



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 259 894**

② Número de solicitud: 200402944

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/35 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **10.12.2004**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2006**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.10.2006

⑥ Número de la solicitud inicial: **200301773**

⑦ Solicitante/s:
Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

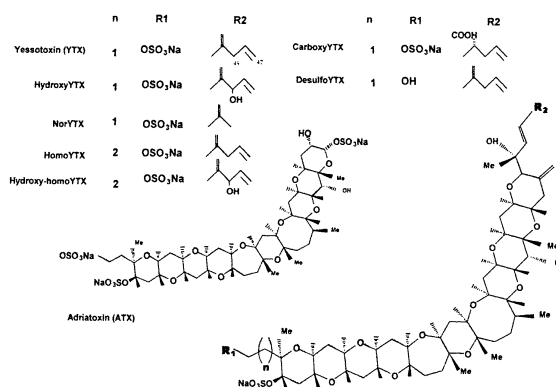
⑦ Inventor/es: **Botana López, Luis Miguel;**
Alfonso Rancaño, Amparo;
Rodríguez Vieytes, Mercedes y
Loza García, María Isabel

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Utilización terapéutica de las yessotoxinas como inhibidores del crecimiento de células tumorales humanas.**

⑤ Resumen:

Utilización terapéutica de las yessotoxinas como inhibidores del crecimiento de células tumorales humanas. El mecanismo de acción de la yessotoxina (YTX) y análogos está relacionado con la activación de las fosfodiesterasas celulares y, como consecuencia, con la disminución de los niveles citosólicos de AMPc. El resultado de esta activación, tras la administración de YTX, es una inhibición del crecimiento de células de hepatocarcinoma humano. Este efecto citotóxico de la YTX sobre células neoplásicas se puede utilizar como estrategia para desarrollar fármacos útiles en el tratamiento de procesos tumorales.



ES 2 259 894 A1

DESCRIPCIÓN

Utilización terapéutica de las yessotoxinas como inhibidores del crecimiento de células tumorales humanas.

La presente invención describe el uso terapéutico de la yessotoxina como agente citotóxico para células tumorales debido a su capacidad para activar las fosfodiesterasas celulares.

La yessotoxina, en adelante YTX, y sus análogos naturales son éteres policíclicos producidas por dinoflagelados de las especies *Protoceratium reticulatum* y *Lingulodinium polyendrum* y originariamente aislados del aparato digestivo de *Patinopecten yessoensis* (Murata, M., Kumagai, M. *et al.*, 1987, *Tetrahedron Letters*, 28, 5869-5872). Su molécula, representada en la Figura 1, está formada por once anillos con grupos éter y una cadena lateral insaturada que lleva unidos diferentes radicales. En esta figura se muestran algunos de los análogos de la YTX, aunque existen más de 50 derivados naturales.

La YTX es un compuesto de naturaleza lipofílica que no resulta tóxico cuando es ingerido por vía oral (Aune, T., Sorby, R. *et al.*, 2002, *Toxicon*, 40, 77-82); sin embargo, produce la muerte tras una inyección intraperitoneal (Tubaro, A., Sosa, S. *et al.*, 2003, *Toxicon*, 41, 783-92), aunque para ello sea necesaria una dosis muy elevada.

Las YTX y sus análogos presentan un mecanismo de acción diferente al de cualquier otra toxina. Originariamente se clasificaron dentro del grupo de las toxinas diarreas, ya que a menudo se detectan juntas; sin embargo, se diferencian en que no producen diarrea, ni afectan a las fosfatasa celulares que son la diana celular de las toxinas diarreas. Su mecanismo de acción se relaciona con otros enzimas; en este sentido se ha descrito que la YTX disminuye los niveles citosólicos del fosfato de adenosina cíclico (AMPc) porque incrementa la actividad de las fosfodiesterasas celulares por un mecanismo dependiente de calcio (Alfonso, A., de la Rosa, L.A. *et al.*, 2003, *Biochem Pharmacol*, 65, 193-208). Además, la YTX incrementa los niveles citosólicos de calcio al estimular su entrada a través de un canal situado en la membrana celular (De la Rosa, L.A., Alfonso, A. *et al.*, 2001, *Biochem. Pharmacol.*, 61, 827-833; De la Rosa, L.A., Alfonso, A. *et al.*, 2001, *Cell Signal*, 13, 711-716). El efecto sobre las fosfodiesterasas ha sido utilizado para desarrollar métodos sensibles, recientemente publicados, para detectar la presencia de estas toxinas en moluscos contaminados (Alfonso, A., Vieytes, M.R. *et al.*, 2004, *Analytical Biochem.*, 326, 93-99; Pazos, M.J., Alfonso, A. *et al.*, 2004, *Analytical Biochem.*, 335, 112-118). Existen once familias de fosfodiesterasas que desde el punto de vista farmacológico son muy importantes puesto que su modulación está implicada en el tratamiento de enfermedades como el asma, la artritis reumatoide y el cáncer (Houslay, M.D. and Adams, D.R., 2003, *Biochem J.*, 370, 1-18).

