(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 684 686**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/185 (2006.01)
A61K 31/255 (2006.01)
A61K 31/315 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2012** **PCT/FR2012/050739**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012** **WO12136937**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012** **E 12720245 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018** **EP 2694054**

(54) Título: **N-Acetil-taurinato de zinc para el tratamiento del cáncer de próstata**

(30) Prioridad:

08.04.2011 FR 1153055

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2018

(73) Titular/es:

TRI-INOV (100.0%)
64 rue de Longchamp
92200 Neuilly sur Seine, FR

(72) Inventor/es:

DURLACH, JEAN PIERRE

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 684 686 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

N-Acetil-taurinato de zinc para el tratamiento del cáncer de próstata

La presente invención tiene por objeto una nueva utilización del N-acetil-taurinato de zinc. WEI HUA Y COL: "Differential expression of metallothioneins (MTs) 1, 2, and 3 in response to zinc treatment in human prostate normal and malignant cells and tissues", MOLECULAR CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDRES, GB, vol. 7, no. 1, 21 de enero de 2008 (21-01-2008), página 7, ISSN: 1476-4598 sugiere la eficacia del zinc en la prevención y el tratamiento del cáncer de próstata. El N-acetil-taurinato de zinc pertenece a la familia de los derivados de la taurina con actividad neuromuscular reforzada, que se describen en la patente FR 2 384 751. En la solicitud WO 2009/112758 se describió la utilización del N-acetil-taurinato de zinc para prevenir y/o tratar las enfermedades con acumulación de lipofuscina debida al envejecimiento o a un estrés oxidativo.

Se ha descubierto ahora de forma sorprendente que el N-acetil-taurinato de zinc (ATA-Zn) se puede utilizar como agente anticanceroso para el tratamiento del cáncer de próstata.

De este modo, la presente invención tiene por objeto el N-acetil-taurinato de zinc de fórmula:

$$[CH_3\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}SO_3]^-{}_2Zn^{2+}$$

para tratar el cáncer de próstata.

La invención también tiene por objeto N-acetil-taurinato de zinc para su utilización en el tratamiento del cáncer de próstata. El N-acetil-taurinato de zinc se prepara mediante acción del anhídrido acético sobre la taurina en presencia de acetato de zinc de acuerdo con un procedimiento análogo al descrito para la preparación de N-acetil-taurinato de sodio por M. TERAKOA (Hoppe-Seyler Zeitschrift für Physiologische Chemie, 145, 242 (1925)).

Preferentemente, se utiliza N-acetil-taurinato de zinc dihidratado.

Para la administración a los pacientes que padecen cáncer de próstata, el N-acetil-taurinato de zinc se mezcla ventajosamente como principio activo con un excipiente farmacéuticamente aceptable utilizado habitualmente para la preparación de composiciones farmacéuticas administrables por vía oral, parenteral o local.

La actividad anticancerosa de ATA-Zn se ha demostrado utilizando células cancerosas y células normales de la próstata.

Los ensayos realizados demostraron que el ATA-Zn tiene un efecto antiproliferativo sobre células cancerosas de la próstata mientras que no tiene ningún efecto sobre células normales de la próstata.

Además, se demostró que este efecto antiproliferativo era concomitante con una detención del ciclo celular mediante la represión del ARNm de la ciclina-D1 y con un aumento de la apoptosis mediante la regulación transcripcional positiva del índice de apoptosis Bax/Bcl-2.

Por otro lado, se demostró que ATA-Zn era atóxico a concentraciones inferiores a 10^{-3} M.

La invención se describirá a continuación con más detalle mediante la preparación y los ensayos a continuación.

PREPARACIÓN

Se mezclaron 20,25 g de taurina y 17,5 g de acetato de zinc puro seco y se añadieron 50 g de agua pura.

Se calentó la suspensión resultante a una temperatura comprendida entre 65 y 75 °C y a esta suspensión se le añaden, 45 g de anhídrido acético y a continuación se calentó a 100-105 °C. A continuación se añadieron 100 ml de etanol anhidro a la mezcla de reacción resultante a una temperatura comprendida entre 70 y 75 °C.

Finalmente se obtuvieron 30 ± 3 g del producto esperado en forma de un polvo blanco soluble en agua y poco soluble en etanol (rendimiento ponderal: 36,25 %).

