

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 177**

51 Int. Cl.:

A61K 31/35 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2007 PCT/US2007/010054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2007 WO07127263**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2007 E 07756026 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2068864**

54 Título: **Usos terapéuticos de las urolitinas**

30 Prioridad:

26.04.2006 US 745717 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2017

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**SEERAM, NAVINDRA P. y
HEBER, DAVID**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 646 177 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Usos terapéuticos de las urolitinas

Introducción

5 Los elagitaninos (ET) son polifenoles poliméricos abundantes en algunos frutos y frutos secos tales como granadas, frambuesas, fresas, moras, nueces y almendras. A pesar de los numerosos informes de las propiedades biológicas y beneficiosas para la salud humana de los ET, es limitado el conocimiento sobre su biodisponibilidad, farmacocinética, disposición y destino metabólico en los seres humanos.

10 Los frutos de granada (*Punica granatum L.*), se consumen ampliamente frescos y como bebidas tales como zumos (PJ). En métodos de procesamiento de zumos comerciales, los ET que son abundantes en la piel de los frutos, se extraen en grandes cantidades en el zumo. La punicalagina [2,3-hexahidroxidifenol-4,6-galagilglucosa], que se encuentra como isómeros (figura 1) es el ET predominante presente en PJ como resultado de este proceso. Los ET pertenecen a la clase química de los taninos hidrolizables, que liberan ácido elágico (EA) con su hidrólisis. Además, PJ contiene otros polifenoles tales como las antocianinas, que están presentes en los arilos de fruta, confiriendo su color rojo rubí brillante.

15 Las propiedades antioxidantes potentes de los PJ se han atribuido a su alto contenido de isómeros de punicalaginas que pueden alcanzar niveles > 2 g/l de zumo. Los ET también se han identificado como los compuestos activos antiaterogénicos en PJ. Se ha sugerido que los ET de granada y los extractos frutales de granada inhiben la proliferación de células cancerosas humanas y modulan rutas de señalización subcelulares inflamatorias y la apoptosis, véanse, por ejemplo Seeram *et al.* (2005) J Nutr Biochem. 2005;16:360-7; Adams *et al.* (2006) J Agric Food Chem. 2006, 54, 980-85; Afaq *et al.* (2005) Photochem Photobiol. 2005; 81:38-45; Afaq *et al.* (2005) Int J Cancer. 2005;113:423-33. Se ha sugerido que el extracto frutal de granada reduce el crecimiento de tumor de próstata y los niveles de antígeno sérico prostático en ratones desnudos atímicos a los que se les han implantado células prostáticas CWR22Rv1 (Malik *et al.* (2005) Proc Natl Acad Sci. 2005; 102: 14813-8.

25 Cerda *et al.*, J. Agric. Food Chem. 2005, vol. 53, págs. 227-235 se refiere al metabolismo de elagitaninos antioxidantes y quimiopreventivos de fresas, frambuesas, nueces y vinos envejecidos en roble en seres humanos.

Seeram *et al.*, Journal of Nutritional Biochemistry, vol. 16, págs. 260-367 comenta la potenciación *in vitro* de la actividad antiproliferativa, apoptótica y antioxidante de punicalagina, ácido elágico y un extracto de tanino de granada total en combinación con otros polifenoles en zumo de granada.

30 Larrosa *et al.*, J. Agric. Food Chem. 2005, vol. 54, págs. 1611-1620 da a conocer urolitinas y metabolitos derivados del ácido elágico producidos por microflora de colon humano.

Cerda *et al.*, J. Agric. Food Chem. 2005, vol. 53, págs. 5571-5576 se refiere a la identificación de urolitina como metabolito producido por microflora de colon humano a partir de ácido elágico y compuestos relacionados.

Kiss *et al.*, Phytomedicine 13, págs. 284-289, 2006 se refiere a la inducción de actividad endopeptidasa neutra en células PC-3 mediante un extracto acuoso de *Epilobium angustifolium* y oenoteína B.

35 Sakagami *et al.*, Phytomedicine, vol. 7(1), págs. 39-47, 2000 se refiere a la actividad citotóxica de taninos hidrolizables frente a líneas celulares tumorales orales humanas.

40 Aunque se han notificado la absorción, el metabolismo, la distribución y excreción de ET de granada en animales y seres humanos, sus parámetros farmacocinéticos permanecen todavía sin investigar. Está cada vez más claro que se produce una variabilidad entre sujetos considerable en el metabolismo de polifenoles en seres humanos. Como tal, existe la necesidad de establecer parámetros de biodisponibilidad, metabolismo y farmacocinética de los ET de granada en voluntarios humanos, y relacionar los ET y/o metabolitos de los mismos con propiedades beneficiosas específicas, por ejemplo, efectos antioxidantes, antiproliferativos en células cancerosas y proapoptóticos, etc. Esta invención satisface estas y otras necesidades.

Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a metabolitos de polifenoles de granada (por ejemplo, elagitaninos), o derivados de los mismos, polifenoles que encuentran uso en métodos de tratamiento y/o prevención de una enfermedad hiperproliferativa en un sujeto. Los metabolitos de elagitaninos objeto se muestran en el presente documento que tienen un efecto antiproliferativo y/o efecto proapoptótico en células y como tal, encuentran uso en el tratamiento y la prevención de varios estados patológicos, por ejemplo, para inhibir el crecimiento tumoral, disminuir la inflamación asociada con un trastorno linfoproliferativo, inhibir el rechazo de injerto o daño neurológico debido a la reparación tisular, etc.

En una realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende una dosis eficaz de un metabolito de elagitaninos y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La dosis eficaz será habitualmente eficaz para inhibir la proliferación de una célula, incluyendo células de tumor, por ejemplo células de tumor sólido,

tales como carcinomas, por ejemplo carcinomas de páncreas, carcinomas de próstata, y similares. En determinadas realizaciones, los metabolitos de elagitaninos de interés son urolitinas y/o derivados de las mismas.

5 En otra realización de la invención, se proporcionan métodos para la inhibición de la proliferación celular no deseada, comprendiendo el método poner en contacto las células con una dosis eficaz de un metabolito de elagitaninos y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las células de interés incluyen, sin limitación, células de tumor, células de tumor sólido, tales como carcinomas, por ejemplo, carcinomas de páncreas, carcinomas de próstata y similares. En determinadas realizaciones, los metabolitos de elagitaninos de interés son urolitinas y/o derivados de las mismas.

10 En algunas realizaciones de la invención, los pacientes se clasifican como productores de metabolitos y no productores de metabolitos, en los que el tratamiento puede adaptarse al estado del paciente.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Estructuras químicas de los isómeros de punicalagina (1), el elagitanino (ET) principal presente en el zumo de granada, y su producto de hidrólisis, el ácido elágico (EA) (2).

15 Figura 2: Actividad proapoptótica de la urolitina B frente a cuatro líneas celulares de cáncer de próstata humano: A = 22Rv1; B = PC3; C = LNCaP; D = LNCaP-AR. La significación estadística son: * p = 0,05 y * p = 0,01.

Figura 3: Actividad antiproliferativa de urolitinas frente a la línea celular de cáncer de colon humano HCT-116.

Figuras 4A y 4B. Actividad antiproliferativa de urolitinas frente a las líneas celulares pancreáticas humanas ASPC-1 y BXPC-3.

20 Figura 5: Inhibición del crecimiento del xenoinjerto tumoral (LAPC-4) por PE en ratones SCID. La inhibición del crecimiento fue significativa comenzando a las dos semanas después del inicio de la administración de PE (0,8 mg/ratón/dosis) por vía oral ($p < 0,05$), con más del 50 por ciento de inhibición del volumen tumoral a las 6 semanas después de la inyección del tumor. El control de vehículo o PE se administró cuando los tumores se volvieron palpables 2 semanas después de la inyección de 200.000 células de tumor de próstata (LAPC-4).

25 Figuras 6A-6B. (A) Concentraciones de urolitina A (UA) y conjugados de UA: UA metilada, sulfato de UA y glucurónido de UA en plasma (ng/ml) y tejidos (ng/g) de ratones que recibieron UA (0,3 mg/ratón/dosis) por vía oral. Los niveles de metabolitos en el punto de tiempo de 24 h estaban por debajo del límite detectable (3 ng/ml para sangre y 5 ng/g para tejidos) y por tanto no se muestran. Los datos muestran la media \pm D.E. para n = 6 ratones por punto de tiempo. (B) Concentraciones de urolitina A (UA) y conjugados de UA: UA metilada, sulfato de UA y glucurónido de UA en plasma (ng/ml) y tejidos (ng/g) de ratones que recibieron UA (0,3 mg/ratón/dosis) por vía intraperitoneal. Los niveles de metabolitos en el punto de tiempo de 24 h estaban por debajo del límite detectable (3 ng/ml para sangre y 5 ng/g para tejidos) y por tanto no se muestran. Los datos muestran la media \pm D.E. para n = 6 ratones por punto de tiempo.

Descripción de realizaciones específicas

35 La presente invención se refiere a metabolitos de polifenoles de granada (por ejemplo, elagitaninos) que encuentran uso en métodos de tratamiento y/o prevención de una enfermedad neoplásica en un sujeto. Los metabolitos de elagitaninos objeto se muestran en el presente documento que tienen un efecto antiproliferativo y/o efecto proapoptótico, y como tal, encuentran uso en el tratamiento y la prevención de varios estados patológicos hiperproliferativos. Entre las células tumorales que son sensibles al tratamiento con metabolitos de elagitaninos se encuentran los tumores sólidos, por ejemplo carcinomas tales como células de carcinomas de páncreas, células de carcinomas de colon, etc. También es de interés el tratamiento de carcinoma de próstata, incluyendo cánceres de próstata con sensibilidad e insensibilidad a andrógenos. En algunas realizaciones, los pacientes se clasifican como productores de metabolitos y no productores de metabolitos, en los que el tratamiento puede adaptarse al estado del paciente. En determinadas realizaciones, los metabolitos de elagitaninos de interés son urolitinas.

45 Antes de que se describa la presente invención en mayor detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que tales pueden variar. Debe entenderse también que la terminología usada en el presente documento es con el propósito de describir sólo realizaciones particulares, y no tiene la intención de ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención sólo se verá limitado por las reivindicaciones adjuntas.

50 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menor que el contexto dicte claramente otra cosa, entre los límites superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos independientemente en los intervalos más pequeños y también están abarcados dentro la invención, sujetos a que cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o 55 ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también están incluidos en

la invención.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque también puede usarse métodos y materiales cualesquiera similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describen ahora métodos y materiales ilustrativos representativos.

Todas las publicaciones y patentes citadas en esta memoria descriptiva se incorporan al presente documento como referencia como si cada publicación o patente individual se indicase específica e individualmente que se incorpora como referencia y se incorporan en el presente documento como referencia para dar a conocer y describir los métodos y/o materiales en relación con los que se citan las publicaciones. La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a tal publicación en virtud de invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicaciones reales que puede ser necesario confirmar independientemente.

Cabe señalar que, tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un(o)" "una" y "el/la" incluye referentes en plural, a menos que en el contexto dicte otra cosa. Cabe señalar así mismo que las reivindicaciones pueden estar redactadas para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base de antecedentes para el uso de tal terminología exclusiva como "únicamente", "sólo" y similares en relación con la cita de los elementos de reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

Tal como resultará evidente para los expertos en la técnica tras leer esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene características y componentes diferenciados que pueden separarse fácilmente de o combinarse con las características de cualquiera de las otras varias realizaciones sin apartarse del alcance de la presente invención. Cualquier método citado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea posible de manera lógica.

