



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 738**

51 Int. Cl.:

A61K 31/675 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04816432 .1**

96 Fecha de presentación : **17.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1694338**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

54 Título: **Uso de miméticos de la superóxido dismutasa y de la glutatión reductasa como agentes anticancerígenos.**

30 Prioridad: **18.12.2003 FR 03 14933**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **Université Paris Descartes
12, rue de l'Ecole de Médecine
75006 Paris, FR
Protexel**

72 Inventor/es: **Weill, Bernard;
Batteux, Frédéric y
Laurent, Alexis**

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

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 de miméticos de la superóxido dismutasa y de la glutatión reductasa como agentes anticancerígenos.

5 La presente invención se refiere al uso de un mimético químico de la superóxido dismutasa (SOD), en particular el mangafodipir, para inhibir el crecimiento tumoral, y potenciar los efectos de tratamientos antitumorales en las células tumorales, a la vez que se inhiben sus efectos tóxicos sobre las células normales.

10 La expresión: “formas reactivas del oxígeno” (FRO) abarca un conjunto de derivados reducidos del oxígeno, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$). Estos derivados normalmente son generados por el metabolismo celular, en particular en las mitocondrias durante la reducción del oxígeno molecular a H_2O . Además se producen en cantidades importantes en determinadas condiciones, por ejemplo, durante la exposición a radiaciones ionizantes o a rayos ultravioletas, o la exposición a determinados productos químicos.

15 Las formas reactivas del oxígeno son muy tóxicas y las células disponen de diferentes medios para neutralizarlas. Entre estos medios de detoxificación figuran en particular las enzimas “antioxidantes”, entre las que pueden citarse las superóxido dismutasas (SOD; EC 1.15.1.1) que catalizan la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno + O_2 , y las enzimas que intervienen después en la detoxificación del peróxido de hidrógeno, tales como la catalasa (EC 1.11.1.6) que cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno ($2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$), la glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9) que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno por el glutatión reducido (GSH), produciendo glutatión oxidado (GSSG) y agua ($2 GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2 H_2O$), y la glutatión reductasa (EC 1.8.1.7) que regenera el GSH de acuerdo con la reacción $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2 GSH + NADP^+$.

25 Cuando la producción de las formas reactivas del oxígeno supera las capacidades de detoxificación de la célula, se manifiestan los efectos tóxicos de estos derivados, y pueden inducir daños importantes en constituyentes celulares tales como las proteínas, los lípidos de membrana o el ADN. El estrés oxidante así generado tiene una función importante en la aparición y desarrollo de diversas enfermedades, en particular patologías inflamatorias y autoinmunes, y cánceres.

30 Actualmente se admite en general que las formas reactivas del oxígeno intervienen en la patogénesis de numerosos cánceres. Sin embargo, parece que sus efectos ponen en juego mecanismos complejos, que todavía no se han elucidado.

35 En cantidades subletales, las FRO pueden favorecer la aparición de cánceres, por ejemplo provocando mutaciones en regiones codificantes o regiones reguladoras, o inhibiendo o al contrario estimulando la expresión de genes implicados en la regulación de la proliferación o la diferenciación celular, o la apoptosis. Así pues, se ha propuesto usar antioxidantes en el marco de tratamientos curativos o preventivos de diferentes cánceres. Por ejemplo, se ha recomendado una alimentación complementada con antioxidantes, en particular con vitamina E, con el fin de prevenir el cáncer.

40 En concentraciones altas, las FRO pueden inducir directamente la muerte celular, en particular provocando reacciones de peroxidación lipídica y proteica, que pueden favorecer la despolarización mitocondrial y así acelerar las fases efectoras de la apoptosis. Esta activación de la apoptosis por las FRO puede constituir un medio de destrucción de las células tumorales.

45 Por ejemplo, los tratamientos de radioterapia se basan esencialmente en la inducción de una superproducción de FRO en las células tumorales. Igualmente, muchas moléculas usadas en la quimioterapia del cáncer inducen en las células una superproducción de FRO, que sería responsable, al menos en parte, del efecto antitumoral de esas moléculas.

50 Las moléculas anticancerígenas que pueden inducir una producción de FRO pueden pertenecer a diferentes clases terapéuticas. Se pueden citar en particular los agentes intercalantes, por ejemplo antraciclinas como la doxorubicina que inhibe la replicación e induce lesiones en el ADN; inhibidores de la topoisomerasa-2 como el etopósido que induce roturas del ADN; antimetabolitos como el 5-fluorouracilo; agentes electrófilos como la mitomicina C y derivados del platino [cisplatino (YOKOMIZO y col., *Cancer Res.*, 55: 4293-4296 1995), y oxaliplatino]; venenos del huso como los taxanos; y antirreceptores hormonales como el tamoxifeno (FERLINI y col., *Br. J. Cancer*, 79, 257-263, 1999).

55 Sin embargo, una de las principales limitaciones del uso de estas moléculas anticancerígenas deriva del hecho de que su acción también puede conllevar la muerte de las células normales y conducir a lesiones, a veces irreversibles, y a consecuencias muy perjudiciales.

60 La mayoría de las moléculas anticancerígenas destruyen de forma preferencial las células que se dividen rápidamente. Así pues, su toxicidad con respecto a las células sanas es en general menor que con respecto a las células tumorales. No obstante, en algunos tejidos existen células cuya tasa de división es muy rápida, y que por lo tanto son particularmente sensibles a los efectos tóxicos de los anticancerígenos. Se trata, en particular, de células hematopoyéticas en vías de diferenciación de la médula ósea. La mielotoxicidad es la más frecuente de las toxicidades asociadas a la quimioterapia y está asociada con la mayor parte de los tratamientos antitumorales. Afecta principalmente a los leucocitos y las plaquetas, y se traduce, en particular, en una leucopenia que aumenta el riesgo infeccioso en los pacientes tratados.

Algunas moléculas anticancerígenas presentan además una citotoxicidad que apunta más específicamente a determinados tejidos u órganos. A modo de ejemplos: las antraciclinas, tales como la doxorubicina, tienen un efecto cardiotóxico que resultaría de la producción de FRO que conlleva una peroxidación de las estructuras lipídicas del retículo sarcoplásmico y las mitocondrias, y una disfunción de sus orgánulos; la bleomicina tiene una fuerte toxicidad pulmonar, que se atribuye también a la producción de FRO, y que puede conducir a una fibrosis pulmonar intersticial irreversible.

Se han propuesto diferentes estrategias para disminuir estos efectos secundarios de los tratamientos anticancerígenos.

En el caso de una citotoxicidad que concierne más en particular a algunos tipos celulares, se ha propuesto usar agentes citoprotectores, y en particular agentes capaces de neutralizar los FRO, tales como la N-acetil-cisteína (DO-ROSHOW y col., *J. Clin. Invest.*, 68, 1053-1064, 1981), o más recientemente la SOD o miméticos de esta enzima. Por ejemplo, la solicitud PCT/WO 97/49390 propone usar un quelato de manganeso derivado del dipiridoxal, el MnDPDP, para prevenir los efectos cardiotóxicos de las antraciclinas; la solicitud PCT/WO 02/060383 describe la capacidad de dos quelatos de manganeso derivados de porfirina, MnTBAP y MnTM-4-PyP, para proteger las células del epitelio pulmonar de los efectos tóxicos de la radioterapia y de la bleomicina; esta solicitud también describe que sus derivados pueden inhibir selectivamente la proliferación de células de adenocarcinoma pulmonar, sin afectar a la de las células epiteliales o endoteliales normales.

La solicitud WO 84/04922 A describe la actividad antitumoral del mimético de la superóxido dismutasa Cu-DIPS, opcionalmente combinado con otros agentes antitumorales.

Para reducir las consecuencias de los efectos citotóxicos de las moléculas anticancerígenas respecto a las células hematopoyéticas, en general se usan factores de crecimiento hematopoyéticos, con el fin de reducir la duración de la leucopenia y el riesgo infeccioso que deriva de la misma. El uso de agentes citoprotectores está limitado por el riesgo de la falta de selectividad de estos agentes y por la tasa de división rápida de las células hematopoyéticas. Actualmente, el único agente citoprotector usado para reducir la leucopenia es la amifostina que es un precursor fosforilado de un antioxidante con grupo tiol, y cuya selectividad resulta de su penetración con preferencia en las células no tumorales en las que libera la molécula activa.

Los autores de la invención han llevado a cabo el ensayo de los efectos de diferentes moléculas, conocidas por su capacidad de neutralizar en diferentes niveles la producción de FRO, en la proliferación de diferentes líneas celulares tumorales, así como en la viabilidad de estas células tumorales y la de los leucocitos humanos normales; después han ensayado, de la misma forma, los efectos de estas moléculas en las propiedades citostáticas y citotóxicas de agentes de quimioterapia antitumoral conocidos por inducir la producción de FRO.

Las moléculas antioxidantes que se han ensayado son las siguientes:

- la N-acetil-cisteína (NAC) (referencia), que es un antioxidante, captador de radicales libres, y precursor del glutatión intracelular;

- CuDIPS (diisopropilsalicilato de Cu [II]) (referencia) que es un mimético químico de la CuZn-SOD (MC KENZIE y col., *Br. J. Pharmacol.* 127, 1159-1164, 1999);

- la MnTBAP (tetrakis(5,10,15,20-(ácido benzoico))porfirina-Mn(III)) (referencia), que es un mimético químico de la MnSOD (PASTERNAK y col., *Inorg. Biochem.*, 15, 261-267, 1981) así como de la catalasa y de la glutatión peroxidasa (solicitud PCT/WO 01/12327);

- el MnDPDP (dipiridoxil-fosfato de manganeso (Mn-DPDP) llamado también Mangafodipir (DCI), que es un mimético de la MnSOD, así como de la catalasa y la glutatión reductasa (solicitud PCT/WO 02/087579).

Los autores de la invención han observado que el tratamiento con NAC induce un aumento de la proliferación de las células tumorales, mientras que el tratamiento con MnTBAP, CuDIPS o MnDPDP induce una reducción de esta proliferación. En lo que se refiere a la viabilidad celular, NAC no tiene ningún efecto en ésta, se trate de células tumorales o de leucocitos humanos normales. MnTBAP o el CuDIPS disminuyen la viabilidad de las células tumorales y también, aunque en menor medida, la de los leucocitos humanos normales. En cambio, MnDPDP disminuye la viabilidad de las células tumorales, pero de forma sorprendente, no influye en la de los leucocitos humanos normales.

En el caso de la asociación de estas moléculas antioxidantes con agentes antitumorales, los autores de la invención han observado que NAC inhibe los efectos citostáticos y citotóxicos de estos agentes en las células tumorales, mientras que la MnTBAP, CuDIPS y MnDPDP los aumentan.

Los efectos de NAC, MnTBAP y CuDIPS sobre la citotoxicidad de los agentes antitumorales respecto a los leucocitos normales son similares a los observados en las células tumorales, en cambio el Mn-DPDP disminuye la citotoxicidad de los agentes antitumorales en los leucocitos humanos normales, al contrario del efecto observado en el caso de las células tumorales.

Por lo tanto, parece que el MnDPDP puede inducir o potenciar un estrés oxidante químicamente inducido a nivel de las células tumorales, pero manteniendo la viabilidad de los leucocitos normales.

Los autores de la invención han ensayado también los efectos de NAC, MnTBAP, CuDIPS y MnDPDP, administrados de forma aislada o asociados con un agente quimioterapéutico antitumoral, en el desarrollo de tumores *in vivo* en el ratón.

Han observado que la administración de NAC inducía un aumento del volumen tumoral, mientras que la administración de MnTBAP, CuDIPS o MnDPDP disminuía el volumen de los tumores. Asociada con un agente antitumoral, la NAC bloquea el efecto inhibidor de este agente en el crecimiento tumoral, mientras que la MnTBAP, CuDIPS o MnDPDP aumentan este efecto inhibidor.

Estas propiedades singulares del mangafodipir, con respecto a las de los otros antioxidantes y en particular los otros miméticos de la SOD ensayados, parecen estar ligadas a su doble actividad de mimético de la superóxido dismutasa y de la glutatión reductasa.

La presente invención tiene por objeto el uso de mangafodipir (MnDPDP) como principio activo antitumoral y protector de los leucocitos, para obtener un medicamento destinado a un tratamiento anticancerígeno.

De acuerdo con un modo preferido de llevar a cabo la presente invención, el mangafodipir se usa asociado con otro agente antitumoral, elegido entre la doxorubicina, mitomicina C, etopósido, derivados del platino, tamoxifeno, taxanos, 5-fluorouracilo, irinotecán (inhibidor de la topoisomerasa-1), gemcitabina (antimetabolito), endoxán (agente electrófilo alquilante), estreptozotocina (agente electrófilo no alquilante), bleomicina (agente que escinde el ADN), y vincristina (veneno del huso).

Debido a la simultaneidad de su efecto citotóxico y citostático respecto a las células tumorales, y su efecto protector respecto a los leucocitos normales, el mangafodipir permite aumentar significativamente el índice terapéutico de los medicamentos anticancerígenos con los cuales está asociado. Efectivamente, con estos medicamentos anticancerígenos tiene una acción sinérgica antitumoral, pero protegiendo a los leucocitos de los efectos dañinos de la quimioterapia.

La presente invención también tiene como objeto una composición farmacéutica que comprende mangafodipir asociado con otro agente antitumoral, tal como se define en la reivindicación 3.

Para llevar a cabo la presente invención, el mangafodipir en general se usará en formulaciones que permitan la administración de una dosis de principio activo comprendida entre 1 y 100 mg/kg/día. Sin embargo, pueden usarse dosis mayores, teniendo en cuenta la baja toxicidad de este producto. Se entiende que el experto en la técnica puede adaptar estas dosis en función de las particularidades de cada paciente y de la patología implicada.

Estas formulaciones se pueden administrar por diferentes vías, por ejemplo por vía oral, por inyecciones, en particular inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares o intravenosas. Pueden considerarse otras vías de administración si aumentan la eficacia, la biodisponibilidad o la tolerancia de los productos. El experto en la técnica puede elegir la vía más adecuada en función de la formulación usada.

La presente invención se entenderá mejor con ayuda del siguiente complemento de la invención, que se refiere a ejemplos que muestran las propiedades antitumorales del mangafodipir y sus efectos citoprotectores en los leucocitos normales.

Ejemplo 1

Influencia de diferentes moléculas antioxidantes en las propiedades proliferativas basales de células tumorales

Se realizaron ensayos de proliferación celular *in vitro* en las siguientes líneas celulares CT26 (carcinoma de colon de ratón, ATCC (American Type Culture Collection) n° 2638), Hepa 1-6 (hepatoma de hígado de ratón ATCC n° 1830), A 549 (carcinoma de pulmón humano, ATCC n° 185). Estas líneas se cultivaron previamente en un incubador húmedo a 37°C con CO₂ al 5%, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/Glutamax-I que contenía suero de ternero fetal al 10% y antibióticos [penicilina (100 U/ml)/estreptomina (100 µg/ml)] (LIFE TECHNOLOGIES, Cergy Pontoise, Francia). Todas estas líneas celulares se han ensayado de forma regular para excluir cualquier infección por micoplasmas.

Para el ensayo de proliferación, las células (2 x 10⁴ células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos (COSTAR, Corning, Inc. NY, EE.UU.) y se incubaron 48 horas en medio completo al que se añadieron concentraciones crecientes, de 0 a 400 µM, de N-acetil-cisteína (NAC, SIGMA, Saint-Quentin Fallavier, Francia), MnTBAP (mimético de la MnSOD; CALBIOCHEM, Paris, Francia), CuDIPS (mimético de la Cu/Zn SOD; SIGMA, Saint-Quentin Fallavier, Francia) o mangafodipir (MnDPDP o TELASCAN, AMERSHAM HEALTH, Amersham, Reino Unido). La NAC, MnTBAP y CuDIPS no entran en la protección reivindicada.

ES 2 315 738 T3

La proliferación celular se determinó incubando las células durante 16 horas con [^3H]-timidina (1 μCi /pocillo).

Los resultados de estos experimentos, en diferentes líneas tumorales, para NAC, MnTBAP, CuDIPS y MnDPDP, se ilustran en las figuras 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Leyendas de las figuras 1, 2, 3 y 4:

En el eje de abscisas: concentración de antioxidante (en μM).

En el eje de ordenadas: radiactividad de la [^3H]-timidina en cpm.

Se observa un aumento de la proliferación de las células tumorales en respuesta al tratamiento con NAC (figura 1). Este aumento de la proliferación es de un 73% para las células Hepa 1-6, en presencia de NAC 100 μM y de 45 y un 47% en presencia de NAC 400 μM para las células tumorales A 549 y CT26, respectivamente.

Por el contrario, el tratamiento de las células tumorales Hepa 1-6, CT26 y A 549 con MnTBAP (figura 2), CuDIPS (figura 3) o MnDPDP (TESLASCAN, figura 4) redujo su proliferación de forma dependiente de la dosis. Esta reducción de la proliferación celular alcanza cerca del 90% en presencia de una de estas tres moléculas 400 μM .