La YTX induce apoptosis, muerte celular programada, en células de neuroblastoma humano y en células de carcinoma de cuello uterino humano (línea HeLa) por activación de la caspasa (Leira, F., Alvarez, C. *et al.*, 2001, *Toxicology in vitro*, 15, 277-283; Malaguti, C., Ciminello, P. *et al.*, 2002, *Toxicol in Vitro*, 16, 357-363). Además, esta toxina tiene un efecto citotóxico sobre células de carcinoma hepatocelular humano (HEP-G2) y células HeLa229, por lo tanto

a priori es susceptible de ser utilizada como fármaco antitumoral.

La ruta del AMPc, tanto por los niveles de este segundo mensajero, como por la activación que produce sobre la proteína cinasa A, está implicada en la proliferación celular. La inhibición de la proteína cinasa A da lugar a actividad antitumoral (Wang, H., Cai, Q. *et al.*, 1999, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13989-94), aunque también se ha descrito que la resistencia a fármacos antitumorales, como el cisplatino, se relaciona con la inactivación de esta proteína (Cvijic, M.E., Yang, W.L. *et al.*, 1998, *Pharmacol Ther*, 78, 115-28). Por otro lado, los niveles de AMPc se relacionan a su vez con citotoxicidad y con resistencia a fármacos (Mann, S.C., Andrews, P.A. *et al.*, 1991, *Int J Cancer*, 48, 866-72; von Knethen, A., Lotero, A. *et al.*, 1998, *Oncogene*, 17, 387-94). Es decir, la ruta del AMPc juega un papel importante y complejo en la regulación del crecimiento celular. Por este motivo, la descripción de moléculas, naturales o sintéticas que afecten a las fosfodiesterasas, y de métodos para estudiar la actividad de estos enzimas, que puedan ser aplicados en protocolos HTS (del inglés, high-throughput screening) (detección de alto rendimiento de actividades farmacológicas), son herramientas muy útiles para descubrir nuevos tratamientos. En este sentido, la descripción del efecto inhibidor de las YTXs sobre el crecimiento de células tumorales, es un indicio de la importancia farmacológica de estas moléculas para su posible aplicación terapéutica. Además, debido a su baja toxicidad, algunos autores apuntan a que la YTX no debe de ser considerada una toxina sino un producto natural con diferentes usos farmacológicos. Las pruebas HTS se utilizan de modo rutinario en la industria farmacéutica para evaluar de forma rápida el valor terapéutico de productos naturales y de librerías de compuestos sintéticos. Se trata de ensayos sobre células o tejidos en los que se determina desde la afinidad, selectividad y especificidad por la diana primaria, al mecanismo de acción o las propiedades farmacéuticas de los compuestos. De esta forma, aquellos que fallen en algún parámetro, son descartados para estudios posteriores.

Una explicación más extensa sobre las familias de toxinas, las características particulares de las YTXs y su mecanismo de acción se detalla en la descripción de las solicitud principal y divisionaria relacionada con la presente invención.

La invención propuesta describe una utilidad de las YTXs como agente inhibidor del crecimiento celular en función de su capacidad para activar las fosfodiesterasas celulares.

Utilidad

Uso de la YTX y de compuestos que activan las fosfodiesterasas como inhibidores de la proliferación de células neoplásicas

La inhibición del crecimiento de células neoplásicas es un indicador de actividad antitumoral ampliamente utilizado para describir propiedades antineoplásicas de fármacos nuevos. Se ha observado que la YTX resulta citotóxica para células de carcinoma hepatocelular humano y además se había descrito que esta toxina induce apoptosis en células de neuroblastoma (Leira, F., Alvarez, C. *et al.*, 2001, *Toxicology in vitro*, 15, 277-283), todo lo cual apunta a que la YTX es susceptible de ser utilizada como fármaco antitumoral. En la presente utilidad se cuantifica la capacidad de la YTX como fármaco citotóxico para

células tumorales de carcinoma hepático. La inhibición del crecimiento celular se puede determinar según distintos protocolos descritos en la bibliografía. A continuación se expone uno en el que la respuesta se cuantifica en la línea celular HEP-G2 por medio de una tinción con cristal violeta y posterior acetilación.

Modo de realización de la invención

a.- Se siembran células HEP-G2 en una placa de microtitulación con una densidad de 10000 células por pocillo. Se incuban durante 24 horas con medio de crecimiento a 37°C y 5% de CO₂.

b.- Se adicionan distintas concentraciones de YTX y se incuba durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂.

c.- Se adicionan 10 µL de glutaraldehído al 11%

para fijar las células y se incuba 15 minutos. Se lava 3-4 veces con agua destilada.

d.- Se adiciona una solución al 0.1% de cristal violeta y se agita la placa durante 15 minutos.

e.- Se retira el colorante lavando con agua destilada y posteriormente se seca.

f.- Se añade ácido acético al 10% y se mantiene en agitación durante 15 minutos.

g.- Se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nanómetros.

h.- Con este protocolo se observó que 10 µM de YTX inducen una inhibición del 82+/-1% en el crecimiento celular.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Yessotoxinas (YTXs) para uso como inhibidores del crecimiento de células tumorales humanas basada en la activación que las toxinas producen en las fosfodiesterasas celulares.

