

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 872**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/35** (2006.01)  
**C12Q 1/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07017630 .0**  
96 Fecha de presentación: **21.07.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1875906**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **USO TERAPÉUTICO DE LA YESSOTOXINA COMO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS.**

30 Prioridad:  
**25.07.2003 ES 200301773**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.11.2011**

73 Titular/es:  
**LABORATORIOS CIFGA, S.A.**  
**C/ CRUZ, 1**  
**27001 LUGO, ES**

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

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

**ES 2 368 872 T3**

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 terapéutico de la yessotoxina como inhibidor del crecimiento de células tumorales humanas.

5 La presente invención se refiere al uso terapéutico de la yessotoxina como agente citotóxico para células de carcinoma hepatocelular humano debido a su capacidad para activar las fosfodiesterasas celulares.

10 La yessotoxina, en adelante YTX, y sus análogos naturales son éteres policíclicos producidos por dinoflagelados de las especies *Protoceratium reticulatum* y *Lingolodinium 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, ni afectan a las fosfatasaas 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 (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.

40 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 YTX 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.

55 Estas pruebas se utilizan 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 rutinarios sobre células o tejidos en los que se determina la afinidad, selectividad y especificidad por la diana primaria y el mecanismo de acción o las propiedades farmacéuticas de los compuestos. Aquellos que fallen en algún parámetro, son por tanto descartados para estudios posteriores.

60 Una explicación más en profundidad sobre las familias de toxinas, las características particulares de las YTX y su

mecanismo de acción se proporciona en la descripción de las solicitudes principal y divisional relacionadas con la presente invención.

5 La invención propuesta describe un uso de la YTX como inhibidor del crecimiento de células de carcinoma hepatocelular humano en función de su capacidad para activar las fosfodiesterasas celulares.

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

10 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 el presente uso se  
15 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 de estos protocolos en el que la respuesta se cuantifica en la línea celular HEP-G2 por medio de una tinción con cristal violeta y posterior acetilación.

20 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 CO<sub>2</sub>.

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

c.- Se adicionan 10 µL de glutaraldehído al 11% para fijar las células y se incuba durante 15 minutos. Se lava 3-4 veces con agua destilada.

30 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.

35 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 encontró que 10 µM de YTX inducen una inhibición del crecimiento celular del 82+/-1%.

40 BIBLIOGRAFÍA

Alfonso, A., de la Rosa, L. A., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. y Botana, L. M. (2003). "Yessotoxin a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes." Biochem Pharmacol 65: 193-208.

45 Alfonso, A., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. y Botana, L. M. (2004). "A rapid microplate fluorescent method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases." Analytical Biochem. 326: 93-99.

50 Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H. y Landsverk, T. (2002). "Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice." Toxicon 40(1): 77-82.

Cvijic, M. E., Yang, W. L. y Chin, K. V. (1998). "Cisplatin resistance in cyclic AMP-dependent protein kinase mutants." Pharmacol Ther 78(2): 115-28.

55 De la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M. R. y Botana, L. M. (2001). "Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin." Biochem. Pharmacol. 61 (7): 827-833.

60 De la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. y Botana, L. M. (2001). "Maitotoxin-induced calcium entry in human lymphocytes - Modulation by yessotoxin, Ca<sup>2+</sup> channel blockers and kinases." Cell Signal 13(10): 711-716.

Houslay, M. D. y Adams, D. R. (2003). "PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization." Biochem J. 370: 1-18.