Ejemplo 2

Efecto de NAC, CuDIPS, MnTBAP y MnDPDP en la viabilidad de líneas tumorales o de leucocitos humanos normales

Se realizaron ensayos de viabilidad *in vitro*, en respuesta al tratamiento con NAC, CuDIPS, MnTBAP o MnDPDP, en las líneas celulares del ejemplo 1, así como en leucocitos humanos normales. Estos últimos se obtuvieron de voluntarios sanos, después de consentimiento informado, mediante la toma de sangre venosa recogida sobre anticoagulante (heparinato de lito). Los glóbulos rojos se lisaron por choque osmótico con ayuda de una solución hipotónica de acetato potásico y los leucocitos se cultivaron en las condiciones descritas en el ejemplo 1.

Para los ensayos de viabilidad, las células (2×10^4 células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos (COSTAR, Corning, Inc. NY, EE.UU.) y se incubaron 48 horas en medio completo al que se añadieron concentraciones crecientes, de 0 a 400 μM , de NAC, MnTBAP, CuDIPS o MnDPDP. La viabilidad celular se evaluó por reducción de una sal de metiltiazol-tetrazolio (MTT; SIGMA) a formazán. Las células se expusieron a 20 μl de MTT (5 mg/ml en PBS) y se incubaron 4 h a 37°C. Después, se retiraron 150 μl de medio de cada pocillo y la reacción se reveló por adición de 100 μl de DMSO (SIGMA). Se analizó la absorbancia de cada pocillo a 550 nm y a 630 nm con un lector de placa ELISA. Se determina el número de células viables por la diferencia entre la absorbancia a 550 nm y la absorbancia a 630 nm.

Los resultados de estos experimentos para las líneas tumorales CT26, Hepa 1-6 y A 549, así como para los leucocitos normales se ilustran en las figuras 5, 6, 7 y 8 para NAC, MnTBAP, CuDIPS y MnDPDP, respectivamente.

Leyenda de las figuras 5 a 8:

En el eje de abscisas: concentración de antioxidante (en μM).

En el eje de ordenadas: DO a 550 nm - DO a 630 nm.

Se observa que el tratamiento con NAC de las células tumorales Hepa 1-6, CT26 y A 549 o de los leucocitos humanos normales no tiene efecto en la viabilidad celular (figura 5).

Al contrario, el tratamiento de las células tumorales Hepa 1-6, CT26 y A 549 con MnTBAP (figura 6) o con CuDIPS (figura 7) disminuye la viabilidad de las células tumorales de forma dependiente de la dosis. La viabilidad de las células tumorales Hepa 1-6, CT26 y A 549 se reduce 62%, 75% y 37%, respectivamente con MnTBAP 400 μM , y 74%, 85% y 50% respectivamente, con CuDIPS 400 μM . Sin embargo, el tratamiento de los leucocitos humanos normales con MnTBAP y CuDIPS induce también una disminución de la viabilidad celular, que alcanza 18% y 50%, respectivamente.

Por último, aunque el MnDPDP (Mangafodipir o TESLASCAN, figura 8) también redujo de forma dependiente de la dosis la viabilidad de las células tumorales Hepa 1-6, CT26 y A 549, no influye en la viabilidad de los leucocitos humanos normales, y esto cualquiera que sea la dosis de mangafodipir usada.

Ejemplo 3

Efecto de NAC, CuDIPS, MnTBAP y MnDPDP en las propiedades antiproliferativas y citotóxicas de moléculas usadas en la quimioterapia del cáncer

Se usaron las siguientes moléculas antitumorales: oxaliplatino (que pertenece a la familia del cisplatino); taxol; 5-fluoro-uracilo; que se sabe que inducen la producción de FRO en las células tumorales. Para cada una de estas moléculas se realizaron ensayos de proliferación y viabilidad celular, en ausencia de moléculas antioxidantes, o en presencia de concentraciones crecientes de NAC, MnTBAP, CuDIPS o MnDPDP.

1) Efectos sobre las propiedades antiproliferativas

Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo en líneas tumorales CT26, Hepa 1-6 y A 549, según el protocolo descrito en el ejemplo 1.

Oxaliplatino

El oxaliplatino (ELOXATINA o [(1R,2R)-1,2-ciclohexanodiamina-N,N']][oxalato (2-)-O,O']platino(II); SANOFI-PHARMA, Paris, Francia) se usó en todos los ensayos con una concentración 10 μ M.

Los resultados de los ensayos de proliferación celular de las líneas tumorales CT26, Hepa 1-6 y A 549 se ilustran en las figuras 9, 10, 11 y 12, para la NAC, MnTBAP, CuDIPS y MnDPDP, respectivamente.

Leyendas de las figuras 9 a 12:

En el eje de abscisas: presencia (+) o ausencia (-) de oxaliplatino; concentración de antioxidante (en μ M).

En el eje de ordenadas: radiactividad de la [3 H]-timidina en cpm.

El tratamiento de las líneas tumorales Hepa 1-6, CT26 y A 549 con oxaliplatino 10 μ M solo, disminuye la proliferación de las células tumorales 70%, 91% y 93%, respectivamente (figuras 9 a 12).

NAC redujo de una forma dependiente de la dosis el efecto citostático del oxaliplatino y esto cualquiera que sea el tipo de células tumorales (figura 9).

Al contrario, MnTBAP (figura 10), CuDIPS (figura 11) o MnDPDP (figura 12) aumentan de forma dependiente de la dosis las propiedades antiproliferativas del oxaliplatino.

Taxol

El taxol (PACLITAXEL; BRISOL-MYERS-SQUIBB, Paris, Francia) se usó en todos los ensayos con una concentración 10 μ M.

Los resultados de los ensayos de proliferación de las líneas tumorales CT26, Hepa 1-6 y A 549 se ilustran en las figuras 13, 14, 15 y 16 para la NAC, MnTBAP, CuDIPS y MnDPDP, respectivamente.

Leyendas de las figuras 13 a 16:

En el eje de abscisas: presencia (+) o ausencia (-) de taxol; concentración de antioxidante (en μ M).

En el eje de ordenadas: radiactividad de la [3 H]-timidina en cpm.

La incubación con taxol reduce respectivamente la proliferación de las células tumorales A 549 CT26 y Hepa 1-6, 85%, 71% y 65% (figuras 13 a 16).

La adición de NAC reduce de forma dependiente de la dosis, el efecto citostático del taxol en las células tumorales (figura 13).

Al contrario, la adición de los tres miméticos de la SOD [MnTBAP (figura 14), CuDIPS (figura 15) o MnDPDP (figura 16)] aumenta el efecto citostático del taxol de forma dependiente de la dosis.

ES 2 315 738 T3

5-Fluorouracilo (5-FU)

El 5-fluorouracilo (5-FU) (5-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-2,5-pirimidinodiona o fluorouracilo; ICN PHARMACEUTICAL FRANCE, Orsay, Francia) se usó en todos los ensayos con una concentración 50 μM .

Los resultados de los ensayos de proliferación de las líneas tumorales CT26, Hepa 1-6 y A 549 se ilustran en las figuras 17, 18, 19 y 20, para la NAC, MnTBAP, CuDIPS y MnDPDP respectivamente.

Leyendas de las figuras 17 a 20:

En el eje de abscisas: presencia (+) o ausencia (-) de 5-FU; concentración de antioxidante (en μM).

En el eje de ordenadas: radiactividad de la [^3H]-timidina en cpm.

La incubación de las células tumorales con 5-FU redujo la proliferación de las células tumorales Hepa 1-6, CT26 y A 549, 91%, 91% y 85% respectivamente (figuras 17 a 20).

Como para el oxaliplatino y el taxol, NAC inhibe el efecto citostático del 5-FU en las células tumorales (figura 17), mientras que los tres miméticos de la SOD [MnTBAP (figura 18), CuDIPS (figura 19) y MnDPDP (TESLASCAN, figura 20)] la aumentan.

2) Efectos sobre la viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad se realizaron en las líneas tumorales CT26, Hepa 1-6 y A 549, así como en leucocitos humanos normales, según el protocolo descrito en el ejemplo 2.

Oxaliplatino

El oxaliplatino se usó con una concentración 10 μM en el caso de células tumorales, y con una concentración 1 mM en el caso de leucocitos normales.

Los resultados se ilustran en las figuras 21, 22, 23 y 25 para la NAC, MnTBAP, CuDIPS y MnDPDP, respectivamente.

Leyendas de las figuras 21 a 24:

En el eje de abscisas: presencia (+) o ausencia (-) de oxaliplatino; concentración de antioxidante (en μM).

En el eje de ordenadas: DO a 550 nm - DO a 630 nm.

El tratamiento solo con oxaliplatino disminuye en promedio la viabilidad de las células tumorales Hepa 1-6, CT26 y A 549, 50%, 27% y 28%, respectivamente, y la de los leucocitos normales aproximadamente 50% (figuras 21 a 24).

NAC disminuyó de forma dependiente de la dosis, los efectos citotóxicos del oxaliplatino en todos los tipos de células tumorales, así como en los leucocitos normales (figura 21).

MnTBAP (figura 22), CuDIPS (figura 23) y MnDPDP (figura 24) aumentan de forma dependiente de la dosis, las propiedades citotóxicas del oxaliplatino en las células tumorales.

En los leucocitos normales MnTBAP (figura 22) y CuDIPS (figura 23), aumentan también las propiedades citotóxicas del oxaliplatino; en cambio, MnDPDP (figura 24) inhibe como NAC el efecto citotóxico del oxaliplatino.

Taxol

El taxol se usó con una concentración 10 μM en el caso de células tumorales, y con una concentración 20 μM en el caso de leucocitos normales.

Los resultados se ilustran en las figuras 25, 26, 27 y 28 para la NAC, MnTBAP, CuDIPS y MnDPDP, respectivamente.

Leyendas de las figuras 25 a 28:

En el eje de abscisas: presencia (+) o ausencia (-) de taxol; concentración de antioxidante (en μM).

ES 2 315 738 T3

En el eje de ordenadas: DO a 550 nm - DO a 630 nm.

El tratamiento solo con taxol disminuye en promedio la viabilidad de las células tumorales Hepa 1-6, CT26 y A 549, respectivamente 25%, 50% y 47%, y la de los leucocitos normales aproximadamente 50% (figuras 25 a 28).

La adición de NAC no influye en la actividad citotóxica del taxol en las células tumorales, y la disminuye en los leucocitos normales (figura 25).

La adición de MnTBAP (figura 26), CuDIPS (figura 27) o MnDPDP (figura 28) aumentan la actividad citotóxica del taxol en las células tumorales. En los leucocitos normales, la MnTBAP no tiene prácticamente influencia sobre el efecto citotóxico del taxol (figura 26) y el CuDIPS (figura 27) aumenta este efecto citotóxico; en cambio el MnDPDP (figura 28) como la NAC inhibe el efecto citotóxico del taxol.

5-Fluorouracilo (5-FU)

El 5-FU se usó con una concentración 50 μ M en el caso de células tumorales, y con una concentración 40 mM en el caso de leucocitos normales.

Los resultados se ilustran en las figuras 29, 30, 31 y 32 para NAC, MnTBAP, CuDIPS y MnDPDP, respectivamente.

Leyendas de las figuras 29 a 32:

En el eje de abscisas: presencia (+) o ausencia (-) de 5-FU; concentración de antioxidante (en μ M).

En el eje de ordenadas: DO a 550 nm - DO a 630 nm.

El tratamiento solo con 5-FU disminuye en promedio la viabilidad de las células tumorales Hepa 1-6, CT26 y A 549, respectivamente 65%, 85% y 25%, y la de los leucocitos normales aproximadamente 19% (figuras 29 a 32).

La adición de NAC no modifica la actividad citotóxica del 5-FU en las células tumorales, y la disminuye en los leucocitos normales (figura 29).

La adición de MnTBAP (figura 30), CuDIPS (figura 31) o MnDPDP (figura 32) aumenta la actividad citotóxica del 5-FU en las células tumorales. En los leucocitos normales, la MnTBAP sólo influye débilmente sobre el efecto citotóxico del 5-FU (figura 30); el CuDIPS (figura 31) aumenta este efecto citotóxico; y en cambio el MnDPDP (figura 32) lo inhibe.

Ejemplo 4

Modulación de los efectos de las formas oxigenadas reactivas en el ADN por la NAC, CuDIPS, MnTBAP o MnDPDP

La molécula de ADN es uno de los principales objetivos del efecto antitumoral de los derivados del platino como el cisplatino o el oxaliplatino. Los derivados de platino reaccionan con el ADN modificando su estructura terciaria. Se sabe que las metaloporfirinas catiónicas son agentes que pueden interaccionar con el ADN.

Recientemente se ha demostrado que las metaloporfirinas que tienen propiedades miméticas de la SOD podían potenciar los efectos dañinos de los FRO en la estructura del ADN.

Se usó el plásmido pcDNA3.1 (INVITROGEN) purificado para analizar las potenciales alteraciones del ADN en respuesta a la adición de moléculas usadas en la quimioterapia del cáncer, en presencia o en ausencia de moduladores de enzimas antioxidantes. Después este ADN se almacenó a -20°C en TRIS 10 mM, EDTA 1 mM hasta su uso.

El ADN plasmídico se incubó con oxaliplatino en una relación molar de 0,50 en un volumen final de 50 μ l. Después se añadieron a la solución MnTBAP (5 μ M), CuDIPS (5 μ M), mangafodipir (5 μ M) o NAC (5 mM). La producción de anión superóxido se llevó a cabo por adición de xantina 200 μ M (SIGMA) y xantina oxidasa 1 U (SIGMA). La incubación se realizó en la oscuridad a 37°C y durante 24 h. Al final del periodo de incubación, partes alícuotas de 10 μ l se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y la detección se hizo por coloración con bromuro de etidio. Después los geles se analizaron por densitometría (VILBER LOURMAT, Marnes-la-Vallée, Francia).

Los resultados se ilustran en la figura 33.

ES 2 315 738 T3

Leyendas de la figura 33:

A: Presencia (+) o ausencia (0) de plásmido; concentración de oxaliplatino (en μM); presencia (+) o ausencia (0) de xantina y de xantina oxidasa (X/XO); presencia (+) o ausencia (0) de NAC.

B: Presencia (+) o ausencia (0) de plásmido; concentración de oxaliplatino (en μM); presencia (+) o ausencia (0) de xantina y de xantina oxidasa (X/XO); presencia (+) o ausencia (0) de antioxidante (Teslacan, MnTBAP, CuDIPS o NAC).

La incubación del ADN plasmídico con la xantina y la xantina oxidasa (X/XO) genera aniones superóxido que alteran la forma nativa superenrollada del ADN (ADN en forma I) y favorecen la forma circular (ADN forma II). Este fenómeno es inhibido por la neutralización de las FRO por la NAC.

La incubación del ADN plasmídico con el oxaliplatino induce una alteración dependiente de la dosis de la estructura del ADN, máxima para la relación de ADN/oxaliplatino de 0,5. En estas condiciones, ya no se observa la forma superenrollada y aparece una banda que corresponde a la forma III (forma lineal). La relación de forma I/forma II es todavía menor si se incuba el ADN plasmídico con el sistema X/XO y dosis pequeñas de oxaliplatino. La incubación con la NAC disminuye los daños causados al ADN.

En un segundo tiempo, se evaluaron los efectos de los miméticos de la SOD en las alteraciones del ADN inducidas por el oxaliplatino solo o asociado con las FRO. La incubación del ADN plasmídico con mangafodipir induce por sí mismo daños en el ADN como muestra el aumento de la proporción de la forma II con respecto al plásmido no tratado. Este efecto se amplifica cuando se añaden bien aniones superóxido u oxaliplatino y es máximo cuando se incuban juntos mangafodipir, FRO y oxaliplatino con el ADN plasmídico. Aquí también, algunos antioxidantes como la NAC inhiben parcialmente las alteraciones del ADN.

Se observa un efecto similar cuando el CuDIPS, y en menor medida la MnTBAP, se usan como miméticos de la SOD.

Ejemplo 7

Efectos antitumorales de NAC, CuDIPS, MnTBAP y MnDPDP asociados o no con una quimioterapia anticancerígena en el ratón

Se evaluó la actividad antitumoral *in vivo* de diferentes tratamientos antioxidantes. Para estos experimentos, se usaron ratones hembra BALB/c (para inyección de células tumorales CT26) o C57/BL6 (para inyección de células tumorales Hepa 1-6) de 6 a 8 semanas de edad. (IFFA CREDO, L'Arbresles, Francia). Se inyectaron 2 millones de células tumorales en el dorso de los animales por vía subcutánea. Cuando el tamaño del tumor alcanzó de 200 a 500 mm^3 , los animales recibieron una inyección única de oxaliplatino 20 mg/kg (ELOXATINE®) o de una solución salina.

Después, los ratones se trataron por vía intraperitoneal, dos horas después de la inyección de oxaliplatino o de solución salina, con mangafodipir, MnTBAP o CuDIPS 10 mg/kg , o con NAC 150 mg/kg , o con una solución salina. La inyección de los diferentes antioxidantes se continuó durante un mes (3 inyecciones por semana con las mismas dosis). Un grupo de ratones a los que se inocularon las mismas células tumorales no se trató.