Tal como se usa en el presente documento, compuestos que están "disponibles comercialmente" pueden obtenerse de fuentes comerciales convencionales tales como Acros Organics (Pittsburgh, PA), Aldrich Chemical (Milwaukee, WI, que incluye Sigma Chemical y Fluka), Apin Chemicals Ltd. (Milton Park, R.U.), Avocado Research (Lancashire, R.U.), BDH Inc. (Toronto, Canadá), Bionet (Cornwall, R.U.), Chemservice Inc. (West Chester, PA), Crescent Chemical Co. (Hauppauge, NY), Eastman Organic Chemicals, Eastman Kodak Company (Rochester, NY), Fisher Scientific Co. (Pittsburgh, PA), Fisons Chemicals (Leicestershire, R.U.), Frontier Scientific (Logan, UT), ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA), Key Organics (Cornwall, R.U.), Lancaster Synthesis (Windham, NH), Maybridge Chemical Co. Ltd. (Cornwall, R.U.), Parish Chemical Co. (Orem, UT), Pfaltz & Bauer, Inc. (Waterbury, CN), Polyorganix (Houston, TX), Pierce Chemical Co. (Rockford, IL), Riedel de Haen AG (Hannover, Alemania), Spectrum Quality Product, Inc. (New Brunswick, NJ), TCI America (Portland, OR), Trans World Chemicals, Inc. (Rockville, MD), Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond, VA); Molecular Probes (Eugene, OR); Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA); y Glen Research (Sterling, VA).

Tal como se usa en el presente documento, las "condiciones adecuadas" para llevar a cabo una etapa de síntesis se proporcionan explícitamente en el presente documento o pueden discernirse mediante referencia a publicaciones dirigidas a los métodos usados en química orgánica de síntesis. Los tratados y libros de referencia expuestos previamente que detallan la síntesis de reactantes útiles en la preparación de compuestos de la presente invención, también proporcionarán condiciones adecuadas para llevar a cabo una etapa de síntesis según la presente invención

Tal como se usa en el presente documento, pueden identificarse "métodos conocidos por uno de los expertos habituales en la técnica" a través de diversas bases de datos y libros de referencia. Los tratados y libros de referencia adecuados que detallan la síntesis de reactantes útiles en la preparación de compuestos de la presente invención, o proporcionan referencias a artículos que describen la preparación, incluyen por ejemplo "Synthetic Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; S. R. Sandler *et al.*, "Organic Functional Group Preparations", 2ª ed., Academic Press, Nueva York, 1983; H. O. House, "Modern Synthetic Reactions", 2ª ed., W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Calif. 1972; T. L. Gilchrist, "Heterocyclic Chemistry", 2ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1992; J. March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure", 4ª ed., Wiley-Interscience, Nueva York, 1992. También pueden identificarse reactantes análogos y específicos a través de índices de productos químicos conocidos preparados por Chemical Abstract Service de la American Chemical Society, que están disponibles en la mayoría de bibliotecas públicas y universitarias, así como a través de bases de datos en línea (puede ponerse en contacto con la American Chemical Society, Washington, D.C., para más detalles). Los productos químicos que se conocen pero no están disponibles comercialmente en catálogos pueden prepararse por empresas de síntesis química personalizadas, en las que muchas de las empresas de suministro de productos químicos convencionales (por ejemplo, los enumerados anteriormente) proporcionan servicios de síntesis personalizados.

“Compuesto estable” y “estructura estable” pretenden indicar un compuesto que es suficientemente robusto como para sobrevivir al aislamiento hasta un grado de pureza útil a partir de una mezcla de reacción, y la formulación para dar un agente terapéutico eficaz.

- 5 “Opcional” u “opcionalmente” significa que el evento de circunstancias descrito posteriormente puede producirse o no, y que la descripción incluye casos en los que se producen dichos eventos o circunstancias y casos en los que no. Por ejemplo, “arilo sustituido opcionalmente” significa que el radical arilo puede estar sustituido o no y que la descripción incluye tanto radicales arilo sustituidos como radicales arilo no sustituidos. El término alquilo inferior se usa en el presente documento tal como se conoce en la técnica para referirse a un alquilo, lineal, ramificado o cíclico, de desde aproximadamente 1 hasta 6 carbonos.
- 10 “Portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye sin limitación cualquier adyuvante, portador, excipiente, agente deslizante, edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador del sabor, surfactante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizante, agente isotónico, disolvente o emulsionante que haya sido aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos como que es aceptable para su uso en seres humanos o animales domésticos.
- 15 “Sal farmacéuticamente aceptable” incluye sales de adición tanto de ácido como de base. “Sal de adición de ácido aceptable farmacéuticamente” se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia y propiedades biológicas de las bases libres, que no son indeseables biológicamente o de otro modo que se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, y similares.

- 25 “Sal de adición de base farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia y propiedades biológicas de los ácidos libres, que no son indeseables biológicamente o de otro modo. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero no están limitadas a las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas que se producen de manera natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitclohexilamina, colina y cafeína.

- Los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden contener uno o más centros asimétricos y, por tanto, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en cuanto a su estereoquímica absoluta, como (*R*) o (*S*) o, como (*D*) o (*L*) para aminoácidos. La presente invención pretende incluir todos de tales isómeros posibles, así como, sus formas racémicas y ópticamente puras. Los isómeros ópticamente activos (+) y (-), (*R*) y (*S*), o (*D*) y (*L*) pueden prepararse usando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse usando técnicas convencionales, tales como HPLC de fase inversa. Cuando los compuestos descritos en el presente documento contienen dobles enlaces olefínicos u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique de otro modo, se pretende que los compuestos incluyan ambos isómeros geométricos *E* y *Z*. Igualmente, también se pretende que estén incluidas todas las formas tautoméricas.

45 USOS TERAPÉUTICOS DE LOS METABOLITOS DE ELAGITANINO

- Trastornos hiperproliferativos*: se refiere a proliferación celular en exceso, con relación a los que se produce con el mismo tipo de células en la población general y/o el mismo tipo de célula obtenida de un paciente en un tiempo previo. El término indica poblaciones de células malignas así como no malignas. Tales trastornos tienen una proliferación celular en exceso de uno o más subconjuntos de células, que a menudo parecen diferenciarse del tejido circundante tanto morfológica como genotípicamente. La proliferación celular en exceso puede determinarse mediante referencia a la población general y/o mediante referencia a un paciente en particular, por ejemplo en un punto previo en la vida del paciente. Los trastornos celulares hiperproliferativos pueden producirse en diferentes tipos de animales y en seres humanos, y producen diferentes manifestaciones físicas dependiendo de las células afectadas.

- 55 Los trastornos celulares hiperproliferativos incluyen cánceres; trastornos proliferativos en vasos sanguíneos tales como reestenosis, aterosclerosis, estenosis en endoprótesis, reestenosis de injerto vascular, etc.; trastornos fibróticos; psoriasis; trastornos inflamatorios, por ejemplo artritis, etc.; nefritis glomerular; endometriosis; trastornos degenerativos maculares; trastornos de crecimientos benignos tales como hiperplasia de próstata y lipomas; y trastornos autoinmunitarios. Los cánceres son de particular interés, incluyendo leucemias, linfomas (de Hodgkin y no

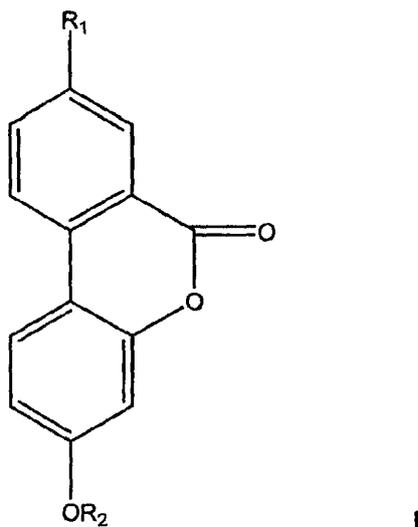
Hodgkin), y otros trastornos mieloproliferativos; sarcomas, melanomas, adenomas, carcinomas de tejido sólido, por ejemplo cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de próstata, etc., tumores hipóxicos, carcinomas de células escamosas de boca, garganta, laringe y pulmón, cánceres genitourinarios tales como cáncer de cuello uterino y de vejiga, un cáncer hematopoyéticos, cánceres de cabeza y cuello y cánceres del sistema nervioso, lesiones benignas tales como papilomas, y similares.

El cáncer de próstata es actualmente el cáncer diagnosticado más frecuentemente en los hombres. El cáncer de próstata es latente; muchos hombres portan células de cáncer de próstata sin signos manifiestos de enfermedad. Está asociado a una alta morbilidad. La metástasis de cáncer en hueso (estadio tardío) es frecuente y casi siempre mortal. Los tratamientos actuales incluyen prostatectomía radical, radioterapia, ablación hormonal y quimioterapia. Desgraciadamente, en aproximadamente el 80% de casos, el diagnóstico de cáncer de próstata se establece cuando la enfermedad ya ha metastatizado en los huesos, limitando por tanto la eficacia de tratamientos quirúrgicos. La terapia hormonal frecuentemente fracasa con el tiempo con el desarrollo de células de tumor resistentes a hormonas. Aunque se han empleado agentes quimioterápicos en el tratamiento de cáncer de próstata, ningún agente ha demostrado superioridad con respecto a sus homólogos, y ninguna combinación de fármacos parece ser particularmente eficaz. La naturaleza generalmente de crecimiento lento y resistente a los fármacos de la mayoría de los cánceres de próstata los hace particularmente resistentes a la quimioterapia convencional.

Tal como se demuestra a continuación en la sección experimental, determinados tipos de metabolitos de elagitaninos (ET) tienen actividades antiproliferativas y/o actividades proapoptóticas sobre células cancerosas. Los ejemplos de tales metabolitos incluyen las urolitinas A y B y derivados de las mismas. Como tales, estos metabolitos o derivados de los mismos encuentran uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neoplásicas en sujetos.

Aunque estos metabolitos se derivan de ET que se encuentran presentes en determinados alimentos (por ejemplo, granadas), el consumo de estos alimentos no siempre conduce a una biodisponibilidad suficiente de estos metabolitos de ET terapéuticos. Específicamente, determinados sujetos, denominados en el presente documento no productores, no producen cantidades detectables de estos metabolitos de ET después del consumo de alimentos que contienen ET (por ejemplo, zumo de granada). Por tanto, en determinadas realizaciones, se administra(n) directamente un(os) metabolito(s) de ET a un sujeto que tiene una enfermedad neoplásica. En determinadas otras realizaciones, se administra(n) directamente un(os) metabolito(s) de ET a un sujeto para prevenir la aparición o recurrencia de una enfermedad neoplásica. En determinadas realizaciones, la enfermedad neoplásica es un cáncer, incluyendo cáncer de próstata. En algunas de estas realizaciones, el cáncer de próstata es dependiente o independiente de andrógenos.

En determinadas realizaciones, el metabolito de ET o derivado del mismo, es un metabolito de ácido elágico (EA) seleccionado del grupo que consiste en urolitina B, urolitina A, metil-urolitina A, hidroxurolitina A y derivados de las mismas. También se incluyen en los métodos de la invención derivados de urolitinas, incluyendo ésteres farmacéuticamente aceptables, etc., y derivados que tienen la estructura:



en la que R_1 es H, OH, OR₃ en el que R_3 es un alquilo inferior C₁ a C₁₀, NH₂, NHR₃, SH, SCH₃, F, OCN, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃ en el que n es de desde aproximadamente 1 hasta 10; alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; SOCH₃, SO₂, CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; y

R_2 es H o alquilo inferior C₁ a C₁₀.

