



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 721**

51 Int. Cl.:
A61K 31/09 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05774387 .4**
96 Fecha de presentación : **19.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1782802**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Uso combinado del pterostilbeno y la quercetina para la fabricación de medicamentos útiles en el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **20.07.2004 ES 200401846**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.07.2009

73 Titular/es: **Universidad de Valencia**
Avda. Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia, ES

72 Inventor/es: **Estrela Ariquel, José M.;**
Asensio Aguilar, Gregorio;
Asensi Miralles, Miguel A.;
Obrador Plá, Elena;
Varea Muñoz, María Teresa;
Jordá Quilis, Leonardo;
Ferrer Pastor, Paula;
Segarra Guerrero, Ramón;
Ortega Valero, Ángel y
Benlloch García, María

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

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

Uso combinado del pterostilbeno y la quercetina para la fabricación de medicamentos útiles en el tratamiento del cáncer.

Ámbito de la invención

La invención se adscribe al ámbito farmacéutico, en concreto al uso combinado de 2 principios activos, el pterostilbeno y la quercetina, en la fabricación de medicamentos útiles para el tratamiento del cáncer.

Estado de la técnica

Diferentes compuestos fenólicos, incluido el resveratrol (RESV), muestran potentes efectos antioxidantes y pueden tener aplicaciones terapéuticas en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo tales como el cáncer (1-3). La actividad anticancerígena del RESV fue comunicada por primera vez por Jang *et al.* en 1997 (4). Los mecanismos por los que el RESV ejerce sus efectos antitumorales están siendo investigados activamente (3) y pueden incluir por ejemplo: a) inhibición de las actividades ribonucleótido reductasa (5), DNA polimerasa (6), proteína quinasa C (7), o ciclooxigenasa-2 (8); b) inhibición de la carcinogénesis mediada por especies reactivas del oxígeno (4) o de la proliferación celular (9); y c) activación de la muerte celular por apoptosis (10-13). Sin embargo, la inhibición potencial del crecimiento canceroso mediada por el RESV está fuertemente limitada debido a su baja biodisponibilidad (14). En consecuencia, parecieron necesarias modificaciones estructurales de la molécula del RESV al objeto de incrementar su biodisponibilidad pero preservando su actividad biológica. El OH de 4' y la estereoisomería en su conformación *trans* son absolutamente necesarias para la inhibición de la proliferación celular (15). El pterostilbeno (PTER), un análogo del RESV presente en la naturaleza pero aproximadamente 60-100 veces más potente como agente antifúngico, muestra propiedades anticarcinógenas similares (16). Además, los flavonoides están entre los antioxidantes más potentes porque muestran uno o más de los siguientes elementos estructurales: un grupo *o*-difénolico, un doble enlace en 2-3 conjugado con la función 4-oxo, grupos OH en las posiciones 3 y 5. La quercetina (QUER) combina estas tres propiedades e investigaciones previas han confirmado que también tiene propiedades antitumorales, probablemente debido a la estimulación inmune, la eliminación de radicales libres, la alteración del ciclo mitótico de las células tumorales, la modificación de la expresión génica, la actividad antiangiogénica, o la inducción de la apoptosis, o una combinación de estos efectos (2, 17). En concreto la QUER se ha descrito (US 2003/0054357) en el tratamiento del cáncer de próstata. Existen patentes (WO02/34262) que ponen de manifiesto el efecto antioxidante de ciertos flavonoides, en concreto de una combinación de quercetina más catequina para su uso en el tratamiento y la prevención de trastornos circulatorios o cardíacos, previniendo la agregación plaquetaria.

Puesto que todavía no se ha demostrado que los efectos anticancerígenos potenciales sean efectivos mediante la administración sistémica, investigamos las propiedades anticancerosas de una administración sistémica combinada de PTER y QUER a concentraciones biodisponibles. Encontramos que su asociación inhibe fuertemente el crecimiento del melanoma maligno metastático B16-F10 (B16M-F10).

Abreviaturas: B16M-F10, melanoma B16-F10; RESV, resveratrol; t-RESV, *trans*-resveratrol; PTER, pterostilbeno; t-PTER, *trans*-pterostilbeno; QUER, quercetina; HSE, endotelio sinusoidal hepático; VCAM-1, molécula de adhesión celular vascular 1; VLA-4, antígeno de activación muy tardía 4; B16M-F10/Tet-Bcl-2, melanoma B16 F10 que sobreexpresa Bcl-2; LC-MS/MS, cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas; i.v., intravenosa/intravenosamente; i.p., intraperitoneal; DS, desviación estándar.

Referencias

[1] Yang CS, Landau JM, Huang MT, y Newmark HL (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* **21**, 381-406.

[2] Ross JA, y Kasum CM (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* **22**, 19-34.

[3] Pervaiz S (2003). Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J* **17**, 1975-1985.

[4] Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, *et al* (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-220.

[5] Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, y Guittet O (1998). Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* **421**, 277-279.

[6] Sun NJ, Woo SH, Cassady JM, y Snapka RM (2003). DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. *J Nat Prod* **66**, 734.

- [7] **Stewart JR, Ward NE, Ioannides CG, y O'Brian CA (1999)**. Resveratrol preferentially inhibits protein kinase C-catalyzed phosphorylation of a cofactor-independent, arginine-rich protein substrate by a novel mechanism. *Biochemistry* **38**, 13244-13251.
- 5 [8] **Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, y Dannenberg AJ (1998)**. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **273**, 21875-21882.
- [9] **Sauer H, Wartenberg M, y Hescheler J (2001)**. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* **11**, 173-186.
- 10 [10] **Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, y Pervaiz S (1998)**. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling- dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* **92**, 996-1002.
- 15 [11] **She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, y Dong Z (2001)**. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res* **61**, 1604-1610.
- [12] **Tinhofer I, Bernhard D, Senfter M, Anether G, Loeffler M, Kroemer G, Kofler R, Csordas A, y Greil R (2001)**. Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *FASEB J* **15**, 1613-1615.
- 20 [13] **Scarlati F, Sala G, Somenzi G, Signorelli P, Sacchi N, y Ghidoni R (2003)**. Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling. *FASEB J* **17**, 2339-2341.
- 25 [14] **Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Bano MC, Obrador E, y Estrela JM (2002)**. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med* **33**, 387-398.
- [15] **Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E, et al (2001)**. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem* **276**, 22586-22594.
- 30 [16] **Rimando AM, Cuendet M, Desmarchelier C, Mehta RG, Pezzuto JM, y Duke SO (2002)**. Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J Agric Food Chem* **50**, 3453-3457.
- 35 [17] **Lamson DW, y Brignall MS (2000)**. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern Med Rev* **5**, 196-208.
- [18] **Tuck KL, Tan HW, y Hayball PJ (2000)**. A simple procedure for the deuteration of phenols. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **43**, 817-823.
- 40 [19] **Navarro J, Obrador E, Pellicer JA, Aseni M, Vina J, y Estrela JM (1997)**. Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic Biol Med* **22**, 1203-1209.
- [20] **Carretero J, Obrador E, Esteve JM, Ortega A, Pellicer JA, Sempere FV, y Estrela JM (2001)**. Tumoricidal activity of endothelial cells. Inhibition of endothelial nitric oxide production abrogates tumor cytotoxicity induced by hepatic sinusoidal endothelium in response to B16 melanoma adhesion *in vitro*. *J Biol Chem* **276**, 25775- 25782.
- 45 [21] **Anasagasti MJ, Martin JJ, Mendoza L, Obrador E, Estrela JM, McCuskey RS, y Vidal-Vanaclocha F (1998)**. Glutathione protects metastatic melanoma cells against oxidative stress in the murine hepatic microvasculature. *Hepatology* **27**, 1249-1256.
- 50 [22] **Carretero J, Obrador E, Anasagasti MJ, Martin JJ, Vidal-Vanaclocha F, y Estrela JM (1999)**. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* **17**, 567-574.
- 55 [23] **Ohigashi H, Shinkai K, Mukai M, Ishikawa O, Imaoka S, Iwanaga T, y Akedo H (1989)**. *In vitro* invasion of endothelial cell monolayer by rat ascites hepatoma cells. *Jpn J Cancer Res* **80**, 818-821.
- [24] **Braman RS, y Hendrix SA (1989)**. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem* **61**, 2715-2718.
- 60 [25] **Okahara H, Yagita H, Miyake K, y Okumura K (1994)**. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res* **54**, 3233-3236.
- 65 [26] **Obrador E, Carretero J, Esteve JM, Pellicer JA, Pascual A, Petschen I, y Estrela JM (2001)**. Glutamine potentiates TNF-alpha-induced tumor cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* **31**, 642-650.