El tamaño de los tumores se midió los tres días. El volumen tumoral se calculó como sigue:

$$VT (\text{mm}^3) = (L \times W^2)/2,$$

en la que L es la dimensión más larga y W la más corta del tumor en mm. Se incluyeron 15 ratones en cada grupo.

Los resultados del experimento basado en la inyección de células tumorales de carcinoma cólico CT26 a ratones BALB/C se ilustran en la figura 34.

Leyendas de la figura 34:

(♦) testigos,

(+) oxaliplatino,

(▲) teslacan,

(●) oxaliplatino + teslacan,

(O) NAC,

(X) oxaliplatino + NAC,

(Δ) MnTBAP,

(□) oxaliplatino + MnTBAP,

(◇) CuDIPS,

(*) oxaliplatino + CuDIPS.

El volumen de los tumores se indica en el eje de ordenadas; en el eje de abscisas se indica el número de días después de la inyección de oxaliplatino o de solución salina.

Se observa que la inyección de NAC a ratones no tratados con oxaliplatino induce un aumento de 44% de los volúmenes tumorales después de un mes, con respecto a los ratones que no reciben NAC.

Aunque la administración de oxaliplatino divide por dos los volúmenes tumorales con respecto a los animales no tratados, la administración de NAC a ratones tratados con oxaliplatino bloquea totalmente el efecto inhibitor del oxaliplatino en el crecimiento tumoral.

Por el contrario, la inyección de miméticos químicos de la SOD como MnTBAP, CuDIPS o mangafodipir disminuye respectivamente un 59%, 28% y 54% los volúmenes de los tumores en un mes, con respecto a los animales no tratados. Además, los tres miméticos de la SOD administrados a ratones tratados con oxaliplatino disminuyen respectivamente un 35%, 31% y 63% el volumen de los tumores en un mes, con respecto a los animales tratados solo con oxaliplatino.

Los resultados del experimento basado en la inyección de células Hepa 1-6 a ratones C57BL/6 se ilustran en la figura 35.

Leyendas de la figura 35:

(◆) testigos,

(■) oxaliplatino,

(▲) teslacan,

(●) oxaliplatino + teslacan,

(O) NAC,

(X) oxaliplatino + NAC,

(Δ) MnTBAP,

(□) oxaliplatino + MnTBAP,

(◇) CuDIPS,

(*) oxaliplatino + CuDIPS.

El volumen de los tumores se indica en el eje de ordenadas; en el eje de abscisas se indica el número de días después de inyección de oxaliplatino o de solución salina.

Aquí también se observa que la inyección de NAC induce un aumento de 50% de los volúmenes tumorales después de un mes, con respecto a los ratones que no reciben NAC. Aunque la administración de oxaliplatino divide por cuatro los volúmenes tumorales con respecto a los animales no tratados, la administración de NAC a ratones tratados con oxaliplatino bloquea totalmente el efecto inhibitor del oxaliplatino en el crecimiento tumoral. Por el contrario la inyección de miméticos químicos de la SOD como MnTBAP, CuDIPS o mangafodipir disminuye respectivamente un 42%, 9% y 34% el volumen de los tumores en un mes, con respecto a los animales no tratados. Además, aunque la coadministración de MnTBAP y CuDIPS con el oxaliplatino no aumenta de forma significativa el efecto antitumoral del oxaliplatino, la administración de MnDPDP a ratones tratados con oxaliplatino disminuye 63% el volumen de los tumores en un mes, con respecto a los animales tratados solo con oxaliplatino (figura 35).

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el autor de la solicitud es sólo para la conveniencia del lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado al recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este aspecto.

Documentos de patente citados en la descripción

WO 9749390 A
WO 02060383 A
WO 8404922

Bibliografía de no patentes citada en la descripción

YOKOMIZO y col. *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 4293-4296.

FERLINI y col. *Br. J. Cancer*, 1999, vol. 79, 257-263.

DOROSHOW y col. *J. Clin. Invest.*, 1981, vol. 68, 1053-1064.

MC KENZIE y col. *Br. J. Pharmacol.*, 1999, vol. 127, 1159-1164.

PASTERNAK y col. *Inorg. Biochem.*, 1981, vol. 15, 261-267.

REIVINDICACIONES

1. Uso de mangafodipir como principio activo antitumoral y protector de leucocitos, para obtener un medicamento
destinado a un tratamiento anticancerígeno.

2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el mangafodipir se usa asociado con un agente antitu-
moral que puede inducir en las células una producción de formas reactivas del oxígeno, elegido entre doxorubicina,
mitomicina C, etopósido, derivados del platino, tamoxifeno, taxol, 5-fluorouracilo, irinotecán, gemcitabina, endoxán,
estreptozotocina, bleomicina y vincristina.

3. Composición farmacéutica que contiene mangafodipir asociado con un agente antitumoral elegido entre mito-
micina C, etopósido, derivados del platino, tamoxifeno, 5-fluorouracilo, irinotecán, gemcitabina, endoxán, estrepto-
toxina, bleomicina y vincristina.