Análisis (en porcentajes)

Análisis	Calculado	Descubierto
C	24,16	22,75
H	4,05	4,60
N	7,04	5,73

Análisis	Calculado	Descubierto
Zn*	16,4	16,7
** dosificación de Zn por EDTA*		

ENSAYOS IN VITRO

a) Materiales y métodos

En los ensayos que comprende, se utilizaron los cultivos celulares y medios de cultivo a continuación:

Cultivos celulares y medios celulares

Se utilizó la línea de células cancerosas de próstata LNCaP, depositada en la ATCC con el n° CRL-1740.

El medio de cultivo de las células era el medio de crecimiento completo RPMI 1640 (ATCC n° 30-2001), que contiene la L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM y piruvato de sodio 1,0 mM, al que se añade:

1) carbonato de sodio y glucosa en cantidades suficientes para obtener una concentración de 20 mM de carbonato de sodio y de 25 mM de glucosa,
2) el 90 % en volumen de una mezcla de antibióticos (10 μg/ml de gentamicina, 100 UI de penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina), y
3) 10 % en volumen de suero fetal de ternero.

A modo de comparación, se utilizaron células epiteliales normales de próstata (PrEC) y el medio de crecimiento PrEC comercializados por la Compañía Cambrex Bioscience (Walkersville, MD).

Tratamiento de las células

Para los estudios de dependencia de la dosis, las células (confluentes al 50 %) se trataron con ATA-Zn a concentraciones de 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} y 10^{-9} M, durante 24 horas, 48 horas, y 72 horas en su medio de crecimiento respectivo. A cabo de 48 h de tratamiento, las células se recogieron y se contaron en el sedimento. Paralelamente, los lisados celulares se prepararon para extraer el ARNm para la RT-Q-PCR y la transferencia de Western.

Numeración celular

Para evaluar el número de células, los sedimentos celulares se mezclaron con 1 ml de su medio respectivo y la viabilidad celular así como el número de células se evaluaron mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano.

RT-O-PCR (reacción de polimerización en cadena y en tiempo real)

Se extrajo el ARN_m de las células en cultivo utilizando el kit titulado «SV Total RNA isolation» de la Compañía Promega y siguiendo el modo operatorio que comprende: Las células se recogen por aspiración del medio de cultivo y se lavan con PBS (3 veces x 4 ml) a temperatura ambiente durante 5 min.

A continuación se añaden 175 μl de tampón de lisis SV RNA a las células lavadas, que comprende se dispersa la masa de ARN y se mezcla bien con ayuda de un vórtice.

Se repite la operación varias veces y se coloca el lisado celular obtenido en tubos de 1,5 ml. Hasta $1x10^6$ células son lisadas fácilmente en 175 μl del tampón de lisis utilizado.

A continuación se añaden 350 μl de tampón de dilución SV RNA a 175 μl de lisado. Se mezcla por volteo de los tubos de 3 a 4 veces.

Los tubos se colocan a continuación al baño maría a 70 °C durante 3 min máximo.

A continuación, se centrifuga durante 10 min a 13000 g y a temperatura ambiente. El sobrenadante transparente obtenido se recupera en microtubos estériles de 1,5 ml. A continuación se añaden 200 μl de etanol al 95 % y se mezcla pipeteando de 3 a 4 veces.

Se añade la mezcla alcohólica obtenida anteriormente en la columna de separación suministrada con el kit, se centrifuga a 13000 g durante 1 min y se añaden 600 μl de solución de lavado y se centrifuga de nuevo a 13000 g durante 1 min.

Se prepara la solución de ADNasa mezclando 40 μl de tampón de extracción, 5 μl de $MnCl_2$ y 5 μl de ADNasa.

Se añaden 50 μl de la solución de ADNasa en la membrana de la columna de separación y se deja incubar durante 15 min a temperatura ambiente.

A continuación se añaden 200 μl de solución de detención SV DNAase, se centrifuga durante 1 min a 13000 g, se añaden 600 μl de solución de lavado, se centrifuga una vez más a 13000 g durante 1 min, a continuación se añaden 250 μl de solución de lavado y se centrifuga a 13000 g durante 2 min. Se colocan las columnas en los tubos de elución estériles suministrados en el kit, se añaden 100 μl de agua suministrada con el kit, y se centrifuga durante 1 min a 13000 g para eluir el ARNm. El ARNm recuperado de este modo se almacena a -80 °C.