- [27] **Eissa S, y Seada LS (1998)**. Quantitation of bcl-2 protein in bladder cancer tissue by enzyme immunoassay: comparison with Western blot and immunohistochemistry. *Clin Chem* **44**, 1423-1429.
- [28] **Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, y Willett WC (1996)**. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* **125**, 384-389.
- [29] **Day AJ, Bao Y, Morgan MR, y Williamson G (2000)**. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med* **29**, 1234-1243.
- [30] **Goldberg DM, Van J, y Soleas GJ (2003)**. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* **36**, 79-87.
- [31] **Off FW, Wang HR, Lafrenie RM, Scherbarth S, y Nance DM (2000)**. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol* **190**, 310-329.
- [32] **Burdon RH (1995)**. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* **18**, 775-794.
- [33] **Fremont L (2000)**. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* **66**, 663-673.
- [34] **Bravo L (1998)**. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* **56**, 317-333.
- [35] **Walle T (2004)**. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* **36**, 829-837.
- [36] **Davies KJ (1995)**. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* **61**, 1-31.

Descripción de la invención

A los efectos de la invención por PTER y QUER se debe entender también cualquier sal farmacéuticamente aceptable, particularmente los sulfatos de ambos polifenoles, así como los glucurónidos de cualquiera de los susodichos polifenoles.

La biodisponibilidad y la eficacia biológica *in vivo* son factores críticos que deben correlacionarse antes de sacar ninguna conclusión sobre los beneficios potenciales para la salud de los polifenoles (14, 30, 33, 34). Como se muestra en la Fig. 2, donde se estudió el efecto de t-RESV, t-PTER, o QUER, la inhibición de la proliferación de las células B16M-F10 *in vitro* fue más potente en presencia de t-PTER + QUER. Las concentraciones biodisponibles de PTER y QUER, medidas en plasma después de la administración oral, no consiguieron inhibir el crecimiento de células B16M-F10, incluso en los casos en que las concentraciones de estos polifenoles fueron constantes a lo largo del tiempo de cultivo, véase Ejemplo 2. Sin embargo, las concentraciones biodisponibles de PTER o QUER, medidas en plasma después de la administración i.v. (véase la Fig. 1), inhibieron el crecimiento tumoral hasta en un 56%, incluso en los casos en que ambos polifenoles estaban presentes sólo durante 60 minutos por cada 24 horas de cultivo (Fig. 2), sin incrementar la tasa de muerte celular (la viabilidad celular siguió siendo > 95%, como en los controles, en todos los casos).

Basándonos en estos hechos, sobre las diferencias de biodisponibilidad, y sobre los datos mostrados en la Fig. 2, seleccionamos la combinación de PTER + QUER para estudiar su efecto sobre la progresión metastática. Como se muestra en la Tabla 3, se investigó el efecto de t-PTER, QUER, t-RESV, o sus combinaciones sobre la interacción *in vitro* entre las células B16M-F10 y el endotelio vascular. De forma paralela al efecto sobre el crecimiento tumoral (Fig. 2), la asociación entre PTER + QUER fue la que mostró mejor capacidad para disminuir (en aproximadamente un 74%) la formación de colonias tumorales en un ensayo de invasión *in vitro* (Tabla 3).

Para demostrar que polifenoles naturales tales como el t-PTER y la QUER inhiben el crecimiento metastático *in vivo* de un tumor altamente maligno y aumentan la supervivencia del portador, utilizamos la administración i.v. diaria de dosis elevadas (20 mg/kg de peso corporal administrados una sola vez al día). Sin embargo, en este punto se pueden considerar diferentes protocolos posibles. Por ejemplo, si demostrara ser más efectivo, y no tóxico para los seres humanos, se podrían elevar las dosis.

De hecho, el t-RESV inhibe la expresión de VCAM-1 a concentraciones muy bajas (1 μ M) (14). No obstante, como han señalado Goldberg y colaboradores (30) y teniendo en cuenta el metabolismo *in vivo* de estos pequeños polifenoles (ver por ejemplo 34-35), investigaciones de esta naturaleza deberían centrarse en los beneficios de sus conjugados (por ejemplo glucurónidos y sulfatos). Es más, las dosis requeridas para inhibir el crecimiento de metástasis puede depender del tipo de célula. En conclusión, nuestros hallazgos ponen de manifiesto las aplicaciones de las asociaciones de los polifenoles reivindicados en la terapia contra el cáncer. Es más, puesto que la administración de estas combinaciones podría en general combinarse con bioterapia, fármacos citotóxicos y/o radiaciones ionizantes, los mecanismos descritos en la invención pueden tener aplicaciones útiles para mejorar la terapia contra el melanoma metastático y, posiblemente, contra otros tipos de tumores malignos.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1

5 Niveles en plasma de Pterostilbeno y Quercetina

Animales y Administración “in Vivo” de Polifenoles

Los ratones (C57BL/6J, machos, 6-8 semanas) eran de Charles River España (Barcelona). Los procedimientos
 10 y cuidado de animales se realizaron en conformidad con normativas institucionales y cumpliendo leyes y políticas
 nacionales e internacionales (Directiva 86/609, OJ L 358. 1 del Consejo de la Comunidad Europea, de 12 de diciembre
 de 1987) y la “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (“Guía para el Cuidado y la Utilización de Animales
 de Laboratorio”) del Instituto Nacional de la Salud (NIH, EE.UU.) (Publicación del NIH nº 85-23, 1985). A todos los
 animales se les alimentó siguiendo dietas concentradas de laboratorio (Letica, Barcelona, España) permitiéndoles
 15 libre acceso a los alimentos y sometiéndoles a un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad con temperatura
 ambiente a 22°C. Los experimentos se comenzaron a las 10.00 a.m. para minimizar los efectos de las variaciones
 diurnas.

Para los estudios farmacocinéticos y para el tratamiento diario se administró a los ratones i.v. (vía vena yugular
 20 donde, previamente, se había fijado por medios quirúrgicos un catéter permanente; la administración i.v. se realizó
 lentamente durante 1 minuto), u oralmente (vía tubo intragástrico), 20 mg/kg de t-PTER (disueltos en etanol 0,5 ml/Kg
 de peso de animal) o QUER (disueltos en dimetilsulfóxido:solución salina fisiológica, 1:0,5 0,15 ml/Kg de peso).
 En general, las composiciones a base de una combinación de PTER y QUER pueden contener como excipientes los
 anteriormente consignados o cualquier otro farmacéuticamente aceptable. La presentación de dichas composiciones
 25 pueden ser en forma de sólidos como tabletas, cápsulas, pellets, píldoras, etc. y presentaciones líquidas como gotas,
 jarabes, inyectables, etc... Sin embargo, cualquiera de las arriba referidas a formas de administración oral están
 excluidas de la invención, tal como se reivindica. Asimismo, los principios activos (PTER y QUER) de la composición
 pueden presentarse en sus formas libres o en forma de sales farmacéuticamente aceptables. El t-PTER se sintetizó en
 nuestro laboratorio siguiendo reacciones estandarizadas de Wittig y Heck (www.orgsyn.org), mientras que la QUER
 30 se obtuvo de Sigma Chemical Co. (San Luis, MO, USA). El ³H-t-PTER (2,2 Ci/mmol), marcado en las posiciones
orto y *para* de los anillos bencénicos, se preparó en nuestro laboratorio siguiendo un método similar al utilizado para
 la deuteración de fenoles (18). La ¹⁴C-QUER (50 mCi/mmol), marcada en la posición 4 del anillo C se obtuvo del NCI
 Radiochemical Carcinogen Repository de Chemsyn Laboratories (Kansas City, MO, USA). La radiactividad se midió
 utilizando un analizador Varisette 2700 TR de Packard. La sangre se recogió por medio del catéter en jeringuillas de
 35 1 ml que contenían heparina sódica (0,05 ml de una solución al 5% en NaCl al 6,9%). El plasma y los eritrocitos se
 separaron como se ha descrito previamente (19).