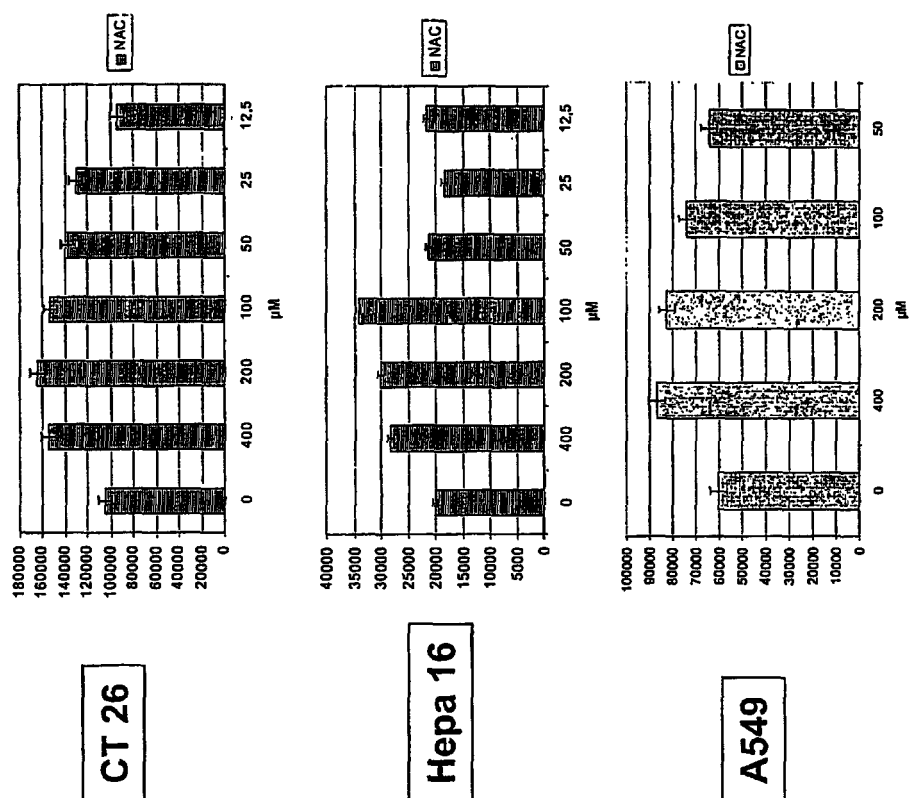


Figura 1

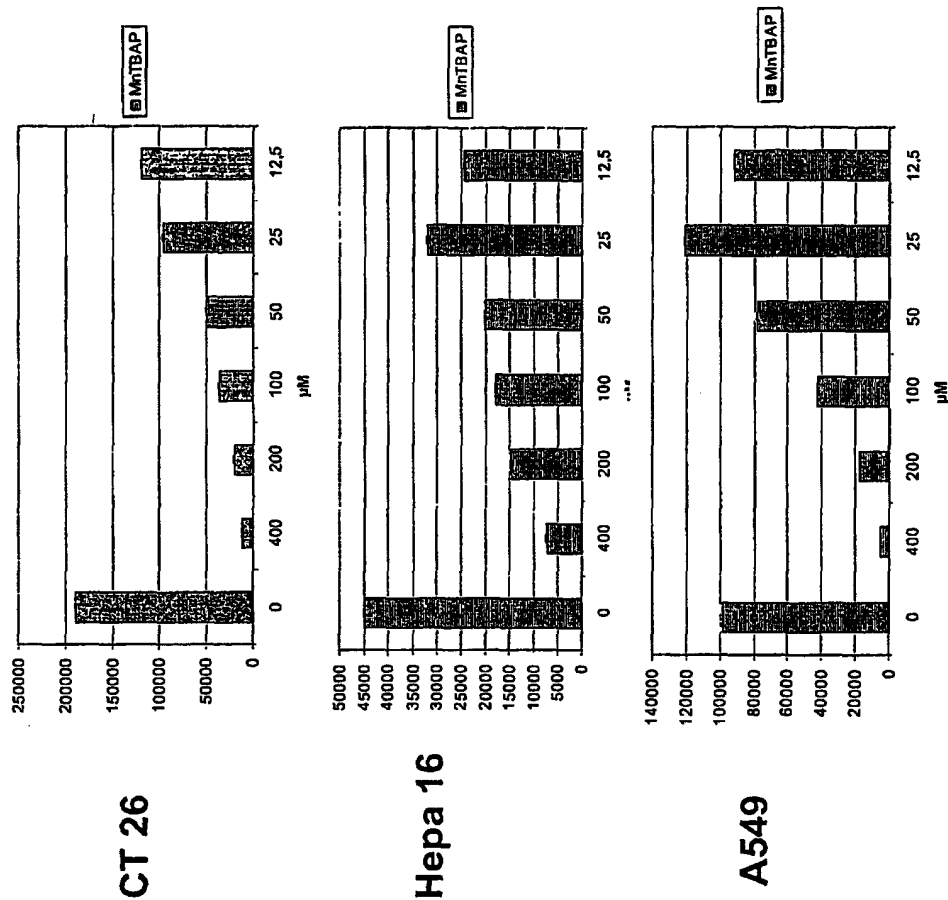


Figura 2

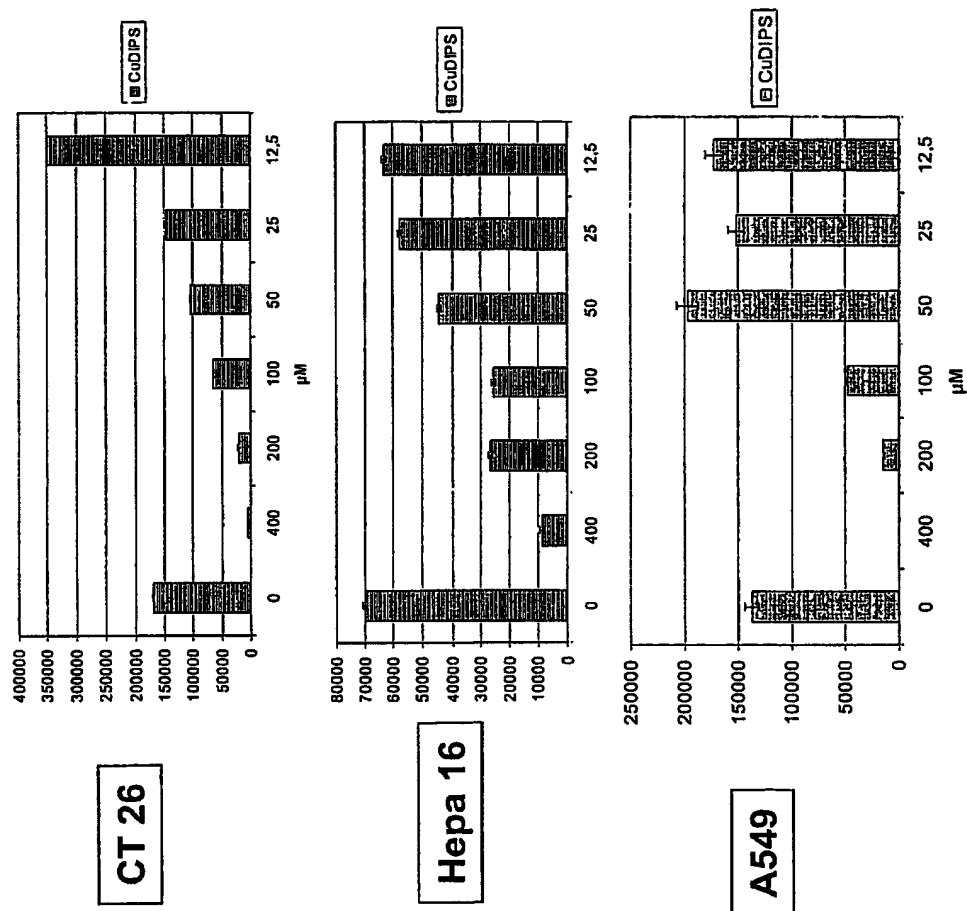


Figura 3

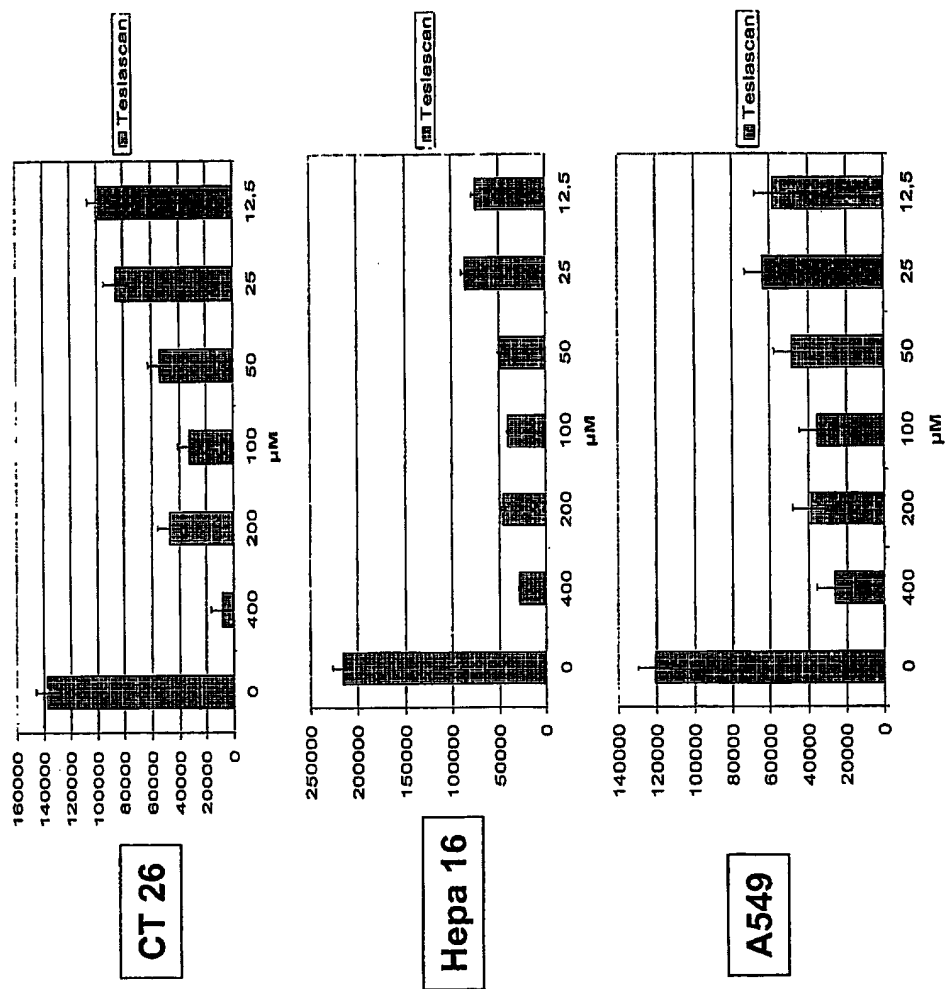


Figura 4

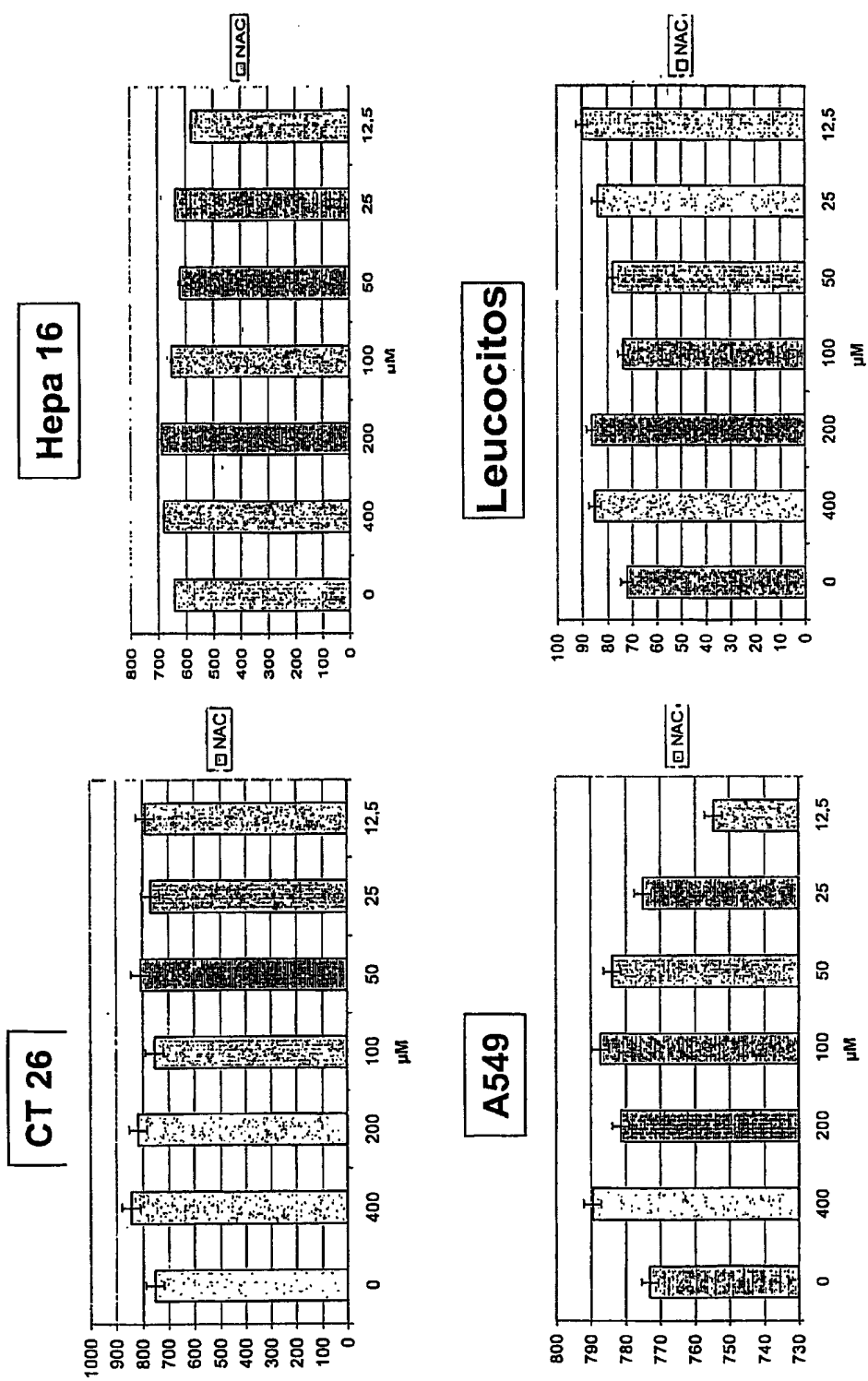


