



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 114 815**

②① Número de solicitud: 9600884

⑤① Int. Cl.⁶: A61K 31/35

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **18.04.96**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.98**

Fecha de concesión: **22.12.98**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.99**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.02.99

⑦③ Titular/es: **Universitat de Valencia**
c/ L'Antiga de Senent, 11
Valencia, ES
Consiglio Nazionale delle Richerche

⑦② Inventor/es: **Alcaraz Tormo, M^a José;**
Ferrándiz Manglano, M^a Luisa;
García Pastor, Pablo;
Paya Peris, Miguel;
Terencio Silvestre, M^a Carmen;
Ubeda Pascual, Amalia;
De Rosa, Salvatore;
De Giulio, Alfonso;
Crispino, Antonio y
Iodice, Carmine

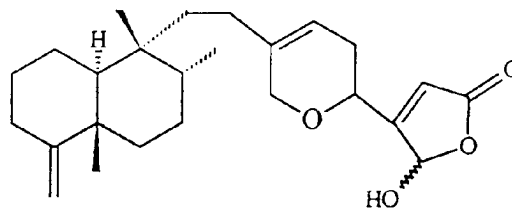
⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Cacospongionolida B, un antiinflamatorio inhibidor de fosfolipasa A₂ secretora humana.**

⑤⑦ Resumen:

El objeto de esta patente es aportar un nuevo agente antiinflamatorio con un mecanismo de acción diferente al que poseen los fármacos convencionales. Cacospongionolida B es un inhibidor *in vitro* de la enzima secretora fosfolipasa A₂ (PLA₂) sinovial humana (obtenida por recombinación genética). El compuesto posee selectividad por esta enzima, puesto que inhibe débilmente o carece totalmente de actividad sobre otras fosfolipasas A₂ secretoras, ciclo-oxigenasas y 5-lipoxigenasa. Las PLA₂ secretoras se liberan en el proceso inflamatorio, contribuyendo a la lesión celular característica de la inflamación.

Cacospongionolida B es también un inhibidor de la actividad PLA₂ *in vivo*, en el modelo de bolsa de aire+zimosán en rata. En otras pruebas *in vivo*, cacospongionolida B ha demostrado actividad antiinflamatoria en ratón, administrada por las vías oral o tópica. Cacospongionolida B también inhibe la migración leucocitaria en los modelos experimentales de inflamación.



Cacospongionolida B

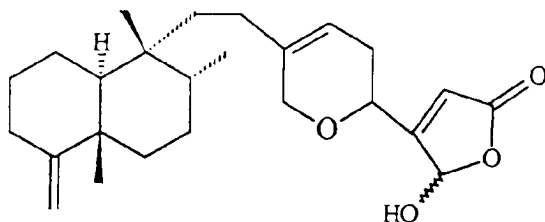
Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Cacospongionolida B, un antiinflamatorio inhibidor de fosfolipasa A₂ secretora humana.

Antecedentes

Cacospongionolida B, es un nuevo sesterterpeno aislado de la esponja *Fasciospongia cavernosa*, del mar Adriático. El aislamiento y caracterización estructural de este compuesto se han publicado en el artículo: De Rosa, S. *et al.* *J. Nat. Prod.* **58**, 1995, 1776-1780.



Cacospongionolida B

Resumen

El objeto de esta patente es aportar un nuevo agente antiinflamatorio con un mecanismo de acción diferente al que poseen los fármacos convencionales. Cacospongionolida B es un inhibidor *in vitro* de la enzima secretora fosfolipasa A₂ (PLA₂) sinovial humana (obtenida por recombinación genética). El compuesto posee selectividad por esta enzima, puesto que inhibe débilmente o carece totalmente de actividad sobre otras fosfolipasas A₂ secretoras, ciclo-oxigenasas y 5-lipoxigenasa. Las PLA₂ secretoras se liberan en el proceso inflamatorio, contribuyendo a la lesión celular característica de la inflamación.

Cacospongionolida B es también un inhibidor de la actividad PLA₂ *in vivo*, en el modelo de bolsa de aire+zimosán en rata. En otras pruebas *in vivo*, cacospongionolida B ha demostrado actividad antiinflamatoria en ratón, administrada por las vías oral o tópica. Cacospongionolida B también inhibe la migración leucocitaria en los modelos experimentales de inflamación.

