

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 078**

51 Int. Cl.:

A61K 31/593 (2006.01)

A61K 31/606 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2013 PCT/IB2013/054846**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13186734**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2013 E 13744833 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2861235**

54 Título: **Quimioprevención del cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

15.06.2012 IT MI20121041

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

28.04.2020

73 Titular/es:

**SOFAR SPA (100.0%)
Via Firenze, 40
20060 Trezzano Rosa (MI), IT**

72 Inventor/es:

**GRANDE, ALEXIS;
FERRARINI, FABRIZIO y
PARENTI, SANDRA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 757 078 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

Quimioprevención del cáncer colorrectal

5 La presente invención se relaciona con una nueva combinación de

(i) ácido 5-aminosalicílico '(S-ASA) o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un derivado del mismo seleccionado del grupo que consiste en: sulfasalazina, olsalazina y balsalazida.

10 (ii) una vitamina del grupo D, y

(iii) al menos un excipiente fisiológicamente aceptable y su uso del mismo en la prevención y/o tratamiento del cáncer colorrectal.

15 Otro aspecto de la invención se relaciona con una composición farmacéutica que contiene dicha combinación y a dicha composición para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer colorrectal.

Técnica anterior

20 Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, NSAIDS, se caracterizan por una actividad quimiopreventiva reconocida contra el cáncer colorrectal (CRC) (O'Morain C et al., World J Gastroenterol, 2009;1(1):21-15). Desafortunadamente, la toxicidad sistémica y gastrointestinal de los NSAIDs limita drásticamente la administración de estos en el área de protocolos que requieren un tratamiento a largo plazo de los pacientes interesados (Guadagni F. et al., Anticancer Res, 2007;27:3147-3162). Diferentes estudios indican que 5-ASA es una alternativa prometedora para obtener una actividad quimiopreventiva comparable contra el CRC, al mismo tiempo evitando los efectos secundarios inducidos por los NSAIDs (Rubin DT et al., Inflamm Bowel Dis, 2008;14:65-274). De hecho, a pesar de la similitud química con la aspirina, es decir, un NSAID típico, el 5-ASA se caracteriza por una inhibición débil de ciclooxigenasa y una absorción sistémica insignificante, que son propiedades que explican claramente la seguridad clínica de este agente terapéutico (Bergman R. et al., Aliment Pharmacol Ther, 2006;23:841-855). A este respecto, no sorprende que el efecto antiinflamatorio del 5-ASA esté mediado por otros mecanismos, entre los cuales un papel importante probablemente sea desempeñado por la inhibición de los factores de transcripción que promueven la respuesta inmune, tal como NFκB y los PPAR (Lyakhovich A. et al., Aliment Pharmacol Ther, 2010;31(2):202-9).

35 El documento US 2001/049364 que divulga una composición que comprende 5-ASA, vitamina D3 y calcio para la prevención del inicio y la progresión del cáncer colorrectal.

El documento WO 2006/125073 divulga el uso de 5-ASA sulfasalazina, olsalazina y balsalazida en el tratamiento del cáncer colorrectal.

40 Estudios recientes han demostrado que el 5-ASA interfiere con la vía de señalización de proliferación mediada por la β-catenina. Esta proteína es un factor de transcripción que se activa constitucionalmente en casi todos los casos de cáncer colorrectal. Se sabe que el estado de fosforilación de la β-catenina influye indirectamente en su función de transcripción, considerando que esta proteína se degrada en el citoplasma cuando se fosforila, mientras que se transloca al núcleo cuando se desfosforila. Bos et al., Carcinogenesis 2006;27(12):2371-82 han demostrado que 5-ASA puede inhibir la actividad enzimática de la fosfatasa PP2A, normalmente responsable de la desfosforilación de la β-catenina, reduciendo así la translocación nuclear del mismo. Parenti S. et al., Aliment Pharmacol Ther; 31(1):108-19 y Losi L. et al., Hum Pathol también han demostrado que el tratamiento de células cancerosas de CRC con 5-ASA induce la expresión de una proteína de membrana, conocida como μ-protocadherina, que pertenece a la superfamilia de las cadherinas y es capaz de secuestrar la B-catenina en la membrana plasmática, evitando que la β-catenina se transloque al núcleo y active la transcripción de los genes objetivo de la misma.

55 El documento EP2239580 ha demostrado además que la translocación nuclear de la β-catenina se inhibe después del tratamiento con 5-ASA debido a la inducción de una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de las cadherinas, dicha protocadherina. Esta cadherina enlaza y secuestra en la membrana a la B-catenina, evitando la translocación nuclear de la misma y la transcripción de los genes objetivo de la misma.