Figura 5

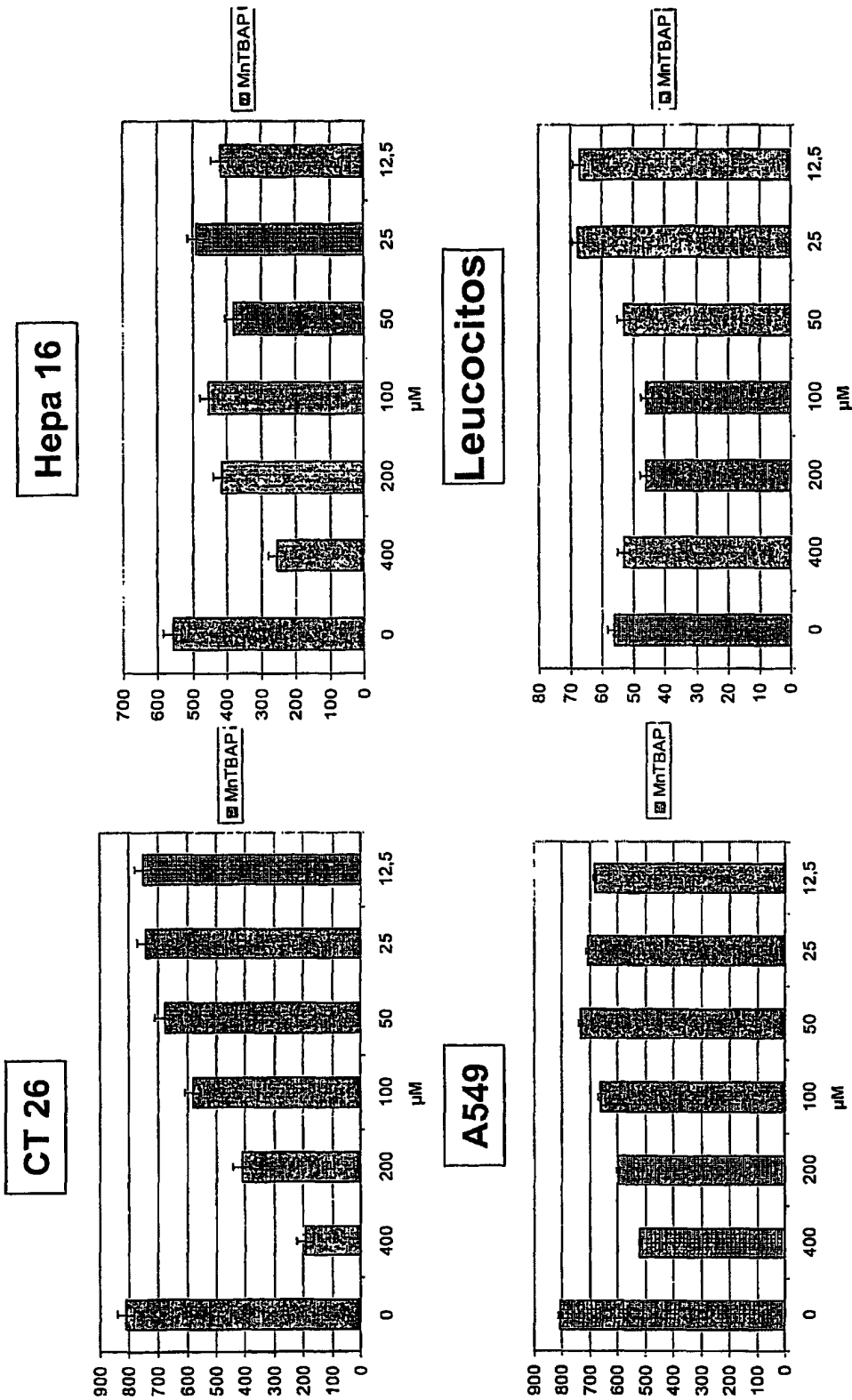


Figura 6

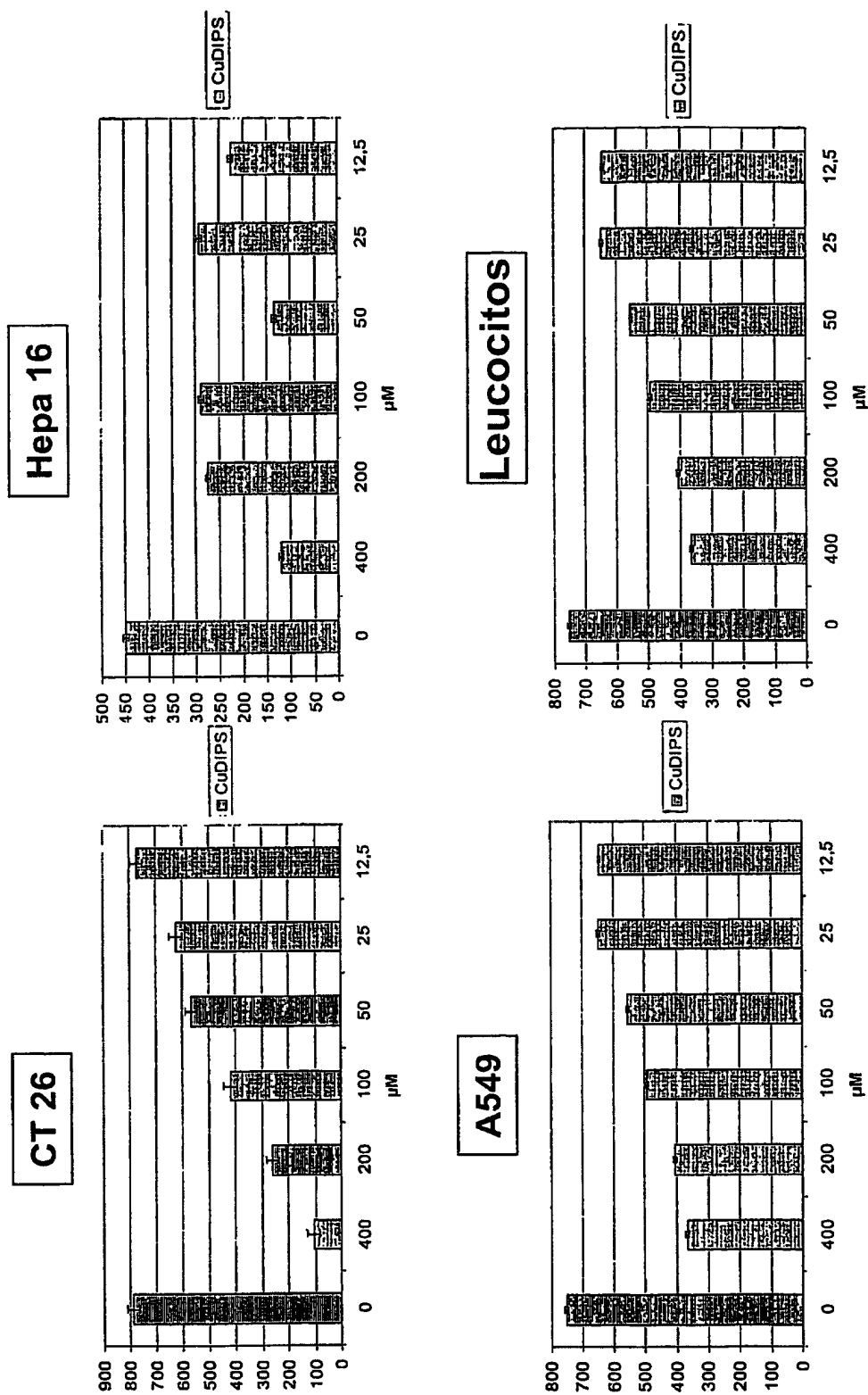


Figura 7

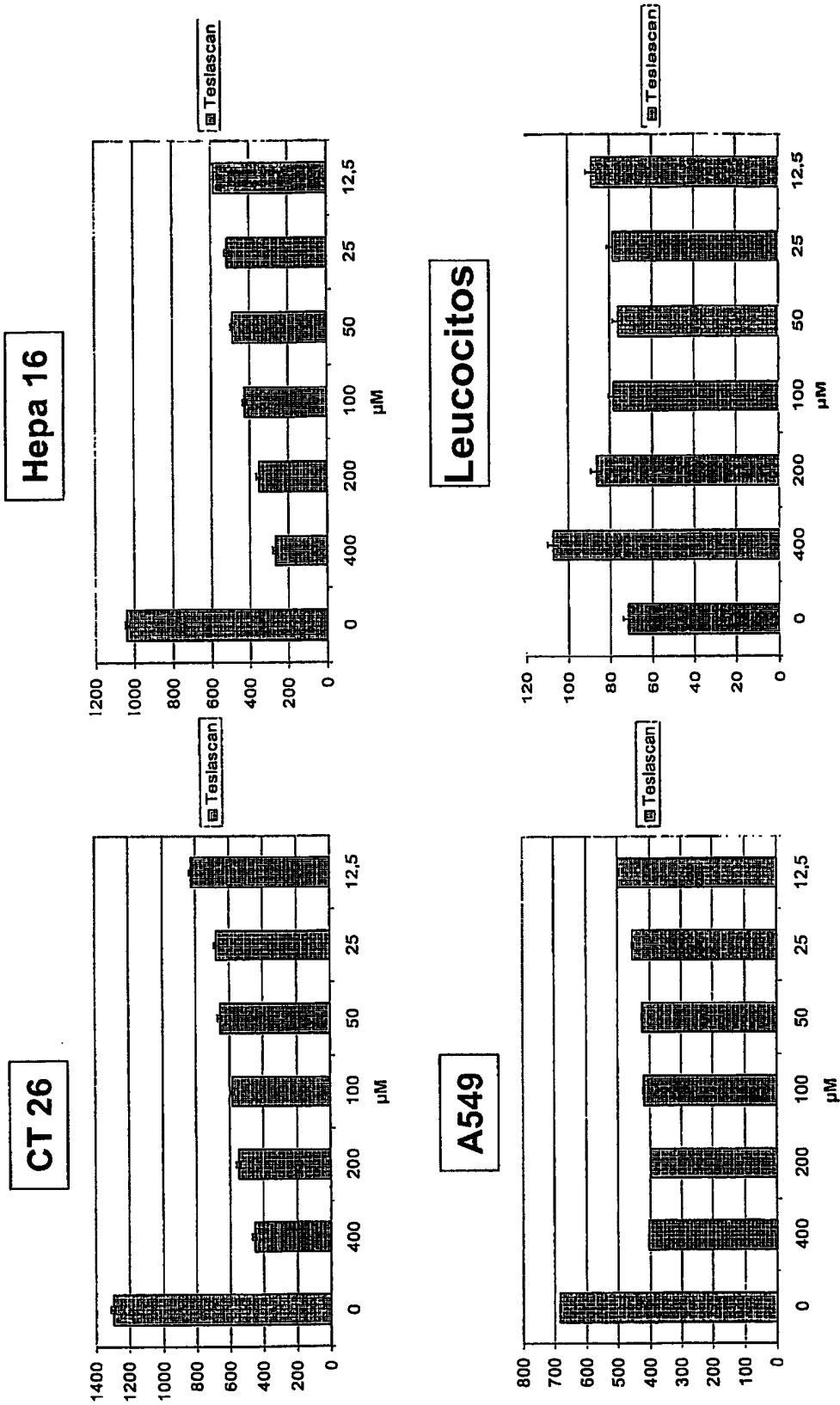


Figura 8



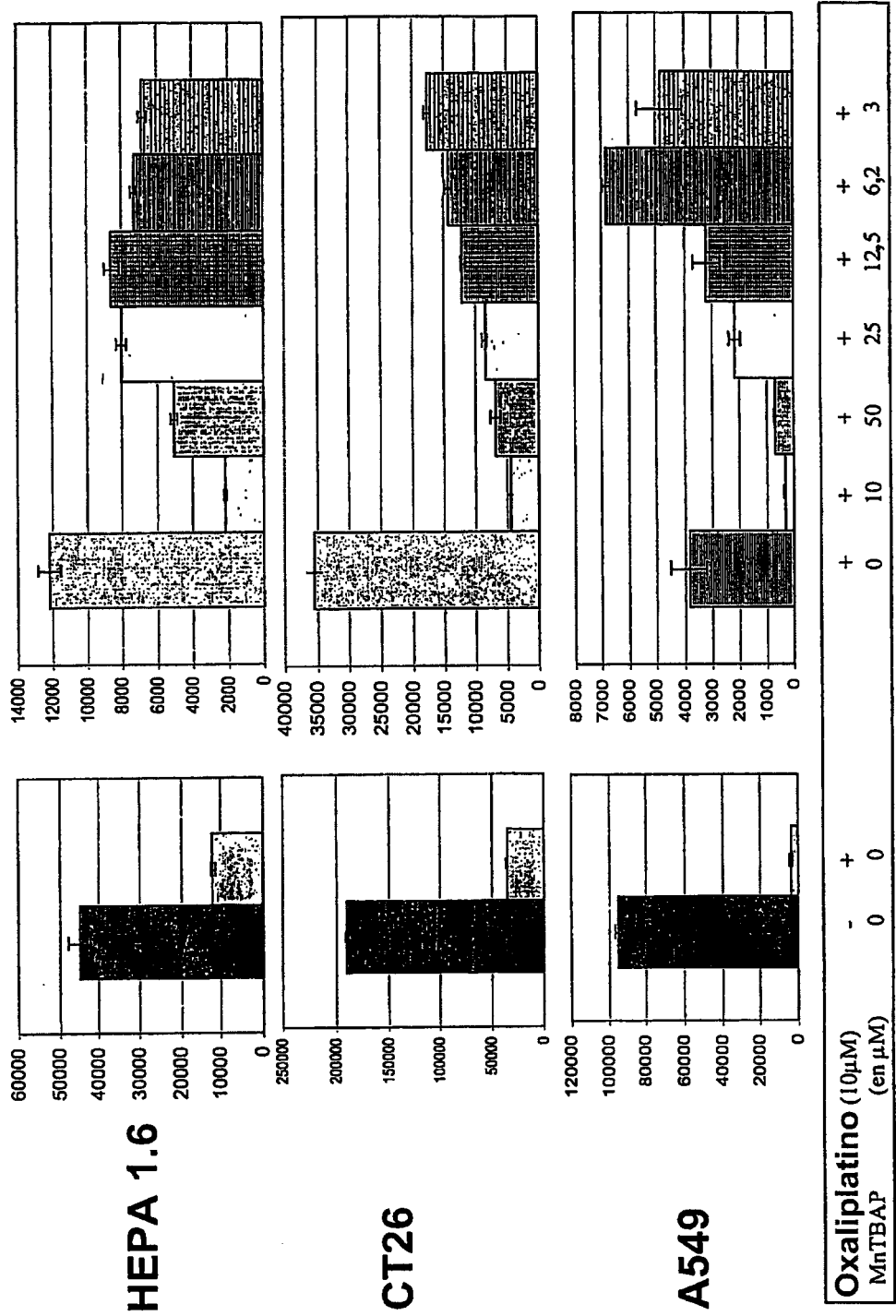


Figura 10

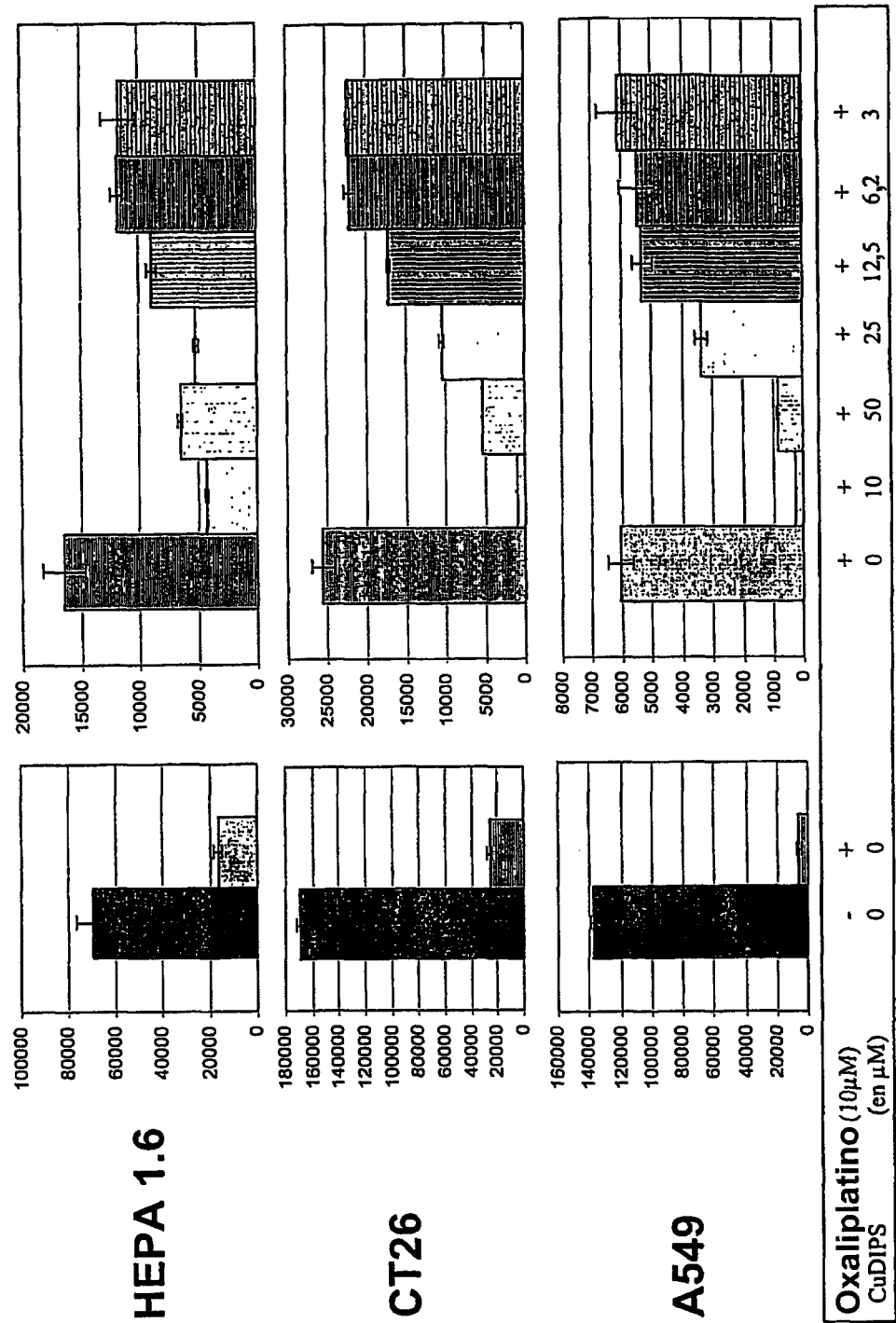


