



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 469**

51 Int. Cl.:
A61P 39/00 (2006.01)
A61K 31/662 (2006.01)
C12N 5/077 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02722273 .6**
96 Fecha de presentación : **27.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1372786**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Citoprotección por fosfotirosina.**

30 Prioridad: **03.04.2001 DE 101 17 834**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2011

73 Titular/es: **Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Universitätsklinikum
Geissweg 3
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es: **Dittmann, Klaus;
Mayer, Claus y
Rodemann, Peter**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Citoprotección por fosfotirosina

5 La presente invención se refiere a la protección de material biológico contra factores perjudiciales para las células.

Es sabido que hay múltiples y diversos factores capaces de dañar la integridad de materiales biológicos tales como p.ej. células, tejidos u organismos de animales o humanos. Estos factores pueden ser p.ej. radiaciones energéticas o ionizantes, como p.ej. radiactividad, rayos X, radiación cósmica, etc. o luz ultravioleta (luz UV). Las radiaciones ionizantes figuran por una parte entre los factores medioambientales nocivos, pero por otra parte también pueden ser útiles en medicina. A este respecto cabe mencionar la diagnosis por rayos X, la medicina nuclear o la radioterapia. Esta radiación energética se caracteriza por su capacidad de ionizar moléculas.

10 Como factores perjudiciales para las células son asimismo relevantes los agentes químicos, p.ej. en forma de contaminantes del medio ambiente, pero también aquellos que se usan como sustancias terapéuticas en el marco de los tratamientos médicos, p.ej. los agentes citostáticos. Estos últimos forman un grupo químicamente heterogéneo de sustancias farmacológicas citotóxicas que impiden o retardan notablemente la citogénesis de células funcionalmente activas al interferir de diversas maneras en su metabolismo. Los agentes citostáticos se usan principalmente en la terapia tumoral por su eficacia frente al aumento de la tasa de división celular en las células tumorales respecto a las células normales. Se conocen varios grupos de agentes citostáticos: agentes alquilantes (p.ej. cisplatino); antimetabolitos (p.ej. antagonistas del ácido fólico); inhibidores de la mitosis; antibióticos (p.ej. bleomicina); enzimas (p.ej. L-asparaginasa), y otros.

25 Estos factores pueden causar daños a todos los niveles de la estructura biológica: por efecto de estos factores se producen reacciones a nivel molecular o macromolecular (p.ej. de los ácidos nucleicos), a nivel celular, reacciones hísticas o reacciones de todo el organismo.

Los daños provocados por radiación energética o ultravioleta son, por ejemplo, la alteración del ADN, es decir la mutagénesis, que puede causar la formación de tumores, así como la degeneración, atrofia, fibrotización o necrosis de los tejidos expuestos a una mayor radiación.

30 Así, por ejemplo, la formación del melanoma maligno es favorecida por una elevada exposición de la piel a la radiación solar.

35 Como se ha dicho al comienzo, el organismo humano se expone a intensidades de radiación especialmente altas, no solo durante una fuerte exposición a la luz solar, sino también, por expresa indicación médica, en el caso de diagnóstico por rayos X o radioterapia para enfermedades tumorales. En este aspecto también están especialmente en situación de riesgo los radiólogos, los dentistas, los cirujanos traumatólogos, los asistentes técnicos radiológicos y los trabajadores de las fábricas de tubos de rayos X.

40 El uso en el organismo humano de los agentes citostáticos arriba citados, considerados especialmente importantes, es ante todo perjudicial, porque las diferencias entre células normales y tumorales relativas a la tasa de división celular no son suficientes como punto de ataque específico y selectivo al tumor. De ahí resultan los indeseados efectos secundarios de los agentes citostáticos, sobre todo la rápida proliferación de los tejidos por inhibición general de la regeneración. Afecta especialmente a la formación de las células sanguíneas, a los epitelios de las mucosas, cuya inhibición regenerativa produce trastornos gastrointestinales, y también a la piel y anexos cutáneos cuya inhibición regenerativa produce alopecia.

45 De la patente DE 197 20 339 A1 proviene el uso de fosfotirosina para preparar una composición dermatológica destinada a la inhibición y tratamiento del bronceado producido por la radiación UV. Sin embargo los autores no dan ninguna información acerca de cómo debe tener lugar una inhibición o tratamiento adecuado de las lesiones de la piel causadas por la radiación UV.

50 Con estos antecedentes el objeto de la presente invención es proporcionar una protección del material biológico frente a las patologías mencionadas al comienzo, que pueden ser desencadenadas por factores lesivos para las células como la radiación, preferentemente de tipo ionizante, o la luz ultravioleta y los productos químicos, preferentemente los citostáticos.

55 La presente invención resuelve este objetivo con el uso de fosfotirosina para preparar una composición farmacéutica destinadas a dichos fines.

60 La fosfotirosina (en lo sucesivo también P-Tyr) es un aminoácido modificado, derivado del aminoácido aromático tirosina, cuyo grupo hidroxilo del fenilo de la cadena lateral está fosforilado. La fosfotirosina está descrita en un gran número de manuales de bioquímica, biología molecular y química de proteínas.

65 Los inventores han encontrado sorprendentemente que este aminoácido fosforilado protege el material biológico de

factores lesivos para las células.

En el sentido de la presente invención se entiende como fosfotirosina tanto la O-fosfo-L-tirosina (L-3-[4-hidroxifenil]alanin-4'-fosfato) como también la O-fosfo-D-tirosina (D-3-[4-hidroxifenil]alanin-4'-fosfato) y la O-fosfo-DL-tirosina (DL-3-[4-hidroxifenil]alanin-4'-fosfato).

En este contexto se entiende como material biológico cualquier unidad biológica estructurada, como p.ej. una célula (en cultivo o formado parte de un tejido), tejidos, órganos, organismos, etc.

Según la presente invención como factores lesivos para las células hay que entender las influencias negativas sobre la integridad y/o viabilidad del material biológico, es decir, radiación ionizante (radiación radiactiva, rayos X, radiación cósmica, etc.), luz ultravioleta, productos químicos de cualquier tipo, sobre todo los agentes citostáticos (por ejemplo compuestos alquilantes como el cisplatino).

El uso de fosfotirosina se refiere a poner en contacto este aminoácido modificado - incluido p.ej. en un preparado galénico - con material biológico, p.ej. aplicándolo sobre un organismo o incorporándolo al mismo, o a ponerlo en contacto *in vitro*, bajo cualquier forma, con material biológico, p.ej. con células aisladas, tejidos u órganos. La puesta en contacto con la fosfotirosina puede tener lugar antes, durante o después de la exposición a factores citotóxicos.