60 Numerosos estudios epidemiológicos de los mismos sugieren que también la administración de vitamina D3 (VD3) reduce significativamente la aparición de CRC. Además de regular la homeostasis del calcio, de hecho, la VD3 también se caracteriza por una importante actividad antiproliferativa, pro diferenciadora y proapoptótica realizada en numerosos tipos de células, entre las cuales también es posible citar los enterocitos cancerosos del colon (Jiménez-Lara AM., Int J Biochem Cell Biol 20(7);39(4):672-7). Para este propósito, Palmer et al., J Cell Biol 2001 ;154(2):369-87 han demostrado que la VD3 interfiere con la vía de señal de la β-catenina a través de un mecanismo similar al ya mencionado para el 5-ASA que consiste en un secuestro de este factor de transcripción en la membrana plasmática que en este caso está mediado por la hiperexpresión de la E-cadherina o de la principal cadherina epitelial.

65 Descripción de la invención

El objeto de la presente invención consiste en encontrar terapias nuevas y más efectivas para el tratamiento del cáncer colorrectal. Sorprendentemente se encontró que la combinación de (i) ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) o un derivado del mismo seleccionado del grupo que consiste en: sulfasalazina, olsalazina y balsalazida, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos, (ii) una vitamina del grupo D y (iii) al menos un excipiente fisiológicamente aceptable, permite que los principios activos ejerzan un efecto sinérgico en comparación con la acción de cada tratamiento individual sobre la vía de transducción de la señal proliferativa de la β -catenina, cuya activación constitutiva es observada en la progresión del 90 % de los cánceres colorrectales.

La presente invención se relaciona así con una combinación de (i) ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) o un derivado del mismo seleccionado del grupo que consiste en: sulfasalazina, olsalazina y balsalazida, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos, (ii) una vitamina del grupo D, y (iii) al menos un excipiente fisiológicamente aceptable, a una composición farmacéutica que comprende esta combinación y al uso de dicha combinación y/o composición farmacéutica en la prevención y/o en el tratamiento del cáncer colorrectal.

La combinación de la invención tiene la ventaja de poder reducir las dosis terapéuticas de ambos componentes con respecto a la dosificación que es habitual en la prevención y/o en el tratamiento del cáncer colorrectal.

Preferiblemente, la presente invención se relaciona con una combinación de (i) ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) y (ii) una vitamina del grupo D, un derivado de este, un metabolito o análogo.

El derivado del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) se elige preferiblemente del grupo que comprende sulfasalazina (ácido 6-oxo-3-((4-(piridin-2-il)sulfamoyl)fenil)hidrazinilideno)ciclohexa-1,4-dieno-1-carboxílico), olsalazina (ácido 5-[(2Z)-2-(3-carboxi-4-oxo-1-ciclohexa-2,5-dienilideno)hidrazinil]-2-hidroxi-benzoico) y balsalazida (ácido 5-[4-(2-carboxietilcarbamil)fenil]diazinil-2-hidroxi-benzoico).

Preferiblemente, la vitamina del grupo D, o un derivado del mismo, metabolito o similar se elige del grupo que comprende vitamina D3 (o colecalciferol, nombre IUPAC: (3S,9S,10R,13R,14R,17R)-17-((2R,5R,E)-6-metilheptán-2-il)-10,13-dimetil-2,3,4,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-01), vitamina D2 (o ergocalciferol, nombre IUPAC: (3S,9S,10R,13R,14R,17R)-17-((2R,5R,E)-5,6-dimetilheptán-3-en-2-il)-10,13-dimetil-2,3,4,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol), 25-hidroxi-vitamina D3, (o calcifediol o calcidiol, nombre IUPAC: (6R)-6-[(1R,3aR,4E,7aR)-4-[(2Z)-2-[(5S)-5-hidroxi-2-metilideno-ciclohexilideno]etilideno]-7a-metil-2,3,3a,5,6,7-hexahidro-1H-inden-1-il]-2-metil-heptan-2-ol) y 1 alfa,25 dihidroxi-vitamina D3 (o calcitriol, nombre IUPAC: (1R,3S)-5-[2-[(1R,3aR,7aS)-1-[(2R)-6-hidroxi-6-metilheptán-2-il]-7a-metil-2,3,3a,5,6,7-hexahidro-1H-inden-4-ilideno]etilideno]-4-metilideno-ciclohexano-1,3-diol).

