



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 PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

- ⑫ Fecha de presentación: **10.12.2004**
- ⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2006**
- Fecha de la concesión: **17.10.2008**
- Fecha de modificación de las reivindicaciones: **15.09.2008**
- ⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.11.2008**
- ⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente: **16.11.2008**
- ⑯ Número de la solicitud inicial: **200301773**

⑰ Titular/es: **LABORATORIOS CIFGA, S.A.**  
**c/ Cruz, 1**  
**27001 Lugo, ES**

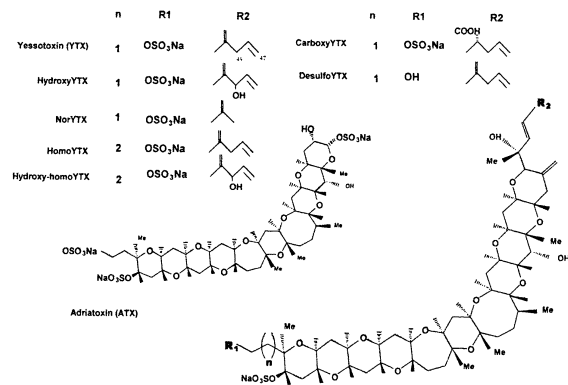
⑱ Inventor/es: **Botana López, Luis Miguel;**  
**Alfonso Rancaño, Amparo;**  
**Rodríguez Vieytes, Mercedes y**  
**Loza García, María Isabel**

⑳ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

②④ Título: **Utilización de las yessotoxinas como activadoras de las fosfodiesterasas en células neoplásicas humanas.**

②⑤ Resumen:

Utilización de las yessotoxinas como activadoras de las fosfodiesterasas en células neoplásicas 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 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Utilización de las yessotoxinas como activadoras de las fosfodiesterasas en células neoplásicas humanas.

5 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.

10 La yessotoxina, en adelante YTX, y sus análogos naturales son éteres policíclicos producidas por dinoflagelados de las especies *Protoceratium reticulatum* y *Lingoldinium 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.

15 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, Toxicol, 40, 77-82); sin embargo, produce la muerte tras una inyección intraperitoneal (Tubaro, A., Sosa, S. *et al.*, 2003, Toxicol, 41, 783-92), aunque para ello sea necesaria una dosis muy elevada.

20 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, y no 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).

35 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-3 tras prologandas incubaciones, (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). Se trata de un efecto muy poco potente cuando se compara con el de otras toxinas, como el ácido okadaico, que activan caspasas y producen marcada apoptosis, y además dan lugar a proliferación y diferenciación celular y son potentes promotores tumorales (Suganuma, M., Fujiki, H. *et al.*, 1988, Proc Natl Acad Sci USA, 45, 1768-71 Suganuma, M., Tatematsu, M.; *et al.*, 1992, Carcinogenesis, 13, 1841-5; Fujiki, H., Sugamuna, M., 1999, J Cancer Res Clin Oncol, 125, 150-5; Rosini, G.P., 2000, *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection.*, Botana, L.M., Marcel Dekker, New York, 257-88). Esta diferente actividad se debe al particular mecanismo de acción de cada toxina y se traduce en distintos efectos finales (Malaguti, C., Ciminello, P. *et al.*, 2002, Toxicol *in Vitro*, 16, 357-363). En la presente invención se describe un efecto citotóxico de la YTX sobre células de carcinoma hepatocelular humano (HEP-G2), habiéndose obtenido este mismo resultado en células neoplásicas de ovario de la línea HeLa229. Estos efectos se deben a la activación que la toxina produce en last fosfodiesterasas celulares que en el caso de las células tumorales parecen estar alteradas. La activación de las fosfodiesterasas y de las rutas moleculares en las que están implicadas es un evento temprano en la cascada que amplifica y transfiere la señal en el interior celular y que finaliza en una respuesta. La modulación de la viabilidad de las células neoplásicas al activar las fosfodiesterasas en presencia de YTX implica que la toxina es susceptible de ser utilizable como fármaco antitumoral mientras que las otras toxinas con actividad en células tumorales pero con distinto mecanismo de acción, como el ácido okadaico, se postulan como promotores tumorales.

55 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.