2. Utilización de la acción activadora de la yessotoxina (YTX) y análogos químicos (YTXs) sobre la actividad de las fosfodiesterasas como activadores de la muerte celular, o como estrategia empleando las PDEs como diana terapéutica.

3. YTXs para uso, según la reivindicación 1, sobre

las células neoplásicas como compuesto antitumoral.

4. Utilización de las YTXs y sus derivados, según la reivindicación 1, en la fabricación de compuestos que se utilicen para el tratamiento de los procesos tumorales.

5. Utilización de las YTXs y sus derivados, según la reivindicación 1, en la fabricación de compuestos que se utilicen para el tratamiento de neoplasias en las que intervenga la modulación de las fosfodiesterasas.

6. Utilización, según la reivindicación 1, de la activación de PDEs en protocolos de HTS: detección de alto rendimiento de actividades farmacológicas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

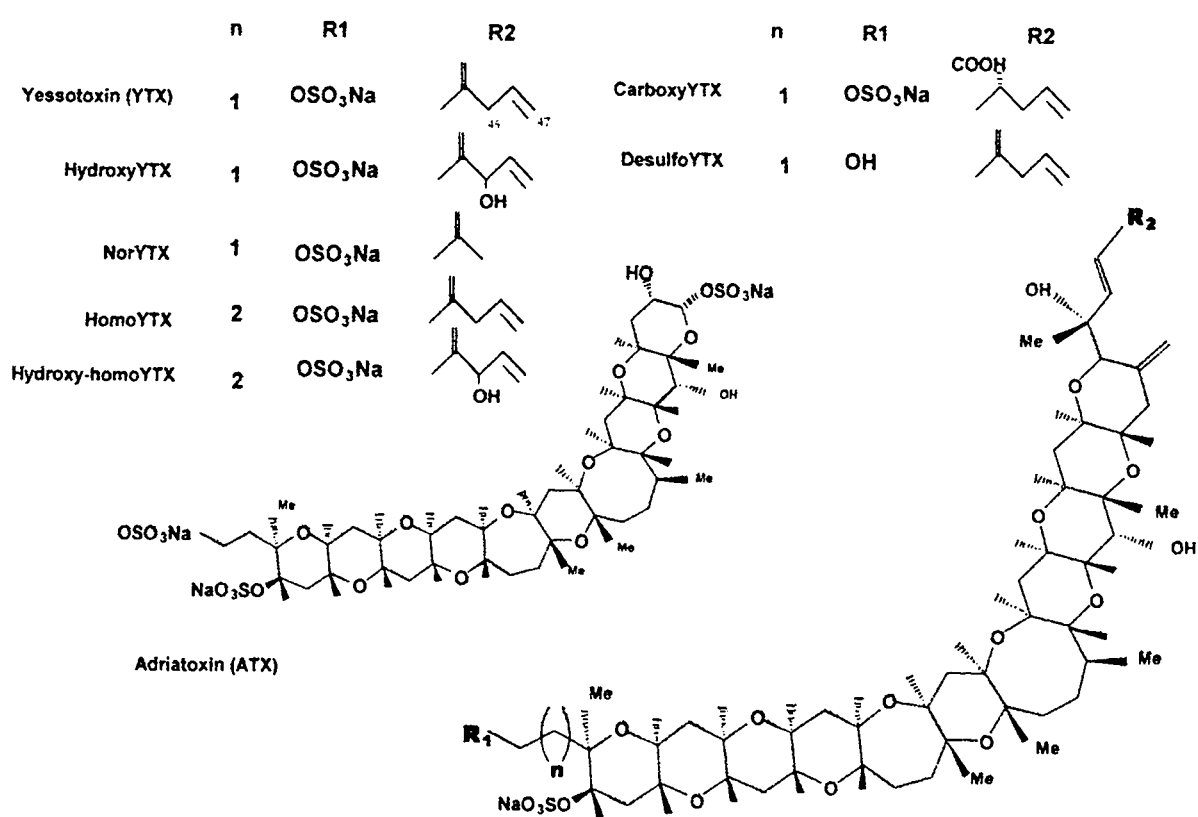


FIGURA 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 259 894

② Nº de solicitud: 200402944

③ Fecha de presentación de la solicitud: 10.12.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 31/35** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LEIRA, F. et al.: "Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line", Toxicology in Vitro (2002), vol. 16, pp.: 23-31, todo el documento	1-6
A	MALAGUTI, C. et al.: "Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells", Toxicology in Vitro (2002), vol. 16, pp.: 357-363, todo el documento	1-6
A	ALFONSO, A. et al.: "Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes", Biochem. Pharmacol. (15.01.2003), vol. 65, pp.: 193-208, todo el documento	1-6

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 nº:

Fecha de realización del informe
27.09.2006

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/1