Más preferiblemente, la combinación de la invención comprende vitamina D3. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, dicha combinación de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) y vitamina D3 no comprende calcio. De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, dicha combinación consiste en ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) y vitamina D3.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención se relaciona con una combinación de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) y vitamina D3, a una composición farmacéutica que comprende esta combinación en asociación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable y al uso de dicha combinación y/o composición farmacéutica en la prevención y/o en el tratamiento del cáncer colorrectal.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de la combinación y/o de la composición farmacéutica de la presente invención para prevenir el cáncer colorrectal en personas con un riesgo diferente de desarrollar neoplasias, tales como, por ejemplo: individuos sanos/normales; pacientes afectados por enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (como la enfermedad de Crohn y la rectocolitis ulcerosa); pacientes sometidos a extirpación endoscópica de adenomas y/o adenocarcinomas del colon-recto; pacientes afectados por síndromes genéticos de cáncer (como el síndrome de Lynch y la poliposis adenomatosa familiar).

Las vías adecuadas para administrar la combinación y/o composición farmacéutica de la invención incluyen administración oral, intramuscular, subcutánea o rectal, preferiblemente administración oral.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular como una preparación combinada, para la administración simultánea, secuencial o separada de los componentes de la combinación, como composiciones farmacéuticas en las que los dos componentes están presentes en la misma unidad de dosificación o en unidades separadas de dosificación.

Preferentemente, la administración por separado de los dos componentes ocurre en un intervalo de tiempo comprendido entre 1 y 24 horas.

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, píldoras, grageas.

De acuerdo con un aspecto preferido, la composición farmacéutica de la presente invención comprende los dos componentes de la combinación en asociación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable en la misma unidad de dosificación en forma comprimida para administración oral.

El uso de la combinación de la invención para prevenir y/o tratar el cáncer colorrectal implica la administración diaria de una cantidad de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) o un derivado del mismo, o una sal farmacológicamente aceptable del mismo comprendida en el intervalo de 0.5 a 5 g, preferiblemente de aproximadamente 2.4 g, y una cantidad de una vitamina del grupo D, un derivado del mismo, un metabolito o análogo comprendido en el intervalo de 500 a 10.000 IU, preferiblemente aproximadamente 2.000 IU.

La cantidad de composición de la invención que se administrará al paciente puede variar de acuerdo con diversos factores que las personas experimentadas en la técnica conocen bien, por ejemplo, el peso del paciente, la vía de administración y la gravedad de la enfermedad.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que es adecuada para la liberación controlada de los dos componentes en zonas distintas del intestino, como el intestino delgado para la vitamina del grupo D, un derivado del mismo, un metabolito o análogo, destinado a la absorción sistémica en este lugar, y el colon para el ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) o un derivado del mismo, o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, donde este compuesto tiene un efecto tópico, de modo que las concentraciones correspondientes de los dos componentes activos son óptimos para los fines del objetivo de la invención.

De acuerdo con un aspecto preferido, la combinación y/o composición farmacéutica de la presente invención se administra a mamíferos, particularmente a humanos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Curva de crecimiento de la línea celular HT29 sometida a tratamiento con 5-ASA, VD3 y 5-ASA + VD3. En el eje x se muestran los tiempos de tratamiento, en el eje y se muestra el número de expansiones de células en comparación con el número inicial de células. Los datos se han mostrado como promedios \pm s.e.m obtenidos de tres experimentos independientes.

Figura 2. Análisis QRT-PCR de los ARN mensajeros de genes que pertenecen a la vía de señal de la cadena β en células HT29 tratadas con 5-ASA, VD3 y 5-ASA + VD3. Los genes analizados se muestran en el eje x, mientras que las variaciones cuantitativas de los niveles de ARN mensajeros se muestran en el eje y. Los datos se han mostrado como promedios \pm s.e.m obtenidos de tres experimentos independientes.

Figura 3. Curva de crecimiento de la línea celular CaCo2 sometida a tratamiento con 5-ASA y ASA. En el eje x, se muestran los compuestos analizados y las concentraciones de estos, en el eje y, se muestra el número de expansiones celulares en comparación con el número inicial de células. Los datos se han mostrado como promedios \pm s.e.m obtenidos de tres experimentos independientes.

Figura 4. Análisis QRT-PCR de los ARN mensajeros de los genes que pertenecen a la vía de señal 7 13GI20E de la [cadena 3 en células CaCo2 tratadas con 5-ASA y ASA. Los genes analizados se muestran en el eje x, mientras que las variaciones cuantitativas de los niveles del ARN mensajero se muestran en el eje y. Los datos se han mostrado como promedios \pm s.e.m obtenidos de tres experimentos independientes.