Los metabolitos de ET o derivados de los mismos pueden administrarse a un sujeto (por ejemplo, mamífero) en una variedad de vías. Por ejemplo, el/los metabolito(s) ET pueden administrarse por vía oral, por vía rectal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intracerebroespinal, por vía subcutánea, por vía intraarticular, por vía intrasinovial, por vía intratecal, de manera tópica o mediante inhalación. Como tal, la forma de la dosis del metabolito de ET puede estar en una variedad de formas, incluyendo microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, emplastos, formas de inhalación, pulverizaciones nasales, comprimidos sublinguales y preparaciones de liberación sostenida.

Los compuestos de esta invención pueden incorporarse en una variedad de formulaciones para la administración terapéutica. Más particularmente, los compuestos de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas mediante combinación con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados, y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, disoluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Como tal, la administración de los compuestos puede lograrse por varias vías, incluyendo administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratraqueal, etc. El agente activo puede ser sistémico tras la administración o puede localizarse mediante el uso de administración regional, administración intramural o el uso de un implante que actúa para retener la dosis activa en el sitio de implantación.

En formas de dosificación farmacéutica, los compuestos pueden administrarse en forma de su sal farmacéuticamente aceptable. También pueden usarse en asociación apropiada con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son meramente a modo de ejemplo y no son limitativos en modo alguno.

Para preparaciones orales, los compuestos pueden usarse solos o en combinación con aditivos apropiados para producir comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes y agentes saborizantes.

Los compuestos pueden formularse en preparaciones para inyección disolviéndolos, suspendiéndolos o emulsionándolos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales, tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

Los compuestos pueden usarse en formulación de aerosol para administrarse mediante inhalación. Los compuestos de la presente invención pueden formularse en propelentes presurizados aceptables tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. Además, los compuestos pueden prepararse en supositorios mezclándolos con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía rectal mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, Carbowax y polietilenglicoles, que se funden a la temperatura corporal aunque se solidifican a temperatura ambiente.

Pueden proporcionarse formas de dosificación unitaria para administración oral o rectal tales como jarabes, elixires y suspensiones en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más compuestos de la presente invención. De forma similar, las formas de dosificación unitaria para inyección o administración intravenosa pueden comprender el compuesto de la presente invención en una composición como disolución en agua estéril, agua, solución salina normal u otro portador farmacéuticamente aceptable.

Los implantes para formulaciones de liberación sostenida se conocen bien en la técnica. Los implantes se formulan como microesferas; férulas, etc. con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros del ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que el huésped tolera bien. El implante que contiene los compuestos inhibidores pueden ponerse en las proximidades del sitio de un tumor, de modo que la concentración local del agente activo esté aumentada con respecto al resto del cuerpo.

El término "formas de dosificación unitaria", tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o vehículo aceptable farmacéuticamente. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria novedosas de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y del efecto que ha de conseguirse, y la farmacodinamia asociada con cada compuesto en el huésped.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, están fácilmente disponibles para el público. Además, están fácilmente disponibles para el público sustancias auxiliares

farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y agentes tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizantes, agente humectantes y similares.

5 El uso combinado de los compuestos proporcionados de la presente invención y otros agentes citotóxicos tiene las ventajas de que las dosificaciones requeridas para los fármacos individuales son menores, y el efecto de los
 10 diferentes fármacos es complementario. Dependiendo del paciente y estado que se traten y de la vía de administración, los compuestos objeto pueden administrarse en dosificaciones de al menos aproximadamente o alrededor de aproximadamente 0,1 pg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente o alrededor de aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal, al menos aproximadamente o alrededor de aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente o alrededor de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente o alrededor de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, al día o incluso valores mayores, y habitualmente de no más de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día. El intervalo es amplio, ya que en general la eficacia de un efecto terapéutico para diferentes mamíferos varía ampliamente, siendo las dosis normalmente 10, 30 o incluso 40 veces menores (por peso corporal unitario) en hombre que en rata. De forma similar el modo de administración puede tener un gran efecto sobre la dosificación. Por tanto y por ejemplo, las
 15 dosificaciones orales en la rata pueden ser diez veces la dosis de inyección. Pueden usarse dosis menores para vías de administración localizadas.

Una dosificación típica puede ser una disolución adecuada para administración intravenosa; un comprimido tomado de dos a seis veces al día, o una cápsula o un comprimido de liberación programada tomado una vez al día y que contiene un contenido proporcionalmente mayor de principio activo, etc. El efecto de liberación programada puede
 20 obtenerse mediante materiales de cápsula que se disuelven a diferentes valores de pH, mediante cápsulas que liberan lentamente por presión osmótica, o mediante algún otro medio conocido de liberación controlada.

Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la intensidad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Algunos de los compuestos específicos son más potentes que otros. Las dosificaciones preferidas para un compuesto dado pueden
 25 determinarlas fácilmente los expertos de la técnica mediante una variedad de medios. Un medio preferido es medir la potencia fisiológica de un compuesto dado.

Para su uso en métodos objeto, los compuestos objeto pueden formularse con otros agentes farmacéuticamente activos, particularmente otros agentes antimetastásicos, antitumorales o antiangiogénicos. Los compuestos
 30 angiostáticos de interés incluyen angiostatina, endostatina, péptidos carboxilo terminales de colágeno alfa (XV), etc. Los agentes citotóxicos y citoestáticos de interés incluyen adriamicina, Alkeran, Ara-C, BICNU, busulfano, CNNU, cisplatino, citoxano, daunorubicina, DTIC, 5-FU, Hydrea, ifosfamida, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza nitrogenada, Velban, vincristina, vinblastina, VP-16, carboplatino, fludarabina, gemcitabina, idarubicina, irinotecán, leustatina, navelbina, taxol, taxotere, topotecán, etc.

Los compuestos de urolitina son útiles para usos profilácticos o terapéuticos. Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" se usa para referirse tanto a la prevención de la enfermedad, como el tratamiento de
 35 estados preexistentes. La prevención de la proliferación se consigue mediante la administración de los compuestos objeto antes del desarrollo de la enfermedad, por ejemplo, para prevenir el nuevo crecimiento de tumores, prevenir el crecimiento metastásico, disminuir la reestenosis asociada con cirugía cardiovascular, etc. Alternativamente, los compuestos se usan para tratar enfermedades en curso, estabilizando o mejorando los síntomas clínicos del
 40 paciente.

El huésped o paciente, puede ser de cualquier especie de mamífero, por ejemplo, primates, particularmente seres humanos; roedores, incluyendo ratones, ratas y hámsteres; conejos; animales equinos, bovinos, caninos, felinos; etc. Los modelos de animales son de interés para investigaciones experimentales, proporcionando un modelo para el tratamiento de la enfermedad humana.

45 La susceptibilidad de una célula particular al tratamiento con el compuesto objeto puede determinarse mediante pruebas *in vitro*. Normalmente, se combina un cultivo de la célula con un compuesto objeto a concentraciones variables durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los agentes activos induzcan muerte celular o inhiban la migración, habitualmente entre aproximadamente una hora y una semana. Para pruebas *in vitro*, pueden usarse células cultivadas de una muestra de biopsia. Se cuentan las células viables que quedan después del
 50 tratamiento.

La dosis variará dependiendo del compuesto específico usado, trastorno específico, estado del paciente, etc. Normalmente, una dosis terapéutica será suficiente para disminuir sustancialmente la población de células no deseadas en el tejido seleccionado como diana, mientras se mantiene la viabilidad del paciente. El tratamiento generalmente se continuará hasta que haya una reducción sustancial, por ejemplo, una disminución de al menos
 55 aproximadamente el 50% de la carga celular, y puede continuarse hasta que no se detecten esencialmente células no deseadas en el cuerpo. La reducción es preferiblemente de al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, y de manera ideal el 100%.

Tal como se usa en el presente documento, "prevención" de un estado (por ejemplo, una enfermedad neoplásica) significa que la aparición del estado y/o sus síntomas se reducen o eliminan. La reducción es preferiblemente de al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, y de manera ideal el 100%.

Los siguientes ejemplos se exponen a continuación de modo que proporcione a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo preparar y usar la presente invención, y no se pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni se pretende representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunas desviaciones y errores experimentales. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados centígrados y la presión es o está cerca de la atmosférica.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes citadas en esta memoria descriptiva se incorporan al presente documento como referencia como si se indicase específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpore como referencia.

La presente invención se ha descrito en cuanto a realizaciones particulares encontradas o propuestas por el presente inventor para comprender modos preferidos para la práctica de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que, a la luz de la presente divulgación, pueden realizarse numerosas modificaciones y cambios en las realizaciones particulares ejemplificadas sin apartarse del alcance pretendido de la invención. Se pretende que todas de tales modificaciones estén incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Parte experimental

EJEMPLO 1

SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos e instrumentos. Todos los disolventes son de calidad para HPLC y se adquirieron de Fisher Scientific Co. (Tustin, CA). Se adquirieron los ácidos eláxico, gálico, fórmico, fosfórico, 2-bromo-benzoico, 2-bromo-5-metoxibenzoico y acético, resorcinol, dihidrogenofosfato de potasio, ABTS (sal de diamonio del ácido 2,20-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), dióxido de manganeso, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), cloruro de magnesio, Tris HCl, acetato de sodio, ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA), desoxiguanosina (dG), β -D-glucuronidasa (tipo X-A de *Escherichia coli*) y arilsulfatasa (tipo VIII de vísceras de abulón) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV) se llevaron a cabo en un sistema Waters Alliance 2690 equipado con un detector de red de fotodiodos de (PDA) (Waters Corp., Milford, MA) y se realizó la manipulación de datos con el software Waters Millennium v 3.02. El sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ECD) consistía en una bomba cuaternaria Agilent Technologies 1100, automuestreador con regulación de temperatura controlado mediante el software Chemstation 9.01 (Agilent Technology, Wilmington, DE), un detector electroquímico COULARRAY ESA 5600A (ESA, Bedford, MA). El sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución con espectroscopía de masas (HPLC-EM) consistía en un sistema LCQ Classic Finnigan (ThermoFinnigan, San Jose, CA), equipado con un sistema de HPLC de la serie HP 1100 que consistía en un automuestreador/inyector, bomba cuaternaria, calentador de columna y detector de red de diodos (DAD) con el software Xcalibur 1.2 (Finnigan Corp.).

Análisis mediante HPLC-EM/EM. Las condiciones para la detección de los metabolitos de ET es tal como sigue: Columna, Symmetry C-18, 100 mm x 2,1 de d.i., 3,5 μ m, (Waters Corp., Milford, MA); Disolvente A) HCOOH al 2%/H₂O, B) HCOOH al 2%/MeOH; gradiente % de A: inicial: 99%, 30 min: 80%, 45 min: 60%, 60 min: 5%; tiempo de operación 60 min; velocidad de flujo 0,15 ml/min; volumen de inyección 20 μ l; Parámetros de EM: modo de ionización, ionización por electropulverización (ESI) tanto en modo positivo como negativo (véase la figura 3); intervalo de barrido: 120-1500 uma; velocidad de barrido: 1 barrido/s; voltaje del cono: 17 eV. Se obtuvieron las identidades de pico haciendo corresponder sus iones moleculares (M-H⁺) o (M+H⁺) obtenidos mediante ESI/EM y EM/EM con los pesos moleculares teóricos esperados de los datos de la bibliografía (4,5,13,15,18).

Materiales de cultivo celular. Se obtuvieron las líneas celulares de cáncer de próstata 22Rv1, DU145, LNCaP y PC3 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD). Las líneas celulares LNCaP-AR y Hi-Myc fueron una amable donación del Dr. C. Sawyers (David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Angeles, CA). Las células DU145, 22Rv1, LNCaP, LNCaP-AR y PC3 se hicieron crecer en RPMI 1640; las células Hi-Myc se hicieron crecer en medio de Dulbecco modificado por Isecove. Todos los medios contenían suero fetal bovino (FBS) al 10% en presencia de penicilina 100 U/ml y estreptomycin 0,1 g/l. Las células de próstata RWPE-1 se hicieron crecer en medio libre de suero de queratinocito definido (DKSFM) que contenía factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Se incubaron las células a 37°C con el 95% de aire y el 5% de

CO₂. Todas las células se mantuvieron por debajo del pase 20 y se usaron en experimentos durante la fase lineal de crecimiento.