Se controla la calidad del ARNm obtenido y se determina la concentración de ARNm en la muestra obtenida de acuerdo con los modos operatorios clásicos bien conocidos por el experto en la materia.

A continuación, se realizó una transcripción inversa del ARN utilizando el ensayo listo para el empleo (kit denominado en lengua inglesa «Ready To Go, You Prime First Strand Beads» disponible en el mercado de Amersham Biosciences, Piscataway, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del proveedor a partir de 3 μg de ARN.

El ensayo «LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I» disponible en el mercado de Roche Diagnostics, Meylan, Francia, se utilizó para cuantificar la expresión génica mediante una reacción de polimerización en cadena (PCR) en tiempo real. La PCR (programa: 95 °C, 30 segundos; 40 ciclos: 95 °C, 5 segundos; 60 °C, 35 segundos) se realizó con ayuda de un aparato «Mastercycler ep realplex» comercializado por la Compañía Eppendorf, Hamburgo, Alemania.

La expresión del gen diana se normalizó con respecto al gen doméstico GAPDH. Se aplicó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para calcular la expresión génica relativa.

Se utilizaron los siguientes cebadores para la PCR:

CICLINA D1:

- cebador sentido: 5'-GGATGCTGGAGGTCTGCGAGGAAC 3' (SEQ ID N°1)
- cebador antisentido: 5'-GAGAGGAAGCGTGTGAGGCGGTAG-3' (SEQ ID N°2)

BAX:

- cebador sentido, 5'-TTTGCTrCAGGGTTTCATCC-3'; (SEQ ID N°3)
- cebador antisentido, 5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'; (SEQ ID N°4)

BCL-2:

- cebador sentido, 5'AATGCAGTGGTGCTTACGCTC-3'; (SEQ ID N°5)
- cebador antisentido 5'-GGATAGCAGCACAGGATTGGAT-3'; (SEQ ID N°6)

GAPDH:

- cebador sentido, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'; (SEQ ID N°7)
- cebador antisentido 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'. (SEQ ID N°8)

Transferencia de Western

Las células se lisaron en el tampón para el ensayo de radioinmunoprecipitación que tiene la composición que comprende:
Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1 %, SDS al 0,1 %, NaF 50 mM, Na_3VO_4 2 mM, ácido okadaico 100 nM, β-glicerofosfato 25 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasas de la Compañía Sigma que contiene:

AEBSF (fluoruro de 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo) 2 mM;
aprotinina 0,3 μM;
bestatina 130 μM;
EDTA 1 mM;
E-64 14 μM;
leupeptina 1 μM.

A continuación, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF Hybond-P (Amersham Biosciences, Pantin, Francia). Las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo constituida por polvo de leche desnatada al 5 % en el tampón TBS-T (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1 %).

Las membranas se incubaron a continuación con anticuerpos primarios de conejo dirigidos contra la ciclina-D1 (n° 29785); los marcadores Bax (n° 1063.1) y BCL-2 (n° 1017-1); Nrf-2 (n° 2178-1) y SOD-1 (n° 2018-1) comercializados todos por la Compañía Epitomies con las referencias indicadas anteriormente y los anticuerpos anti-actina, N-terminal, A2103, comercializados por la Compañía Sigma-Aldrich, (Saint Quentin Fallavier, Francia) en la solución de bloqueo toda una noche a 4 °C.

Dichos anticuerpos se diluyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a 1/1000. Los anticuerpos anti-actina sirvieron para normalizar las membranas.