Ejemplos

Material y métodos 1

Las líneas celulares CaCo2 y HT29 del adenocarcinoma colorrectal obtenido del ATCC (Rockville, MD, Estados Unidos) se cultivaron en un medio de cultivo DMEM (Euroclone, Devon, Reino Unido), al que se le añadió suero bovino fetal al 10 % (Lonza, Walkersville, MD, Estados Unidos) inactivado al calor y 1mM de L-glutamina (Euroclone). El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA, SOFAR S.p.A., Milán, Italia) y el ácido acetilsalicílico (ASA, Sigma Aldrich, St Louise, MO, Estados Unidos) se disolvieron en un medio de cultivo en una concentración de 20 y 10 mM respectivamente. La vitamina D3 (VD3) (1 alfa, 25 dihidroxivitamina D3, calcitriol, Sigma Aldrich) se diluyó en el medio de cultivo a una concentración de 10^7 M. Para los experimentos realizados con la línea celular HT29, se sembraron 300.000 células para cada muestra y se agregaron 5-ASA, vitamina D3 o la combinación de 5-ASA y VD3 a cada pozo. Para los experimentos realizados con la línea celular CaCo2, por otro lado, se sembraron nuevamente 300.000 células para cada muestra, pero agregando 5-ASA o ASA a cada pozo. Las células tratadas se sometieron a un recuento de células cada 24 horas para controlar el efecto antiproliferación de los diferentes estímulos. Después de 96 horas de tratamiento, se recolectaron todas las células, se reabsorbieron y se extrajo el ARN mediante el "kit de purificación de ARN total Qiagen" siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). La integridad y la concentración del ARN se probaron utilizando la técnica Bio-Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA). Luego se retrotranscribieron 100 ng en total de ARN usando el kit de Archivo de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems)

de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El QRT-PCR se realizó luego con un sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) para cuantificar los niveles relativos de ARNm medidos en las diversas muestras. Applied Biosystems ideó los activadores y las sondas para amplificar el ARNm de la μ -protocadherina, E-cadherina, p21^{waf-1}, KLF4 y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Cada muestra de ADNc se procesó por triplicado en 50 μ l de volumen de reacción usando la Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).

La ciclización térmica se inició con desnaturalización inicial a 50 °C durante 2 minutos y a 90 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Las señales QRT-PCR se evacuaron utilizando el método de cuantificación correspondiente $\Delta\Delta C_t$ (Livak KJ, Schmittgen TD. Los datos relativos de la expresión génica se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real y el método $2^{-\Delta(\Delta C(T))}$. Methods 2001;25(4):402-8). Este procedimiento calcula la diferencia relativa en la expresión génica del gen objetivo normalizado en el control endógeno (GAPDH) y se compara con una muestra de calibración. Los valores obtenidos se expresaron como una cantidad relativa (RQ) de la variación en los niveles de mensajería.

Ejemplo 1

Análisis de los efectos antiproliferativos promovidos por el tratamiento con 5-ASA y VD3 de la línea celular de adenocarcinoma HT29 del colon-recto.

La línea celular HT29 de adenocarcinoma colorrectal, que se eligió por su capacidad de respuesta al VD3 derivado del receptor VDR correspondiente, se sometió a tratamiento "in vitro" con 5-ASA 20 mM y VD3 10⁻⁷ M, utilizados individualmente y en asociación, para cuantificar el efecto antiproliferativo determinado por los compuestos analizados en colonocitos cancerosos. El trazado de las curvas de crecimiento, con base en los valores de recuento celular obtenidos de este experimento, ha demostrado que el tratamiento combinado con 5-ASA y VD3 determina un efecto antiproliferativo adicional que es claramente superior a lo observado con los tratamientos individuales. Esta observación es evidente sobre todo a las 96 horas de estimulación, donde se detectaron 14 expansiones en el control, 8 veces en el tratamiento con 5-ASA, 10 veces en el tratamiento con VD3 y solo 5 veces en el tratamiento combinado (Figura 1). Estos datos confirman los efectos antiproliferativos logrados individualmente mediante el tratamiento con 5-ASA y VD3 en células de cáncer colorrectal, demostrando además la existencia de un efecto adicional resultante de la asociación farmacológica de los mismos.

Ejemplo 2

Análisis QRT-PCR de genes que regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis en células HT29 de adenocarcinoma colorrectal del colon-recto sometidas a tratamiento con 5-ASA y VD3.