En las pruebas *in vitro*, inhibe la actividad fosfolipasa A₂ sinovial recombinante humana, con una CI₅₀ de 4.3 μM, similar a la del inhibidor de referencia, manoalida (CI₅₀=3,9. μM). Cacospongionolida B es más selectivo que manoalida, puesto que posee un menor efecto sobre otras fosfolipasas A₂ secretoras: Veneno de abeja (% inhibición a 10 μM: 35,4±1,2 y 62,5±3,8% para cacospongionolida B y manoalida, respectivamente); no afecta la enzima de veneno de *Naja naja*, frente a un 17,0±1,7% de inhibición para manoalida, y en el exudado de bolsa de aire+zimosán en rata presenta un porcentaje de inhibición a 10 μM: de 36,9±1,4 y 38,4±0,5% para cacospongionolida B y manoalida, respectivamente. Cacospongionolida B no inhibe las actividades ciclo-oxigenasa-1 (microsomos de plaquetas humanas) ni ciclo-oxigenasa 2 (microsomos de leucocitos humanos tratados con lipopolisacárido), y es un débil inhibidor de 5-lipoxigenasa de sobrenadante de 100.000 g de neutrófilos humanos (36,7±8,8% de inhibición a 10 μM).

Métodos

1. *In vivo*

1.1 Edema auricular en ratón inducido por TPA

Se aplicaron 10 μl de una solución de 2.5 μg de TPA en 20 μl de acetona, a la parte interna y a la parte externa de la oreja derecha de ratones Swiss hembras (20-25 g). Los productos en estudio se administraron tópicamente antes de la aplicación de TPA. La oreja izquierda fue tratada solamente con acetona (control). Después de 4 horas los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y con un sacabocados se retiraron las secciones centrales de las orejas. La diferencia de peso entre la sección de la oreja derecha y la de la izquierda, para cada animal, indica el valor del edema (Carlson, R.P. *et al.* *Agents Actions* **17**, 1985, 197-204). Las secciones se homogeneizaron en 750 μl de suero fisiológico y se centrifugó a 10.000 g /15 min/ 4°C, para determinar en los sobrenadantes la actividad mieloperoxidasa, mediante una modificación del método de Suzuki previamente descrita (De Young, L.M. *et al.* *Agents Actions* **26**, 1989, 335-341).

1.2 Edema plantar en ratón inducido por carragenina

Según la técnica de Sugishita, E. *et al.* (*J. Pharmacobio-Dynam.* **4**, 1981, 565-575). Se utilizaron ratones Swiss hembras (20-25), mantenidos en ayuno 12 horas antes del experimento, con agua "ad libitum". Los fármacos o su vehículo (etanol, tween 80, agua destilada: 5/5/90, v/v/v) se administraron por vía oral (0,5 ml) 1 h antes de la inyección de carragenina (0,05 ml; 3% p/v en suero fisiológico) en la zona subplantar de la pata derecha. Los volúmenes de las patas derecha a izquierda se midieron a las 1, 3 y 5 h después de la inducción del edema mediante un pletismómetro (Ugo Basile). El volumen de edema se expresó como la diferencia entre los volúmenes de la pata derecha y la pata izquierda de cada animal.

1.3 Bolsa de aire en rata (RAP) tratada con zimosán

Ratas Wistar hembras de unos 150 g, fueron inyectadas s.c. en el dorso con 20 ml de aire estéril y 3 días más tarde, la cavidad fue reinflada con 10 ml más de aire estéril. Después de 3 días, se inyectó en la bolsa 1 ml de zimosán al 1% p/v en suero fisiológico+vehículo (10 μl etanol: grupo control) o 1 ml de zimosán al 1% p/v en suero fisiológico+compuesto en estudio (disuelto en 10 μl de etanol) a la dosis de 1 μmol/bolsa. Otro grupo recibió solamente 1 ml of suero fisiológico +vehículo (grupo suero). Después de 8 h, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se recogió el exudado de la bolsa, en 1 ml de suero fisiológico (Edwards, J.C.W. *et al.*, *J.*

Pathol. 134, 1981, 147-156). La migración leucocitaria se midió en un contador Coulter. El exudado se centrifugó a 1.200 g /4°C/ 10 min, y en los sobrenadantes se determinaron los niveles de mieloperoxidasa como se ha indicado anteriormente, de PGE₂ por radioinmunoensayo (Moroney, M.A. et al., *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 1988, 787-792), y la actividad PLA₂, siguiendo el método previamente publicado (Payá et al., *Br. J. Pharmacol.* 117, 1996, 1773-1779) citado en el apartado in vitro.