Determinación de Pterostilbeno y Quercetina por Cromatografía Líquida y Espectrometría de Masas (LC-MS/MS)

La LC-MS/MS se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quattro Micro (Micro-
 40 mass, Manchester, UK) equipado con una bomba LC-10Advp, un sistema de control SLC-10Avp y un autoinyector
 SIL-10Advp de Shimadzu. Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa
 utilizando una columna Prodigy ODS (100 x 2 mm) de Phenomenex (Torrance, CA, USA), con un tamaño de partícula
 de 3 µm. En todos los casos se inyectaron en la columna 40 µl. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C. Se
 45 utilizó el siguiente sistema de gradiente, bombeado a través de la columna a 0,2 ml/minuto (min/%A/%B/%C) (A,
 metanol; B, 10% de acetonitrilo y 90% de formiato amónico 10 mM pH 3,75; C, formiato amónico 10 mM pH 3,75):
 0/5/5/90, 10/5/5/90, 20/5/90/5, 30/100/0/0, 40/5/5/90. Los espectros de masas en tándem de iones negativos obtenidos
 mediante electrospray se registraron con el capilar de electrospray fijado a 3,5 keV y a una temperatura del bloque de
 origen de 120°C. Como gas nebulizador y de secado se utilizó nitrógeno con flujos de 300 y 30 l/h, respectivamente.
 50 Como gas de colisión para la disociación inducida por colisión se utilizó argón a 1,5 x 10⁻³ mbares. Se realizó un
 ensayo basado en LC-MS/MS con el seguimiento de múltiples reacciones utilizando las transiciones m/z 255-240 para
 el PTER y 300-151 para la QUER, los cuales representan en ambos casos rutas de fragmentación favorables para estas
 moléculas desprotonadas. Las curvas de calibración se obtuvieron utilizando un patrón de PTER o QUER (0,01-100
 µM) y en cada caso se encontró que eran lineales con coeficientes de correlación >0,99. Los límites de detección y
 55 cuantificación de nuestro método fueron de 0,01 µM.

Dependiendo de los hábitos dietéticos la ingesta humana de flavonas y flavonoles (los flavonoides más comunes)
 es ~3-70 mg/día, de los que entre un 60 y un 70% es de QUER [las principales fuentes incluyen té, vino, bayas,
 60 manzanas y cebollas (28)]. Sin embargo, no hay informes sobre estimaciones respecto a la ingesta de PTER, el cual
 está presente por ejemplo en extractos del duramen de *P. marsupium*, y es utilizado en la medicina ayurvédica para el
 tratamiento de la diabetes, y en la uva negra (aunque los estudios cuantitativos han demostrado que por cada 10 partes
 de RESV, hay sólo 1-2 partes de PTER) (16 y referencias contenidas en ella). Como se muestra en la Fig. 1, después
 de la administración i.v. a ratones de 20 mg/Kg de t-PTER o QUER (una dosis que representa para un humano adulto
 de 70 kg de peso corporal ~1000 veces la cantidad máxima de PTER encontrada en un kg de uva negra, y ~20 veces
 65 la ingesta diaria máxima de QUER), su concentración más elevada en plasma (~95 µM de PTER y ~46 µM de QUER
 5 minutos después de su administración) disminuye hasta ~1 µM en 120 minutos la QUER y 480 minutos el PTER.
 Siguiendo un protocolo idéntico encontramos previamente que la concentración más elevada de QUER en plasma ~43
 µM (5 minutos después de la administración i.v. a conejos) disminuye hasta ~1 µM en 60 minutos (14). Calculamos

una semivida del RESV en plasma de ratón de ~10,2 minutos (Estrela *et al.*, datos no publicados). A partir de los datos de la Fig. 1 calculamos una semivida del PTER y la QUER de ~77,9 y 20,1 minutos, respectivamente (véase la Fig. 1). Los niveles de PTER y QUER en sangre total de ratones no fueron significativamente diferentes de los mencionados anteriormente para el caso del plasma. Al menos 99% del PTER medido en plasma o sangre estaba en la forma *trans*.

A modo de comparación, se administró también oralmente t-PTER o QUER (20 mg/kg). Se administró una mezcla de ³H-t-PTER (5 μ Ci/ratón) y t-PTER sin marcar o de ¹⁴C-QUER (2 μ Ci/ratón) y QUER sin marcar, con el fin de diferenciar entre polifenoles libres no modificados y sus metabolitos/conjugados generados *in vivo*. Para el cálculo de las formas libres realizamos medidas mediante LC/MS-MS (véase la metodología descrita anteriormente en este documento). Tras aplicar las correcciones correspondientes por diluciones, la radioactividad de las muestras que contenían sólo PTER o QUER libres se sustrajo de la radioactividad total medida en una muestra equivalente de plasma. Como se muestra en la Tabla 1, después de la administración oral, los niveles en plasma de PTER y QUER mostraron unos picos a los 60 y 10 minutos, respectivamente. Sin embargo, los niveles totales de PTER y QUER (polifenoles libres sin modificar más sus metabolitos y formas conjugadas) fueron muy diferentes. La concentración total de PTER fue > 10 μ M entre los 30 y 240 minutos tras su administración, mientras que los niveles de QUER total sólo permanecieron > 1 μ M dentro de los primeros 10 minutos (Tabla 1). Durante estos periodos de tiempo, el PTER libre representó un % pequeño del total (15-35%), mientras que la QUER libre (exceptuando los primeros 5 minutos) fue casi indetectable (0,5%) (Tabla 1).

TABLA 1

Niveles en plasma de pterostilbeno y quercetina después de su administración oral a ratones

Tiempo (minutos)	PTER		QUER	
	(μ M)	(% libre)	(μ M)	(% libre)
5	2,9 \pm 0,6	67 \pm 13	1,6 \pm 0,3	22 \pm 6
10	6,6 \pm 1,8*	50 \pm 10	2,3 \pm 0,7	< 0,5 *
30	11,1 \pm 3,0*	35 \pm 5*	0,6 \pm 0,2*	< 0,5 *
60	18,2 \pm 2,7*	17 \pm 6*	0,2 \pm 0,1*	< 0,5 *
120	13,3 \pm 3,4*	15 \pm 3*	0,07 \pm 0,01*	< 0,5 *
240	10,6 \pm 1,2*	16 \pm 4*	0,05 \pm 0,02*	< 0,5 *
480	7,1 \pm 0,8*	14 \pm 4*	0,05 \pm 0,02*	< 0,5 *
720	1,6 \pm 0,5*	12 \pm 2*	0,04 \pm 0,01*	< 0,5*
1440	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Los animales se trataron con 20 mg/Kg de peso corporal de t-PTER o QUER. Para cada punto temporal se sacrificó un grupo de 6-7 ratones. No detectable = n.d. *P<0,01 comparando los datos obtenidos a los 10-1440 minutos con los hallados 5 minutos después de la administración del polifenol.

Niveles Extravasculares de Pterostilbeno y Quercetina

Con el fin de complementar la farmacocinética en plasma/sangre evaluamos también la biodisponibilidad en tejidos extravasculares del PTER y la QUER. Como se muestra en la Tabla 2, después de su administración i.v. a ratones, el contenido más elevado de PTER y QUER en cerebro, pulmón, hígado y riñón se encontró dentro de los primeros 5 minutos tras la administración (Tabla 2). Por ello, parece que ambos polifenoles no se acumulan extravascularmente y que su presencia en diferentes tejidos (Tabla 2) es paralela en el tiempo a su biodisponibilidad en el torrente sanguíneo (Fig. 1).

TABLA 2

Niveles extravasculares de pterostilbeno y quercetina después de la administración intravenosa a ratones

5

10

15

Tiempo (min)	Cerebro		Pulmón		Hígado		Riñón	
	PTER	QUER	PTER	QUER	PTER	QUER	PTER	QUER
5	5 ± 1	4 ± 1	36 ± 6	15 ± 3	14 ± 4	9 ± 3	3 ± 1	1 ± 0,2
10	2 ± 0,5*	2 ± 0,4*	15 ± 3*	8 ± 2*	7 ± 1*	3 ± 1*	3 ± 0,3	1 ± 0,5
30	n.d.	n.d.	6 ± 1*	2 ± 0,6*	3 ± 0,5*	1 ± 0,2*	2 ± 0,4*	n.d.
60	n.d.	n.d.	2 ± 1*	n.d.	n.d.	n.d.	1 ± 0,3*	n.d.

20

Se trató a los animales con t-PTER o QUER (20 mg/Kg, que contenían 5 μ Ci de 3 H-t-PTER o 2 μ Ci 14 C-QUER). Para cada punto temporal se sacrificó un grupo de 4-5 ratones. No detectable = n.d. *P<0,01 comparando los datos obtenidos a los 10-60 minutos con los hallados 5 minutos después de la administración del polifenol.