Para verificar a nivel molecular los efectos determinados en la línea celular HT29 por la asociación 5-ASA/VD3, se usó RT-PCR cuantitativa de "tiempo real", para analizar la expresión de una serie de genes cuyos productos proteicos están involucrados en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis de los colonocitos cancerosos tales como μ -protocadherina, E-cadherina, p21^{waf-1} y KLF4. Este análisis se realizó en cultivos celulares sometidos a 96 horas de tratamiento con los fármacos estudiados, que se utilizaron en las concentraciones divulgadas anteriormente. La elección de los genes enumerados deriva de una serie de observaciones explicadas a continuación. La M-protocadherina y la E-cadherina son proteínas que pertenecen a la familia de las cadherinas que mediadoras de la adhesión intercelular y por lo tanto, indirectamente, tienen una actividad antimetastásica. También se ha demostrado que regulan la proliferación celular secuestrando, en la membrana plasmática, el factor de transcripción β -catenina y evitando que active la transcripción de los genes objetivo. Por las razones expuestas, la expresión de estas cadherinas está frecuentemente subregulada en los tumores epiteliales. El gen codificante para la proteína p21^{waf1} es uno de los principales objetivos negativos de la β -catenina y es un regulador importante del ciclo celular que es capaz de determinar, después de una inducción masiva de expresión del mismo, el paro proliferativo después de la muerte celular por apoptosis. Por último, el KLF4 es un gen oncosupresor codificador para un factor de transcripción que desempeña un papel crucial en la regulación de la proliferación y diferenciación de los colonocitos, derivado en parte de su capacidad para contrastar la actividad proliferativa mediada por la β -catenina, o mediante mecanismos moleculares que solo se caracterizan parcialmente. La importancia de los genes mencionados hasta ahora también se subraya completamente por el hecho de que todos están involucrados en la aparición y progresión de los cánceres colorrectales.

Los datos obtenidos han demostrado que el tratamiento único con 5-ASA determina un aumento en la expresión del mensajero que es 2.5 veces aumentada para la μ -protocadherina, 2.2 veces aumentada para E-cadherina, 2.9 veces aumentada para p21 y 2.2 veces aumentada para KLF-4. Después del tratamiento con VD3, estos valores son respectivamente 1, 1.7, 1.5 y 1.6, mientras que después del tratamiento combinado, son respectivamente 3.2, 3.1, 4.2 y 3.1, lo que demuestra que la asociación de los fármacos en cuestión determina un efecto aditivo en la inducción de la expresión del mensajero de los genes examinados (figura 2).

Estos resultados hacen claramente que la asociación 5-ASA/VD3 sea adecuada para el uso quimiopreventivo contra los cánceres colorrectales.

Ejemplo 3

Análisis comparativo de los efectos antiproliferativos y moleculares promovidos por el tratamiento con 5-ASA y ASA en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal.

A fin de caracterizar aún más el perfil de eficacia y seguridad asociado con las propiedades quimiopreventivas del 5-ASA, se realizó una serie de experimentos del mismo tipo que la serie explicada anteriormente, en la que se realizó un análisis comparativo de los efectos biológicos determinados en colonocitos cancerosos después del tratamiento con 5-ASA y con aspirina (ASA), es decir, el fármaco principal de la familia de los NSAIDs. Estos experimentos se realizaron en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal, debido a su respuesta electiva al 5-ASA que surge de la comparación con otras líneas celulares del mismo origen, exponiendo el cultivo a un tiempo de tratamiento de 96 horas.

Los resultados obtenidos han demostrado que aunque el ASA tiene un efecto antiproliferativo más pronunciado que el 5-ASA, esto es asociado con un claro efecto tóxico que se crea a una concentración de 20 mM de los fármacos analizados en los que todas las células tratadas con 5-ASA sobreviven, a pesar del bloqueo proliferativo completo indicado por el valor de "veces de cambio" de la celularidad igual a 1, mientras que las células sometidas a tratamiento con 80 % de mortalidad ASA, indicado por el valor de "veces de cambio" de la celularidad igual a 0.2 (Figura 3).

Una observación adicional que surge de estos resultados consiste en el hecho de que una concentración de 10 mM de ASA y 20 mM de 5-ASA pueden considerarse equivalentes de los dos fármacos comparados a medida que promueven, en las células cancerosas sometidas a tratamiento, un efecto antiproliferativo absolutamente superimponible (Figura 3).