2. In vitro

2.1 Actividad PLA₂

Se utilizaron membranas de *Escherichia coli* CECT 101 marcadas con [³]-ácido oleico, según una modificación del método de Franson et al. (*J. Lipid Res.* 15, 1974, 380-388). La actividad PLA₂: veneno de abeja (0,05 U), veneno de *Naja naja* (0,1 U), RAP + zimosán (10 µl) y recombinante humana (0,03 µg proteína) en 10 µl de volumen fue preincubada 5 min a 37°C, con 250 µl de 100 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ pH 7,5 y 2,5 µl de solución del compuesto en estudio o su vehículo (metanol). Se incubó después 15 min a 37°C en presencia de 10 µl de membranas marcadas. Se detuvo la reacción al añadir 100 µl de una solución fría de albúmina sérica bovina al 0.25% en suero fisiológico, para dar una concentración final del 0,07% p/v. Se centrifugó a 2.500 g /10 min/ 4°C, y se determinó la radiactividad en los sobrenadantes mediante centelleo líquido (Payá et al., *Br. J. Pharmacol.* 117, 1996, 1773-1779).

2.2 Citotoxicidad en neutrófilos humanos

La liberación de lactato deshidrogenasa se determinó midiendo la oxidación de NADH (Bergmeyer, H.U. & Bernt, E, *Methods of enzymatic analysis*, 2nd Ed., ed. Bergmeyer, H.U., New York: Academic Press). Una serie de tubos con 0.5% Triton X-100 fueron utilizados para determinar el contenido celular total de LDH.

2.3 5-Lipoxigenasa

Se obtuvieron sobrenadantes (100.000 g) de neutrófilos humanos y se incubaron (50 µg de proteína/tubo) con ácido araquidónico (5 µM) durante 5 min a 37°C. Los niveles de LTB₄ se determinaron por radioinmunoensayo (Moroney, M.A. et al., *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 1988, 787-792)..

2.4 Ciclo-oxigenasa-1

Se obtuvieron microsomas de plaquetas humanas por centrifugación a 15.000 g /20 min/ 4°C y posterior centrifugación del sobrenadante a 100.000 g /100 min/ 4°C. Los microsomas (20 µg proteína/tubo) se incubaron 30 min a 37°C en 50 mM Tris HCl, pH 7,4 ácido araquidónico (5 µM) y compuesto o su vehículo, en presencia de 2 µM hematina y 1 mM L-triptófano. Los niveles

de TXB₂ se determinaron por radioinmunoensayo (Moroney, M.A. et al., *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 1988, 787-792).

2.5 Ciclo-oxigenasa-2

La fracción leucocitaria de sangre humana se suspendió en medio RPMI + ácido acetilsalicílico (30 µM) y se incubó a 37°C 15 min. Después de lavar dos veces los leucocitos, se resuspendieron en RPMI1640 con 10% de suero bovino fetal y se incubaron con lipopolisacárido de *E. coli* (10 µg/ml) a 37°C 4 h. Después de separar las células por centrifugación, fueron sonicadas a 4°C en un ultrasonicador a la máxima potencia y se obtuvo a continuación la fracción microsomal, como se ha indicado anteriormente. La reacción se realizó utilizando 40 µg de proteína microsoma por tubo, en las mismas condiciones descritas para el ensayo de ciclo-oxigenasa 1. Los niveles de PGE₂ se determinaron por radioinmunoensayo (Moroney, M.A. et al., *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 1988, 787-792).

3. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media ± ε y fueron sometidos al análisis de varianza, seguido del test de Dunnett para comparaciones múltiples. La Concentración Inhibitoria 50% (CI₅₀) fue calculada a partir del análisis de la regresión lineal.

Explicación de las figuras:

Figura 1: Efecto antiinflamatorio de cacospongionolida B frente a indometacina en el edema auricular inducido por TPA en ratón. (■) Control (grupo sin tratamiento); (⊞) grupos tratados con cacospongionolida B; (□) grupos tratados con indometacina.