Síntesis de urolitina B y metilurolitina A. Se sintetizaron los derivados de urolitina (dibenzo[b,d]piran-6-ona) según el método publicado (21). En resumen, se suspendieron ácido 2-bromobenzoico (5 g) y resorcinol (5 g) en una disolución acuosa de NaOH (2 g/25 ml de agua), y se mantuvo a reflujo durante 30 minutos. Después de añadir de una disolución acuosa de CuSO₄ al 5% (15 ml), se puso la mezcla a reflujo durante unos 10 min adicionales. Con enfriamiento, la urolitina B (3-hidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona) precipitó como un polvo blanco pálido y se recristalizó en una disolución de MeOH-ácido acético glacial (10:1) como agujas. De forma similar, se sintetizó 8-metoxi-urolitina A (3-hidroxi-8-metoxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona), a partir de ácido 2-bromo-5-metoxibenzoico (1 g), resorcinol (1 g) y una disolución acuosa de NaOH al 8% (2 g/25 ml de agua; 10 ml). La 8-metilurolitina A precipitó como un polvo de color amarillo pálido desde la disolución y se recristalizó en una disolución de MeOH-ácido acético glacial (10:1) como agujas. Los datos de CL-EM/EM de los derivados de la urolitina corresponden a los informes publicados (5, 13-15).

Ensayo celular antiproliferativo. Se midió la proliferación usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Boletín técnico n.º 288, Promega Corp., Madison, WI). Cuando se añadió a las células, el reactivo de ensayo produce luminiscencia en presencia de ATP procedente de células viables. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo e se incubaron durante 24 horas. Se solubilizaron las muestras de ensayo en DMSO mediante sonicación, se esterilizaron por filtración y se diluyeron con medios hasta la concentración de tratamiento deseada. Se trataron las células con 100 µl de medios de control, control de vehículo (DMSO < 0,2% del total) o muestras de análisis e se incubaron durante un periodo de exposición al fármaco de 48 horas a concentraciones de 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 µg/ml. Al final de las 48 h, se equilibraron las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos; se añadieron 100 µl del reactivo de ensayo a cada pocillo y se indujo la lisis celular en un agitador orbital durante 2 min. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 10 min para estabilizar la señal de luminiscencia y se leyeron los resultados en un luminómetro de microplacas Orion (Bertholds Detection Systems, Pforzheim, Alemania). Todas las placas tenían pocillos de control que contenían medio sin células para obtener un valor para la luminiscencia de fondo. Se expresan los datos como porcentaje de células sin tratar (es decir, valor de tratamiento-blanco/ valor de vehículo-blanco), media ± D.E. para tres réplicas.

Evaluación de la apoptosis. Se evaluó la apoptosis usando el ensayo de detección de muerte celular ELISAPLUS (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Este ensayo es un inmunoensayo fotométrico ligado a enzimas que mide cuantitativamente la degradación internucleosómica de ADN, que se produce durante la apoptosis. Específicamente, el ensayo detecta mono y oligonucleosomas asociados a histonas que son indicadores de apoptosis. Se sembraron las células (22RV1, PC-3, LNCaP, LNCaP-AR) en placas de 60 mm a una densidad de 100.000 células/placa y se permitió que se fijasen durante 24 horas. Se trataron las células con control de vehículo (DMSO al 100%; concentración final del 0,3%) o urolitina B (0-50 µg/ml o 0-236 µM) durante 48 horas. Tras los tratamientos, se recogieron las células no adherentes y se sedimentaron a 200 x g durante diez minutos. Se desechó el sobrenadante; se lavó el sedimento celular con CMF-PBS frío y se volvió a centrifugar. Se lavaron las células adherentes con solución salina tamponada con fosfato libre de calcio y magnesio fría (CMF-PBS, cloruro de sodio 137 mmol/l, fosfato de potasio 1,5 mmol/l, fosfato de sodio 7,2 mmol/l, cloruro de potasio 2,7 mmol/l, pH 7,4), se tripsinizaron, se recogieron y se combinaron con las células no adherentes en un total de 1 ml de DMEM. Entonces se contaron tanto las células vivas como las muertas por exclusión de azul tripano (Pierce, Rockford, IL) y se añadieron números iguales de células a la placa de microtitulación para todos los grupos de tratamiento y se realizó el ensayo de apoptosis de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se expresan los datos como absorbancia a 405 nm de cada muestra con respecto a los controles de vehículo tal como sigue = valor de tratamiento-blanco/valor de vehículo-blanco.

45 RESULTADOS

Actividad antiproliferativa. Se evaluaron el EA y los metabolitos de EA (ácidos gálico y galágico, urolitina B y urolitina A metilada) para determinar la actividad antiproliferativa frente a un panel de líneas celulares de cáncer de próstata humano (22Rv1, PC3, DU145, LNCaP, LNCaP-AR) y una línea celular de cáncer de próstata de ratón (Hi-Myc). Los valores de Cl₅₀ se muestran en la tabla 1. Las líneas celulares mostraron diferentes niveles de sensibilidad frente a metabolitos específicos tal como sigue. La urolitina B era la más eficaz frente a células LNCaP-AR con una Cl₅₀ de 28,5 µM mientras que el derivado metilado de la urolitina A mostró el mayor efecto frente a esta misma línea celular pero a una concentración mucho mayor con una Cl₅₀ de 150,7 µM. El EA era el más eficaz frente a las células Hi-Myc con una Cl₅₀ de 1,7 µM, el ácido gálico frente a 22RV1 con una Cl₅₀ de 18,6 µM y el ácido galágico frente a LNCaP con una Cl₅₀ de 71,4 µM.

55 Tabla 1. Valores de Cl₅₀ (µM) de EA y metabolitos de EA frente a líneas celulares de cáncer de próstata

	Urolitina B	8-Metil-urolitina A	Ácido elágico	Ácido gálico	Ácido galágico
22RV1	117,6	127,0	41,7	18,5	166,1
DU145	59,4	466,5	96,0	29,4	197,7
HiMyc	59,9	586,2	1,7	73,5	82,7

LNCaP	90,5	206,4	20,5	32,3	71,4
LNCaP-AR	28,5	150,7	82,6	29,2	82,4
PC3	127,2	526,4	83,6	110,9	83,6

Actividad proapoptótica. Se examinó la urolitina B para determinar su capacidad para inducir la apoptosis de las líneas celulares 22Rv1, PC3, LNCaP y LNCaP-AR a concentraciones que oscilan entre 0 y 236 μM (entre 0 y 50 $\mu\text{g/ml}$) tal como se muestra en las figuras 5A-D. La urolitina B mostró efectos proapoptóticos estadísticamente significativos frente a diferentes líneas celulares tal como sigue: 59 μM frente a 22Rv1 ($p = 0,05$), 29,5 μM frente a PC3 ($p = 0,05$), 118 μM frente a LNCaP ($p = 0,01$) y 59 μM frente a LNCaP-AR ($p = 0,01$).

DISCUSIÓN

Las propiedades biológicas atribuidas a las granadas y PJ se han relacionado con sus constituyentes fenólicos y, en particular, con sus ET principales, punicalagina (3,6-9). Se ha investigado previamente la actividad antiproliferativa de varios ácidos fenólicos producidos por la acción de bacterias colónicas en flavonoides del té, soja y cítricos y se halló que la actividad era específica de un metabolito particular (32). En el presente estudio, se han evaluado varios posibles y supuestos metabolitos de ET de granada incluyendo los ácidos elágico, ácido gálico y galálico, la urolitina B y urolitina A metilada para determinar la actividad antiproliferativa frente a un panel de líneas celulares de cáncer de próstata humano (22Rv1, PC3, DU145, LNCaP, LNCaP-AR) y una línea celular de cáncer de próstata de ratón (Hi-Myc) (tabla 1). Aunque no ha sido informado sobre el ácido gálico a partir de los estudios de biodisponibilidad con polifenoles de granada, puede estar presente en estado libre en las granadas y/o liberarse a partir de la hidrólisis de los galotaninos, que se sabe que están presentes en las granadas. El ácido gálico tiene una de las mayores biodisponibilidades entre los compuestos fenólicos de los alimentos (38). Debido a la no disponibilidad de un patrón puro de urolitina A, no se monitorizó en los ensayos contra el cáncer.

Las características de las líneas celulares se describen a continuación. 22Rv1 es una línea celular epitelial de carcinoma de próstata humano con una débil respuesta a andrógenos, expresión de antígeno sérico prostático (PSA) y receptor de andrógenos (AR). DU145 es un carcinoma de próstata metastásico humano aislado de tejido cerebral, no responde a andrógenos, no expresa PSA ni AR. PC3 es una metástasis en hueso de un paciente con carcinoma de próstata metastásico con débil respuesta a andrógenos, no expresa PSA ni AR. La línea celular LNCaP es un carcinoma de próstata metastásico humano aislado de ganglio linfático. A diferencia de las tres líneas celulares mencionadas anteriormente, las células LNCaP son sensibles a andrógenos y expresan PSA y AR. La línea celular LNCaP-AR es la línea celular LNCaP con el AR sobreexpresado de manera estable. Las cinco líneas celulares son tumorigénicas en ratones desnudos. Hi-Myc es una línea celular murina desarrollada para sobreexpresar el oncogén c-myc.

Los metabolitos de ET de granada inhibieron significativamente la proliferación de células de próstata de manera dependiente de la dosis en las líneas celulares sometidas a prueba ($p \leq 0,01$) y los valores de CI_{50} se muestran en la tabla 1. Estos resultados proporcionan datos en cuanto a la capacidad de estos compuestos para inhibir el crecimiento de diferentes líneas celulares de próstata.

En los ensayos antiproliferativos, la urolitina B mostró ser de dos a diez veces más potente que la urolitina A metilada en todas las líneas celulares sometidas a prueba, dependiendo de la línea celular. Las líneas celulares eran sensibles a la urolitina B en el siguiente orden: LNCaP-AR < DU145 < HiMyc < LNCaP < 22Rv1 < PC3 (tabla 4). El ácido gálico fue hasta nueve veces más eficaz en la inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata que el ácido galálico y hasta tres veces más que el ácido elágico (tabla 1). Las líneas celulares eran sensibles al ácido gálico en el siguiente orden: 22Rv1 < LNCaP-AR < DU145 < LNCaP < Hi-Myc < PC3. Como con los metabolitos, el resultado más interesante es que la línea celular LNCaP-AR, que tiene un receptor de andrógenos (AR) sobreexpresado es más sensible a la inhibición proliferativa que la línea celular parental LNCaP. La sobreexpresión de AR es un rasgo distintivo de la enfermedad independiente de andrógenos, por tanto es posible que los metabolitos de granada desempeñen un papel en la prevención del estadio de la enfermedad independiente de andrógenos.

Mientras que se ha mostrado que los EA y otros ET inducen apoptosis en células cancerosas, no se han notificado los efectos proapoptóticos de las urolitinas. En estos estudios de apoptosis, se examinó la urolitina B a concentraciones que oscilaron entre 0 y 236 μM (de 0 a 50 $\mu\text{g/ml}$) frente a células PC3, 22Rv1, LNCaP y LNCaP-AR (figura 5). Las células PC3, 22Rv1 y LNCaP-AR fueron más sensibles a la urolitina B que las células LNCaP (figura 5). Las concentraciones de urolitina B que indujeron apoptosis frente a estas líneas celulares fueron de 29,5, 59, 59 y 118 μM para las células PC3, 22Rv1, LNCaP-AR y LNCaP, respectivamente. Como con los datos de proliferación, la línea celular LNCaP-AR era más sensible a los efectos de la urolitina B que la línea celular parental LNCaP, lo que sugiere que el consumo de granada puede desempeñar un papel en la progresión del cáncer de próstata.