En las muestras tomadas de estos cultivos celulares y de otros cultivos utilizados como control, los niveles de ARN mensajero de los genes enumerados en el párrafo anterior (ver Figura 2) se determinaron por RT-PCR cuantitativo en tiempo real. Los resultados obtenidos han demostrado que la expresión mensajera de μ -protocadherina, E-cadherina, p21^{waf1} y los genes KLF4 se indujeron respectivamente 3.8, 2.4, 8.0 y 5.5 veces después del tratamiento con 5-ASA 20 mM (Figura 4), confirmando los datos previamente observados en la línea celular HT29. El tratamiento con la dosis equivalente de ASA, igual a 10 mM, no induce, por otro lado, ninguno de los genes analizados con la única excepción del gen p21^{waf1} cuya expresión muestra un aumento de 5.8 veces que parece ser comparable con lo observado en el tratamiento correspondiente con 5-ASA. Este dato no es sorprendente, considerando la redundancia y la heterogeneidad que caracterizan la regulación molecular del gen p21^{waf1}, cuya expresión no solo está regulada por la vía de señalización de proliferación de la cadena β , explorada en nuestras condiciones experimentales a través de la evaluación de los genes codificadores para μ -protocadherina, E-cadherina y KLF4, sino también por numerosas vías de señalización. La conclusión más plausible que surge de este resultado por consiguiente consiste en la consideración de que el ASA induce la expresión de la p21^{waf1} a través de mecanismos moleculares que no son los que median el mismo efecto a través del 5-ASA, lo que demuestra una especificidad de acción de este último en relación con el fármaco comparado. En general, los datos presentados hasta ahora indican que: 1) 5-ASA inhibe la vía de señal de la β -catenina y, de manera consistente, la actividad proliferativa de los colonocitos cancerosos, trabajando en cooperación con la VD3, lo que hace que esta asociación farmacológica sea adecuada para uso quimiopreventivo contra el cáncer colorrectal; 2) el 5-ASA es menos tóxico y, por lo tanto, más seguro que el ASA para fines de uso prolongado como el requerido para obtener protección quimiopreventiva; 3) dosis equivalentes de ASA y 5-ASA actúan a través de distintos mecanismos moleculares, lo que vindica la especificidad de acción del 5-ASA en comparación con el ASA.

Bibliografía

1. Reinacher-Schick A, Schoeneck A, Graeven U, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W. Mesalazine causes a mitotic arrest and induces caspase-dependent apoptosis in colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2003;24(3):443-51.
2. Luciani MG, Campregher C, Fortune JM, Kunkel TA, Gasche C. 5-ASA affects cell cycle progression in colorectal cells by reversibly activating a replication checkpoint. *Gastroenterology* 2007;132(1):221-35.
3. Stolfi C, Pellegrini R, Franze E, Pallone F, Monteleone G. Molecular basis of the potential of mesalazine to prevent colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2008;14(28):4434-9.
4. Lyakhovich A, Gasche C. Systematic review: molecular chemoprevention of colorectal malignancy by mesalazine. *Aliment Pharmacol Ther*;31(2):202-9.
5. Bos CL, Diks SH, Hardwick JC, Walburg KV, Peppelenbosch MP, Richel DJ. Protein phosphatase 2A is required for mesalazine-dependent inhibition of Wnt/beta-catenin pathway activity. *Carcinogenesis* 2006;27(12):2371-82.