Figura 2. Efecto antiinflamatorio de cacospongionolida B frente a indometacina en el edema plantar inducido por carragenina en ratón. Se indica el valor del edema medido 1, 3 y 5 horas después de la administración de carragenina. (■) Control (grupo sin tratamiento); (⊞) grupos tratados con cacospongionolida B; (□) grupos tratados con indometacina.

Figura 3. Efecto inhibitor de cacospongionolida B frente a manolida sobre la actividad fosfolipasa A₂ sinovial humana. (■) Manoalida; (▲) Cacospongionolida B.

Resultados

1. In vivo

1.1 Edema auricular en ratón inducido por TPA

Como se observa en la figura 1, cacospongionolida B en aplicación tópica, redujo de forma dosis-dependiente el edema inducido por TPA, siendo más potente que indometacina. A las dosis de 50 y 100 µg/oreja, produjo una inhibición de 43,4±4,8 y 54,6±4,5, respectivamente, ** P<0,01, n=6), mientras que indometacina produjo una inhibición de 14,0±1,3% (no significativa) y

37,0±5,0% (*, P<0,05, n=6) a 62,5 y 125 µg/oreja, respectivamente. Este producto marino también redujo la migración leucocitaria, puesto que inhibió los niveles de mieloperoxidasa presentes en homogenadas de oreja, con unos porcentajes de 64,3±7,2** y 70,9±6,3** (n=6), a 50 y 100 µg/oreja, frente a 46,6±1,7** y 77,4±10,4** (n=6), de la indometacina a 62,5 y 125 µg/oreja.

1.2 Edema plantar en ratón inducido por carragenina

La administración oral de 20 mg/kg de manoalida a ratones, una hora antes de la administración de carragenina, inhibió muy significativamente el edema plantar a las tres determinaciones realizadas, es decir, 1, 3 y 5 horas después de la inducción de la respuesta inflamatoria. Los efectos producidos fueron similares a los de indometacina a 10 mg/kg, en las determinaciones de las 3 y de las 5 horas. Sin embargo, 1 hora después de la inyección de carragenina, fue superior el efecto de cacospongionolida B (Figura 2).

1.3 Bolsa de aire en rata (RAP) tratada con zimosán

Según se indica en la tabla 1, cacospongionolida B a la dosis de 1 µmol/bolsa, redujo de forma muy significativa la migración leucocitaria y la actividad PLA₂ en el exudado de la bolsa. El primer parámetro fue inhibido en un 57,8±13,6% ** (n=6), mientras que el segundo lo fue en un 73,6±9,2% ** (n=6). El compuesto no afectó los niveles de mieloperoxidasa ni de PGE₂ en el exudado.

TABLA 1

Efecto de cacospongionolida B en la bolsa de aire en rata tratada con zimosán

	PLA ₂ (c.p.m./ml exudado)	Migración (cél.s.x 10 ⁶ /ml)
Suero	256,9±19,4**	36,2±8,2**
Zimosán	609,0±41,2	152,5±12,5
Cacospongionolida B	347,3±46,5**	86,5±16,8**
Los resultados son la media ± ε de n=6: * P<0,05; ** P<0,01, respecto al grupo de zimosán.		

2. In vitro

2.1 Actividad PLA₂

Cacospongionolida B inhibió débilmente la actividad PLA₂ de veneno de abeja y del exudado de RAP+zimosán, siendo totalmente inactiva sobre la enzima del veneno de *Naja naja* (Tabla 2).

TABLA 2

Efecto de cacospongionolida B y manoalida sobre la actividad PLA₂ in vitro

	% Inhibición	
	Veneno de abeja	Veneno de Naja naja
Manoalida		
10 µM	62,5±3,8**	17,0±1,7*
Cacospongionolida B		
10 µM	35,4±1,2**	0,0±0,0
	% Inhibición	
	RAP+ Zimosán	Sinovial humana
Manoalida		
10 µM	38,4±0,5**	93,2±0,2**
Cacospongionolida B		
10 µM	36,9±1,4**	86,7±2,5**
Los resultados son la media ± ε de n=6; * P<0,05; ** P<0,01. Los niveles de liberación de ácido oleico en el control fueron: 379,0±2,0, 274,6±3,2, 251,1±6,6 y 214,0±1,2 pmoles de ácido oleico/mg proteína de membranas, para las enzimas de veneno de abeja, veneno de <i>Naja naja</i> , RAP+zimosán y sinovial humana, respectivamente.		