En el sentido de la presente invención, protección del material biológico significa que la fosfotirosina disminuye o evita los daños provocados por los factores citotóxicos mencionados.

Una de las ventajas del uso de fosfotirosina, según la presente invención, es que la fosfotirosina se puede producir o adquirir económicamente en grandes cantidades, pues no es necesaria ninguna síntesis peptídica ni una costosa purificación proteica.

Además, en comparación con péptidos o proteínas, la fosfotirosina es mucho más resistente a la degradación. Por tanto la preparación galénica resulta considerablemente más fácil y estable.

El pequeño tamaño molecular de la fosfotirosina facilita su absorción por las células tratadas, produciendo un buen efecto citoprotector. Por la misma razón no cabe esperar ningún riesgo de reacciones inmunológicas en caso de incorporar o aplicar fosfotirosina a un organismo.

También por ello son sorprendentes las propiedades citoprotectoras de la fosfotirosina, pues hasta la fecha se le atribuían actividades muy diferentes. Así, por ejemplo, Shrikant Mishra y Anne W. Hamburger han demostrado que la fosfotirosina inhibe el crecimiento de las células carcinómicas de mama y riñón humanas ("O-phospho-L-tyrosine inhibits cellular growth by activating protein tyrosine phosphatases" [*La O-fosfo-L-tirosina inhibe el crecimiento celular por activación de las proteína tirosina fosfatasas*], Cancer Research 53, S. 557-563, 1993) y que esta inhibición del crecimiento depende de la dosis de P-Tyr ("Exogenous phosphotyrosine modulates epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation" [*La fosfotirosina exógena modula la fosforilación de tirosina del receptor del factor de crecimiento epidérmico*], Carcinogenesis 14, S. 269-273, 1993). Este grupo de trabajo ha demostrado la inhibición por fosfotirosina del crecimiento celular en otras dos líneas de células tumorales, una de células de carcinoma hepático y otra de células NIH3T3 transformadas por src ("Association of inhibition of all growth by O-phospho-L-tyrosine with decreased phosphorylation" [*Relación entre la inhibición de todo crecimiento por O-fosfo-L-tirosina y una menor fosforilación*], Cancer Letters 102, S. 65-71, 1996). Los autores no describen ninguna protección de células sanas por tratamiento con fosfotirosina.

Los autores de la presente invención no han podido comprobar ningún efecto inhibitor del crecimiento de células tumorales con la mera administración de fosfotirosina. En cambio, sorprendentemente, han podido observar que después de irradiar con radiación ionizante mueren más células tumorales pretratadas con fosfotirosina que células tumorales sin dicho pretratamiento.

Además se comprobó que, contrariamente a las células tumorales, las células normales pretratadas con fosfotirosina presentan mayores tasas de supervivencia - tanto tras la irradiación con rayos ionizantes como tras el tratamiento con cisplatino - que las células normales no pretratadas con fosfotirosina.

Esta selectividad de las propiedades citoprotectoras de la fosfotirosina para las células normales, es decir células sanas no tumorales, no era de esperar, teniendo en cuenta las propiedades de la fosfotirosina conocidas del estado técnico, descritas en un contexto completamente distinto.

Por tanto el objetivo de la presente invención queda totalmente resuelto.

Según la reivindicación 1 la fosfotirosina se usa para proteger el material biológico contra la radiación, preferentemente de la radiación ionizante y/o de la luz ultravioleta.

Esto tiene la ventaja concreta de proporcionar protección frente a factores citotóxicos especialmente importantes, a

los cuales está expuesto casi todo organismo humano, al menos en parte.

Asimismo se prefiere, según la reivindicación 1, emplear fosfotirosina para proteger el material biológico contra productos químicos, preferentemente agentes citostáticos.

Como se ha dicho al principio los productos químicos, sobre todo los agentes citostáticos, tienen un papel importante como factores citotóxicos.

Este uso preferente de la fosfotirosina según la presente invención ofrece por tanto una protección efectiva contra factores citotóxicos especialmente importantes.

En otro aspecto preferente la fosfotirosina se usa para proteger la piel.

Esto tiene la ventaja especial de proteger un órgano que está continuamente expuesto a factores citotóxicos de naturaleza física o química, p.ej. en forma de radiación solar o de contaminantes medioambientales.

En este contexto también es ventajoso que la fosfotirosina sea estable en condiciones oxidantes, por ejemplo en el aire, y que pueda ejercer una protección duradera, p.ej. contra la radiación UV del sol. Por tanto es apropiado utilizarla como protección cutánea frente a la radiación solar intensa. El uso de fosfotirosina para este fin tiene además la ventaja de poder penetrar en la piel y permanecer largo tiempo en ella, gracias a su pequeño tamaño.

Asimismo se prefiere usar fosfotirosina en el marco de una radioterapia para pacientes con tumores.

En este tipo de radioterapia se utiliza radiación ionizante para tratar neoplasias malignas. Su finalidad es dañar al máximo el tejido tumoral, protegiendo al mismo tiempo el tejido sano circundante. En virtud de las propiedades de la fosfotirosina anteriormente mencionadas y reconocidas por los autores, el uso de fosfotirosina en este contexto es especialmente ventajoso porque protege selectivamente el tejido normal, es decir sano, del daño celular y en cambio no muestra ninguna cualidad citoprotectora del tejido tumoral e incluso promueve su muerte.

También se prefiere usar fosfotirosina en el marco de una quimioterapia para pacientes con tumores.

En quimioterapia se usan específicamente sustancias quimioterapéuticas o citostáticas para inhibir el crecimiento de células tumorales en el organismo, teniendo como meta proteger las células sanas de los efectos citotóxicos de los agentes quimioterapéuticos. Gracias a sus reconocidas propiedades, arriba descritas, el uso de fosfotirosina según la presente invención resulta especialmente ventajoso porque proporciona un citoprotector selectivo para células sanas.

También se revela el uso de fosfotirosina para preparar una composición farmacéutica destinada al tratamiento profiláctico y/o coadyuvante de los pacientes tratados con radioterapia y/o quimioterapia.

Para ello la fosfotirosina puede formar parte de preparados galénicos adecuados y corrientes, es decir, en combinación con vehículos, sustancias auxiliares y/o aditivos usuales. Una composición farmacéutica de este tipo se puede administrar por vía intravenosa, percutáneamente mediante inyección local, p.ej. en partes o cavidades corporales afectadas directamente por el factor citotóxico, o también por aplicación local.