Se observó una variabilidad interindividual significativa de la producción de urolitina entre los sujetos del estudio, lo que condujo a una posible clasificación en sujetos productores y no productores de metabolitos. Se ha observado una variabilidad interindividual similar para otros polifenoles. Las urolitinas se producen como resultado de transformaciones metabólicas llevadas a cabo por la microflora colónica en EA y compuestos relacionados. Se han

encontrado urolitinas en orina humana recogida 24 h después de la ingestión de PJ y en orina de rata, 4 días después de la ingestión de ET de granada, lo que sugiere que las producen bacterias colónicas. Se detectaron EA y metabolitos de EA (glucurónido de ácido dimetilelágico, glucurónido de urolitina A y glucurónido de urolitina B) en muestras de orina de 24 h de quince de los diecinueve sujetos. La glucuronidación y metilación forman parte del metabolismo hepático de fase II que sirve para aumentar la solubilidad en agua y facilitar la excreción. Los metabolitos que fueron los más prevalentes en los sujetos incluyeron el glucurónido de ácido dimetilelágico y el glucurónido de urolitina B que se encontraron en 13 voluntarios.

Se ha demostrado la potente actividad antiproliferativa frente a células cancerosas para muchos flavonoides, pero sólo se ha sometido a prueba un número limitado de metabolitos colónicos. Se han evaluado previamente las urolitinas para determinar sus actividades antioxidantes y estrogénicas. El presente estudio es el primero que evalúa la actividad antiproliferativa de urolitinas frente a una variedad de líneas celulares de cáncer de próstata humano, 22Rv1, PC3, DU145, LNCaP (tabla 1). EA presentó la actividad antiproliferativa más intensa en todas las líneas celulares (tabla 1) siendo las células independientes de andrógenos (DU145 y PC3) las más resistentes. En los ensayos antiproliferativos, la urolitina B mostró ser de dos a diez veces más potente que la metil-urolitina A en todas las líneas celulares sometidas a prueba.

Tampoco se han estudiado previamente los efectos proapoptóticos de las urolitinas. En el ensayo de apoptosis, las células PC3 y 22Rv1 fueron más sensibles a la urolitina B que las células LNCaP (figuras 4A-C).

En resumen, se han identificado metabolitos de ET que tienen actividad antiproliferativa y proapoptótica con respecto a las células cancerosas. Como tales, estos metabolitos encuentran uso como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Además, estos hallazgos hacen posible examinar composiciones que contienen elagitaninos (por ejemplo, productos alimentarios) para determinar su capacidad para producir estos metabolitos beneficiosos en un individuo.

Ejemplo 2

Efecto de las urolitinas sobre células de cáncer de colon

Actividad antiproliferativa. Se evaluaron EA y los metabolitos EA (ácidos gálico y galágico, urolitina B y urolitina A metilada) para determinar su actividad antiproliferativa frente a la línea celular de cáncer de colon humano HCT-116. Se hicieron crecer las células hasta una concentración de 10.000 células por pocillo en un formato de 96 pocillos; y luego se resuspendieron en un medio que contenía control de vehículo o el compuesto indicado: ácido elágico, urolitina A, metil-urolitina A o urolitina B, a una concentración de 100 µg/ml. Se incubaron las células durante 48 h, y se sometió a ensayo la viabilidad mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Boletín técnico n.º 288, Promega Corp., Madison, WI).

Estos datos, tal como se muestra en la figura 3, demuestran la eficacia de los metabolitos de elagitanino como agentes antiproliferativos. Los datos muestran que la urolitina A es la más activa, luego el ácido elágico, la urolitina B y la metil-urolitina A.

Ejemplo 3

Efecto de las urolitinas sobre células de cáncer de páncreas

Actividad antiproliferativa. Se evaluaron EA y metabolitos de EA (ácidos gálico y galágico, urolitina B y urolitina A metilada) para determinar su actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares de cáncer de páncreas humano ASPC-1 y BXPC-3. Se hicieron crecer las células hasta una concentración de 10.000 células por pocillo; y luego se resuspendieron en un medio que contenía el control de vehículo o el compuesto indicado: ácido elágico, urolitina A, metil-urolitina A o urolitina B, a una concentración de 100 µg/ml. Se incubaron las células durante 48 h, y se sometió a ensayo la viabilidad mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Boletín técnico n.º 288, Promega Corp., Madison, WI).

Estos datos mostrados en la figura 4 demuestran la eficacia de los metabolitos de elagitaninos como agentes antiproliferativos. Los datos muestran que la urolitina A es la más activa, luego el ácido elágico, la urolitina B y la metil-urolitina A.

Bibliografía

13. Cerda B, Espin JC, Parra S, Martinez P, Tomas-Barberan FA. The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. Eur J Nutr. 2004; 43:205-20.

14. Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. Clin Chim Acta 2004;348:63-8.

15. Cerda B, Tomas-Barberan FA, Espin JC. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from

- strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem.* 2005;53: 227-35.
- 5 16. Lee M-J, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CY. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epid Bio Prev* 2002;11:1025-32.
17. Hong YJ, Mitchell A.E. Metabolic profiling of flavonol metabolites in human urine by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Agric Food Chem.* 2004;52:6794-801.
18. Seeram NP, Lee R, Hardy ML, Heber D. Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Sep Purific Tech.* 2005; 41:49-55.
- 10 19. Henning SM, Niu Y, Liu Y, Lee NH, Hara Y, Thames GD, Minutti RR, Carpenter CL, Wang H, Heber D. Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in health individuals. *J Nutr Biochem.* 2005;16: 610-6.
20. Huang X, Powell J, Mooney LA, Li G, Frenkel K. Importance of complete DNA digestion in minimizing variability of 8-oxo-dG analyses. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1341-51.
- 15 21. Ghosal S, Lal J, Singh SK, Kumar Y, Shilajit FS. Chemistry of two bioactive benzopyrone metabolites. Part 4. *J Chem Res.* 1989;350-1.
22. Hamlett A, Ryan L, Wolfinger, R. On the use de PROC MIXED to estimate correlation in the presence of repeated measures. *SAS SUGI 29 Conference Proceedings, 1999; Paper 198.*
- 20 23. Seeram NP, Lee R, Scheuller HS, Heber, D. Identification of fenolics in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chem.* 2006;97:1-11.
24. Daniel EM, Ratnayake S, Kinstle T, Stoner GD. The effects of pH and rat intestinal contents on the liberation of ellagic acid from purified and crude ellagitannins. *J Nat Prod.* 1991;54:946-52.
25. Lei F, Xing D-M, Xiang L, Zhao Y-N, Wang W, Zhang LJ, Du LJ. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *J Chrom B* 2003;796:189-94.
- 25 26. Teel RW, Martin RW. Disposition of the plant phenol ellagic acid in the mouse following oral administration by gavage. *Xenobiotica*, 1998;18:397-405.
27. Doyle B, Griffiths LA. The metabolism of ellagic acid in the rat, *Xenobiotica*, 1980;10, 247-56.
28. Smart RC, Huang M-T, Chang RL, Sayer JM, *et al.* Disposition of the naturally occurring antimutagenic plant phenol, ellagic acid, and its synthetic derivatives, 3-O-decylellagic acid and 3,3-di-O-methylellagic acid in mice. *Carcinogenesis* 1986;7:1663-7.
- 30 29. Espin JC, Seeram NP, Tomás-Barberán FA. Bioavailability of pomegranate polyphenols. In: *Pomegranates: Ancient Roots Modern Medicine.* Eds. Seeram NP, Schulman R, Heber D. CRC press Medicinal & Aromatic Plant Series; 2005, en impresión.
- 30 30. Whitley AC, Stoner GD, Darby MV, Walle T. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid-extensive binding to protein and DNA. *Biochem Pharmacol* 2003;66:907-15.
31. Cerda B, Periago P, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Identification of Urolithin A as a Metabolite Produced by Human Colon Microflora from Ellagic Acid and Related Compounds. *J Agric Food Chem.* 2005;53:5571-76.
32. Gao K, Xu A, Krull C, Venema K, Liu Y, Niu Y, Lu J, Bensoussan L, Seeram NP, Heber D, Henning SM. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus and soy flavanoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J Nutr.* 2006;136:52-7.
- 40 33. Zhu BT, Patel UK, Cai MX, Lee AJ, Conney AH. Rapid conversion of tea catechins to monomethylated products by rat liver cytosolic catechol-O-methyltransferase. *Xenobiotica* 2001;31:879-90
34. Lotito S, Frei B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. *Free Radical Biol Med.* 2004;36:201-11.
- 45 35. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43:89-143.
36. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies. *J Nutr.* 2003;133:3275S-3284S.

37. Gedik CM, Boyle SP, Wood SG, Vaughan NJ, Collins AR. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis*, 2002;23:1441-6.
38. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesey C. Bioavailability and bioefficacy of phytonutrients in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:230S-242S.
- 5 39. Larosa M, Gonzalez-Sarrias A, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA, Espin JC. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities, *J Agric Food Chem*. 2006;54:1611-20.
40. Atkinson C, Frankenfield CL, Lampe JW. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med*. 2005;230:155-70.
- 10 41. Puupponen-Pimia R, Aura AM, Karppinen S, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K. Interactions between plant bioactive food ingredients and intestinal flora-effects on human health. *Biosci Microflora*. 2004;23:67-80.
42. Zoetendal EG, Akkermans ADL, de Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:3854-59.
- 15 43. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 2002;46:535-548.
44. Frankenfeld CL, Atkinson C, Thomas, W K, Gonzalez A, Jokela T, Wähälä K, Schwartz SM, Li, SS, Lampe JW. High concordance of daidzein-metabolizing phenotypes in individuals measured 1 to 3 years apart. *Br J Nutr*. 2005;94:873-6.
- 20 45. Low YL, Tahylyr JI, Grace PB, Dowsett M, Folkard E, Doody D, Dunning AM, Scollen S, Mulligan AA, Welch AA, Luben RN, Khaw KT, Day NE, Wareham NJ, Bingham SA. Polymorphisms in the CYP19 gene may affect the positive correlations between serum and urine phytoestrogen metabolites and plasma androgen concentrations in men. *J Nutr*. 2005;135:2680-6.

Ejemplo 4

- 25 Metabolitos derivados de elagitaninos de granada inhiben el crecimiento de cáncer de próstata y se localizan en la próstata de ratón

Se ha mostrado previamente en un ensayo clínico de fase II que el zumo de granada aumenta el tiempo de duplicación del antígeno prostático específico (PSA) en pacientes con cáncer de próstata (CaP) con un PSA creciente. Usando un extracto de granada (PE) normalizado, se trató de definir adicionalmente el metabolismo y la
30 distribución tisular de los metabolitos de granada, y sus efectos *in vivo* sobre el crecimiento de xenoinjerto CaP humano en un modelo preclínico bien establecido.

Se administraron PE y un metabolito de granada, la urolitina A (UA), a ratones macho y se determinaron los niveles de metabolitos en plasma y tejidos a lo largo de 24 horas. Se administró control de vehículo o PE por vía oral a ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) a los que se les inyectó por vía subcutánea células CaP
35 humanas (LAPC-4). Se estudiaron los efectos *in vitro* de los metabolitos de granada, ácido elágico (EA) y urolitinas en líneas celulares CaP dependientes e independientes de andrógenos.