Figura 11

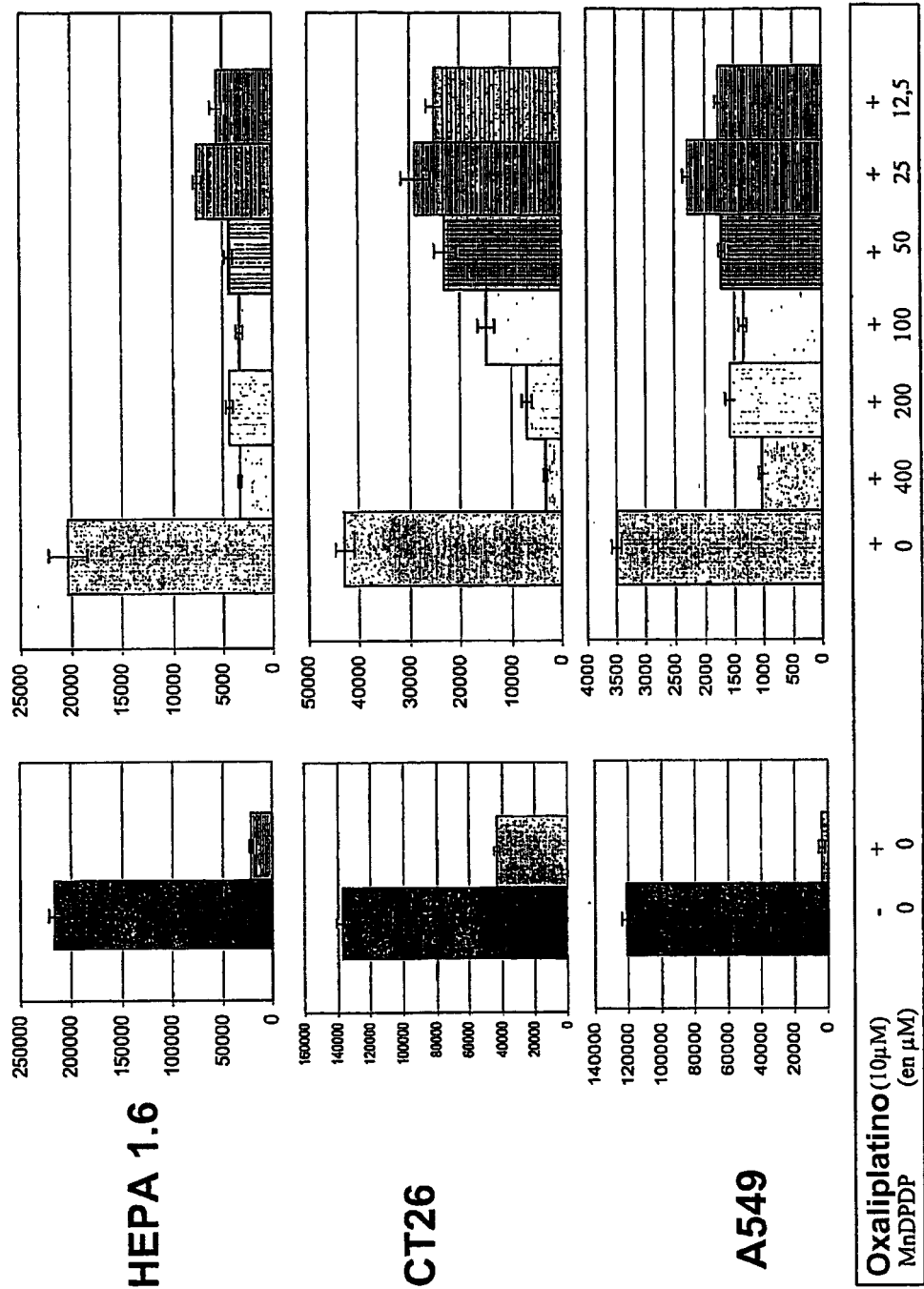


Figura 12



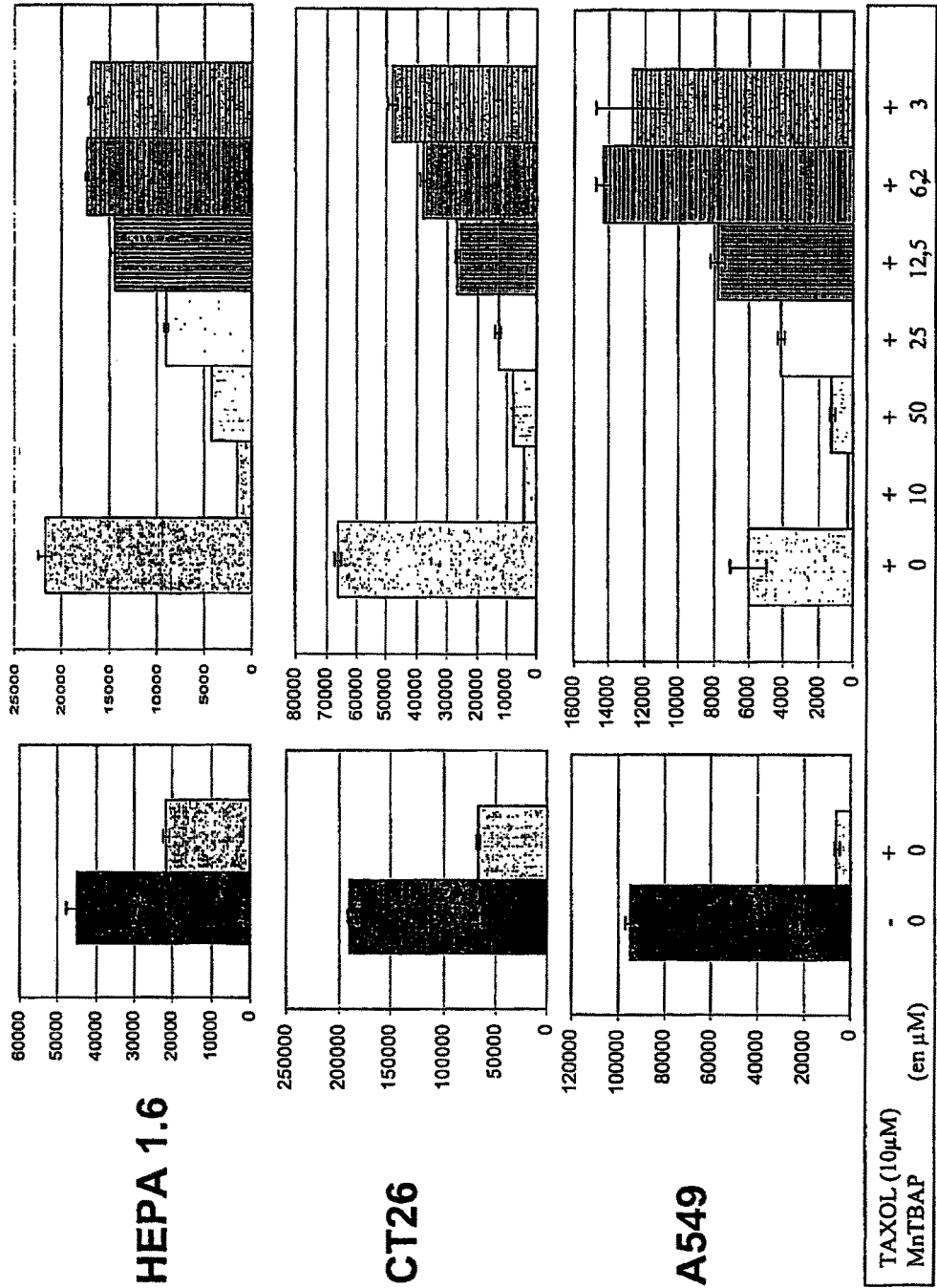


Figure 14

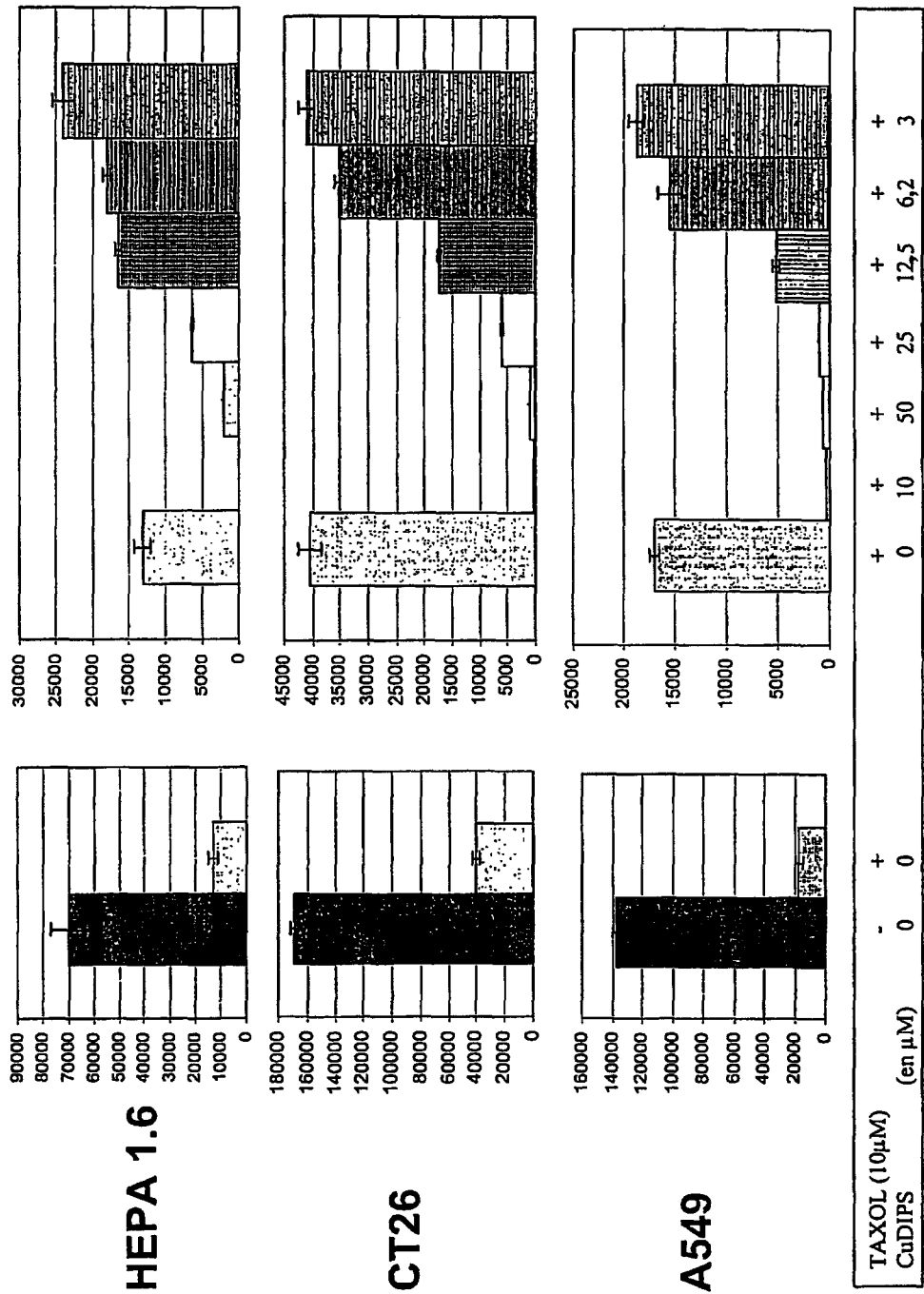
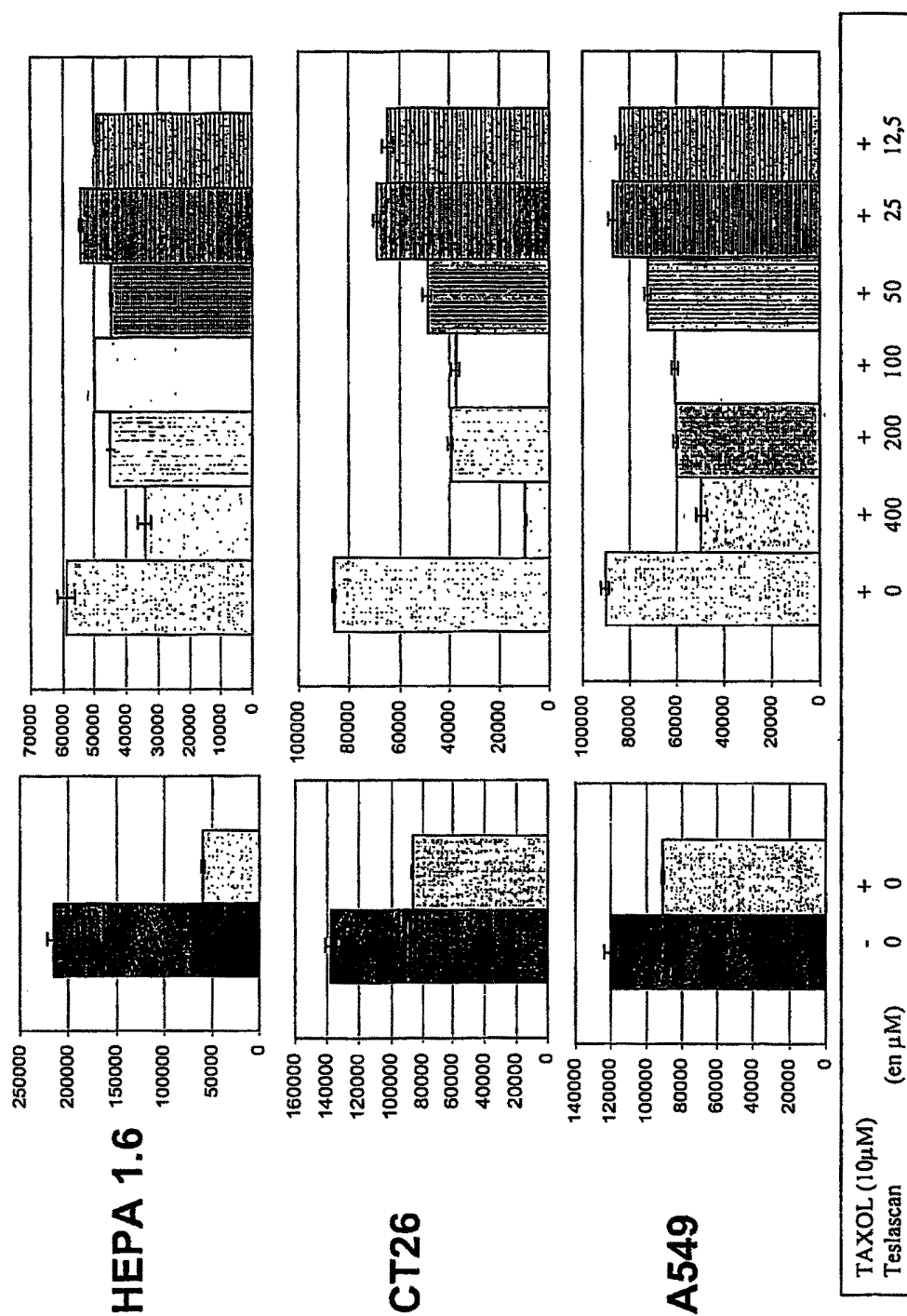
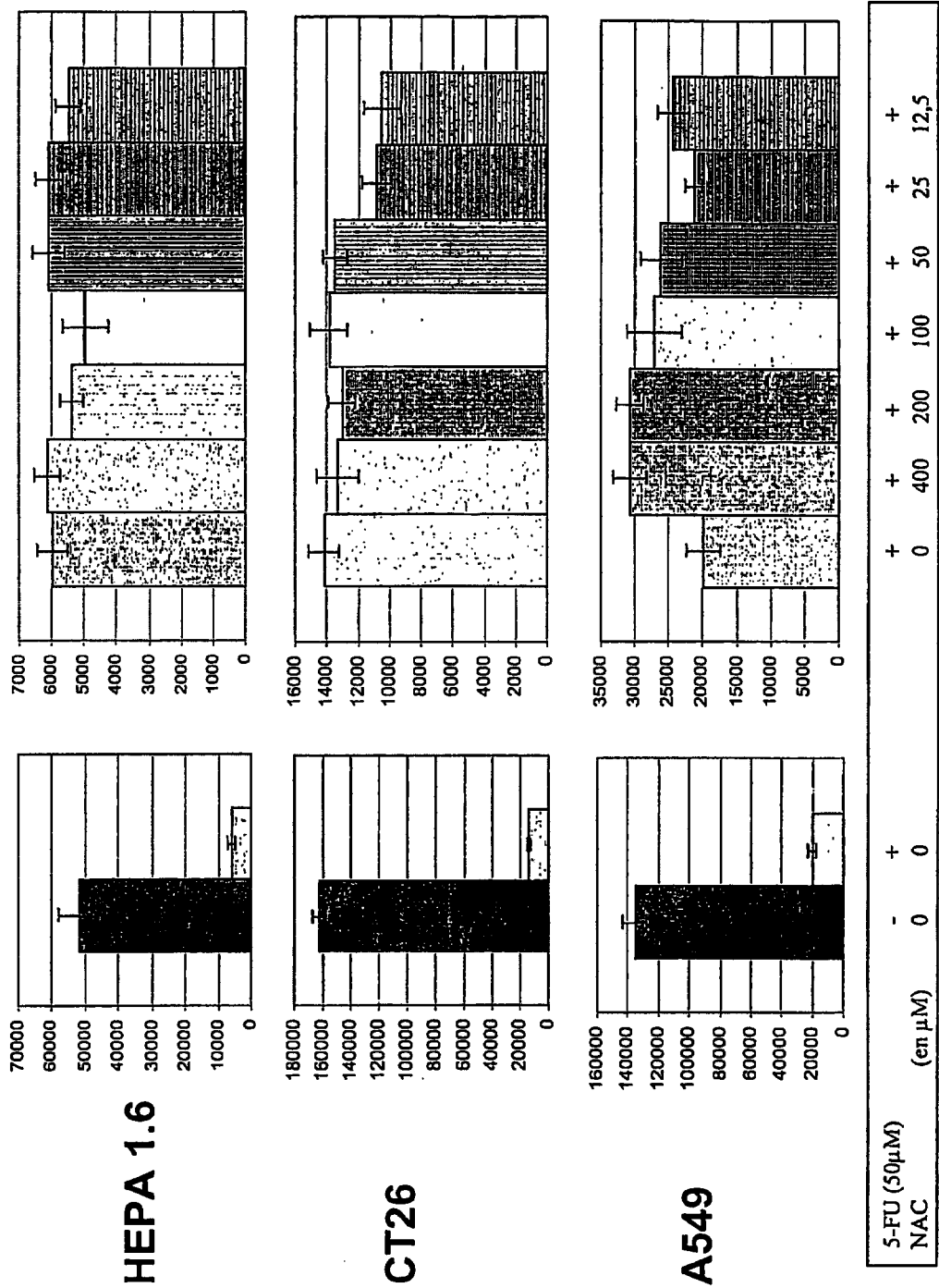