Este uso en la preparación de una composición farmacéutica tiene asimismo la ventaja de que dicho aminoácido modificado puede desplegar su acción citoprotectora como sustancia activa de la composición, sin inducir simultáneamente reacciones inmunológicas peligrosas. Por su pequeño tamaño la fosfotirosina tiene una baja inmunogenia y no cabe esperar ninguna reacción alérgica al aplicar la composición farmacéutica sobre o en el cuerpo humano o animal, de modo que la fosfotirosina se elimina del respectivo organismo sin la intervención de anticuerpos.

La acción citoprotectora selectiva para las células normales sanas y la propiedad de promover la toxicidad selectiva para las células tumorales irradiadas hace que el uso de fosfotirosina sea adecuado para preparar una composición farmacéutica.

La presente invención también puede ponerse en práctica mediante la elaboración de una composición cosmética que contenga fosfotirosina y, dado el caso, otros vehículos, sustancias auxiliares y/o aditivos usuales.

Una composición cosmética de tal tipo puede servir, por ejemplo, como leche solar, crema cutánea o similares. Además contiene los componentes usuales de estas composiciones, como aceites, emulsiones, pigmentos, etc. Se comprende que la composición cosmética puede llevar asimismo filtros UV como los derivados de ácido p-amino-benzoico, de ácido salicílico, de ácido cinámico, de dibenzofilmetano o similares.

Gracias al efecto citoprotector de la fosfotirosina este tipo de composición cosmética proporciona una protección ideal, sobre todo contra la radiación UV de la luz solar. Dado que la fosfotirosina, por su pequeño tamaño, también puede penetrar en la piel y además es largamente estable, se puede alcanzar una protección duradera contra la

radiación. En este contexto también cabe pensar en cremas de manos para proteger la piel de aquellas personas que manipulan frecuentemente productos químicos tóxicos.

También es objeto de la presente invención un medio de cultivo que contiene fosfotirosina y, dado el caso, otras sustancias tampón, vehículos, sustancias auxiliares y/o aditivos habituales, en un intervalo de concentración comprendido entre 1 y 100 μ M.

Se ha visto que las células en cultivo o incluso los órganos, durante su transporte – que suele tener lugar mediante vuelos a gran altura – pierden un 50% y más de su viabilidad por efecto de la radiación cósmica. Gracias a las propiedades citoprotectoras de la fosfotirosina, el medio de cultivo de la presente invención proporciona, además de condiciones adecuadas de conservación y cultivo, una protección efectiva contra factores citotóxicos como p.ej. la radiación. Así se garantiza que las muestras celulares o los órganos puedan soportar largos trayectos de transporte, p.ej. por avión, sin o con poca merma de viabilidad.

El medio de cultivo de la presente invención contiene fosfotirosina en un intervalo de concentración comprendido entre 1 y 100 μ M. Los estudios de los autores han dado como resultado que en este intervalo el efecto citoprotector de la fosfotirosina es especialmente elevado. Este hallazgo es realmente sorprendente, porque los experimentos de Mishra y Hamburger arriba mencionados tuvieron lugar a concentraciones de P-Tyr de 1,67 mM, en parte incluso de 16,7 mM, aunque el efecto de la fosfotirosina fue otro.

Se entiende que las características antes citadas y las indicadas a continuación no solo son utilizables en las combinaciones ya mencionadas, sino también en otro tipo de combinaciones o aisladamente, sin abandonar el marco de la presente invención.

Otras ventajas se desprenden de los siguientes ejemplos de ejecución y en relación con los gráficos, en los cuales se muestra:

Fig. 1 la fórmula química estructural de la fosfotirosina (P-Tyr) u O-fosfo-L-tirosina (L-3-[4-hidroxifenil]alanina-4'-fosfato) en forma no ionizada;

Fig. 2 la supervivencia de fibroblastos cutáneos normales en comparación con fibroblastos transformados, tras el tratamiento previo con distintas concentraciones de P-Tyr e irradiación radiactiva;

Fig. 3 comparación de los efectos radioprotectores de fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina sobre fibroblastos normales;

Fig. 4 el efecto radioprotector de una preincubación con P-Tyr en células sanas no tumorales, en comparación con células tumorales;

Fig. 5 la supervivencia clonogénica de fibroblastos normales en comparación con células tumorales tras irradiación UVB, en función de un pretratamiento con P-Tyr; y

Fig. 6 la supervivencia clonogénica de fibroblastos normales en comparación con células tumorales tras un tratamiento con cisplatino, en función de un pretratamiento con P-Tyr.

Ejemplo 1: cultivos celulares empleados para estudiar el efecto citoprotector de la fosfotirosina

Para estudiar las propiedades citoprotectoras de la fosfotirosina son especialmente aptos los fibroblastos humanos (líneas celulares HSF1, HSF6, procedentes de piel humana, pasaje 9 hasta 15, CCD32, procedente de tejido pulmonar embrionario, pasaje 9 hasta 11).

Además pueden usarse las líneas de carcinoma escamoso humano HTB-35 (ATCC, procedentes de un carcinoma de cuello uterino, pasaje desconocido, usadas en el pasaje 10 tras la recepción) (Srivastava y otros, "The status of the p53 gene in human papilloma virus positive or negative cervical carcinoma cell lines" [*Estatus del gen p53 en líneas celulares de carcinoma cervical positivo o negativo al virus del papiloma humano*], Carcinogenesis 13, páginas 1273-1275, 1992) y HTB-43 (ATCC, procedente de un tumor hipofaríngeo, pasaje 124). Ambas líneas de carcinoma se caracterizan por una mutación puntual en el gen p53 (Kim y otros, "State of p53, Rb and DCC tumor suppressor genes in human oral cancer cell lines" [*Estatus de los genes oncosupresores p53, Rb y DCC en líneas celulares de cáncer oral humano*], Anticancer Research 13, páginas 1405-1413, 1993).

También sirven para el estudio los fibroblastos humanos transformados, p.ej. la línea celular HH4dd (procedente de piel humana, pasaje 65 hasta 70). Esta línea celular procede de la línea celular normal HH4 y también se caracteriza por una mutación en el gen p53 (Dittmann y otros, "The radioprotective effect of BBI is associated with the activation of DNA-repair relevant genes" [*El efecto radioprotector de BBI está relacionado con la activación de importantes genes reparadores de ADN*], Int. J. Radiat. Biol. 74, páginas 225-230, 1998). La HH4dd crece en agar blando y se caracteriza por su aneuploidía e inducción de tumores en ratones desnudos.

Las células se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO/BRL, Eggenstein, Alemania, nº de artículo 40G7285K) (= medio normal), usando condiciones estándar.