Las membranas se lavaron tres veces en el tampón TBS-T, a continuación se incubaron con anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano (1:5000) (Santa Cruz, CA, Estados Unidos) en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después de tres lavados, las membranas se revelaron utilizando el sistema de detección mejorado de la quimioluminiscencia, conocido con la denominación inglesa «ECL Prime Western Blotting Detection Reagent», comercializado por (Amersham Biosciences (Pantin, Francia).

b) Ensayo 1: Numeraciones celulares

- *células cancerosas LNCaP*

La numeración de las células viables y de las células no viables se realizó después de una exclusión con azul de tripano. Al cabo de 48 horas de incubación, se constató que el ATA-Zn reducía el número de células con cada dosis; se observó una reducción máxima del 25 % a la concentración más elevada (10^{-4}). La mortalidad evolucionaba en sentido inverso con un aumento máximo que se aproxima al 50 %. La concentración de 10^{-3} M era tóxica. Los resultados obtenidos se notifican en los gráficos de las figuras 1a y 1b que dan el porcentaje de células cancerosas con respecto al control (cultivo celular sin ATA-Zn) en función de la concentración de ATA-Zn. La figura 1a se refiere a las células viables y la figura 1b se refiere a las células no viables.

- *células normales PrEC*

Se procedió de la misma manera con las células epiteliales de próstata normal (PrEC) y se constató que el ATA-Zn no tenía ningún efecto sobre el número de células incluso después de 72 horas de incubación a excepción de la dosis de ATA-Zn de 10^{-3} M que era tóxica para las células, estando estas completamente muertas al cabo de 72 horas de incubación con ATA-Zn 10^{-3} M.

Los resultados obtenidos se notifican en los gráficos de las figuras 2a y 2b que dan el porcentaje de células normales con respecto al control (cultivo celular sin ATA-Zn) en función de la concentración de ATA-Zn. La figura 2a se refiere a las células viables y la figura 2b se refiere a las células no viables.

c) Ensayo 2: disminución del ARNm de ciclina-D1

Se incubaron células LNCaP con diferentes concentraciones de ATA-Zn (10^{-5}-10^{-9} M) durante 48 horas. La cantidad del ARNm de ciclina-D1 se midió mediante RT-Q-PCR siguiendo el modo operatorio descrito anteriormente en el párrafo titulado "Materiales y métodos". Se constató que ATA-Zn reduce la síntesis del ARNm de ciclina-D1 al cabo de 24 horas de exposición como demuestran los resultados notificados en el gráfico de la figura 3 que da la cantidad del ARNm de ciclina-D1 producido en función de la concentración de ATA-Zn. Se repitió el mismo ensayo con las células normales y se constató que el ATA-Zn no tenía ningún efecto sobre la síntesis del ARNm de ciclina-D1 como muestra la figura 4.

d) Ensayo 3: aumento de la relación Bax/Bcl-2

Se incubaron células LNCaP con diferentes concentraciones de ATA-Zn (10^{-5}-10^{-9} M) durante 48 horas. La evolución de la síntesis de los ARNm de Bax y de Bcl-2 se midió mediante RT-Q-PCR siguiendo el modo operatorio descrito anteriormente en el párrafo titulado "Materiales y métodos". Se constató que ATA-Zn aumentaba fuertemente la relación Bax/Bcl-2 como demuestran los resultados notificados en el gráfico de la figura 5 que da la relación Bax/Bcl 2 en función de la concentración de ATA-Zn.

Se realizó el mismo ensayo con células PrEC. Con estas células normales, la acumulación de Bax y de Bcl-2 fue imposible de determinar, ya que la cantidad de base era demasiado pequeña para una buena amplificación mediante PCR. De ello se puede llegar a la conclusión de que la apoptosis es muy pequeña para las células

normales PrEC en las condiciones basales y que no está influida por el ATA-Zn.

e) Ensayo 4: influencia del ATA-Zn sobre la síntesis de las proteínas Nrf-2 y SOD-1

Se incubaron células LNCaP con un intervalo de concentraciones de ATA-Zn durante 48 horas. A continuación se midió la cantidad de las proteínas Nrf-2 y SOD-1 mediante transferencia de Western. La cuantificación se realizó con el software «Quantity One» y los resultados se normalizaron con respecto a los datos de la actina. Los resultados obtenidos se notifican en la figura 6 (prótesis Nrf-2) y la figura 7 (prótesis SOD-1).

Estos resultados demuestran que ATA-Zn disminuye la tasa de la prótesis SOD-1 mediante un mecanismo mediado un ARE («antioxydant response element» o elemento responsable de la antioxidación) ya que la prótesis Nrf-2 está también reprimida. La prótesis Nrf-2 es un factor de transcripción afectado por el estado redox intracelular. Esta regula la transcripción de los genes que posee un elemento responsable de la antioxidación en su promotor. De este modo, se piensa que el ATA-Zn modifica el estado oxidativo de las células cancerosas lo que conlleva una disminución del crecimiento y/o un aumento de la apoptosis de las células.