Figura 15





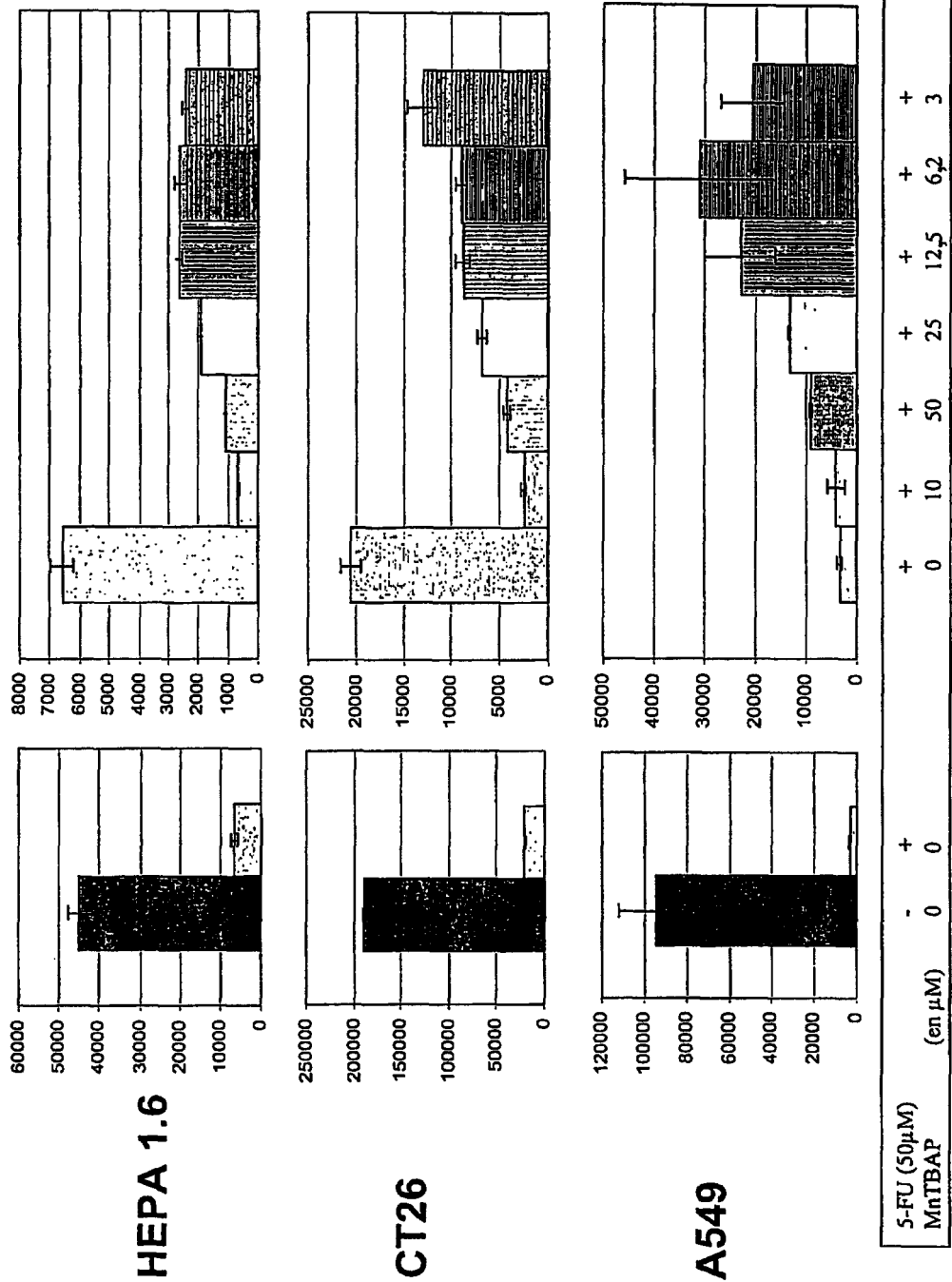


Figura 18

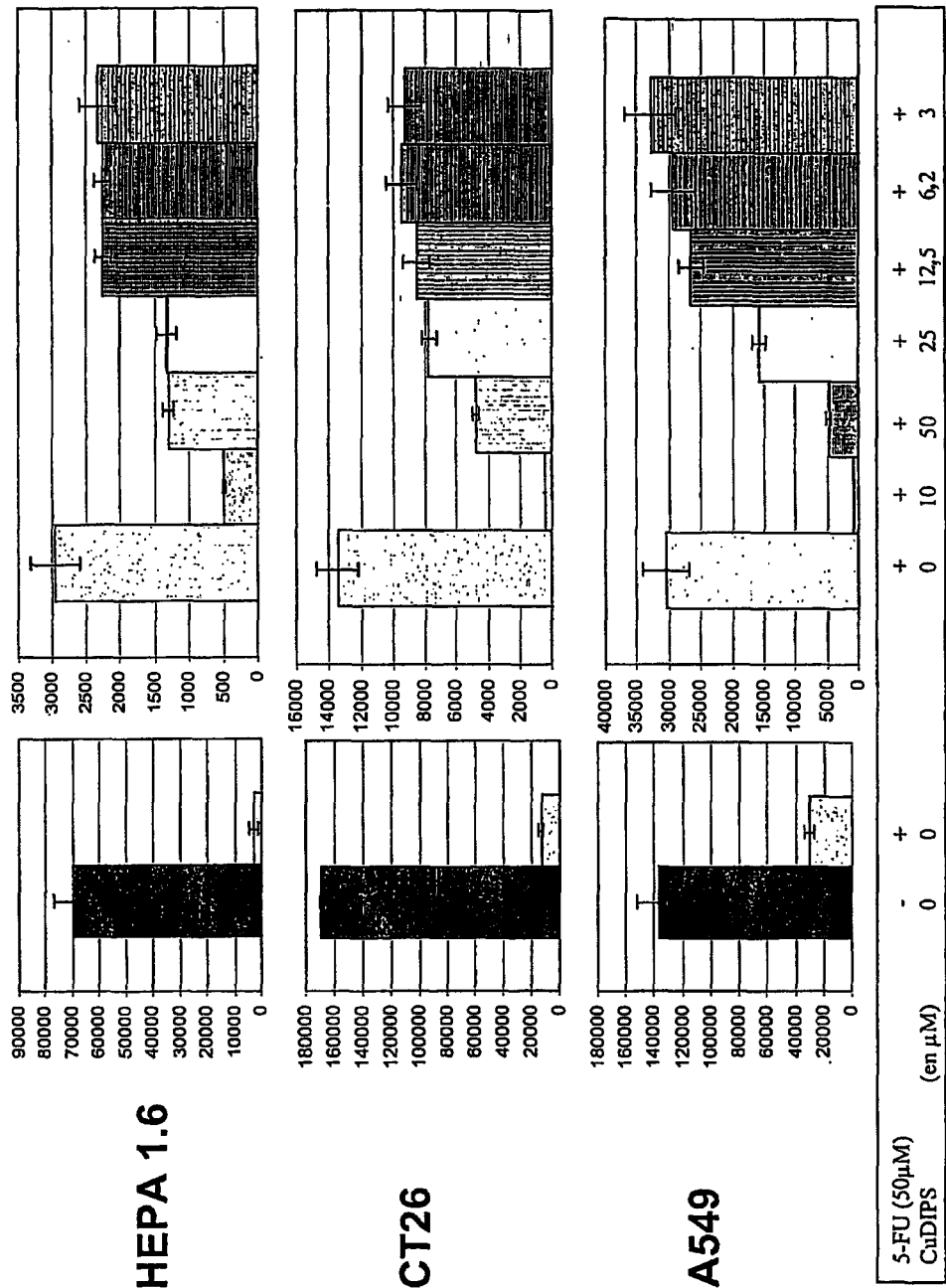


Figura 19

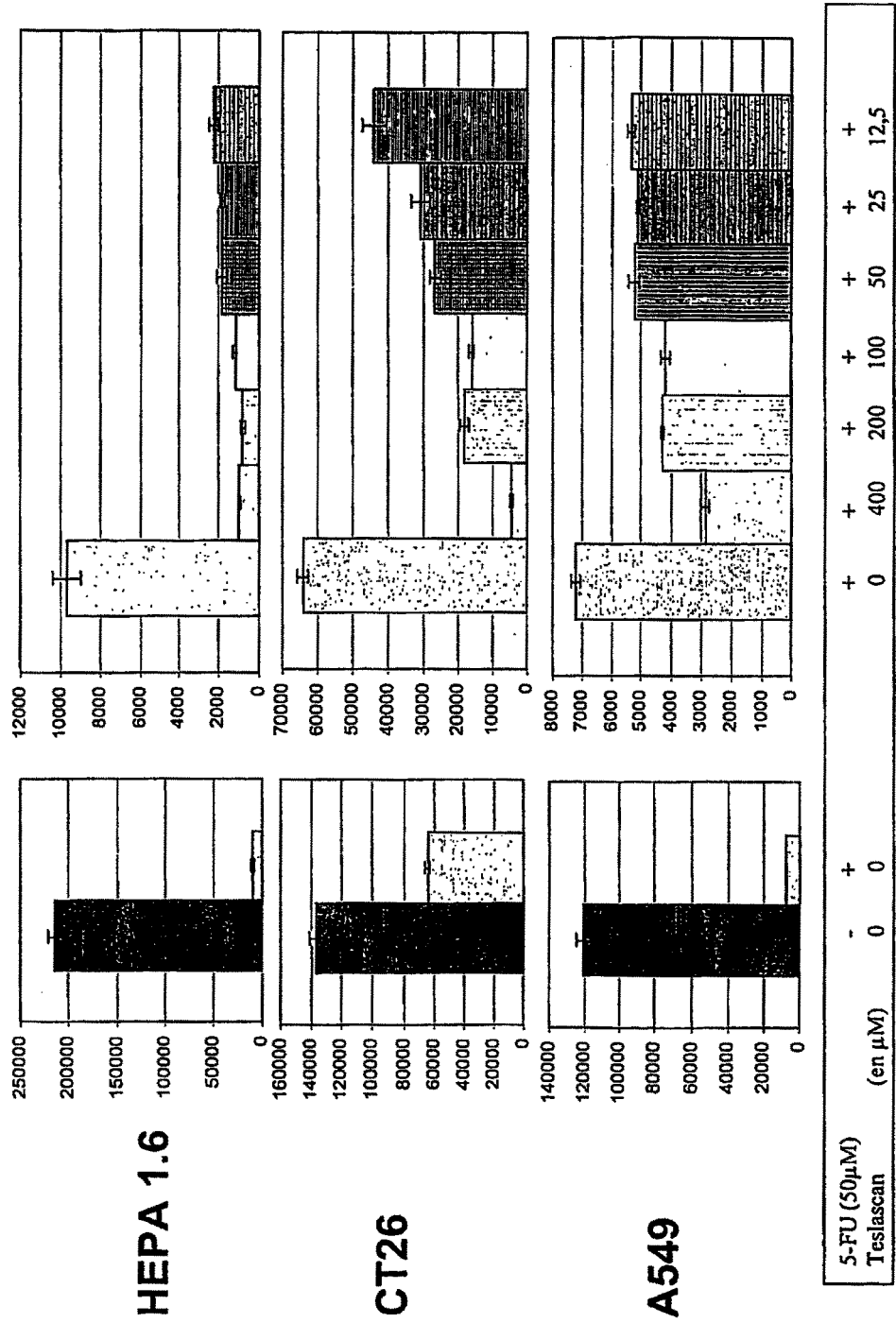


Figura 20

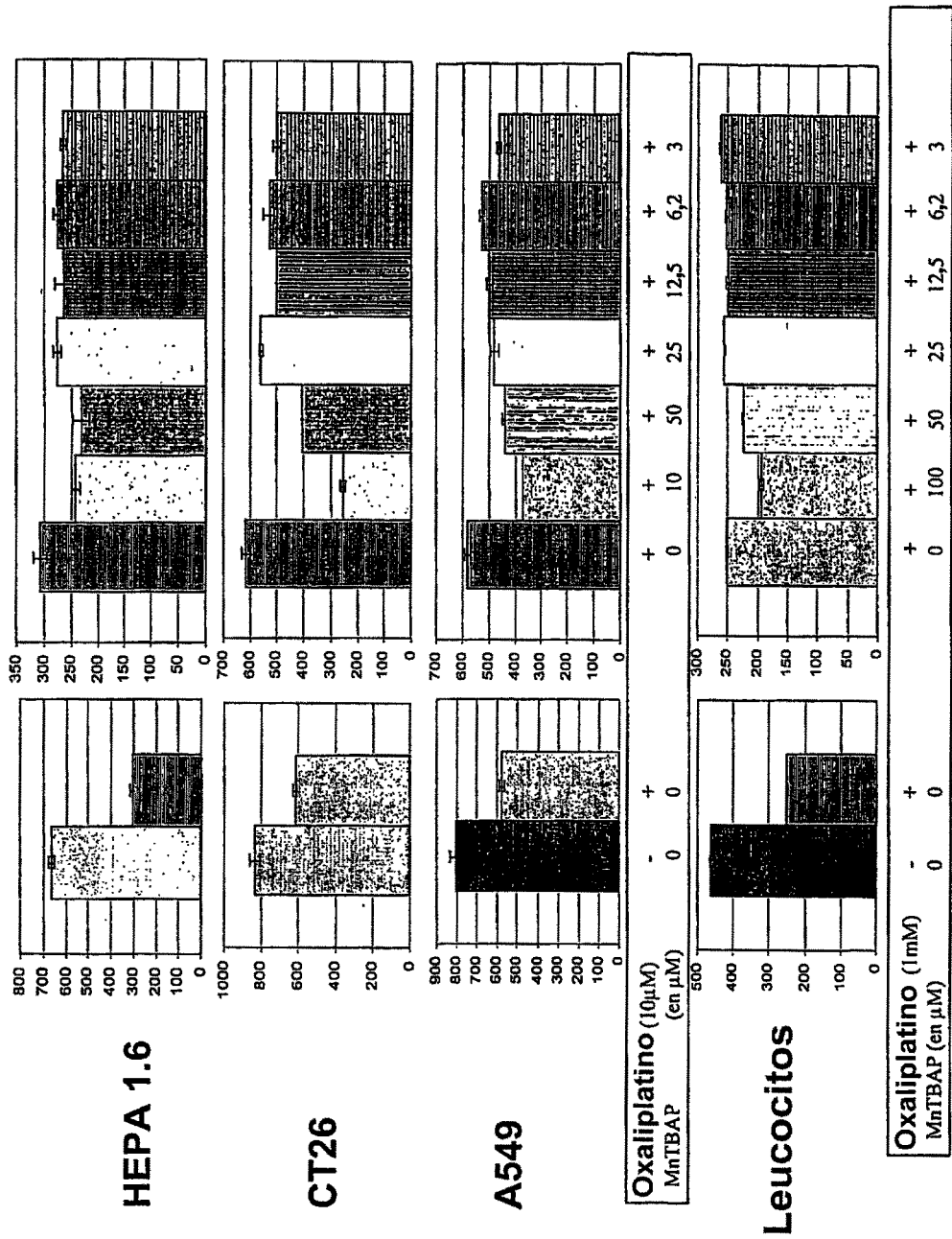


Figura 22

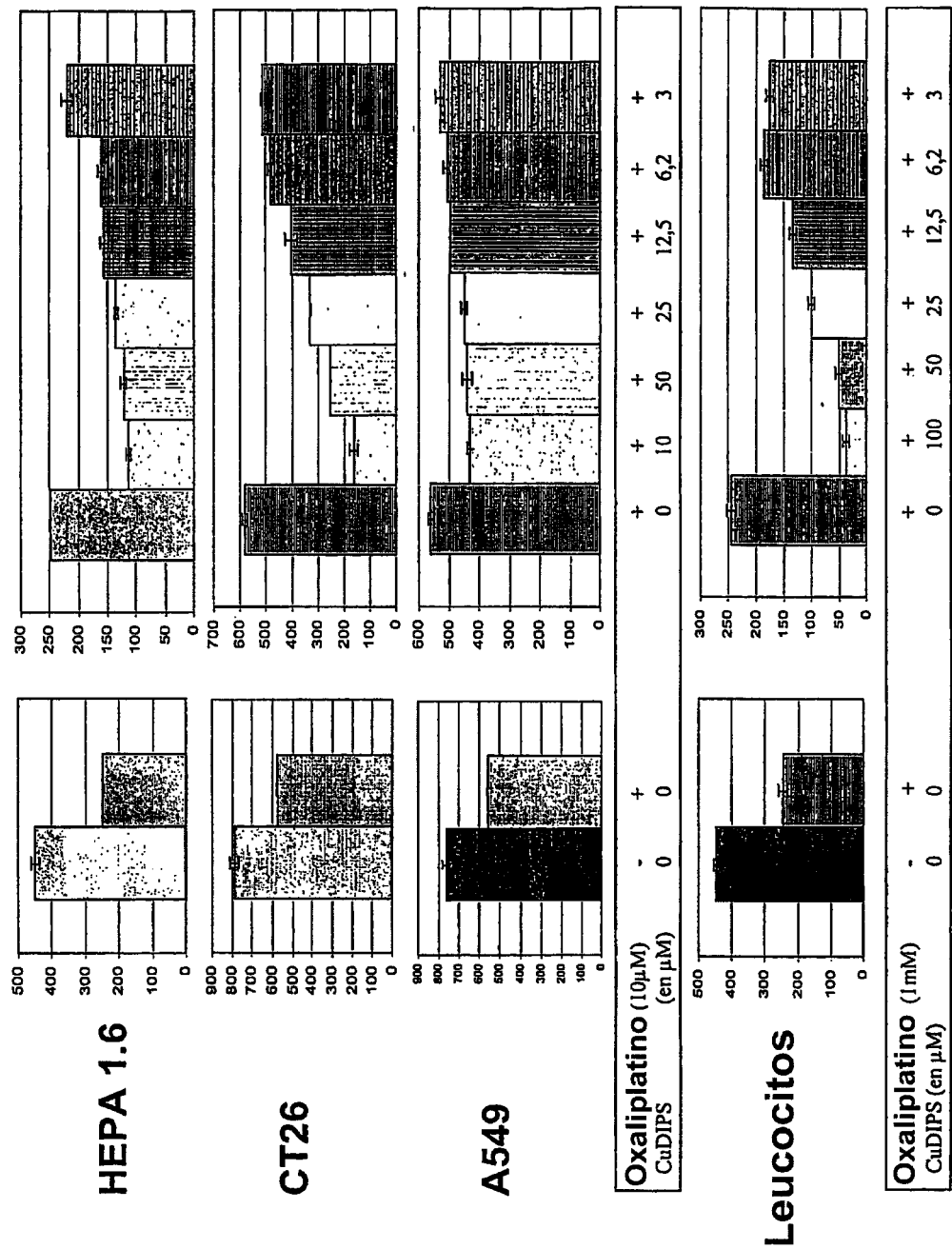
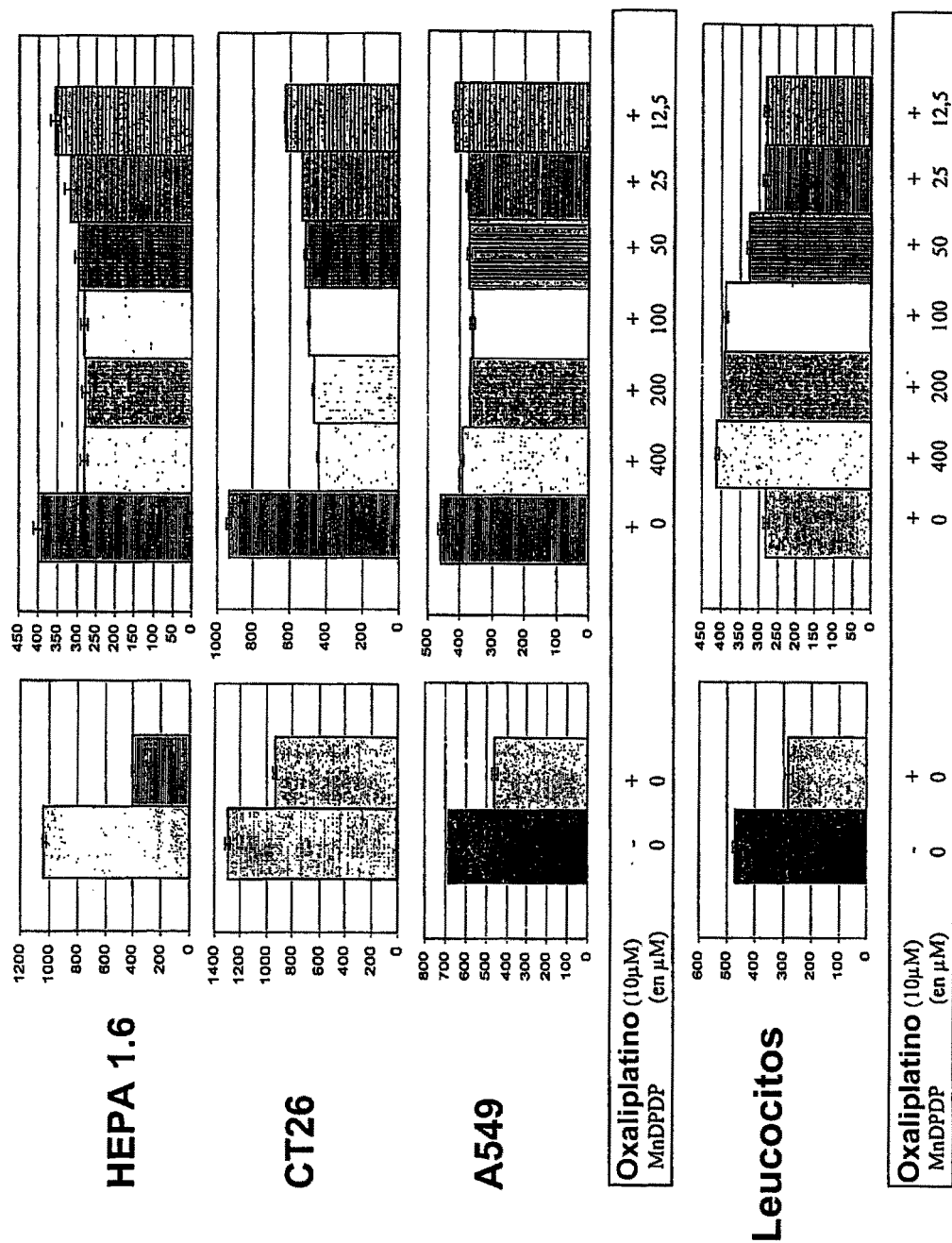