Ejemplo 2: irradiación de las células, incubación con cisplatino

Las células desarrolladas en cultivo confluyente se incuban durante 16 horas en medio normal simple o en medio que contiene fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina (Sigma, Munich, Alemania) en las concentraciones indicadas.

Para la exposición radiactiva las células se irradian a temperatura ambiente con fotones de 4MV usando un aparato "Linac" (Mevatron⁶⁰/Siemens, Erlangen, Alemania) a una dosis de radiación de 2 Gy/min, del modo descrito (Dittmann y otros "Bowman-Birk Proteinase inhibitor modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture" [*El inhibidor Bowman-Birk de proteasas modula la radiosensibilidad de los fibroblastos humanos en cultivo y su diferenciación inducida por radiación*], Radiother. Oncol. 34, páginas 137-143, 1995).

La irradiación de las células con luz UV (312 nm) tiene lugar con una lámpara UVB (Bioblock Scientific, Illkirch Cedex, Francia) a una dosis de radiación de 450 J/m² por minuto.

La incubación con cisplatino tiene lugar a una concentración de 1 µg/ml de cisplatino (cis-diaminodicloroplatino(II); Sigma, Munich, Alemania).

Ejemplo 3: ensayo clonogénico (= ensayo de formación de colonias)

Los estudios sobre la propiedad citoprotectora de la fosfotirosina se realizan en el llamado ensayo clonogénico, descrito, por ejemplo, por Dittmann y otros, 1995, en el lugar citado, y explicado brevemente a continuación.

Las células cultivadas del modo descrito en el ejemplo 1, incubadas según el ejemplo 2 con factores citotóxicos o dejadas sin tratamiento para servir de controles, se liberan del medio, se lavan y se desprenden del sustrato con 0,05% de tripsina y 0,1% de EDTA. Para analizar la formación de colonias, las células desprendidas se extienden a una densidad celular constante de 1.500 células por cada placa de 78 cm². A continuación las células extendidas se incuban durante 14 días en medio normal con adición de 20% de SFB. En este periodo de tiempo se puede formar una colonia.

Una colonia es en este caso una acumulación de células formada en 14 días de cultivo a partir de una sola célula por divisiones celulares sucesivas. Esta colonia también se designa como clon. En el sentido de la supervivencia clonogénica el número de colonias o de clones está relacionado con la extensión del efecto dañino de un agente químico o físico. Si durante el tratamiento con factores citotóxicos mueren muchas células, al cabo de 14 días se forman pocas colonias; si sobreviven muchas células, al cabo de 14 días se pueden contar muchas colonias. Por tanto la supervivencia clonogénica de las células después de un tratamiento citotóxico es una medida directa del efecto protector de la fosfotirosina.

Tras los 14 días de cultivo las células se fijan, se tiñen y se recuentan del modo descrito (Dittmann y otros, 1995, en el lugar citado). Para calcular la supervivencia clonogénica se determinan en cada placa las colonias de más de 50 células. El recuento tiene lugar tras codificar las placas de cultivo y es realizado por dos personas independientemente entre sí.

El resultado de dicho ensayo clonogénico se expresa como "citoprotección relativa" o en "% de número de clones", relacionando entre sí las cantidades de las colonias formadas en las distintas preparaciones.

Ejemplo 4: reacción de los fibroblastos a la exposición radiactiva tras el tratamiento previo con diferentes dosis de fosfotirosina

Durante 16 horas se incuban fibroblastos cutáneos normales (HSF6) con P-Tyr, cuya fórmula química estructural está representada en la fig. 1, en un intervalo de concentración de 0 hasta 2000 µM. A continuación se determina sin tratamiento citotóxico la supervivencia clonogénica del modo indicado en el ejemplo 3. El resultado de este ensayo está representado en la fig. 2A.

En este gráfico las barras de color gris claro indican la fracción de supervivencia de las células HSF6 y las barras de color gris oscuro la de las células HH4dd. En él se demuestra que el pretratamiento exclusivo con P-Tyr a concentraciones de hasta 2000 µM no tiene ningún efecto en la supervivencia clonogénica de las células HSF6. Para la línea celular HH4dd de fibroblastos transformados se obtienen resultados comparables. Aquí tampoco, inesperadamente según los resultados de Mishra y Hamburger (en el lugar citado), aparece ningún efecto en la supervivencia clonogénica (fig. 2A).

El tratamiento combinado de fosfotirosina y radiación ionizante a una dosis energética de 4 Gy muestra en cambio

un claro aumento de la supervivencia clonogénica en el caso de los fibroblastos normales. La supervivencia máxima se alcanza a una concentración de P-Tyr de 10 μ M (fig. 2B, barras de color gris claro). En cambio, con el mismo tratamiento y las mismas condiciones de exposición no se observa ningún incremento de la supervivencia clonogénica en el caso de los fibroblastos transformados HH4dd. Totalmente al contrario, el tratamiento de los fibroblastos transformados con P-Tyr 2000 μ M muestra un aumento significativo de la radiotoxicidad; véase fig. 2B.

Ejemplo 5: comparación del efecto radioprotector de la fosfotirosina con el de la fosfoserina y la fosfotreonina

Para comprobar si otros aminoácidos fosforilados, como por ejemplo fosfoserina (P-Ser) o fosfotreonina (P-Thr), muestran efectos radioprotectores análogos, se someten fibroblastos no transformados (HSF1) durante 16 horas a un tratamiento previo con concentraciones equimoleculares de estos dos aminoácidos (10 μ M respectivamente), se exponen a una radiación ionizante de 4 Gy, tal como se indica en el ejemplo 2, y se comparan los resultados de un ensayo clonogénico con los de la P-Tyr.

El resultado de este experimento está representado en la fig. 3. Puede verse que la preincubación de fibroblastos normales con P-Tyr produce una radioprotección importante (2ª barra desde la izquierda), mientras que la incubación con P-Ser o P-Thr en idénticas condiciones experimentales no produce ninguna radioprotección (3ª y 4ª barras desde la izquierda).

Ejemplo 6: reacción de los fibroblastos a distintas dosis de radiación ionizante tras el pretratamiento con fosfotirosina

Las líneas celulares HSF6 y CCD32, así como las líneas celulares HTB-35 y HTB-43, se preincubaban durante 16 horas con P-Tyr 10 μ M. A continuación se irradian las células con dosis de 0 hasta 6 Gy y al cabo de 6 horas se determina la supervivencia clonogénica. En la fig. 4A cada punto de este experimento representa el valor medio de varias mediciones y la desviación estándar. El ajuste de la curva se calculó según el modelo cuadrático lineal, se determinaron los valores α y β y se probó su significancia mediante el test t de Student. Los asteriscos señalan una significancia distinta ($p < 0,05$) para α , β o ambos. En la fig. 4B está tabulado el valor medio de la citoprotección relativa de las cuatro mediciones (SF4) de cada preparación y la desviación estándar, incluyendo el valor p.