Los metabolitos de granada se concentraron a mayores niveles en la próstata y en los tejidos intestinales de los ratones en comparación con otros tejidos después de la administración de PE o UA. PE inhibió significativamente el
40 crecimiento de xenoinjerto LAPC-4 en ratones SCID. Los metabolitos de PE, EA y las urolitinas, inhibieron el crecimiento de células CaP dependientes e independientes de andrógenos *in vitro*.

Los efectos anticancerosos de PE en modelos preclínicos de CaP y la localización de metabolitos bioactivos en tejidos de próstata demuestran que PE puede desempeñar un papel en el tratamiento y la quimioprevención de CaP. Estos resultados forman una base sólida para ensayos clínicos en hombres con CaP.

El consumo de zumo de granada por parte de pacientes con cáncer de próstata (CaP) con antígeno prostático específico (PSA) creciente, tras la terapia primaria, aumentó significativamente el tiempo de duplicación de PSA
45 medio de 15 a 54 meses ($p < 0,001$). Los elagitaninos son los polifenoles predominantes que se encuentran en los frutos de granada, y también son los polifenoles más abundantes en algunos frutos de bayas, tales como fresas, frambuesas, moras y uvas moscatel. Algunos estudios publicados han mostrado que los ET y su producto de hidrólisis, el ácido elágico (EA), inhiben el crecimiento de células CaP a través de una detención del ciclo celular y la
50 estimulación de apoptosis. El zumo de granada y los extractos de granada (PE) también han mostrado que inhiben el crecimiento de CaP *in vitro* (ver Seeram *et al.* *J Nutr Biochem*. 16 (2005), pág. 360; Lansky *et al.* *Invest New Drugs* 23 (2005), pág. 11). Asimismo, los PE administrados en dietas para animales han mostrado que inhiben el crecimiento del xenoinjerto CaP en ratones con una inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (ver Albrecht *et al.* *Med Food* 7 (2004), pág. 274; Malik *et al.* *Proc Natl Acad Sci. USA* 102 (2005), pág. 14813).

En voluntarios humanos, los ET del zumo de granada se hidrolizan para dar EA, y luego se convierten adicionalmente por bacterias intestinales para producir derivados de "urolitina A (UA)" biodisponibles (ver Seeram *et al.* J Nutr Biochem.16 (2005), pág. 360; Lansky *et al.* Invest New Drugs 23 (2005), pág. 11; Albrecht *et al.* Med Food 7 (2004), pág. 274; Malik *et al.* Proc Natl Acad Sci. USA 102 (2005), pág. 14813; Seeram *et al.* J Nutr. 136 (2006), pág. 2481; Cerdá *et al.* Eur J Nutr. 43 (2004), pág. 205; Cerdá, *et al.* J Agric Food Chem. 53 (2005), pág. 227; Cerda *et al.* Eur J Clin Nutr. 60 (2006), pág. 245). Las urolitinas aparecen en sangre, orina y heces de voluntarios humanos 12-24 horas después del consumo de una única dosis bebidas o comidas ricas en ET y persisten *in vivo* entre 45 y hasta 48-56 horas después de la ingestión. A pesar de estos avances en la comprensión del metabolismo de ET de granada en roedores y seres humanos, no ha habido ningún estudio que determine la disposición de metabolitos de ET en tejidos de interés incluyendo la próstata, y ningún estudio *in vitro* que evalúe el efecto antiproliferativo de las urolitinas. Por tanto, se planificaron los presentes estudios para analizar la bioactividad y la distribución tisular de PE y UA, los efectos de PE administrado por vía oral sobre el crecimiento de xenoinjerto CaP en ratones SCID y los efectos de derivados de EA y UA sobre líneas celulares CaP dependientes de andrógenos (LNCaP) e independientes dependientes de andrógenos humanas *in vitro*.

15 MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto de granada. El extracto de granada (PE) obtenido de la piel del fruto de granada (*Punica granatum* L., Paramount Farms, Lost Hills, CA) se normalizó al 37% de ET (como punicalaginas) y el 3,5% de EA libre tal como se notifica (Seeram *et al.* Sep Purific Tech. 41 (2005), pág. 49). Se administró PE a los animales en dosis basadas en la cantidad de ET en una sola ración de zumo de granada (240 ml de zumo una única concentración, 80 mg de ET). Se calculó que la dosis equivalente que se le administraría a un ser humano de 70 kg para un ratón de peso corporal de 25 g era de 0,03 mg de ET. Se usó diez veces (10 X) esta dosis en el estudio en animales (0,8 mg de PE por dosis por animal) para mejorar nuestra capacidad para detectar la distribución fitoquímica. Para estudios en que se administraron UA, se calcularon las dosis suponiendo la completa conversión de ET en UA. Esto da como resultado una dosis de 0,3 mg de US sintetizada purificada por animal. Se suspendieron tanto PE como UA en 50 μ l de PBS o disolución acuosa de glucosa al 10% para administración intraperitoneal u oral, respectivamente.

Estudios de disposición tisular. Se alimentaron ratones macho C57/B6 (n = 156 ratones procreadores retirados, 7 meses de edad, 25-30 g) de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) con dietas AIN 93G y agua a voluntad, y se mantuvieron en ayunas 6 horas antes de la dosificación. Se les dosificó a los ratones por vía oral o por vía intraperitoneal o bien PE (0,8 mg/ratón/dosis; n = 72), UA (0,3 mg/ratón/dosis; n = 72) o bien control de vehículo (50 μ l; n = 12 ratones). Se extrajeron muestras de sangre a las 0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 h después de la dosificación y se extirparon tejidos de próstata, hígado, riñón, pulmón, colon, intestino y cerebro y se almacenaron a -80°C. Se homogeneizó el tejido recogido (200 mg) en metanol con ácido acético al 0,1% (1 ml) y se centrifugó a 3000 x g durante 10 min. Se secó el sobrenadante en un sistema SpeedVac y se reconstituyó con 200 μ l de la fase móvil de HPLC para un volumen de inyección final de 20 μ l. Los homogeneizados de tejido de xenoinjerto requirieron hidrólisis ácida antes de la cromatografía tal como se informa (Gu *et al.* J Agric Food Chem. 53 (2005), pág. 6858). Se llevaron a cabo análisis mediante HPLC-UV y HPLC-EM/EM en un sistema Waters Alliance 2690 (Waters Corp., Milford, MA) un sistema LCQ Classic Finnigan (ThermoFinnigan, San Jose, CA), respectivamente, tal como se describió previamente (Seeram *et al.* Clin Chim Acta.348 (2004), pág. 63). Se construyeron curvas de calibración lineal usando un método de patrón interno con adiciones conocidas de EA o UA usando tejidos plasmáticos o hepáticos recogidos de ratones de control tal como se describió previamente. (Seeram *et al.* Clin Chim Acta.348 (2004), pág. 63). Los valores de exactitud variaron entre el 91-108% para las muestras de control de calidad que contenían el patrón de EA o UA.

Estudio de xenoinjerto. Todos los ratones recibieron una dieta de investigación convencional (AIN 93G, Dyets, Bethlehem, PA) a voluntad en el transcurso del experimento. Se implantaron 2 x 10⁶ células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos LAPC-4 (donación de Charles Sawyers) por vía subcutánea en los hombros de 24 ratones SCID de 5 semanas de edad (Granja Taconic, Germantown, NY). Cuando los tumores se volvieron palpables, se les administró a los ratones por vía oral 5 días a la semana (de lunes a viernes) o bien PE (n = 12 ratones) o bien control de vehículo (n = 12 ratones). La dosificación oral se consiguió sujetando suavemente al ratón con una mano y suministrando el PE o control de vehículo mediante una jeringa de alimentación para animales (Biomedical Needles, Popper y Sons Inc., New Hyde Park, NY) unida a una jeringa para tuberculina de 1 ml. Se midieron los tumores dos veces a la semana y se pesaron los ratones semanalmente. Se calcularon los volúmenes tumorales usando la fórmula: longitud x anchura x altura x 0,5236 (Gleave *et al.* Cancer Res. 51 (1991); pág. 3753). En el sacrificio, se extirparon los tumores primarios y se extrajo sangre Todos los protocolos para animales fueron aprobados por la Universidad de California, Los Angeles Chancellor's Animal Care Committee.

Estudios de proliferación in vitro. Se mantuvieron células DU145 y LNCaP (ATCC, Rockville, MD), células 22Rv1 (donación de Pinchas Cohen) y células LNCaP-AR (donación de Charles Sawyers) por debajo del pase 20 y se usaron en experimentos durante la fase lineal de crecimiento tal como se describió previamente (Seeram *et al.* J Nutr Biochem.16 (2005), pág. 360). Se adquirió EA de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se sintetizaron UA (3,8-dihidroxi-6H-benzo[b,d]cromen-6-ona), UA metilada y UA dimetilada en este laboratorio tal como se describió previamente (Ghosal *et al.* J Chem Res Synop.11 (1989), pág. 350). Se disolvieron los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) luego se añadieron a medios para conseguir la concentración de prueba deseada final con

una concentración en DMSO final que no superase el 0,1%. Se determinó la proliferación mediante la captación de timidina tritiada tal como se describió previamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5 *Análisis estadístico.* Para los ensayos de proliferación celular, se expresan los datos como porcentaje de células sin tratar (es decir, valor de tratamiento-blanco/valor de vehículo-blanco), media \pm D.E. para al menos tres experimentos independientes. Se analizaron los datos o bien mediante la prueba de la t de Student o bien mediante ANOVA de un factor seguido por la prueba de rangos múltiples de Dunnett ($\alpha = 0,05$) con Graph Pad Prism 3.0 (Graph Pad Software Inc.) según fuese apropiado. Se usó el paquete estadístico R.2.5.1 para calcular la estadística descriptiva y generar las representaciones gráficas mostradas en la figura 6.

RESULTADOS

10 *Inhibición del crecimiento de xenoinjerto.* La administración oral de PE condujo a una inhibición significativa del crecimiento de xenoinjerto LAPC-4 con relación al grupo de control de vehículo (figura 5). Los volúmenes tumorales se redujeron significativamente en el grupo tratado con PE con relación al grupo de control a las cuatro semanas ($0,35 \pm 0,19$ frente a $0,20 \pm 0,14$ cm³; $p = 0,0280$), las cinco semanas ($0,78 \pm 0,39$ frente a $0,39 \pm 0,26$ frente a cm³; $p = 0,005$) y las seis semanas ($1,18 \pm 0,37$ frente a $0,47 \pm 0,28$ cm³; $p = 0,0002$) después de la inyección de células tumorales. Se encontró EA a mayores concentraciones en tejidos tumorales recogidos de tres ratones tratados con PE ($1030 \pm 124,9$ ng/g) en comparación con ratones que recibieron el control de vehículo ($316,3 \pm 54,1$ ng/g; $p = 0,0008$). No se detectaron UA y sus metabolitos en tejidos de xenoinjerto.

20 *Distribución tisular de los metabolitos de extracto de granada.* Después de la administración oral de PE (a ratones sin xenoinjertos), se detectó EA en plasma a las 0,5 horas y se eliminó después de 2 h. El PE administrado por vía intraperitoneal proporcionó mayores niveles de EA en plasma a las 0,5 horas en comparación con la dosificación oral ($134,5 \pm 12$ frente a $11,5 \pm 1,4$ ng/ml) y persistió en el plasma durante 6 h. No se detectó EA en tejido prostático después de la administración de PE oral, mientras que se detectó a altas concentraciones en tejido prostático (676 ± 172 ng/g) y en menor grado en el intestino, colon e hígado después de la administración intraperitoneal. No se detectó UA, un metabolito de EA, en plasma o en tejidos tras la administración de PE.