## ES 2 259 894 B2

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 tanto de la solicitud principal (PO200301773), como de la otra divisionaria (PO200402943) relacionadas con la presente invención.

- 5 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

- 10 Uso de la YTX y de compuestos derivados 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. 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

- 20 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 CO<sub>2</sub>.
- b.- Se adicionan distintas concentraciones de YTX y se incuba durante 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.

40

45

50

55

60

65

# ES 2 259 894 B2

## REIVINDICACIONES

5 1. Yessotoxinas (YTXs) y derivados para su uso como activadores de las fosfodiesterasas (PDEs) en células neoplásicas con la actividad de estas enzimas modificada.

2. Utilización de la acción activadora de la YTX y sus derivados sobre las PDEs, según la reivindicación 1, como moduladores de la viabilidad y el crecimiento de células neoplásicas.

10 3. 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 PDEs.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

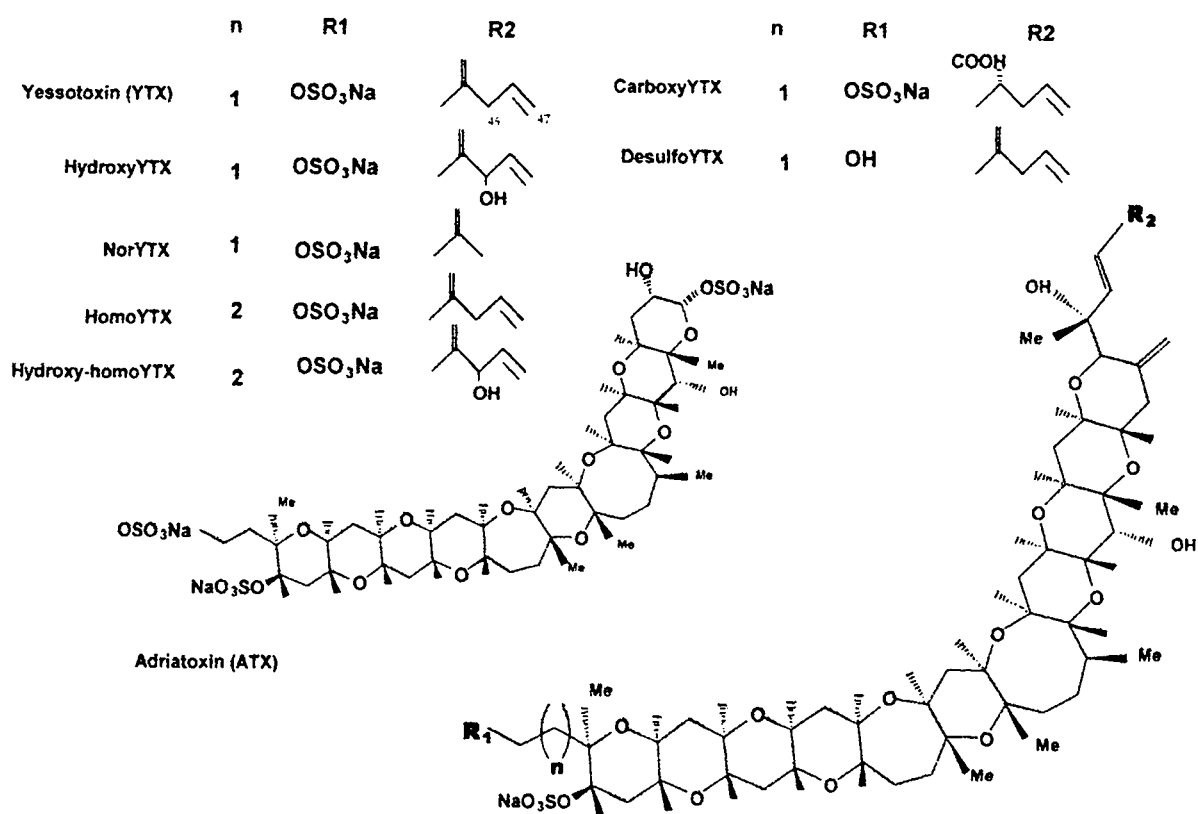


FIGURA 1



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", <i>Toxicology in Vitro</i> (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", <i>Toxicology in Vitro</i> (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", <i>Biochem. Pharmacol.</i> (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