El pretratamiento de fibroblastos cutáneos normales (HSF6) y fibroblastos pulmonares normales (CCD32) con P-Tyr 10 μ M produce un incremento significativo de la supervivencia clonogénica hasta una dosis de 6 Gy (fig. 4A, fila superior; fig. 4B, filas 1 y 2). En cambio el pretratamiento con P-Tyr de las líneas celulares transformadas (HTB-35, HTB-43) da como resultado una reducción importante de la supervivencia clonogénica (fig. 4A, fila inferior; fig. 4B, filas 3 y 4).

Estos resultados demuestran que un pretratamiento de las células normales, es decir sanas, con fosfotirosina las protege efectivamente contra factores citotóxicos y, por el contrario, un pretratamiento de las células tumorales con fosfotirosina, incubando con factores citotóxicos, produce una mayor mortalidad de estas células transformadas.

Ejemplo 7: reacción de los fibroblastos pretratados con fosfotirosina a la radiación UVB

Para probar la citoprotección de la fosfotirosina contra radiación no ionizante se tratan previamente con P-Tyr 10 μ M durante 16 horas fibroblastos normales, no transformados, (HSF1) y fibroblastos transformados (HH4dd) y a continuación se irradian con 200 J de UVB, y 7 horas después se estudian en un ensayo clonogénico como el descrito en el ejemplo 3.

Se comprueba un aumento del 37% de supervivencia clonogénica en los fibroblastos normales, no transformados, (HSF1) irradiados con UVB y tratados previamente con fosfotirosina (véase fig. 5A, barras 2 y 3 desde la izquierda).

En cambio un pretratamiento con P-Tyr de los fibroblastos transformados (HH4dd) no produce ningún efecto en la irradiación con UVB (véase fig. 5B, barras 2 y 3 desde la izquierda).

Como controles (Ko) sirven en ambos casos células no irradiadas, para los cuales el número de clones formados representa el 100%.

Este experimento demuestra que la fosfotirosina también tiene propiedades citoprotectoras para las células no tumorales frente a radiación no ionizante. Aquí la citoprotección también es selectiva para las células normales, no transformadas. La supervivencia de las células transformadas tras la irradiación UVB no varía mediante un pretratamiento con P-Tyr.

Ejemplo 8: reacción de los fibroblastos al tratamiento con cisplatino tras el pretratamiento con fosfotirosina

Para estudiar el efecto citoprotector de la fosfotirosina frente a factores químicos citotóxicos, por ejemplo citostáticos, se tratan previamente fibroblastos normales (HSF1) y fibroblastos transformados (HH4dd) durante 16 horas con P-Tyr 10 μ M y luego se incuban una hora con 1 μ g/ml de cisplatino. A continuación se lavan las células con medio normal y 6 horas más tarde se colocan en placas. Después se efectúa un ensayo clonogénico como el descrito en el

ejemplo 3.

5 En la fig. 6 está representado el resultado de este experimento. En comparación con los fibroblastos normales, no transformados (HH4dd) sin tratar, el pretratamiento con P-Tyr de los fibroblastos normales, no transformados (HSF1) produce un incremento del 38,7% de la supervivencia clonogénica en una incubación con cisplatino (véase fig. 6A, 2ª y 3ª barra desde la izquierda).

10 En cambio un pretratamiento con P-Tyr de fibroblastos transformados (HH4dd) no produce ningún aumento de la supervivencia clonogénica durante el tratamiento con cisplatino (fig. 6B, 2ª y 3ª barra desde la izquierda).

De nuevo sirven en ambos casos como controles (Ko) células no irradiadas, para los cuales el número de clones formados representa el 100%.

15 Por consiguiente la fosfotirosina también proporciona una citoprotección selectiva de las células normales, es decir sanas, contra un factor citotóxico de tipo químico.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de fosfotirosina para preparar una composición farmacéutica destinada a proteger material biológico
- contra mutagénesis, degeneración, atrofia, fibrotización, necrosis y melanoma maligno desencadenados por la radiación, preferentemente de tipo ionizante, y/o la luz ultravioleta como factores citotóxicos,
- contra la inhibición de la regeneración de las células sanguíneas y de las mucosas, así como de la piel y sus anexos, desencadenada por agentes citostáticos como factores citotóxicos.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, para proteger la piel.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2 en el marco de una radioterapia para pacientes con tumores.
4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3 en el marco de una quimioterapia para pacientes con tumores.
- 15 5. Uso de fosfotirosina para preparar una composición farmacéutica destinada a proteger células sanas
- contra mutagénesis, degeneración, atrofia, fibrotización, necrosis y melanoma maligno en el marco de un tratamiento profiláctico y/o coadyuvante de los pacientes tratados con radioterapia,
- contra la inhibición de la regeneración de las células sanguíneas y de las mucosas, así como de la piel y sus anexos, en el marco de un tratamiento profiláctico y/o coadyuvante de la quimioterapia en los pacientes con tumores.
- 20 6. Medio de cultivo que contiene fosfotirosina y, dado el caso, otras sustancias tampón, vehículos, sustancias auxiliares y/o aditivos habituales, **caracterizado porque** el contenido de fosfotirosina está comprendido en un intervalo de concentración de 1 hasta 100 µM.
- 25