6. Parenti S, Ferrarini F, Zini R, Montanari M, Losi L, Canovi B, et al. Mesalazine inhibits the beta-catenin signalling pathway acting through the upregulation of mu-protocadherin gene in colo-rectal cancer cells. *Aliment Pharmacol Ther*;31(1):108-19.
- 5 7. Losi L, Parenti S, Ferrarini F, Rivasi F, Gavioli M, Natalini G, et al. Down-regulation of mu-protocadherin expression is a common event in colorectal carcinogenesis. *Hum Pathol*.
8. Grande AP, S. Ferrarini, F., inventor Determination of 5-ASA efficacy in CRC prevention and/or treatment by gene expression analysis. 2009.13 13GI20E
- 10 9. Tagliafico E, Tenedini E, Manfredini R, Grande A, Ferrari F, Roncaglia E, et al. Identification of a molecular signature predictive of sensitivity to differentiation induction in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20(10):1751-8.
- 15 10. Jimenez-Lara AM. Colorectal cancer: potential therapeutic benefits of Vitamin D. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(4):672-7.
- 20 11. Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J , et al. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 2001 ;154(2):369-87.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 ;25(4):402-8.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de:
- 5 (i) ácido 5-aminosalicílico, o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, o un derivado del mismo seleccionado del grupo que consiste en: sulfasalazina, olsalazina y balsalazida, y
- (ii) una vitamina del grupo D, y
- 10 (iii) al menos un excipiente fisiológicamente aceptable
- o una composición farmacéutica que comprende dicha combinación para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer colorrectal en un sujeto.
- 15 2. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizada porque dicha vitamina D se selecciona del grupo que comprende: vitamina D3, vitamina D2, 25-hidroxi-vitamina D3 y 1 alfa,25 dihidroxi-vitamina D3.
3. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que
- 20 comprende ácido 5-aminosalicílico y vitamina D3.
4. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde la composición que comprende la combinación no comprende calcio.
- 25 5. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 caracterizada porque dicho ácido 5-aminosalicílico, o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra en una dosis diaria comprendida entre 0.5 y 5 g, aproximadamente 2.4 g preferiblemente y dicha vitamina del grupo D o un análogo de la misma se administra en una dosis diaria comprendida entre 500 y 10.000 IU, preferiblemente
- 30 aproximadamente 2.000 IU.
6. La combinación o la composición para su uso en la prevención del cáncer colorrectal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho sujeto es sano/normal o es un paciente afectado por enfermedades
- 35 inflamatorias crónicas del intestino, preferiblemente enfermedad de Crohn o rectocolitis ulcerosa, o es un paciente sometido a extirpación endoscópica de adenomas y/o adenocarcinomas del colon-recto, o es un paciente afectado por síndromes de cáncer genético, preferiblemente síndrome de Lynch o poliposis adenomatosa familiar.
7. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizada porque este sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano.
- 40 8. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha combinación o composición es para administración oral, intramuscular, subcutánea o rectal.
9. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha combinación o
- 45 composición está en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, píldoras, grageas.
10. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde dicha combinación o composición es para liberación controlada.
- 50 11. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde dicha combinación o composición es una preparación combinada, adecuada para la administración simultánea, secuencial o separada de los componentes de la combinación.
12. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde el tratamiento del cáncer colorrectal se debe al efecto antiproliferativo sobre las células cancerosas del colon-
- 55 recto.
13. La combinación o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho efecto antiproliferativo implica la sobreexpresión de μ -protocadherina, E-cadherina, p21 y KLF4.