- 5 Leira, F., Alvarez, C., Vieites, J. M., Vieytes, M. R. y Botana, L. M. (2001). "Okadaic acid and yessotoxin induce caspase-3 mediated apoptosis in neuroblastoma cells. Characterization of distinct apoptotic changes induced by these phycotoxins in the BE(2)-M17 cell line by means of new fluorimetric microplate assays." *Toxicology in vitro* 15: 277-283.
- 10 Malaguti, C., Ciminello, P., Fattorusso, E. and Rossini, G. P. (2002). "Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells." *Toxicol in Vitro* 16(4): 357-363.
- 15 Mann, S. C., Andrews, P. A. y Howell, S. B. (1991). "Modulation of cisdiaminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells." *Int J Cancer* 48(6): 866-72.
- 20 Murata, M., Kumagai, M., Lee, J. S. y Yasumoto, T. (1987). "Isolation and structure of Yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning." *Tetrahedron Letters* 28: 5869-5872.
- 25 Pazos, M. J., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Yasumoto, T., Vieites, J. M. y Botana, L. M. (2004). "Resonant mirror biosensor detection method based on yessotoxin-phosphodiesterase interactions." *Analytical Biochem.* 335: 112-118.
- Tubaro, A., Sosa, S., Carbonatto, M., Altinier, G., Vita, F., Melato, M., Satake, M. y Yasumoto, T. (2003). "Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice." *Toxicol* 41(7): 783-92.
- von Knethen, A., Lotero, A. y Brune, B. (1998). "Etoposide and cisplatin induced apoptosis in activated RAW 264.7 macrophages is attenuated by cAMP-induced gene expression." *Oncogene* 17(3): 387-94.
- Wang, H., Cai, Q., Zeng, X., Yu, D., Agrawal, S. y Zhang, R. (1999). "Antitumor activity and pharmacokinetics of a mixed-backbone antisense oligonucleotide targeted to the R1alpha subunit of protein kinase A after oral administration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (24): 13989-94.

**REIVINDICACIONES**

1. Yessotoxina capaz de activar las fosfodiesterasas celulares para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular humano.

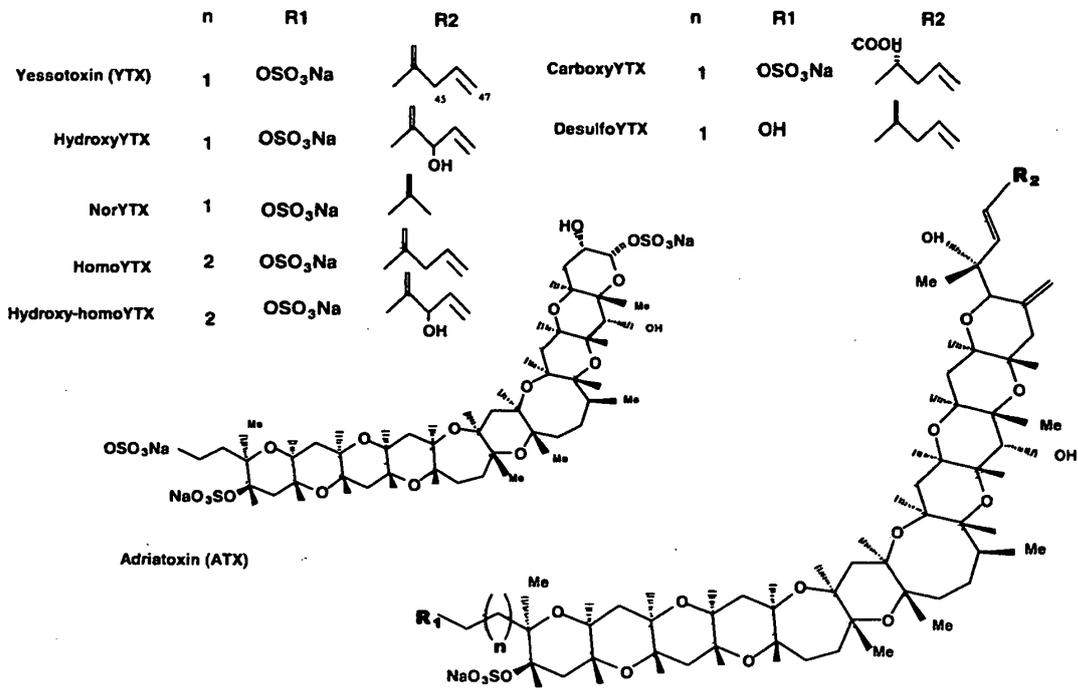


Figura 1