Por el contrario, inhibió potentemente y de forma dependiente de la concentración la actividad sinovial recombinante humana (Figura 3), con un comportamiento similar al del inhibidor de referencia, manoalida, y con una CI₅₀ muy próxima a la de este compuesto; 4,3 µM y 3,0 µM para cacospongionolida B y manoalida, respectivamente.

2.2 Citotoxicidad de neutrófilos humanos

Cacospongionolida B produce un débil efecto citotóxico a la concentración 10µM, a la que presentó un 14,9±3,3% * de liberación de LDH.

2.3 5-Lipoxigenasa

La actividad 5-lipoxigenasa de neutrófilos humanos fue inhibida débilmente por cacospongionolida B a la concentración de 10 µM, con una inhibición de 36,7±8,8% ** (n=6), similar a la presentada por manoalida a la misma concentración (35,0±5,2% *; n=4). El grupo control liberó 18,7±0,9 ng/ml de LTB₄, mientras que en los tubos sin ácido araquidónico, la generación de este icosanoide fue de 0,3±0,2 ng/ml.

2.4 *Ciclo-oxigenasa-1*

Cacospongionolida B no inhibió significativamente esta actividad, a la concentración de 10 μ M.

2.5 *Ciclo-oxigenasa-2*

Tampoco se vió afectada esta actividad enzimática, en presencia de 10 μ ; de cacospongionolida B.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Utilización de Cacospongionolida B en la

fabricación de sustancias antiinflamatorias inhibidoras de fosfolipasa A₂ sinovial humana.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