25 UA administrada por vía oral se absorbió rápidamente y se captó en las mayores concentraciones en la próstata seguida por el intestino delgado y el colon (figura 6A). UA administrada por vía intraperitoneal se concentró en próstata, colon e intestino con un máximo a las 2 h (figura 6B). Entre los metabolitos de UA, se detectaron sulfato de UA y UA metilada principalmente en la próstata, mientras que el glucurónido de UA se encontró en mayor concentración en los tejidos hepáticos y renales.

30 Bioactividad de metabolitos de PE *in vitro*. Se incubaron EA, UA sintetizada y metabolitos de UA sintetizados a concentraciones de 10-100 μ mol/l con líneas celulares CaP dependientes de andrógenos (LNCaP) e independientes de andrógenos (LNCaP-AR, DU145 y 22RV1). Todos los metabolitos mostraron efectos antiproliferativos dependientes de la dosis en todas las líneas celulares sometidas a prueba. La CI₅₀ de UA era menor que la de EA en todas las líneas celulares (tabla 2). Entre los metabolitos de UA, UA metilada tuvo la mayor bioactividad en la inhibición del crecimiento de células LNCaP y 22RV1. Los valores de CI₅₀ para cada metabolito se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de CI₅₀ (μ mol/l) de metabolitos de elagitaninos de granada en el crecimiento de células de cáncer de próstata humano. Los datos se expresan como porcentaje de células sin tratar (esto es, valor de tratamiento-blanco/valor de vehículo-blanco), media \pm D.E. para al menos tres experimentos independientes.

Células	EA	UA	mUA	dmUA
LNCaP	62,4 \pm 4,2	31,3 \pm 0,5	15,9 \pm 4,7	71,4 \pm 13,5
LNCaP-AR	78,7 \pm 3,2	43,3 \pm 2,8	126,7 \pm 7,3	ND
DU145	74,3 \pm 5,2	49,8 \pm 3,9	43,3 \pm 3,5	70,7 \pm 13,0
22RVA	108,7 \pm 16,6	47,8 \pm 3,2	6,2 \pm 0,8	85,0 \pm 8,6

40 [†]UA = UA, mUA = UA metilada, dmUA = UA dimetilada.

Los presentes estudios se diseñaron para determinar la disposición tisular de los metabolitos de extracto de granada, EA y urolitinas, y para determinar si los metabolitos se localizan en la próstata y en xenoinjertos de tumor de próstata. Se estudió la urolitina A (UA) en detalle. En el presente estudio, la administración oral de PE a ratones condujo a niveles aumentados de EA en plasma, pero no se detectó EA en la próstata. Por otro lado, la administración intraperitoneal de PE condujo a niveles diez veces mayores de EA en plasma, y niveles de EA mayores y detectables en próstata, intestino y colon con relación a otros sistemas de órganos. Los niveles de EA detectables en tejido prostático tras la administración peritoneal pero no oral, se deben probablemente a los mayores niveles en plasma obtenidos después de la administración intraperitoneal. La administración intraperitoneal y oral de UA condujo a la captación de UA y sus conjugados en el tejido prostático, y los niveles de urolitina eran mayores en tejidos prostáticos e intestinales con relación a otros sistemas de órganos. De manera importante, la predilección de los metabolitos bioactivos de granada por localizarse en tejido prostático combinado con datos preclínicos que demuestran los efectos anticancerígenos demuestra el potencial de los productos de granada para desempeñar un

papel en la quimioprevención del cáncer de próstata.

Este es el primer estudio que demuestra que las urolitinas tienen una potente actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de cáncer de próstata dependientes de andrógenos e independientes de andrógenos, con valores de CI_{50} menores que EA.

5 Tras la administración de UA, varios conjugados de UA pudieron detectarse en la próstata. La UA y otros polifenoles se metabolizan por enzimas hepáticas de fase II incluyendo glucuronosil transferasas para formar glucurónidos, sulfottransferasas para formar sulfatos y catecol-o-metiltransferasas para formar derivados metilados. Estos procesos metabólicos de fase II aumentan la hidrofiliidad de los metabolitos y facilitan su excreción. El sulfato de UA fue el principal producto metabólico de UA en este estudio, lo que sugiere que entre las enzimas de fase II, las sulfottransferasas desempeñaron un papel principal en la transformación de UA. De forma importante, la UA y los conjugados de UA que se concentraron en la próstata de ratón en el presente estudio tenían actividad antiproliferativa frente a líneas celulares CaP sensibles e insensibles a andrógenos humanas.

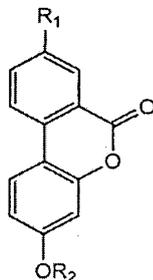
10 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y comprensión, resulta fácilmente evidente para los expertos habituales en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que pueden realizarse determinados cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15 Por consiguiente, lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la técnica podrán concebir diversas disposiciones que, aunque no se describan o muestren explícitamente en el presente documento, presentan los principios de la invención y se incluyen dentro de su espíritu y alcance. Además, todos los ejemplos y lenguaje condicional citados en el presente documento están destinados principalmente a ayudar al lector a comprender los principios de la invención y los conceptos con los que contribuyen los inventores para hacer avanzar la técnica, y han de interpretarse como que carecen de limitación para tales ejemplos y condiciones citados específicamente. Además, todas las declaraciones en el presente documento que citan principios, aspectos y realizaciones de la invención así como ejemplos específicos de la misma, pretenden abarcar tanto equivalentes conocidos actualmente como equivalentes desarrollados en el futuro, por ejemplo, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función independientemente de su estructura. Por tanto, no se pretende que el alcance de la presente invención se limite a las realizaciones a modo de ejemplo mostradas y descritas en el presente documento. Más bien, el alcance y espíritu de la presente invención se presenta mediante las reivindicaciones adjuntas.

30

REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado del grupo consiste en: urolitina B, urolitina A, hidroxurolitina A, metil-urolitina A y un compuesto representado por la estructura



5 en la que

R₁ es H; OH; u OR₃;

R₂ es H o alquilo C₁ a C₁₀; y

R₃ es alquilo C₁ a C₁₀

10 para su uso en el tratamiento en un sujeto de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: un sarcoma, un melanoma, un carcinoma de células escamosas de boca, garganta, laringe o pulmón, un cáncer genitourinario seleccionado de cáncer de cuello uterino o de vejiga, un cáncer hematopoyético, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer del sistema nervioso, cáncer de próstata, cáncer de páncreas y cáncer de colon.

15 2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho cáncer es uno de cáncer de próstata, cáncer de páncreas y cáncer de colon.

3. Compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que dicho cáncer es cáncer de próstata, y dicho cáncer de próstata es independiente de andrógenos.

4. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho cáncer es cáncer hematopoyético.

20 5. Compuesto para su uso según la reivindicación 4, en el que cáncer hematopoyético se selecciona del grupo que consiste en: linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y una leucemia.

6. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en: urolitina B, urolitina A, hidroxurolitina A y metil-urolitina A.

7. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho sujeto es un mamífero.

25 8. Compuesto para su uso según la reivindicación 7, en el que dicho mamífero es un ser humano.

FIGURA 1

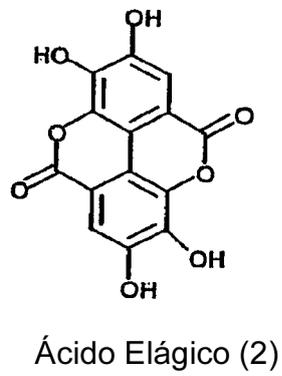
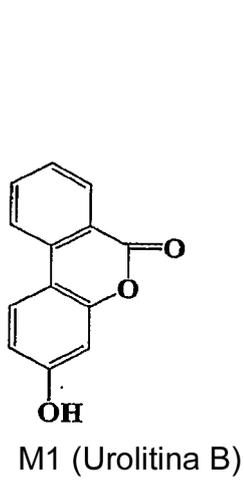
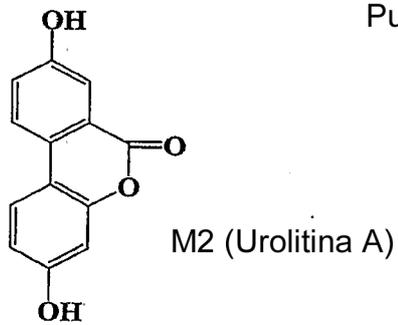
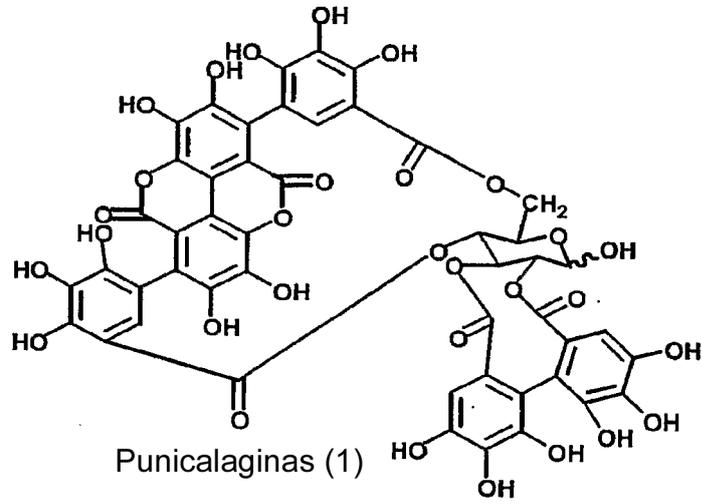
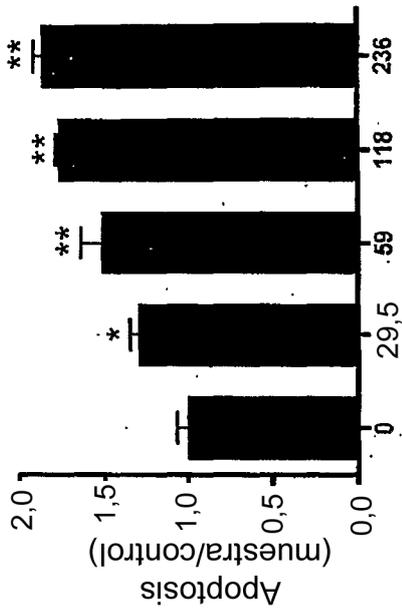
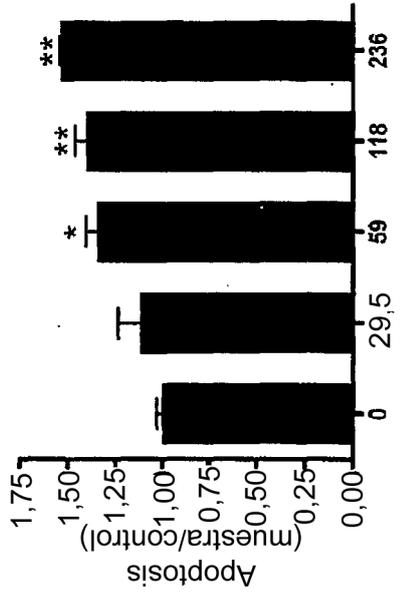
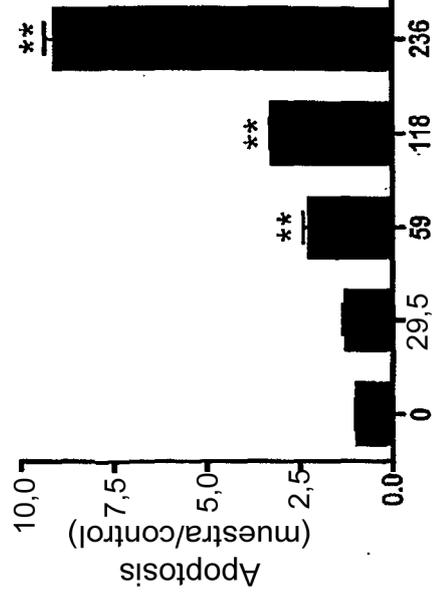