Fig. 1

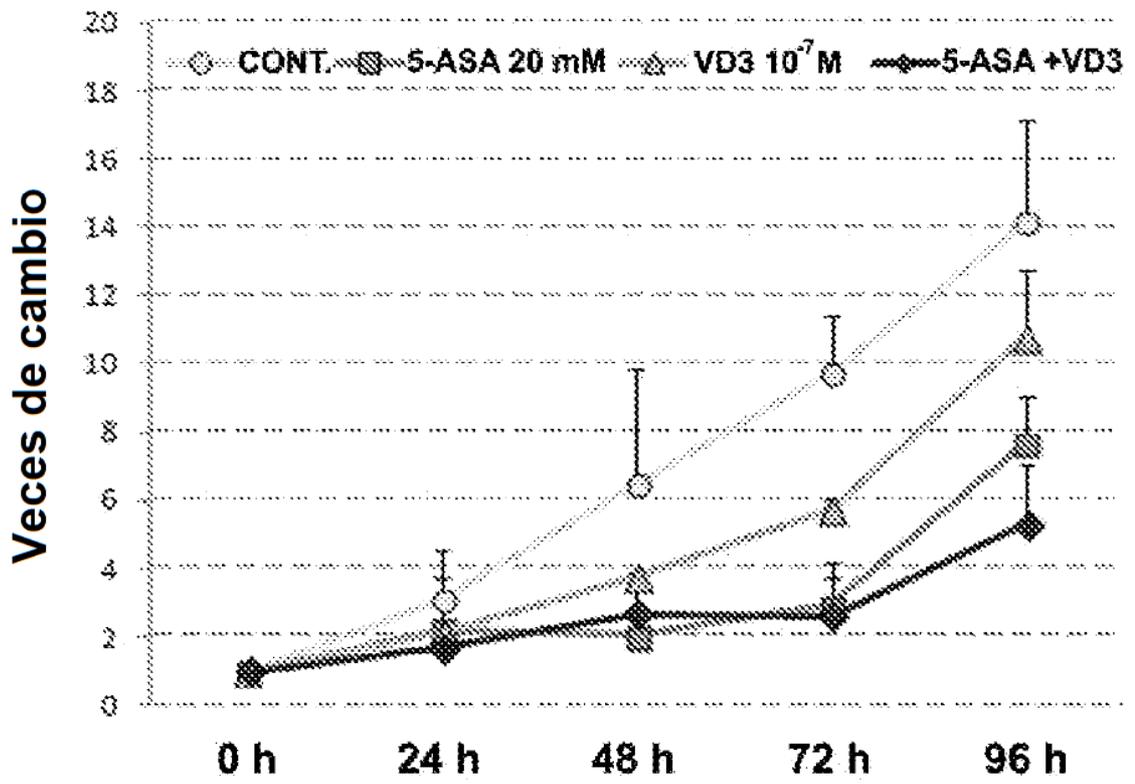


Fig. 2

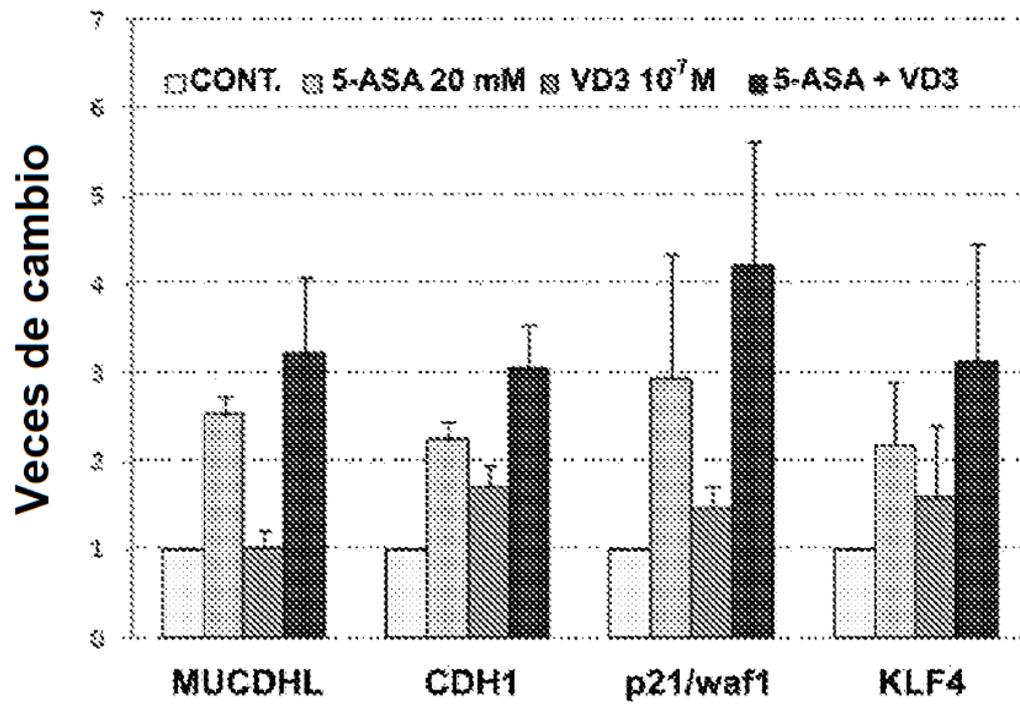


Fig. 3

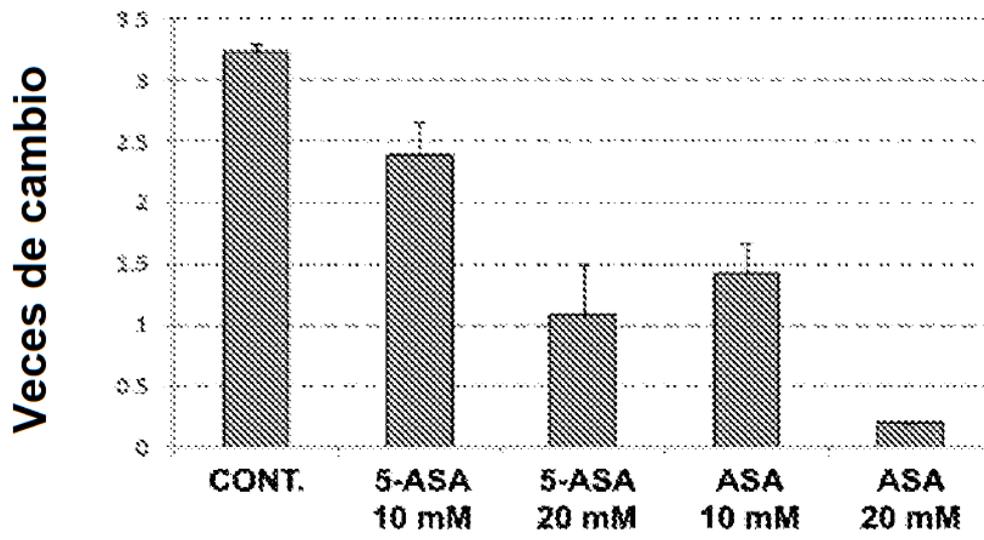


Fig. 4