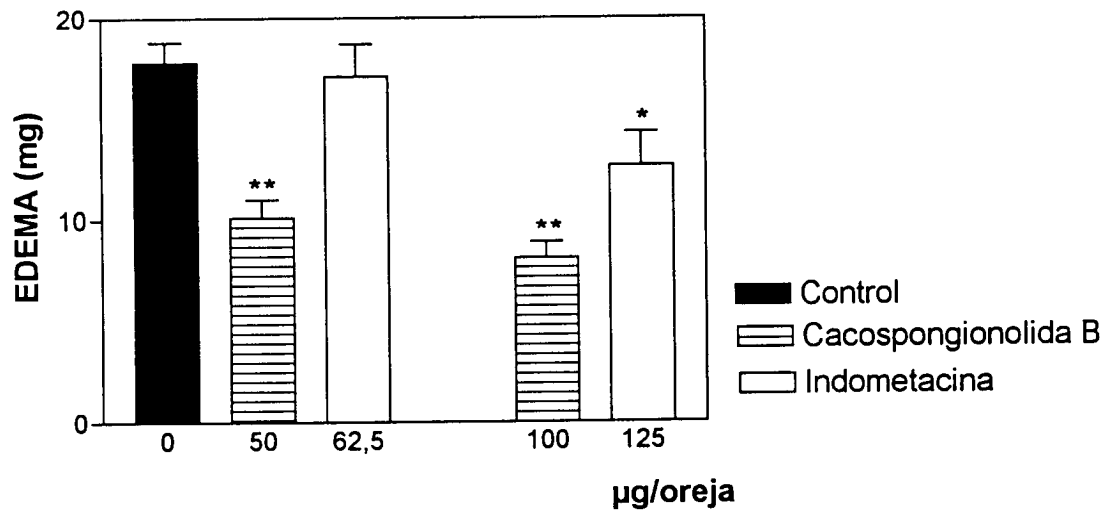


FIGURA 1

* P<0,05
** P<0,01

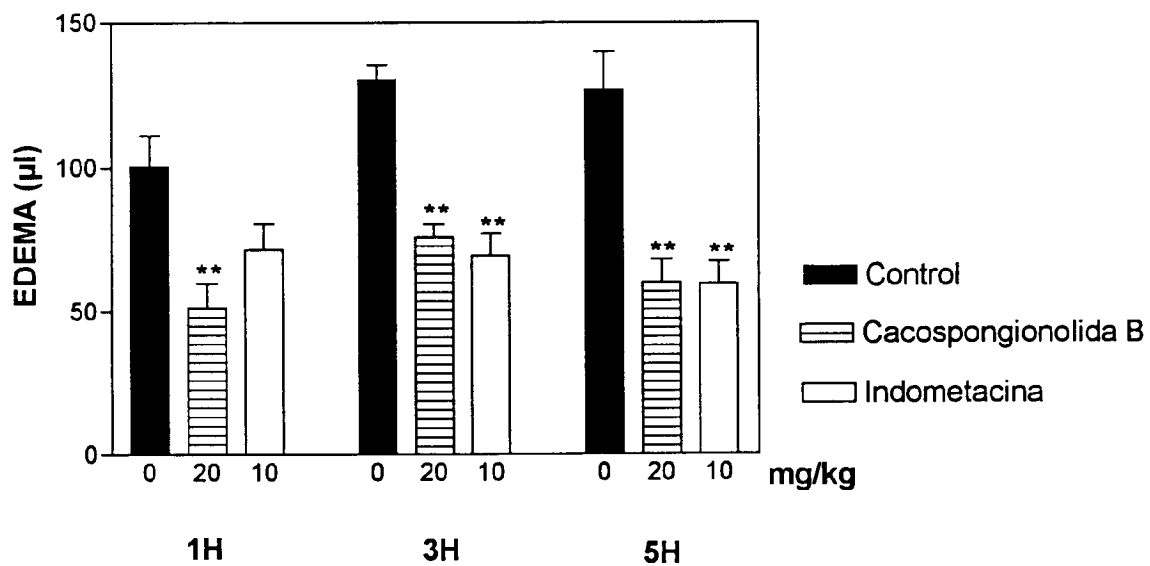


FIGURA 2

** P<0,01

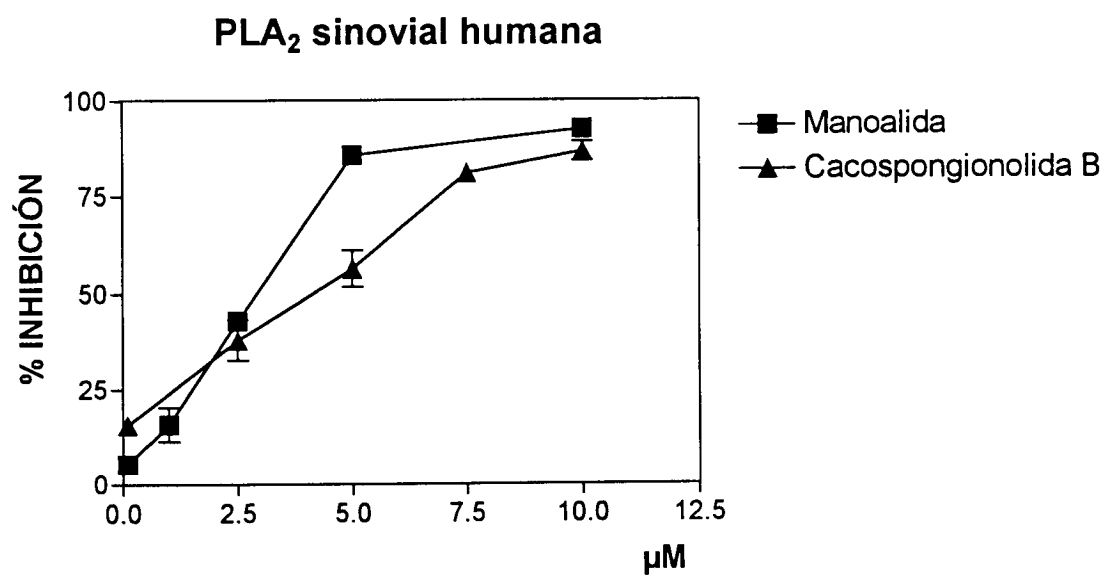


FIGURA 3



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: A61K 31/35

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DE ROSA, S. et al. "Cacospongionolide: A new antitumoral sesterterpene, from the marine sponge Cacospongia mollior", 1988, J. Org. Chem., Vol. 53, páginas 5020-5023 * Todo el documento *	1
A	DE ROSA, S. et al. "Cacospongionolide B, a new sesterterpene from the sponge Fasciospongia cavernosa", 1995, Journal of Natural Products, Vol. 58, páginas 1776-1780 * Todo el documento *	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

28.04.98

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1