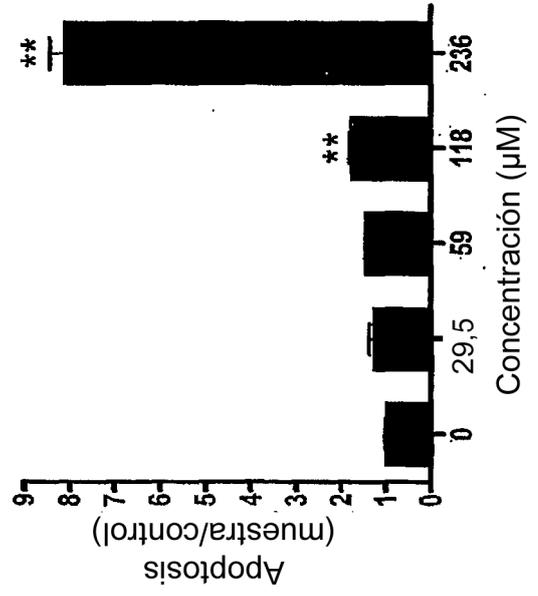
FIGURA 2



Concentración (µM)



Concentración (µM)



Concentración (µM)

Cáncer de colon HCT-116

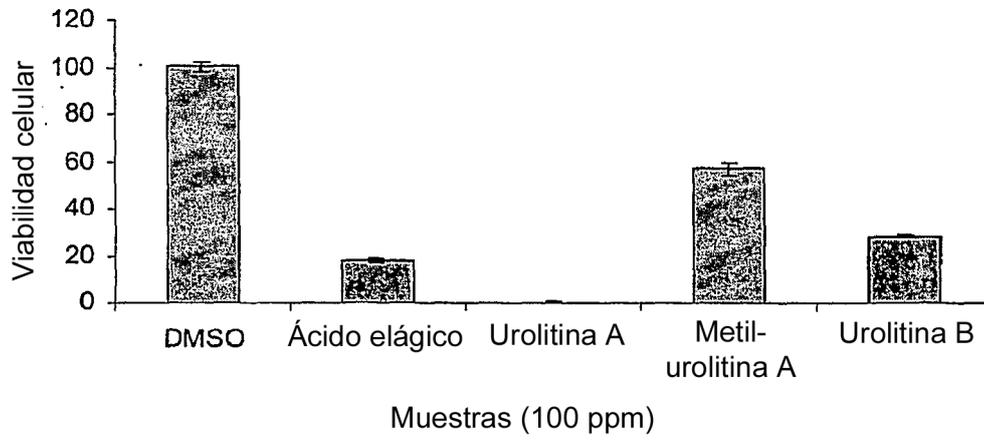
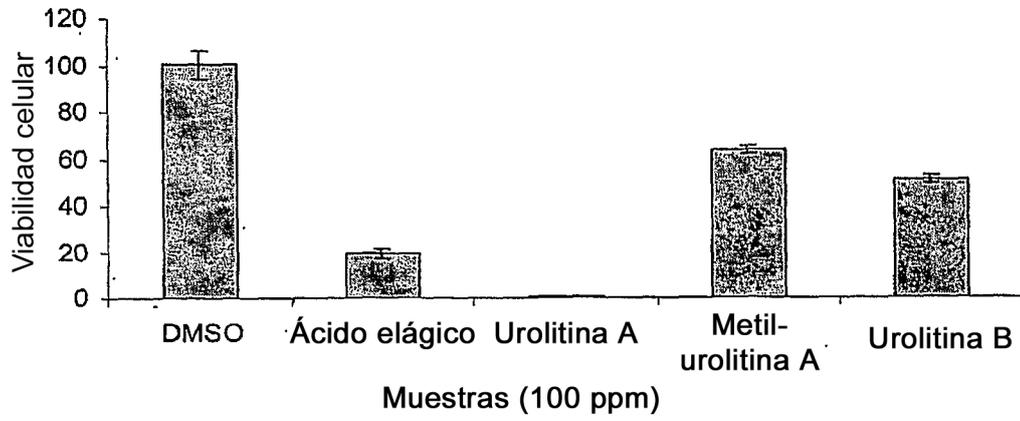


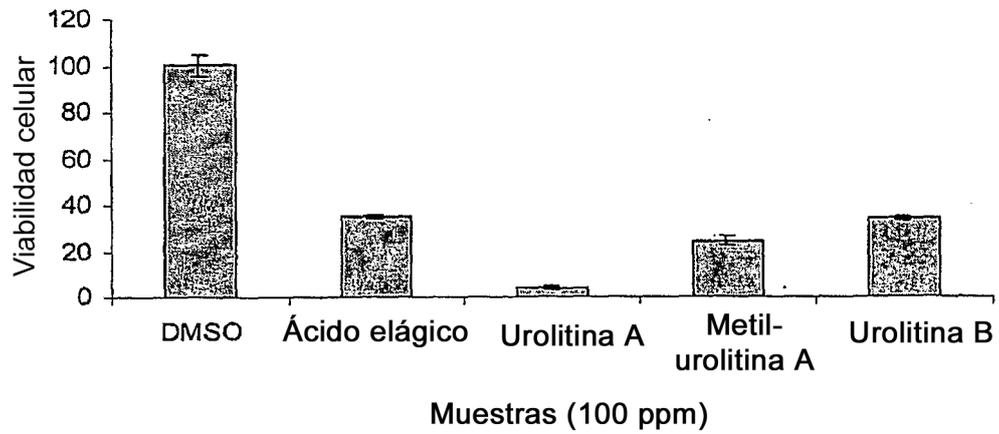
FIGURA 3

Células pancreáticas ASPC-1



A

Células pancreáticas BXPC-3



B

FIGURA 4

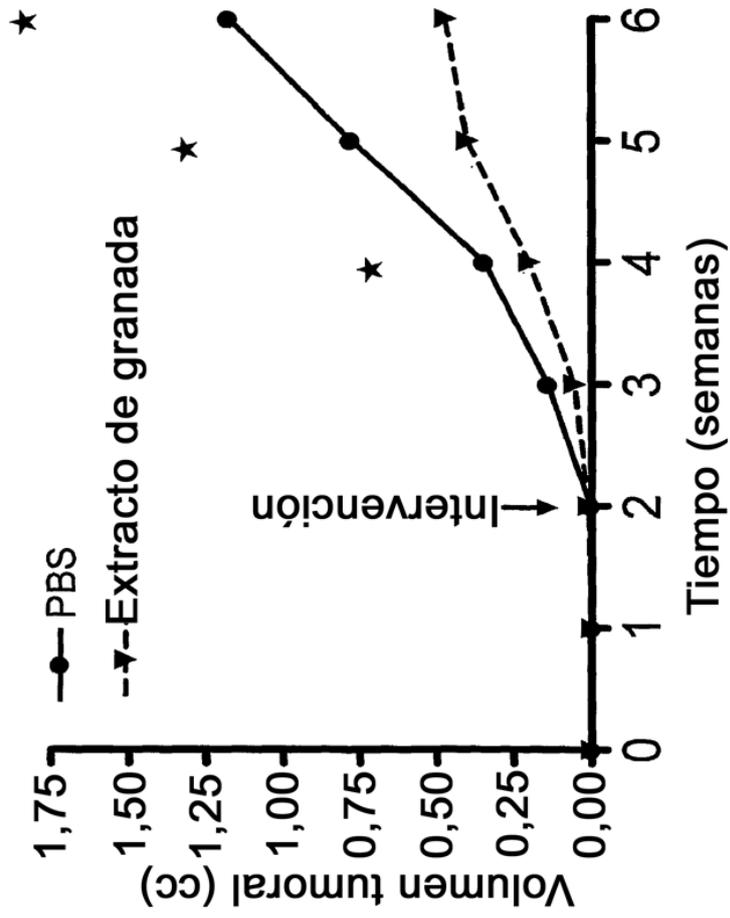


FIGURA 5

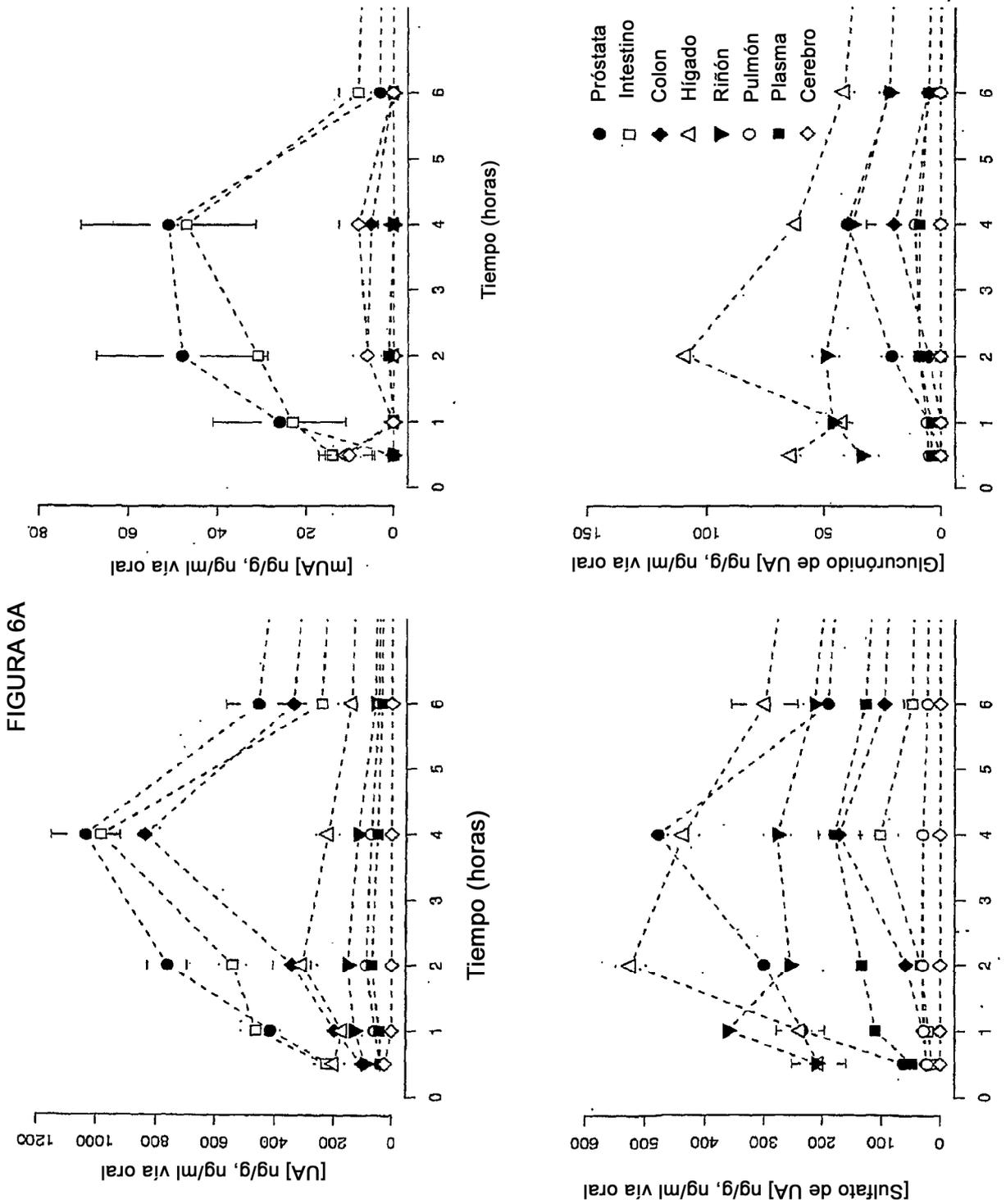


FIGURA 6B