Ejemplo 2

25

Inhibición del Crecimiento de Células de Melanoma B16 "in Vitro"

Cultivo de Células Tumorales

30

Se cultivaron células B16M-F10 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco Labs., Grand Island, NY, USA), pH 7,4, suplementado con suero fetal al 10% (Gibco), HEPES 10 mM, NaHCO₃ 40 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (20).

35

40

45

50

55

60

65

El melanoma B16M-F10, altamente agresivo, es un modelo ampliamente utilizado para estudiar la diseminación metastática y la invasión de tejidos (21), y por esta razón se seleccionó para nuestros estudios. En el primer grupo de experimentos se estudió el efecto *in vitro* de t-PTER + QUER sobre el crecimiento de células B16M-F10. Para reproducir las condiciones *in vivo* después de la administración i.v., incubamos células B16M-F10 en presencia de t-PTER (40 μ M) y/o QUER (20 μ M) durante un periodo limitado (60 minutos) (esto representa un valor aproximado a la media de las concentraciones de PTER y QUER medidas en plasma durante la primera hora tras la administración i.v. de 20 mg/kg de cada polifenol (Fig. 2). A modo de comparación, utilizamos también t-RESV (12 μ M; para seleccionar esta concentración se siguió un criterio similar, véanse los datos citados en la ref. 14). Los polifenoles se añadieron al medio de incubación cada 24 horas y, como se indica, estuvieron presentes sólo durante 60 minutos. Como se muestra en la Fig. 2, el t-PTER y la QUER inhibieron el crecimiento de B16M-F10 un 40 y un 19%, respectivamente. Sin embargo, cuando ambos estuvieron presentes la inhibición del crecimiento se incrementó hasta ~ un 56%, lo que sugiere un efecto aditivo (en presencia de t-PTER + QUER ~ 77,7% de las células se acumularon en G0/G1, mientras que ~ 13,2% y 9,1% estaban en las fases S y G2/M, respectivamente; además, los controles, que estaban creciendo exponencialmente, mostraron una distribución del ciclo celular de ~ 58,0% en G0/G1, 22,4% en S y 19,6% en G2/M; n=6 en ambos casos; la viabilidad celular siguió siendo > 95% en todos los casos). En nuestras condiciones experimentales el t-RESV no afectó significativamente la tasa de crecimiento de células tumorales (Fig. 2). Es más, el t-RESV no afectó significativamente al % de inhibición del crecimiento de B16M-F10 promovido por t-PTER + QUER (Fig. 2).

También a modo de comparación, incubamos células B16M-F10 en presencia de t-PTER + QUER a concentraciones que representen un valor medio aproximado del nivel total de cada polifenol medido en plasma en la primera hora después de la administración oral (11 μ M de PTER y 1 μ M de QUER) (véase la Tabla 1). Ambos polifenoles, como formas libres, estuvieron presentes de forma constante en el medio de incubación. Aunque tanto el PTER como la QUER sufren transformaciones metabólicas después de la administración oral, el uso de formas libres es un planteamiento válido puesto que no es esperable que sus metabolitos/conjugados muestren una actividad antitumoral más potente (veanse por ejemplo las refs. 29-30). Sin embargo, en estas condiciones el t-PTER (11 μ M) y/o QUER (1 μ M) no afectaron significativamente a las tasas de control del crecimiento de las células B16M-F10 *in vitro* (tasas similares de control que corresponden a las de la Fig. 2).

Los niveles totales de polifenoles libres añadidos al medio de incubación no cambiaron a lo largo del tiempo de cultivo indicando que las células cancerosas no metabolizaron el t-PTER o la QUER.

Ejemplo 3

*Interacción entre las Células de Melanoma B16 y las Células Endoteliales “in Vitro”*5 *Aislamiento y Cultivo de Endotelio Sinusoidal Hepático*

Se utilizaron ratones C57BL/6J (machos de 10 a 12 semanas de edad) de IFFA Credo (L'Arbreole, Francia). El endotelio sinusoidal hepático (HSE) se separó e identificó tal y como se ha descrito previamente (20). Las células sinusoidales se separaron en un gradiente de metrizamida al 17,5% (p/v). Los cultivos de HSE se estabilizaron y se mantuvieron en DMEM libre de pirógenos suplementado como se describió anteriormente para las células B16M-F10. La adhesión diferencial de las células endoteliales a la matriz de colágeno y el lavado permitieron una eliminación completa de otros tipos de células sinusoidales (de Kupffer, estrelladas, linfocitos) de los frascos de cultivo.

15 *Ensayos de Adhesión y de Citotoxicidad entre Células de Melanoma B16 y Células Endoteliales*

Las células B16M-F10 se marcaron con acetoximetiléster de 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6)-carboxifluoresceína (BCECF-AM; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (se incubaron, durante 20 minutos a 37°C, 10^6 células en 1 ml de DMEM tamponado con HEPES que contenía 50 μg de BCECF-AM y 5 μl de DMSO). Después de lavar, las células que contenían BCECF-AM se resuspendieron en DMEM tamponado con HEPES sin rojo fenol a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml y se añadieron (0,2 ml/pocillo) al cultivo de células endoteliales (sembradas 24 horas antes), así como, a pocillos de plástico y controles previamente tratados con colágeno. Las placas se incubaron entonces a 37°C y, 20 minutos más tarde, se lavaron los pocillos tres veces con medio fresco, para a continuación leer su fluorescencia utilizando un Fluoroskan Ascent FL (Labsystems, Manchester, UK). El número de células tumorales adheridas se cuantificó mediante unidades arbitrarias de fluorescencia basadas en el porcentaje con respecto al número inicial de células B16M-F10 añadidas al cultivo de HSE (20). El daño causado a las células B16M-F10 durante su adhesión *in vitro* al HSE se evaluó tal y como se describió previamente (21) utilizando células tumorales marcadas con calceína-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). La integridad de las células B16M-F10 cultivadas en solitario se evaluó mediante la exclusión del azul tripano y midiendo la actividad lactato deshidrogenasa liberada al medio extracelular (22). Los otros reactivos utilizados en los experimentos de citotoxicidad tumoral fueron de Sigma.

30 *Citoquinas*

El TNF- α murino recombinante (2×10^7 U/mg de proteína) y el interferón- γ murino recombinante (IFN- γ ; 10^5 U/mg de proteína) se obtuvieron de Sigma. Las soluciones concentradas (5×10^5 U TNF- α /ml y 25×10^4 U IFN- γ /ml) se diluyeron en solución salina fisiológica estéril (NaCl al 0,9%), ajustada a pH 7,0, y almacenada a 4°C.

Ensayo de Invasión “in Vitro” de la Monocapa de Células Endoteliales Hepáticas por Células de Melanoma B16

El ensayo de invasión de la monocapa de células endoteliales por células B16M-F10 se realizó de acuerdo con el método de Ohgashi *et al.* (23) con algunas modificaciones. Las células HSE se sembraron en placas de cultivo con rejillas recubiertas con gelatina (1%). Cuando las células alcanzaron la confluencia, se reemplazó el medio de cultivo con medio de reciente preparación. Tras 2 horas de incubación, se lavaron los cultivos con DMEM y luego se sembraron las células B16M-F10 sobre las células de HSE, manteniendo el cultivo durante 5 días. La capacidad de invasión de las células B16M-F10 se midió contando el número de colonias por 1 cm^2 formadas bajo la monocapa de HSE utilizando un microscopio de contraste de fases.

Medida de H_2O_2 , nitrito y nitrato

El ensayo de la producción de H_2O_2 se basó en la oxidación del ácido homovanílico (ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético), dependiente de H_2O_2 y mediada por la peroxidasa de rábano, para dar un dímero altamente fluorescente (ácido 2,2'-dihidroxidifenil-5,5'-diacético) (20). Con este propósito se cultivaron las células en presencia de ácido homovanílico 100 μM y 1 U de peroxidasa de rábano/ml. Se obtuvo una relación lineal entre la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 312 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 420 \text{ nm}$) y la cantidad de H_2O_2 en el intervalo de 0,1-12 nmoles por cada 2 ml de muestra de ensayo.