REIVINDICACIONES

1. N-acetil-taurinato de zinc de fórmula:

$$[CH_3\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}SO_3]^-{}_2Zn^{2+}$$

para su utilización en el tratamiento del cáncer de próstata.

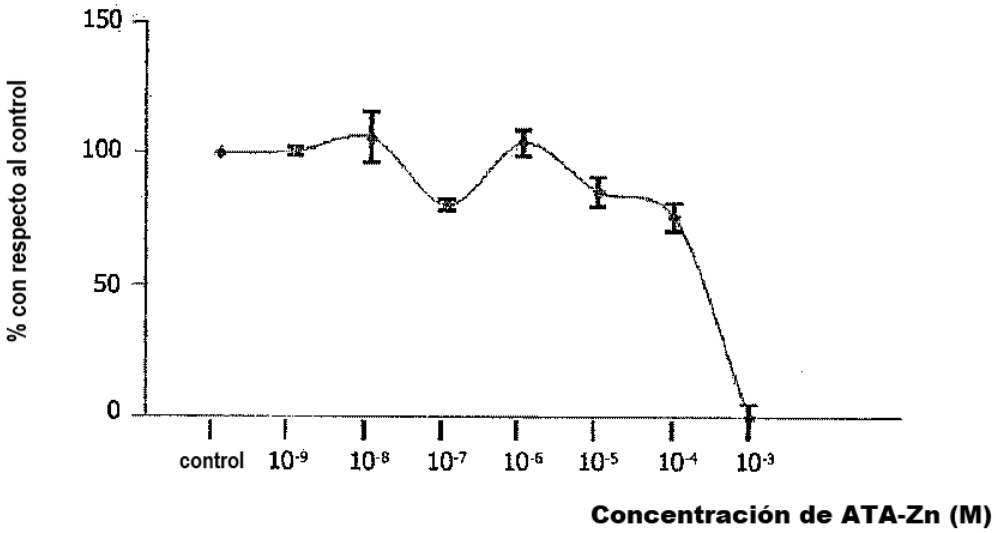

FIGURA 1a

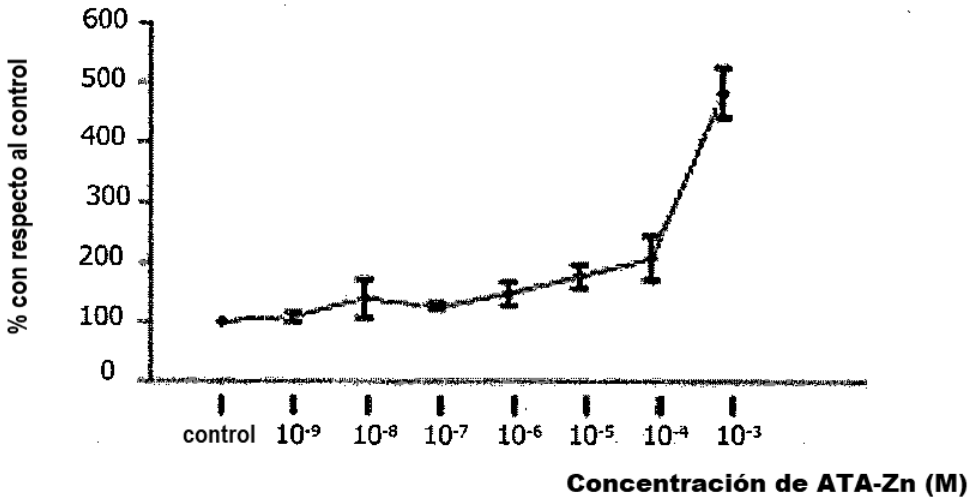

FIGURA 1b

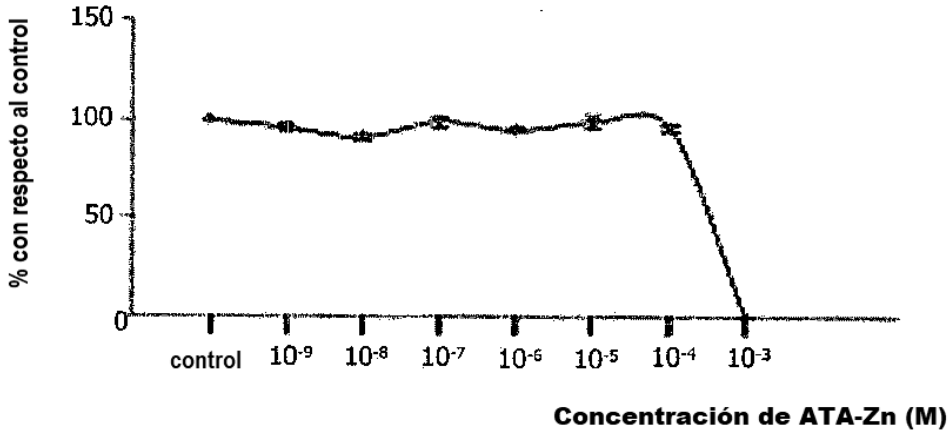

FIGURA 2a

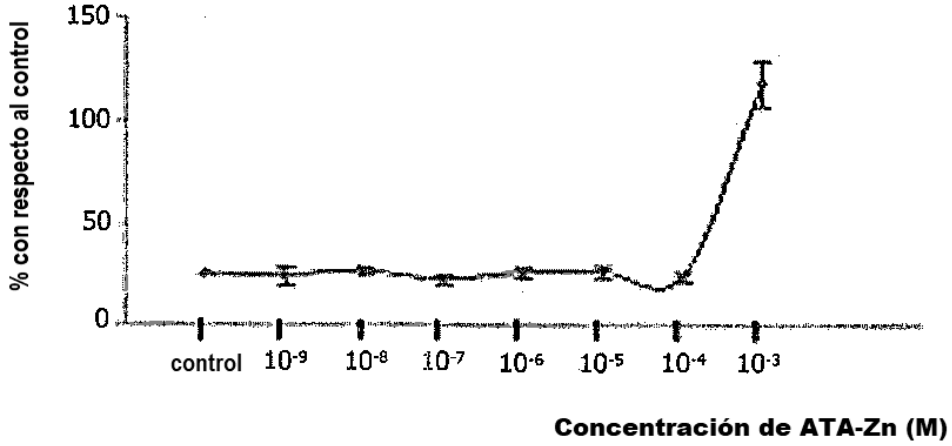

FIGURA 2b

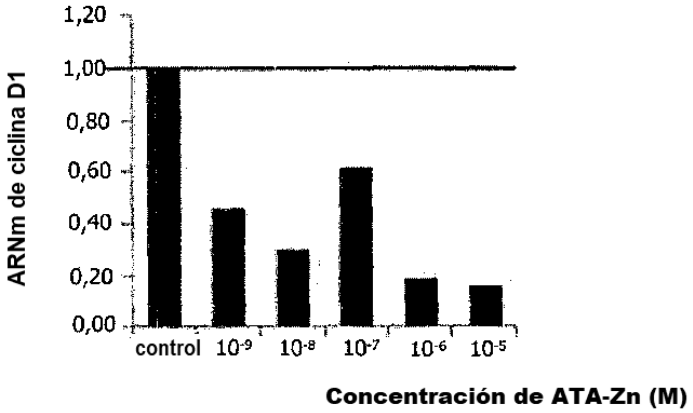