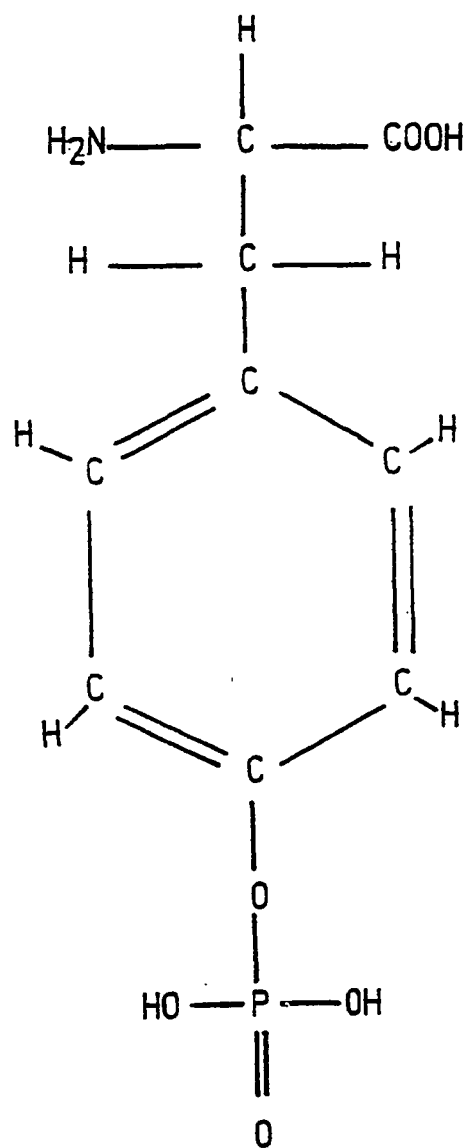
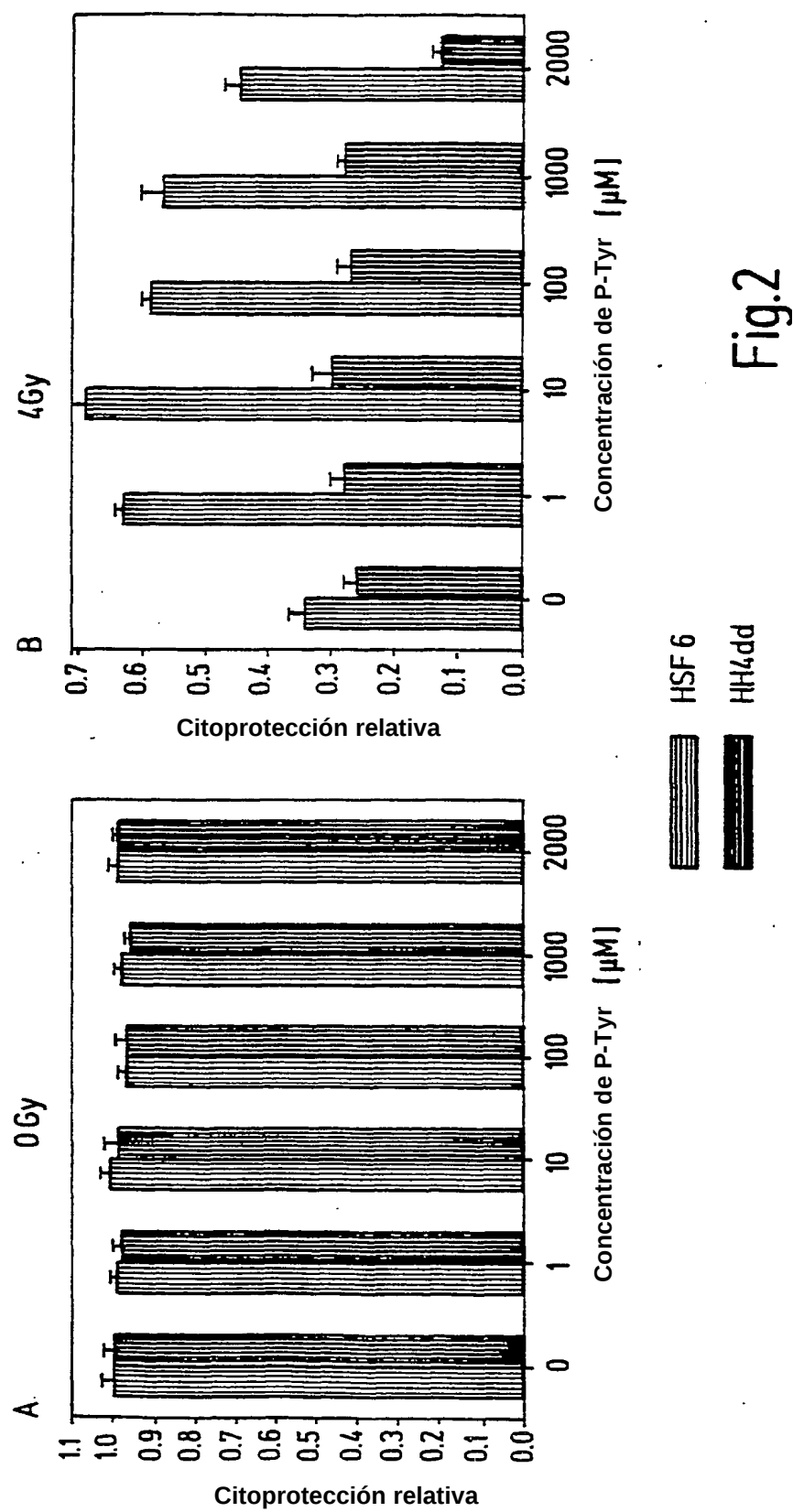