Las determinaciones de nitrito y nitrato se llevaron a cabo utilizando la metodología de Braman y Hendrix (24). Brevemente, se determinaron los niveles de NO_2^- mediante la detección por quimioluminiscencia de NO en presencia de yoduro/ácido acético (que reduce el NO_2^- , y no el NO_3^- , a NO). Las determinaciones de NO_x total (NO_2^- más NO_3^-) se realizaron midiendo la generación de NO en muestras sometidas a una solución en ebullición de VCl_3/HCl (que reducirá tanto el NO_2^- como el NO_3^- a NO). La determinación de los niveles de NO_3^- se llevó a cabo sustrayendo el valor de NO_2^- del valor del NO_x . La cuantificación se efectuó utilizando una curva patrón obtenida a partir de cantidades conocidas de NO_2^- y NO_3^- .

65 *Citometría de Flujo*

La expresión de las moléculas de adhesión intercelular se analizó mediante citometría de flujo (25). A tal efecto, se incubaron, durante 1 hora a 4°C, células B16M-F10 (1×10^6) con 1 μg de un anticuerpo monoclonal (tipo IgG2b de rata, clon PS/2 de Serotec, Oxford, UK) contra el antígeno de activación muy tardía 4 (VLA-4) de ratón. El HSE

ES 2 323 721 T3

(1 x 10⁶ células) se incubó con 2 µg de un anticuerpo monoclonal (tipo IgG de rata, kappa, clon M/K-2 de R & D Systems, MN, USA) contra la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) de ratón. Se lavaron dos veces con PBS las células B16M-F10 y de HSE y luego se trataron, durante 1 hora a 4°C, con un anticuerpo de cabra contra inmunoglobulinas de rata marcado con isotiocianato de fluoresceína (Serotec). Después de lavar dos veces con PBS, se analizaron las células utilizando un separador celular activado por fluorescencia (FACscan, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). La proliferación y/o viabilidad de las células B16M-F10 y de HSE no se vieron afectadas por estos anticuerpos monoclonales (incluso tras añadir hasta 100 µg de anticuerpo/ml de medio de cultivo) (datos no mostrados).

Además del efecto de PTER + QUER sobre el crecimiento tumoral, investigamos el potencial antimetastático. Primero se estudió *in vitro* la interacción de células B16M-F10 y el HSE. Basándonos en los resultados obtenidos anteriormente, seleccionamos la exposición durante periodos cortos (60 minutos) de las células metastásicas a los polifenoles (a las concentraciones medidas en plasma después de su administración i.v.). Puesto que la interacción de las células metastásicas con las endoteliales y las de Kupffer activa la liberación local de citoquinas proinflamatorias [facilitadoras de la adhesión de las células cancerosas al endotelio y de la invasión (14, 31)] investigamos el efecto de los polifenoles sobre la adhesión de las células B16M-F10 al HSE en presencia de TNF-α e IFN-γ, esta combinación de citoquinas induce una activación máxima del HSE (ver la ref. 20 y las referencias contenidas en ella) (Tabla 3). Tal como se ha descrito anteriormente el t-RESV inhibe la adhesión de células tumorales al endotelio (~47%) sin incrementar la citotoxicidad inducida por el HSE sobre las células metastásicas (14). Se encontró un efecto similar (~60% de inhibición de la adhesión) en presencia de t-PTER (Tabla 3). Por el contrario, la QUER incrementó la muerte de células B16M-F10 inducida por el HSE (~48%) pero sin afectar a la tasa de adhesión (Tabla 3). Como se muestra en la Tabla 3, combinando t-PTER + QUER obtuvimos el % más bajo de adhesión de células B16M-F10 al HSE y el % más alto de citotoxicidad en las células cancerosas adheridas. Ensayando la invasión *in vitro* de las monocapas de células hepáticas endoteliales por células B16M-F10, encontramos una marcada disminución (~74%) en el número de colonias formadas en presencia de t-PTER y QUER (Tabla 3).

TABLA 3

Efecto de la exposición durante tiempos cortos a resveratrol, pterostilbeno y/o quercetina sobre la interacción in vitro entre las células B16M-F10 y el endotelio vascular

Adiciones	Células tumorales		Número de colonias penetradas por cm ²
	Adhesión (%)	Citotoxicidad (% de células adheridas)	
Ninguna	100 ± 15	15 ± 2	157 ± 17
RESV	53 ± 7**	12 ± 3	104 ± 12**
PTER	40 ± 6**	19 ± 3*	89 ± 9**
QUER	98 ± 11	52 ± 6**	106 ± 15**
RESV + PTER	32 ± 4**	17 ± 4	77 ± 8**
RESV + QUER	55 ± 7**	55 ± 7**	70 ± 7**
PTER + QUER	37 ± 5**	54 ± 5**	41 ± 5**

Se cocultivaron células HSE, cultivadas previamente durante 24 horas [± polifenol(es), añadido(s) a las 12 horas de la siembra y eliminados mediante lavado 60 minutos más tarde], con células B16M-F10 cultivadas previamente durante 72 horas [± polifenol(es), como en la Fig. 2]. Se añadieron citoquinas [100 unidades de TNF-α/ml y 50 unidades de IFN-γ/ml, véase (20)] o el vehículo (solución salina fisiológica) a los medios de cultivo 12 horas antes de comenzar con los cocultivos. La proporción de adhesión de las células tumorales al HSE fue ~ 1:1 en los cultivos tratados con citoquinas en ausencia de polifenoles (a este valor se le asignó una tasa de adhesión del 100%). En los experimentos de adhesión entre células B16M-F10 y endoteliales, 20 minutos después de la adición de las B16M-F10 al HSE, se lavaron las placas tal como se ha descrito en la metodología. En los ensayos de citotoxicidad inducida por el endotelio sobre las B16M-F10, se determinó el daño tumoral (expresado como el % de células tumorales que perdieron viabilidad durante el período de 4-6 horas incubación, véase la metodología) tras de 6 horas de incubación. Durante

el periodo de incubación de 6 horas el % de viabilidad de las células de HSE fue 99-100% en todos los casos. Todos los ensayos se llevaron a cabo en ausencia o en presencia de t-RESV (12 μ M), t-PTER (40 μ M), y/o QUER (20 μ M). Los valores representan medias \pm DS de 5-6 experimentos diferentes en cada caso. *P<0,05, **P<0,01 comparando las incubaciones en presencia y en ausencia de polifenol(es).

La adhesión de células B16M-F10 al HSE induce la liberación de NO y H₂O₂ del endotelio, lo que causa muerte en parte de las células metastásicas (20). Previamente observamos que el H₂O₂ no era citotóxico en ausencia de NO, sin embargo, la citotoxicidad tumoral inducida por NO fue incrementada por H₂O₂ debido a la formación de potentes oxidantes tales como radicales \cdot OH y \cdot ONOO por un proceso dependiente de iones metálicos (20). Durante la interacción de B16M-F10 y HSE en presencia de t-PTER y QUER (ambos presentes x 60 minutos como en la Tabla 3), el NO_x acumulado en el medio de cultivo durante un período de 3 horas no fue significativamente diferente al de los controles (7,5 \pm 1,3 nmoles/10⁶ células; n=6). Por otro lado, el t-PTER y la QUER disminuyeron la generación de H₂O₂ de 70 \pm 12 nmoles/10⁶ células (controles) a 34 \pm 10 nmoles/10⁶ células (n=5-6 en ambos casos, P>0,01). De ello se induce que el potencial antioxidante de estos polifenoles debería contribuir, al menos parcialmente, a frenar la citotoxicidad inducida por el HSE sobre las B16M-F10. Aunque, obviamente, otros mecanismos activados por t-PTER y/o QUER están favoreciendo la disminución de la actividad metastásica (Tabla 3). En este sentido, puesto que el H₂O₂ puede actuar como mensajero intracelular promoviendo el crecimiento (32), al menos en parte, la inhibición del crecimiento tumoral inducida por t-PTER y QUER (Fig. 2) podría explicarse por una disminución de las señales intracelulares dependientes del H₂O₂.

Ejemplo 4

Crecimiento de Metástasis en el Hígado

RT-PCR y Detección de la Expresión de mRNA

El aislamiento del RNA total se realizó con trizol (Invitrogen, San Diego, CA, USA). El cDNA se obtuvo utilizando un hexámero y el kit con transcriptasa inversa MultiScribe siguiendo las instrucciones del fabricante (TaqMan RT Reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para realizar la PCR cuantitativa se utilizaron la polimerasa de DNA AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) con cebadores específicos: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.