FIGURA 3

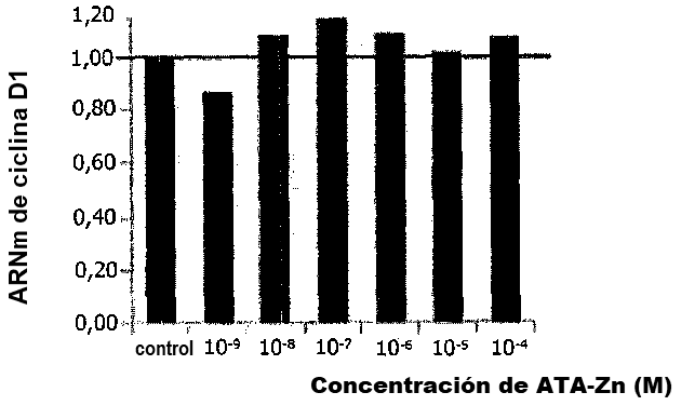

FIGURA 4

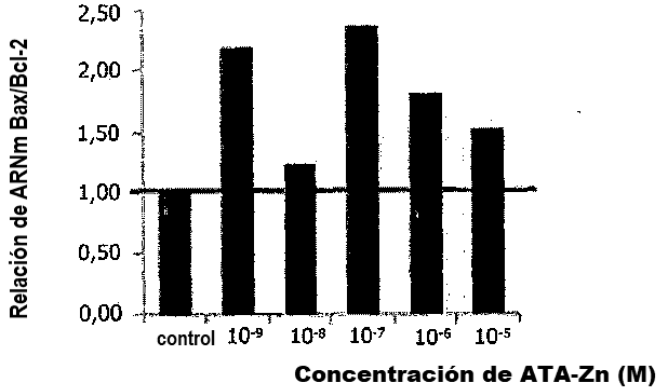

FIGURA 5

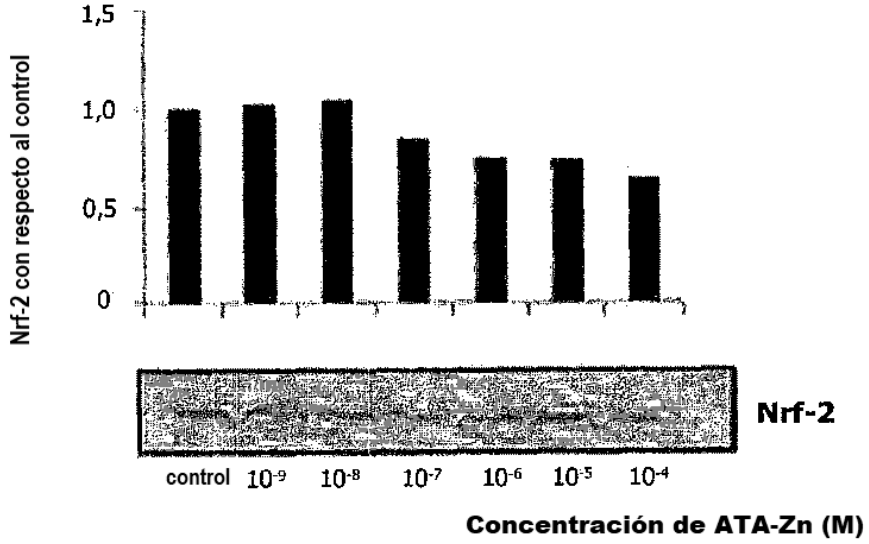

FIGURA 6

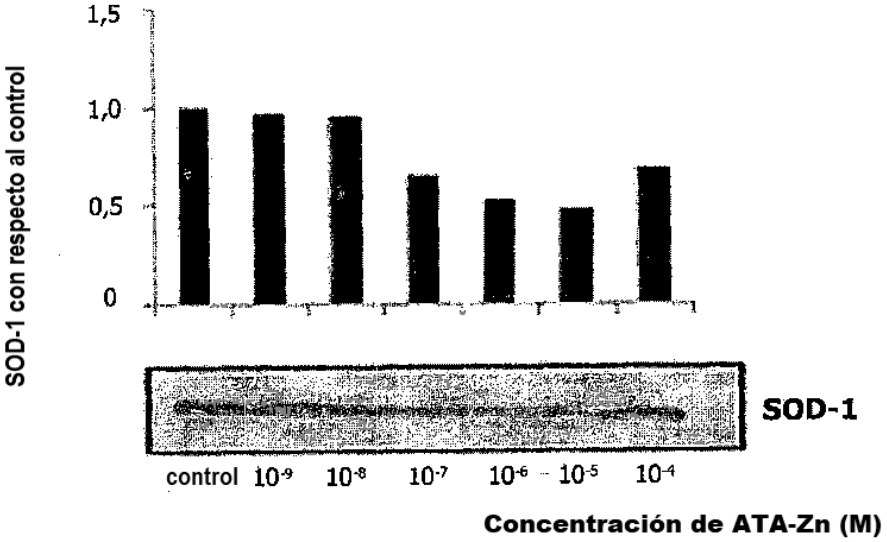

FIGURA 7