Fig.1



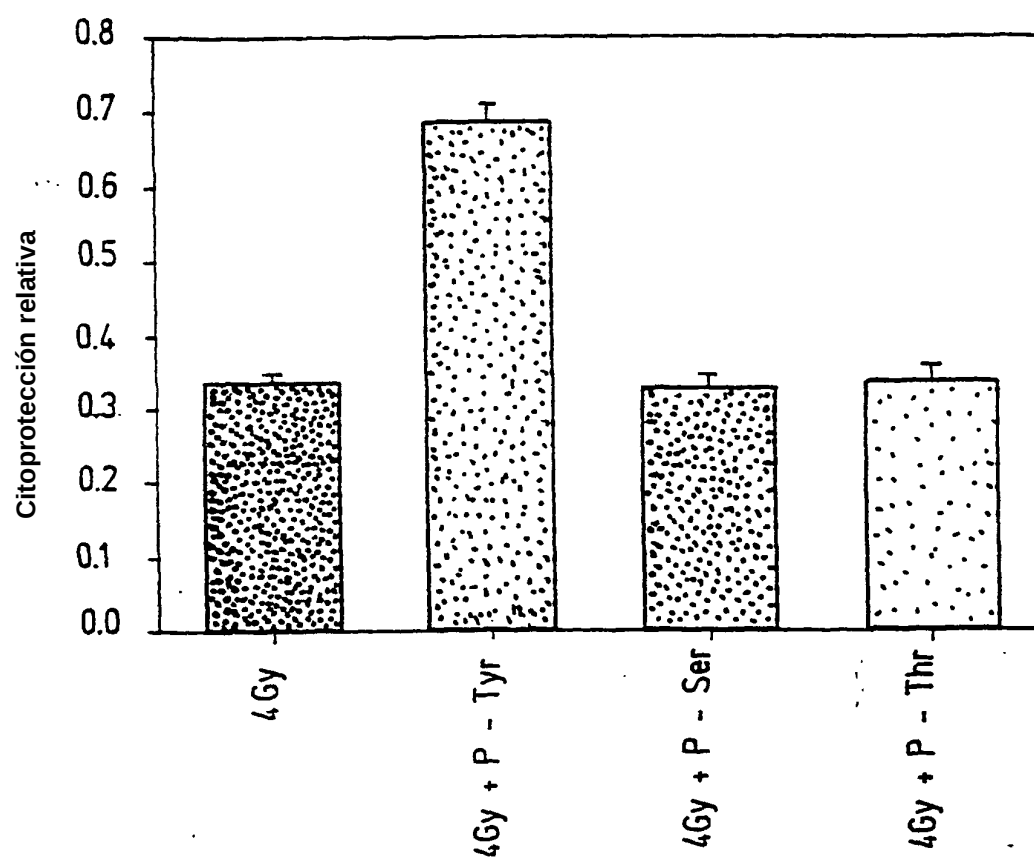
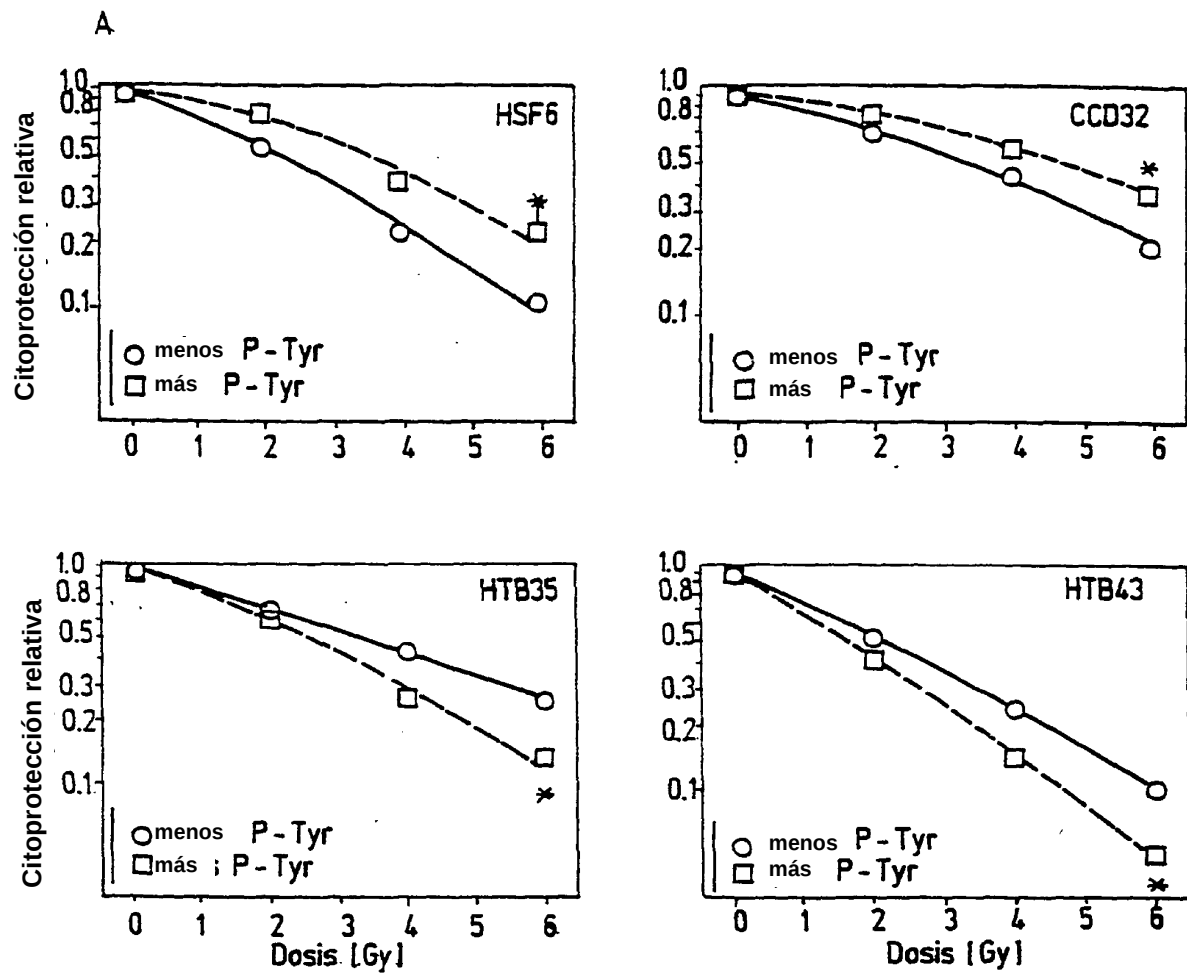


Fig.3



B

Línea celular	SF4 menos P-Tyr	SF4 más P-Tyr	Valor P
HSF 6	0.23 ± 0.015	0.39 ± 0.016	0.0004
CDC 32	0.42 ± 0.024	0.56 ± 0.01	0.001
HTB - 35	0.43 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.0002
HTB - 43	0.24 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.01