La cuantificación de la transcripción de cada mRNA se llevó a cabo con SYBR Green I y un sistema de detección iCycler (Biorad, Hercules, CA, USA), relativizándolo al mRNA de la gliceraldehído-3P-deshidrogenasa (GAPDH). Los cDNA diana se amplificaron en tubos separados utilizando las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C durante 30 segundos; apareamiento y extensión a 60°C durante 1 minuto por ciclo). El incremento en la fluorescencia se midió a tiempo real durante la etapa de extensión. Se determinó el ciclo umbral (C_T), y luego se calculó la expresión relativa al gen como: cambio de expresión = 2^{- $\Delta(\Delta C_T)$} , donde ΔC_T = C_T diana - C_T GAPCH, y $\Delta(\Delta C_T)$ = ΔC_T tratado - ΔC_T control.

Transferencia y análisis del gen bcl-2

Se utilizó el sistema de expresión de genes Tet-off (Clontech, Palo Alto, CA, USA) para insertar el gen bcl-2 de ratón y transfectar las células B16M-F10, tal y como se ha descrito previamente (26) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína Bcl-2 se cuantificó en la fracción citosólica soluble mediante inmunoensayo enzimático (27) utilizando un test basado en un anticuerpo monoclonal de Sigma (San Luis, MO, USA) (se definió una unidad de Bcl-2 como la cantidad de proteína Bcl-2 en 1000 células B16M-F10 no transfectadas).

Metástasis experimentales

Se provocaron metástasis hepáticas mediante inoculaciones i.v. (vena portal), en ratones anestesiados (Nembutal, 50 mg/kg i.p.), de 4 x 10⁵ células B16M-F10 viables suspendidas en 0,2 ml de DMEM. Los ratones fueron sacrificados 10 días después de la inoculación por dislocación cervical. Los hígados se fijaron por inmersión durante 24 horas a 22°C en formaldehído al 10% en PBS (pH 7,4), y posteriormente se incluyeron en parafina. La densidad de metástasis (número medio de focos/100 mm³ de hígado detectados en quince secciones de 10 x 10 mm² por hígado) y el volumen de metástasis (% medio de volumen hepático ocupado por metástasis) se determinaron como se ha descrito anteriormente (22).

Presentación de los Resultados y Significancia Estadística

Los datos se presentan como media \pm DS correspondientes al número indicado de diferentes experimentos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando la prueba t de Student y los valores de P <0,05 se consideraron significativos.

Esta metodología permite el estudio bien *in vivo* del efecto del PTER y la QUER. Con este propósito, se inocularon en ratones células control B16M-F10 o B16M-F10/Tet-Bcl-2 que sobreexpresaban Bcl-2. Ambos subgrupos de

ES 2 323 721 T3

células se cultivaron previamente en ausencia o en presencia de t-PTER y QUER. Se cultivaron células B16M-F10 durante 72 horas. Se añadió t-RESV (12 μ M), t-PTER (40 μ M), y QUER (20 μ M) a las 6, 30 y 54 horas de tiempo de cultivo, y estuvieron presentes en cada caso durante sólo 60 minutos. Luego se eliminaron de los frascos de cultivo mediante lavado (3 veces con PBS) y se renovó el medio. Los niveles de Bcl-2 en las células B16M-F10 control y tratadas con Tet-Bcl-2 fueron 24 ± 5 y 105 ± 14 unidades/mg de proteína, respectivamente ($n=5$ en cada caso, $P<0,01$). El número de células adheridas presentado en la tabla se calculó a los 60 minutos postinyección (no se encontraron diferencias significativas cuando las medidas se realizaron a 30, 120, 180, 240 o 360 minutos postinyección, datos no mostrados). El número de células intactas se calculó a las 6 horas postinyección. Los datos de experimentos *in vivo* de microscopía son medias \pm DS correspondientes a 4-5 experimentos diferentes. El crecimiento de metástasis en el hígado se evaluó como se indica en el apartado correspondiente de la descripción, y en este caso los ratones se trataron diariamente (x 10 días) con t-PTER y/o QUER (20 mg/Kg de peso corporal) administrados i.v. (los datos son medias \pm DS correspondientes a 25 ratones por grupo). Un procedimiento similar e igual número de ratones por grupo se utilizaron para evaluar la supervivencia de los animales portadores. La prueba de significancia se refiere, en todos los grupos, a la comparación entre los casos de PTER y/o QUER y los casos sin adiciones (* $P<0,05$ y ** $P<0,01$), y también a la comparación entre las células B16M-F10/Tet-Bcl-2 con las células control B16M-F10 (⁺ $P<0,05$, ⁺⁺ $P<0,01$). Como se muestra en la Tabla 4, el t-PTER y la QUER disminuyeron los niveles intracelulares de Bcl-2 y el número de células B16M-F10 y B16M-F10/Tet-Bcl-2 adheridas al endotelio. Sin embargo, dadas las diferencias en el nivel de Bcl-2 entre ambos subgrupos celulares, el t-PTER y la QUER sólo disminuyeron el % de células adheridas e intactas en el caso de las células B16M-F10 control (Tabla 4). En consecuencia, aunque los ratones sin tratar, a los que se habían inoculado células B16M-F10 o B16M-F10/Tet-Bcl-2, mostraron tasas similares de crecimiento metastático en el hígado y una supervivencia similar del huésped, el efecto de la administración diaria i.v. de t-PTER y QUER fue más evidente en las células control B16M-F10: un 74% de disminución en la densidad y volumen de metástasis y un incremento de 2 veces en la supervivencia del huésped portador (Tabla 4). Esta es la primera vez que la administración combinada *in vivo* de polifenoles naturales induce una inhibición del crecimiento metastático de un tumor altamente maligno y el aumento en la supervivencia del portador. Como se observa en la mencionada Tabla 4, PTER y QUER, por separado, también disminuyen la densidad y el volumen de la metástasis, pero su combinación produce un efecto sinérgico sobre el tumor superior al 100% si tomamos como base la acción respectiva de cada uno por separado. Por el contrario, por separado, ninguno de estos compuestos incrementó significativamente la supervivencia de las células huésped, frente a la duplicación de la tasa de supervivencia observada mediante la acción combinada de ambos polifenoles.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 4

Crecimiento de metástasis en el hígado de ratones a los que se inyectaron intraesplénicamente células B16M-F10 tratadas con PTER y QUER y que contenían diferentes niveles de Bcl-2

		Melanoma		
	Adiciones	B16M-F10	B16M-F10/ter-Bcl-2	
5 10 15	Niveles intracelulares de Bcl-2 antes de la inoculación (unidades/mg proteína)	NINGUNA		160 ± 25^{**}
		PTER	35 ± 5	151 ± 18 ^{**}
		QUER	21 ± 4 ^{**}	125 ± 13 ^{***}
		PTER + QUER	9 ± 3 ^{**} 7 ± 2 ^{**}	118 ± 16 ^{****}
20	Nº de células adheridas al HSE (número medio por lóbulo)	NINGUNA	45 ± 7	42 ± 6
		PTER	20 ± 5 ^{**}	21 ± 4 ^{**}
		QUER	46 ± 9	40 ± 7
		PTER + QUER	18 ± 4 ^{**}	17 ± 3 ^{**}
25 30	Células intactas (% de células adheridas al HSE)	NINGUNA	83 ± 14	85 ± 13
		PTER	85 ± 17	91 ± 20
		QUER	52 ± 8 ^{**}	87 ± 13 ^{**}
		PTER + QUER	48 ± 10 ^{**}	90 ± 17 ^{**}
35	Densidad de metástasis (nº de focos/100 mm³)	NINGUNA	27 ± 5	29 ± 5
		PTER	18 ± 4 ^{**}	15 ± 3 ^{**}
		QUER	15 ± 4 ^{**}	26 ± 516 ^{**}
		PTER + QUER	7 ± 2 ^{**}	20 ± 4 ^{***}
40	Volumen de metástasis (% de volumen hepático)	NINGUNA	22 ± 4	25 ± 6
		PTER	14 ± 4 ^{**}	15 ± 3 ^{**}
		QUER	12 ± 3 ^{**}	24 ± 5 ^{**}
		PTER + QUER	6 ± 2 ^{**}	19 ± 5 ^{**}
45 50	Supervivencia del portador (días)	NINGUNA	13 ± 2	12 ± 1
		PTER	15 ± 2	12 ± 2
		QUER	15 ± 1	13 ± 2
		PTER + QUER	27 ± 3 ^{**}	14 ± 2 ^{**}

Descripción de las figuras

55 Fig. 1. Niveles en plasma y vida-media del pterostilbeno y la quercetina después de su administración intravenosa a ratones.

60 Los animales se trataron con t-PTER (círculos vacíos) o QUER (círculos negros) (20 mg/Kg de peso corporal). Los niveles en plasma se determinaron como se explica en la descripción. Los resultados son medias ± DS correspondientes a 5-6 ratones por cada punto en el tiempo, medido en minutos (abcisas). En el recuadro se representa lo mismo a escala logarítmica.

65 Fig. 2. Inhibición *in vitro* del crecimiento de células B16M-F10 mediante exposiciones de corta duración a resveratrol (RESV), pterostilbeno (PTER) y/o quercetina (QUER).

Todos los puntos son medias ± DS correspondientes a 5-6 experimentos independientes. *P<0,05, **P<0,01 por comparación con los valores control.

Referencias citadas en la descripción

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 20030054357 A [0002]
- WO 0234262 A [0002]

Literatura no patente citada en la descripción

• **YANG CS; LANDAU JM; HUANG MT; NEW-MARK HL**, Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*, 2001, vol. 21, 381-406 [0005]

• **ROSS JA; KASUM CM**. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*; 2002, vol. 22, 19-34 [0005]

• **PERVAIZ S**. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J*, 2003, vol. 17, 1975-1985 [0005]

• **JANG M; CAI L; UDEANI GO; SLOWING KV; THOMAS CF; BEECHER CW; FONG HH; FARNSWORTH NR; KINGHORN AD; MEHTA RG et al.** Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997, vol. 275, 218-220 [0005]

• **FONTECAVEM; LEPOIVRE M; ELLEINGAND E; GEREZ C; GUITTET O**. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett*, 1998, vol. 421, 277-279 [0005]

• **SUN NJ; WOOSH; CASSADY JM; SNAPKA RM**. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. *J Nat Prod*, 2003, vol. 66, 734 [0005]

• **STEWART JR; WARD NE; IOANNIDES CG; O'BRIAN CA**. Resveratrol preferentially inhibits protein kinase C-catalyzed phosphorylation of a cofactor-independent, arginine-rich protein substrate by a novel mechanism. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, 13244-13251 [0005]

• **SUBBARAMAIAH K; CHUNG WJ; MICHALUART P; TELANG N; TANABE T; INOUE H; JANG M; PEZZUTO JM; DANNENBERG AJ**. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cell *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, 21875-21882 [0005]

• **SAUER H; WARTENBERG M; HESCHELER J**. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 2001, vol. 11, 173-188 [0005]

• **CLEMENT MV; HIRPARA JL; CHAWDHURY SH; PERVAIZ S**. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 1998, vol. 92, 996-1002 [0005]

• **SHE QB; BODE AM; MA WY; CHEN NY; DONG Z** Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res*, 2001, vol. 61, 1604-1610 [0005]

• **TINHOFFER I; BERNHARD D; SENFTER M; ANETHER G; LOEFFLER M; KROEMER G; KOFLER R; CSORDAS A; GREIL R**. Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondria pathway controlled by Bcl-2. *FASEB J*, 2001, vol. 15, 1613-1615 [0005]

• **SCARLATTI F; SALA G; SOMENZI G; SIGNORELLI P; SACCHI N; GHIDONI R**. Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling. *FASEB J*, 2003, vol. 17, 2339-2341 [0005]

• **ASENSI M; MEDINA I; ORTEGA A; CARRETERO J; BANO MC; OBRADOR E; ESTRELA JM**. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med*, 2002, vol. 33, 387-398 [0005]

• **STIVALA LA; SAVIO M; CARAFOLI F; PERUCCAP; BIANCHI L; MAGA G; FORTI L; PAGNONI UM; ALBINI A; PROSPERI E et al.** Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem*; 2001, vol. 276, 22588-22594 [0005]

- **RIMANDO AM; CUENDET M; DESMARCHELIER C; MEHTA RG; PEZZUTO JM; DUKE SO.** Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J Agric Food Chem*, 2002, vol. 50, 3453-3467 [0005]
- 5 • **LAMSON DW; BRIGNALL MS.** Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern Med Rev*, 2000, vol. 5 (19610), 208 [0005]
- **TUCK KL; TAN HW; HAYBALL PJ.** A simple procedure for the deuteration of phenols. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2000, vol. 43, 817-823 [0005]
- 10 • **NAVARRO J; OBRADOR E; PELLICER JA; ASENI M; VINA J; ESTRELA JM.** Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic Biol Med*, 1997, vol. 22, 1203-1209 [0005]
- **CARRETERO J; OBRADOR E; ESTEVEV JM; ORTEGA A; PELLICER JA; SEMPERE FV; ESTRELA JM.** Tumoricidal activity of endothelial cells. Inhibition of endothelial nitric oxide production abrogates tumor cytotoxicity induced by hepatic sinusoidal endothelium in response to B16 melanoma adhesion *in vitro*. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 25775-25782 [0005]
- 15 • **CARRETERO J; OBRADOR E; ESTEVEV JM; ORTEGA A; PELLICER JA; SEMPERE FV; ESTRELA JM.** Tumoricidal activity of endothelial cells. Inhibition of endothelial nitric oxide production abrogates tumor cytotoxicity induced by hepatic sinusoidal endothelium in response to B16 melanoma adhesion *in vitro*. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 25775-25782 [0005]
- **ANASAGASTI MJ; MARTIN JJ; MENDOZA L; OBRADOR E; ESTRELA JM; MCCUSKEY RS; VIDAL-VANACLOCHAF.** Glutathione protects metastatic melanoma cells against oxidative stress in the murine hepatic microvasculature. *Hepatology*, 1998, vol. 27, 1249-1256 [0005]
- 20 • **CARRETERO J; OBRADOR E; ANASAGASTI MJ; MARTIN JJ; VIDAL-VANACLOCHA F; ESTRELA JM.** Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*, 1999, vol. 17, 567-574 [0005]
- 25 • **OHIGASHI H; SHINKAI K; MUKAI M; ISHIKAWA O; IMAOKA S; IWANAGA T; AKEDO H.** *In vitro* invasion of endothelial cell monolayer by rat ascites hepatoma cells. *Jpn J Cancer Res*, 1989, vol. 80, 818-821 [0005]
- **BRAMAN RS; HENDRIX SA.** Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem*, 1989, vol. 61, 2715-2718 [0005]
- 30 • **BRAMAN RS; HENDRIX SA.** Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem*, 1989, vol. 61, 2715-2718 [0005]
- **OKAHARA H; YAGITA H; MIYAKE K; OKUMURA K.** Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res*, 1994, vol. 54, 3233-3238 [0005]
- 35 • **OKAHARA H; YAGITA H; MIYAKE K; OKUMURA K.** Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res*, 1994, vol. 54, 3233-3238 [0005]
- **OBRADOR E; CARRETERO J; ESTEVE JM; PELLICER JA; PASCUAL A; PETSCHEN I; ESTRELA JM.** Glutamine potentiates TNT-alpha-induced tumor cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*, 2001, vol. 31, 642-650 [0005]
- 40 • **OBRADOR E; CARRETERO J; ESTEVE JM; PELLICER JA; PASCUAL A; PETSCHEN I; ESTRELA JM.** Glutamine potentiates TNT-alpha-induced tumor cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*, 2001, vol. 31, 642-650 [0005]
- **EISSA S; SEADA LS.** Quantitation of bc12 protein in bladder cancer tissue by enzyme immunoassay: comparison with Western blot and immunohistochemistry. *Clin Chem*, 1998, vol. 44, 1423-1429 [0005]
- **RIMM EB; KATAN MB; ASCHERIO A; STAWPFER MJ; WILLETT WC.** Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med*, 1996, vol. 125, 384-389 [0005]
- 45 • **RIMM EB; KATAN MB; ASCHERIO A; STAWPFER MJ; WILLETT WC.** Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med*, 1996, vol. 125, 384-389 [0005]
- **DAY AJ; BAO Y; MORGAN MR; WILLIAMSON G.** Conjugation position of quercetin glucuronides and effects on biological activity. *Free Radic Biol Med*, 2000, vol. 29, 1234-1243 [0005]
- 50 • **DAY AJ; BAO Y; MORGAN MR; WILLIAMSON G.** Conjugation position of quercetin glucuronides and effects on biological activity. *Free Radic Biol Med*, 2000, vol. 29, 1234-1243 [0005]
- **GOLDBERG DM; VAN J; SOLEAS GJ.** Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem*, 2003, vol. 36, 79-87 [0005]
- **OFF FW; WANG HR; LAFRENIE RM; SCHERBARTH S; NANCE DM.** Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol*, 2000, vol. 190, 310-329 [0005]
- 55 • **OFF FW; WANG HR; LAFRENIE RM; SCHERBARTH S; NANCE DM.** Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol*, 2000, vol. 190, 310-329 [0005]
- **BURDON RH.** Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*, 1995, vol. 18, 775-794 [0006]
- 60 • **BURDON RH.** Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*, 1995, vol. 18, 775-794 [0006]
- **FREMONT L.** Biological effects of resveratrol. *Life Sci*, 2000, vol. 66, 663-673 [0005]
- **BRAVO L.** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev*, 1998, vol. 56, 317-333 [0005]
- 65 • **BRAVO L.** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev*, 1998, vol. 56, 317-333 [0005]
- **WALLE T.** Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 2004, vol. 36, 829-837 [0005]
- **DAVIES KJ.** Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, 1995, vol. 61, 131 [0005].