Fig.4

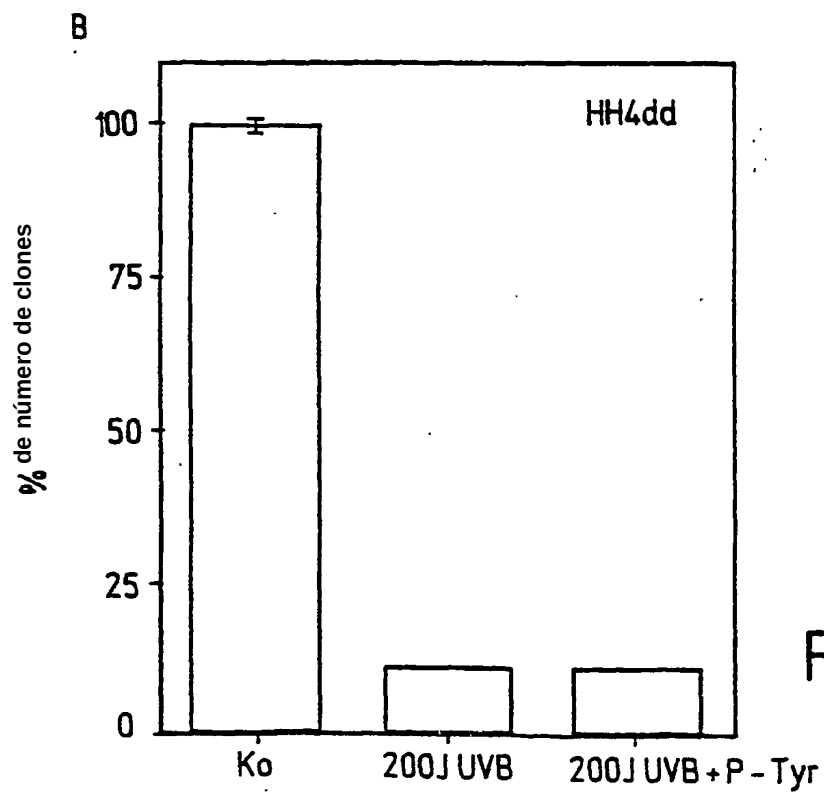
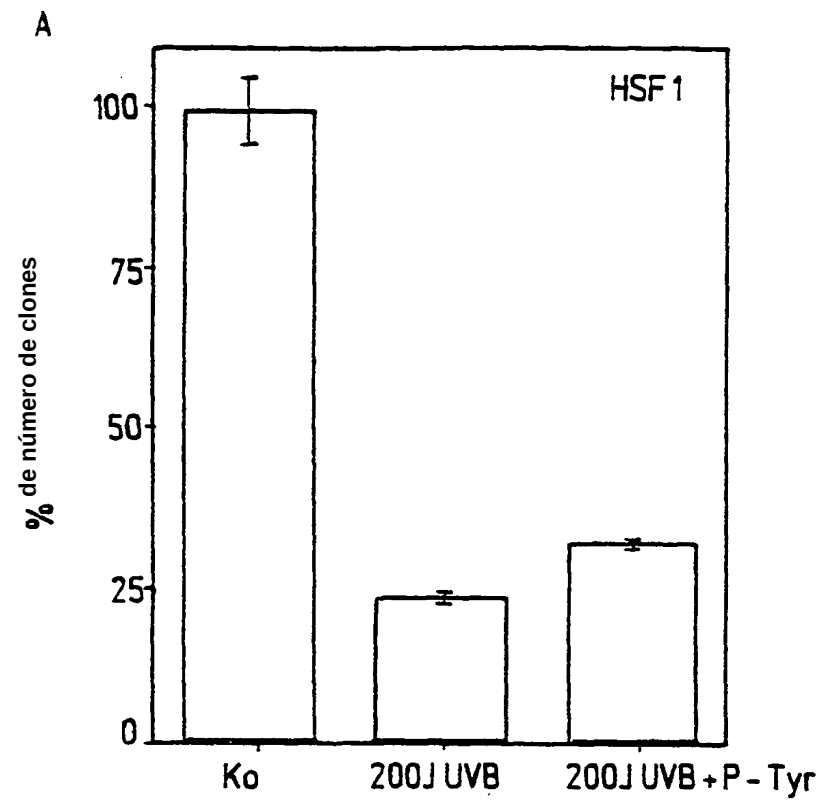


Fig.5

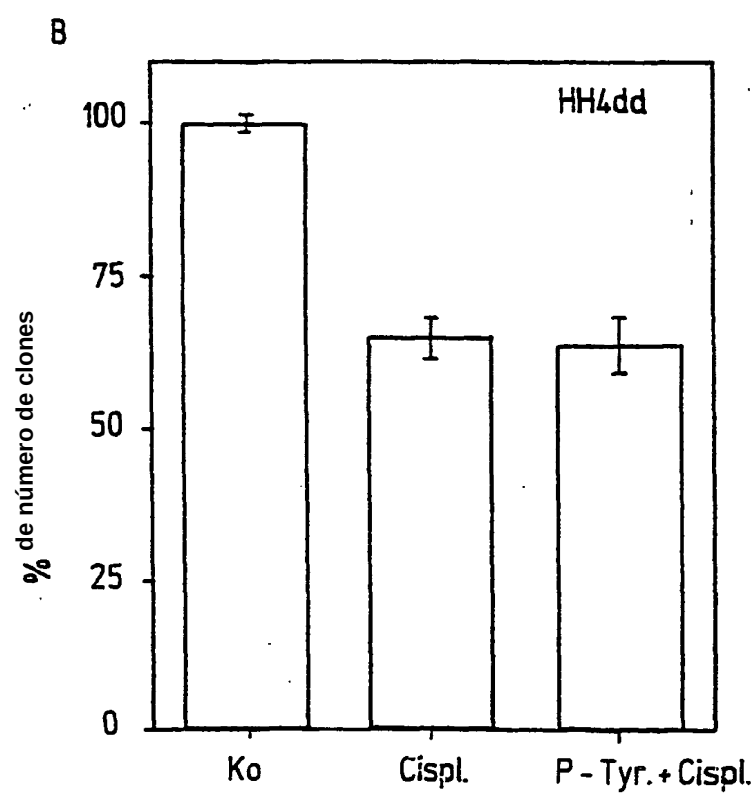
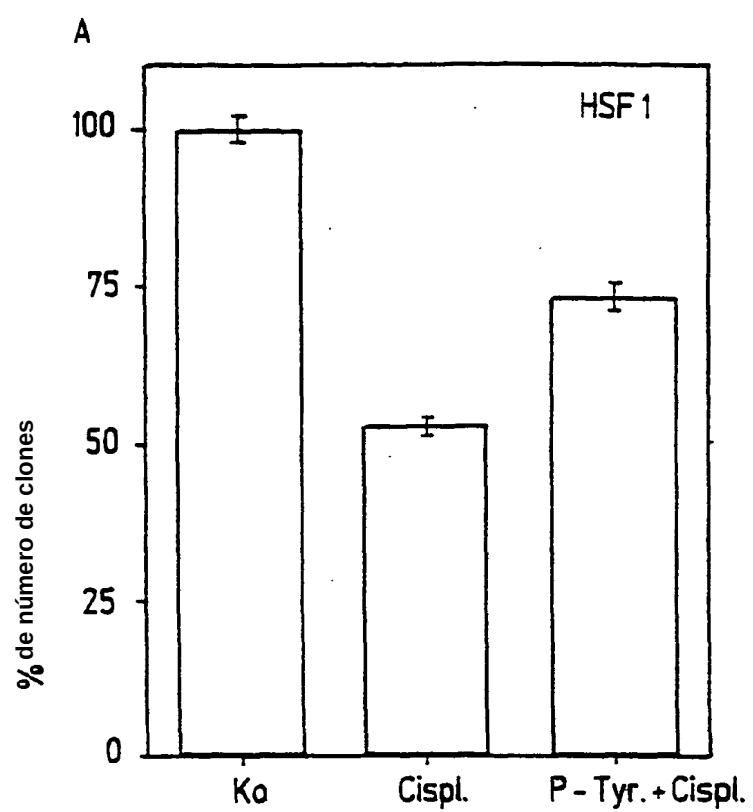


Fig.6