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una combinación de pteroestilbeno y quercetina (PTER + QUER), incluyendo las sales y los glucorónidos farmacéuticamente aceptables de los mismos, para la fabricación de un medicamento útil en el tratamiento del cáncer, **caracterizado** porque el medicamento fabricado se administra de forma intravenosa.

10 2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el medicamento fabricado contiene además de PTER y QUER, cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado** porque el medicamento fabricado es particularmente útil en el tratamiento de la metástasis de hígado.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

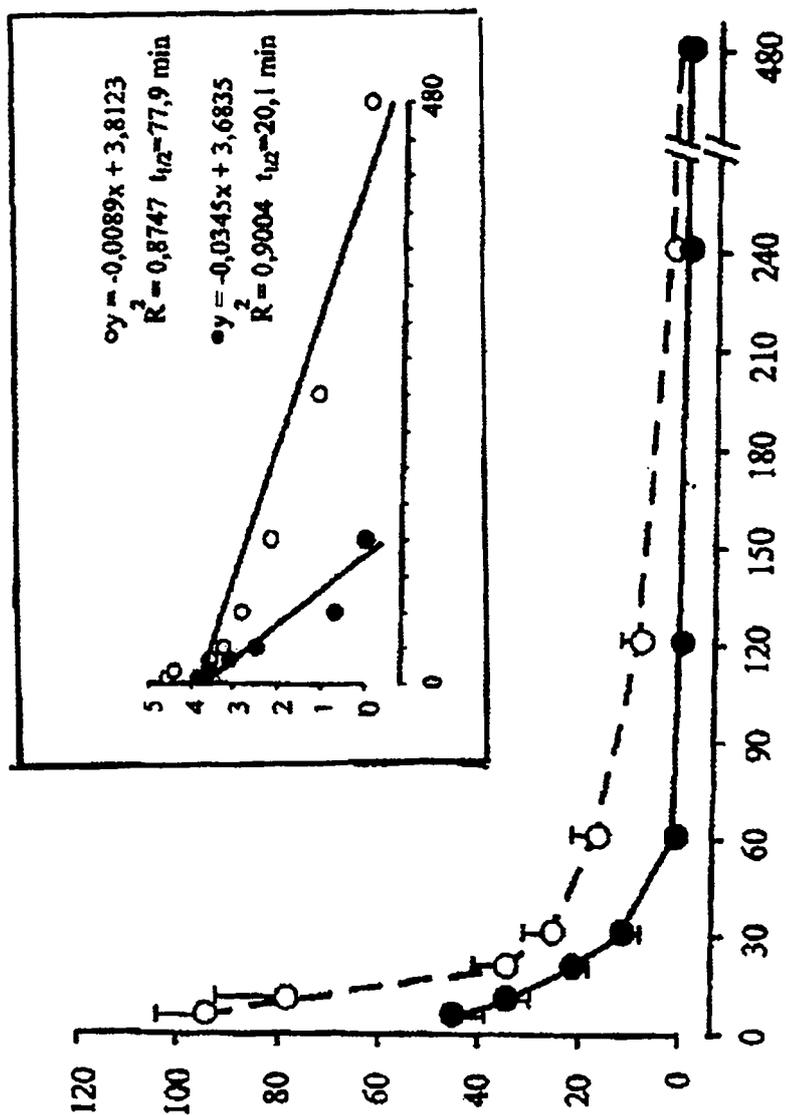


FIG. 1

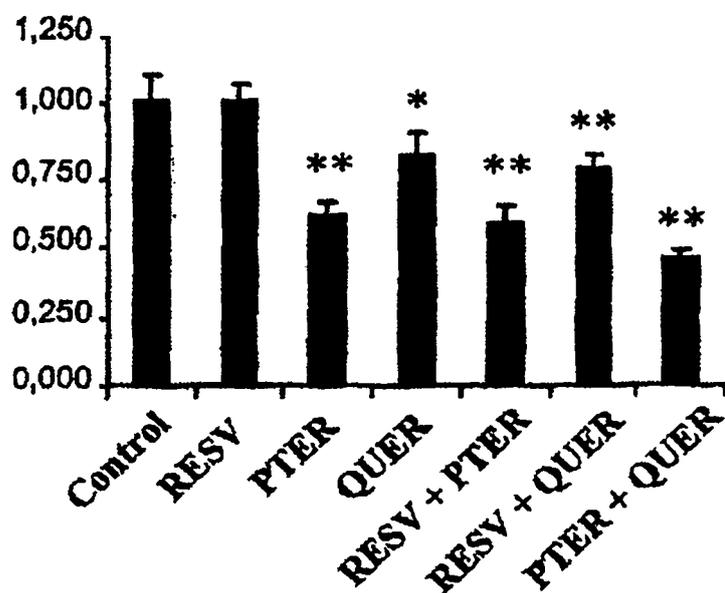


FIG. 2

ES 2 323 721 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> UNIVERSIDAD DE VALENCIA
- 5 <120> "USO COMBINADO DEL PTEROESTILBENO Y LA QUERCETINA PARA LA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS UTILES EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER".
- <130> CO-6684
- <160> 16
- 10 <210> 1
- <211> 23
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> Cebador
- 20 <223> BAX 5'-3'
- <400>
- 25 AAGCTGAGCGAGTGTCTCCGGCG
- <210> 2
- <211> 25
- 30 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 35 <221> Cebador
- <223> BAX 3'-5'
- <400>
- 40 GCCACAAAGATGGTCACTGTCTGCC
- <210> 3
- 45 <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
- <221> Cebador
- <223> BAK 5'-3'
- 55 <400>
- AGTGAGGGCAGAGGTGAGAGTICA
- 60 <210> 4
- <211> 25
- <212> ADN
- 65 <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 323 721 T3

<221> Cebador
<223> BAK 3'-5'

5 <400>

CACAGTTGCTTCTGCTGGAGTAGTT

10 <210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<221> Cebador
<223> BAD 5'-3'

20

<400>

CCAGTGATCTTCTGCTCCACATCCC

25

<210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<221> Cebador
<223> BAD 3'-5'

35

<400>

40

CAACTTAGCACAGGCACCCGAGGG

<210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<221> Cebador
<223> BID 5'-3'

50

<400>

55

ACAAGGCCATGCTGATAATGACAAT

60 <210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65

<220>
<221> Cebador

ES 2 323 721 T3

<223> BID 3'-5'
<400>
5 CAGATACTCAAGCTGAACGCAG
<210> 9
10 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<221> Cebador
<223> Bcl-2 5'-3'
20 <400>
CTCGTCGCTACCGTCGTGACTTCG
25 <210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<221> Cebador
<223> Bcl-2 3'-5'
35 <400>
CAGATGCCGGTTCAGGTACTIONCAGTC
40 <210> 11
<211> 23
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> Cebador
50 <223> Bcl-w 5'-3'
<400>
55 CGAGTTTGAGACCCGTTCCGCC
<210> 12
60 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
65 <220>
<221> Cebador
<223> Bcl-w 3'-5'

ES 2 323 721 T3

<400>

GCACTTGTCCCACCAAAGGCTCC

5

<210> 13

<211> 24

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

15 <223> Bcl-xL 5'-3'

<400>

20 TGGAGTAAACTGGGGGTCGCATCG

<210> 14

<211> 22

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <221> Cebador

<223> Bcl-xL 3'-5'

<400>

35

AGCCACCGTCATGCCCGTCAGG

<210> 15

40 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<221> Cebador

<223> Gliceraldehído-3P-deshidrogenasa 5'-3'

50

<400>

CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG

55

<210> 16

<211> 23

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

65 <223> Gliceraldehído-3P-deshidrogenasa 3'-5'

ES 2 323 721 T3

<400>

GGTCCTCAGTGTAGCCCAAGATG

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65