Figura 23



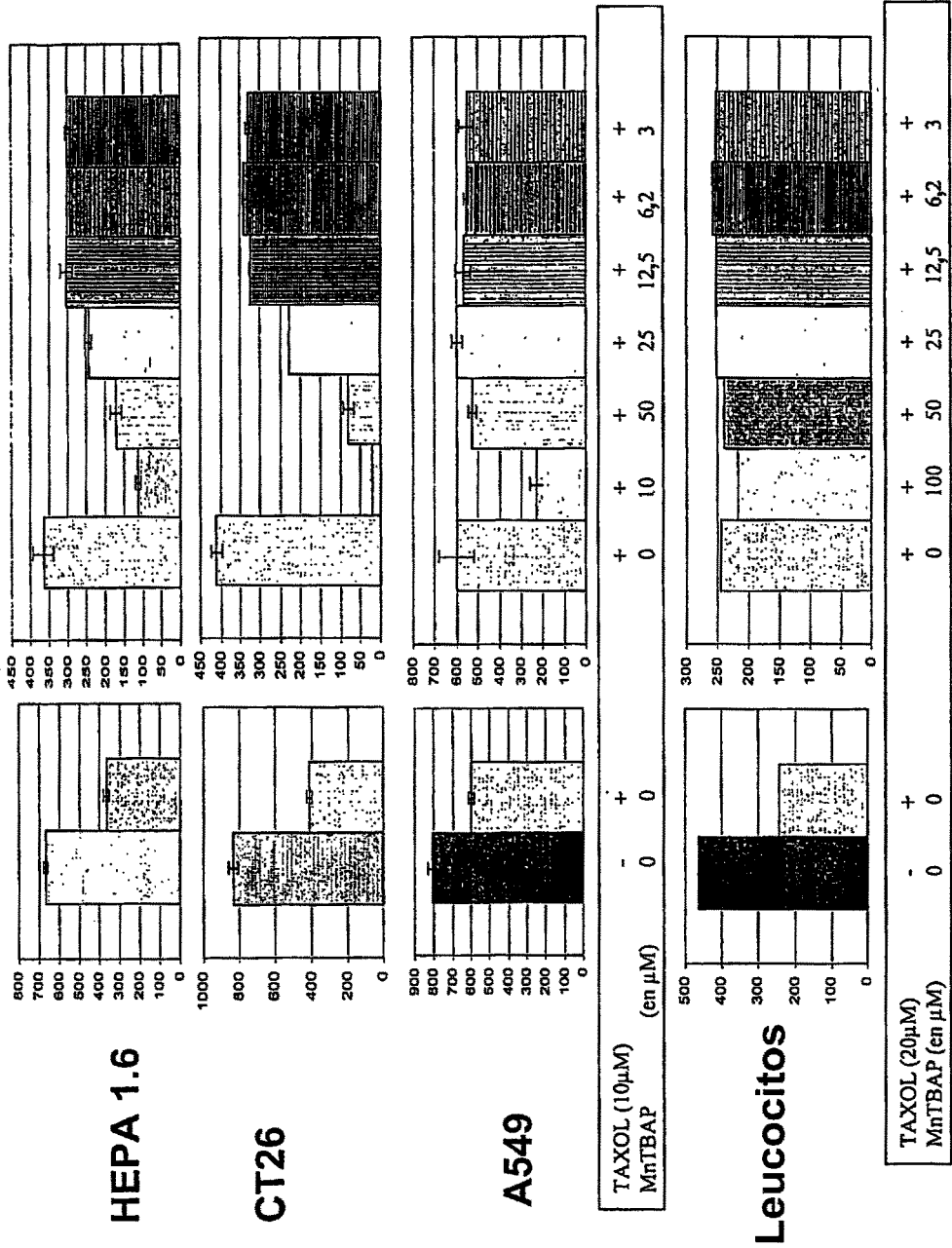


Figura 26

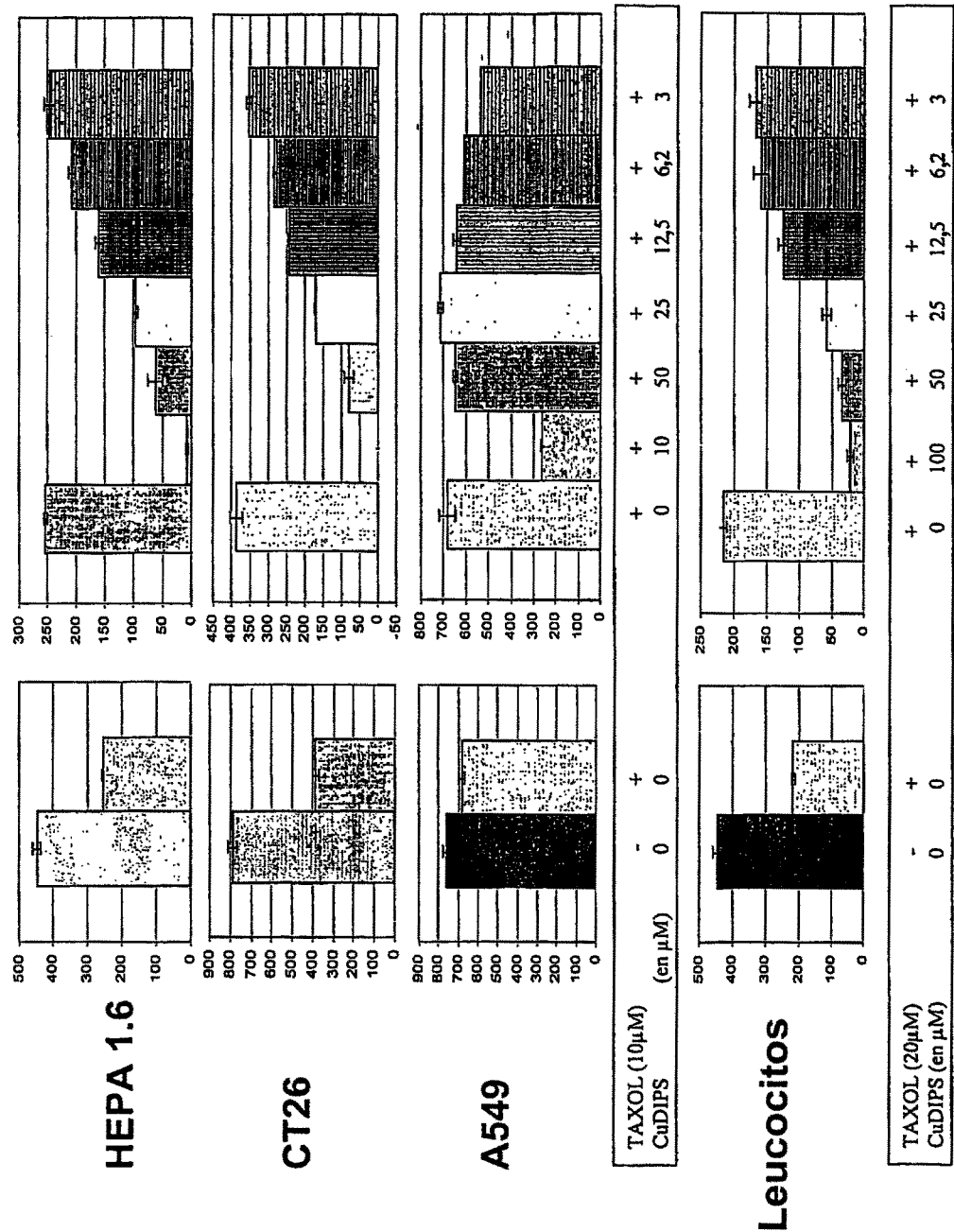


Figura 27

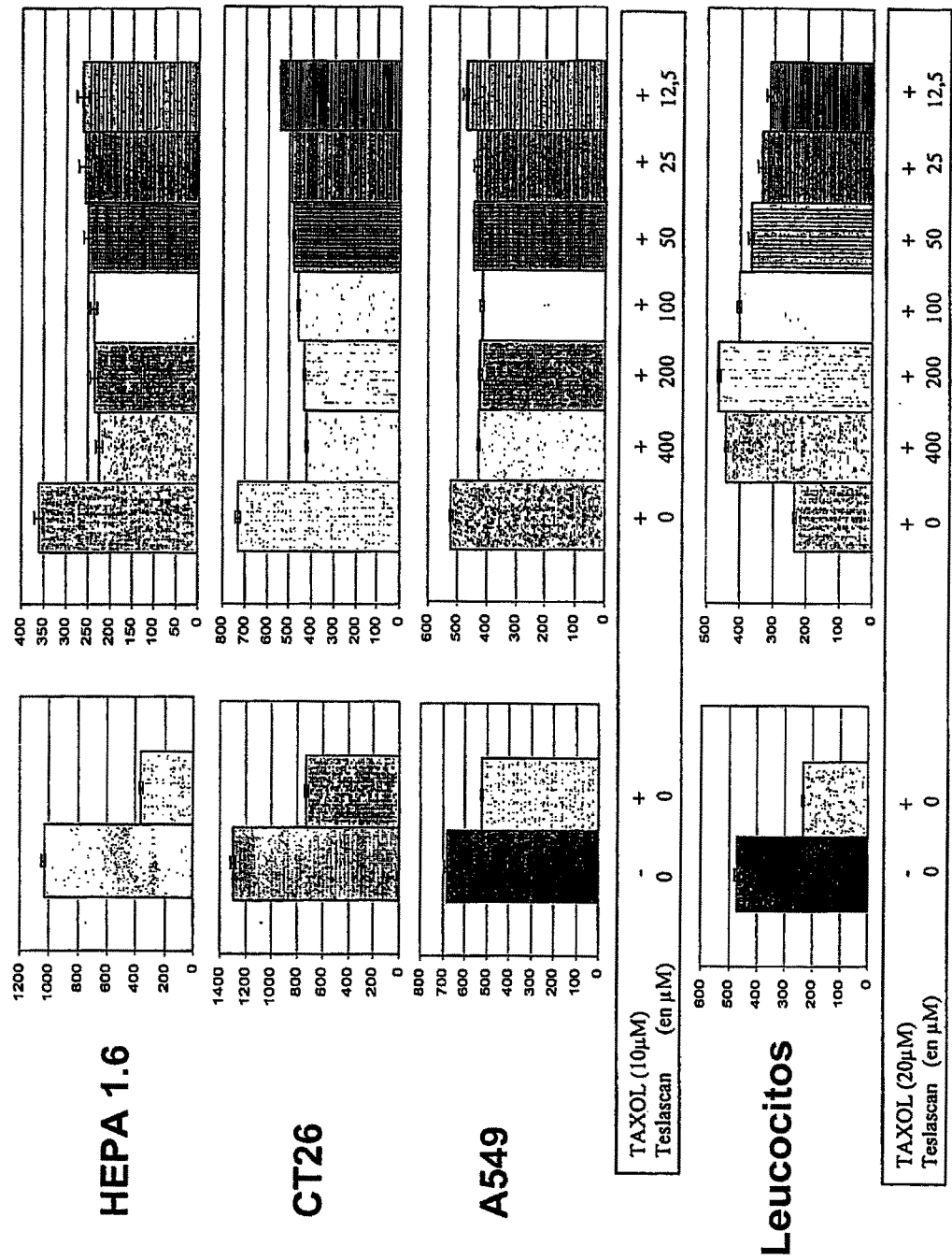


Figura 28

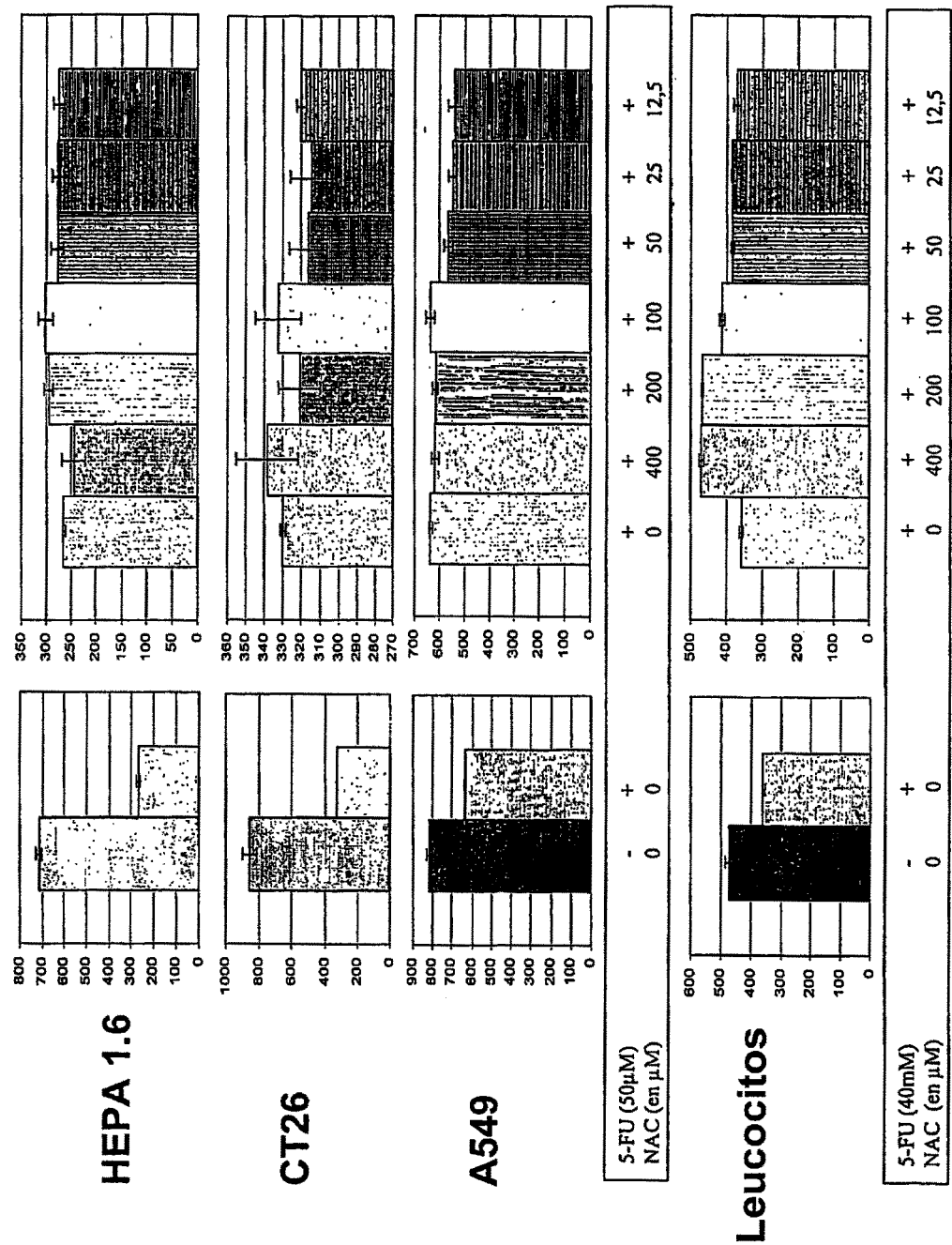


Figura 29

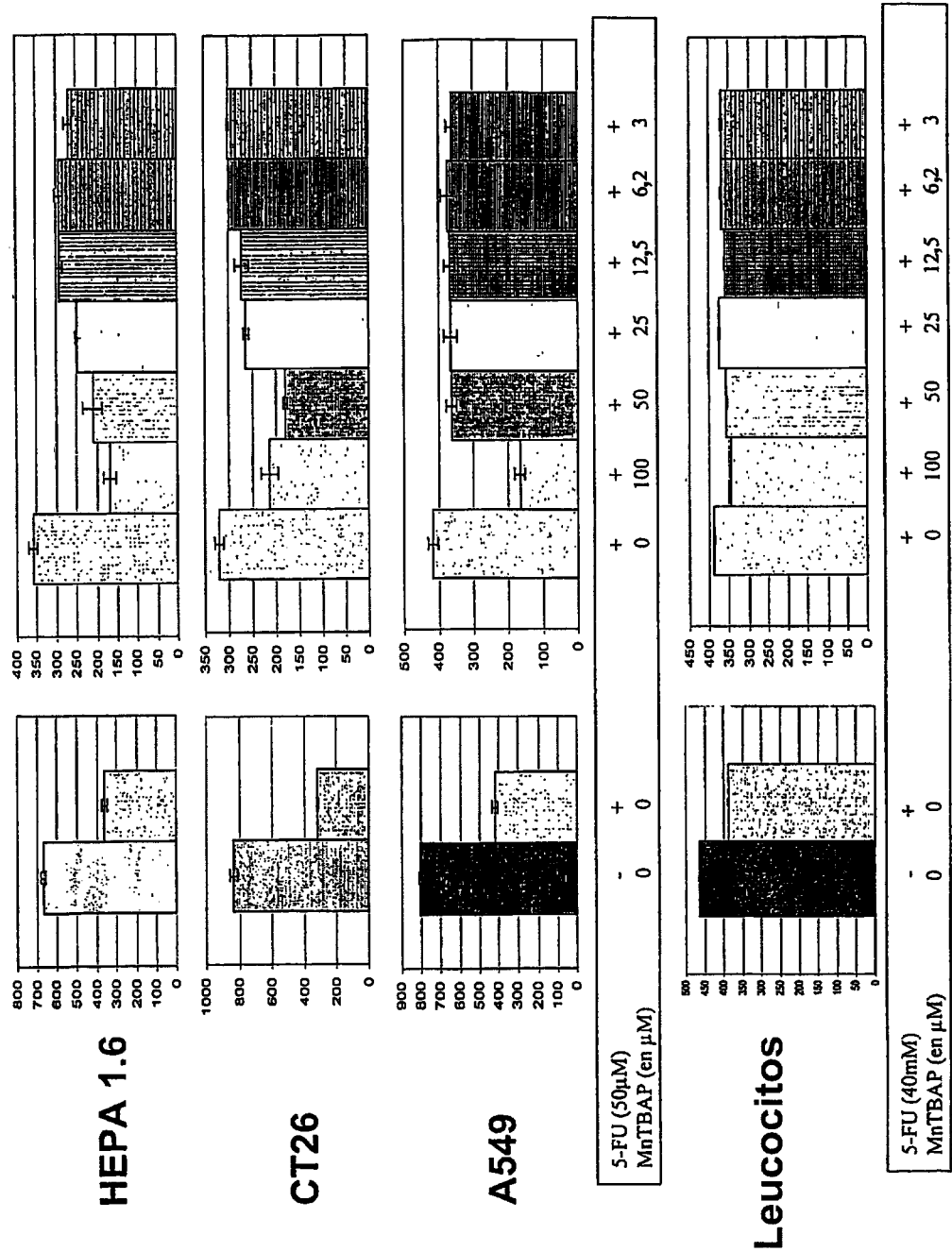


Figura 30

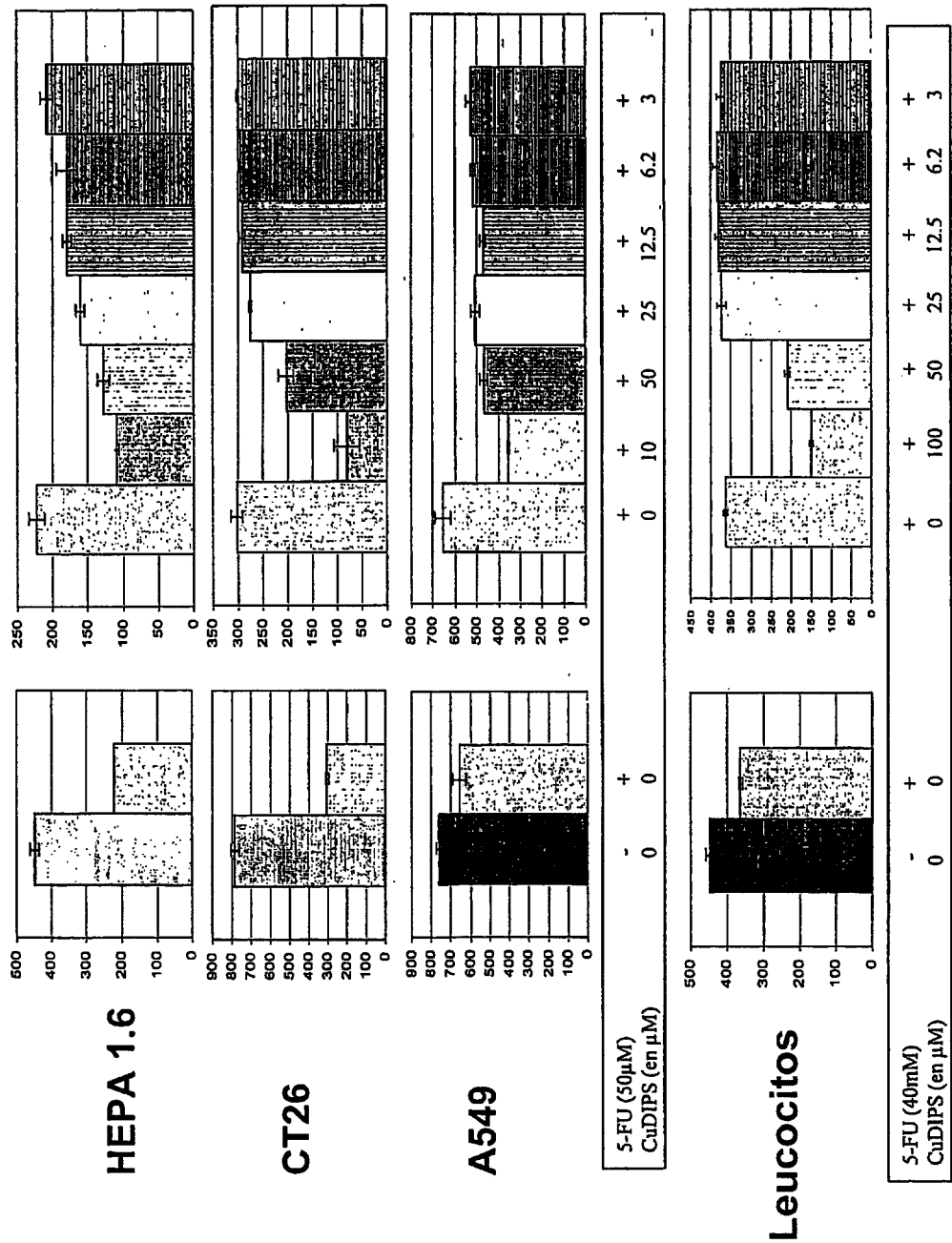


Figura 31

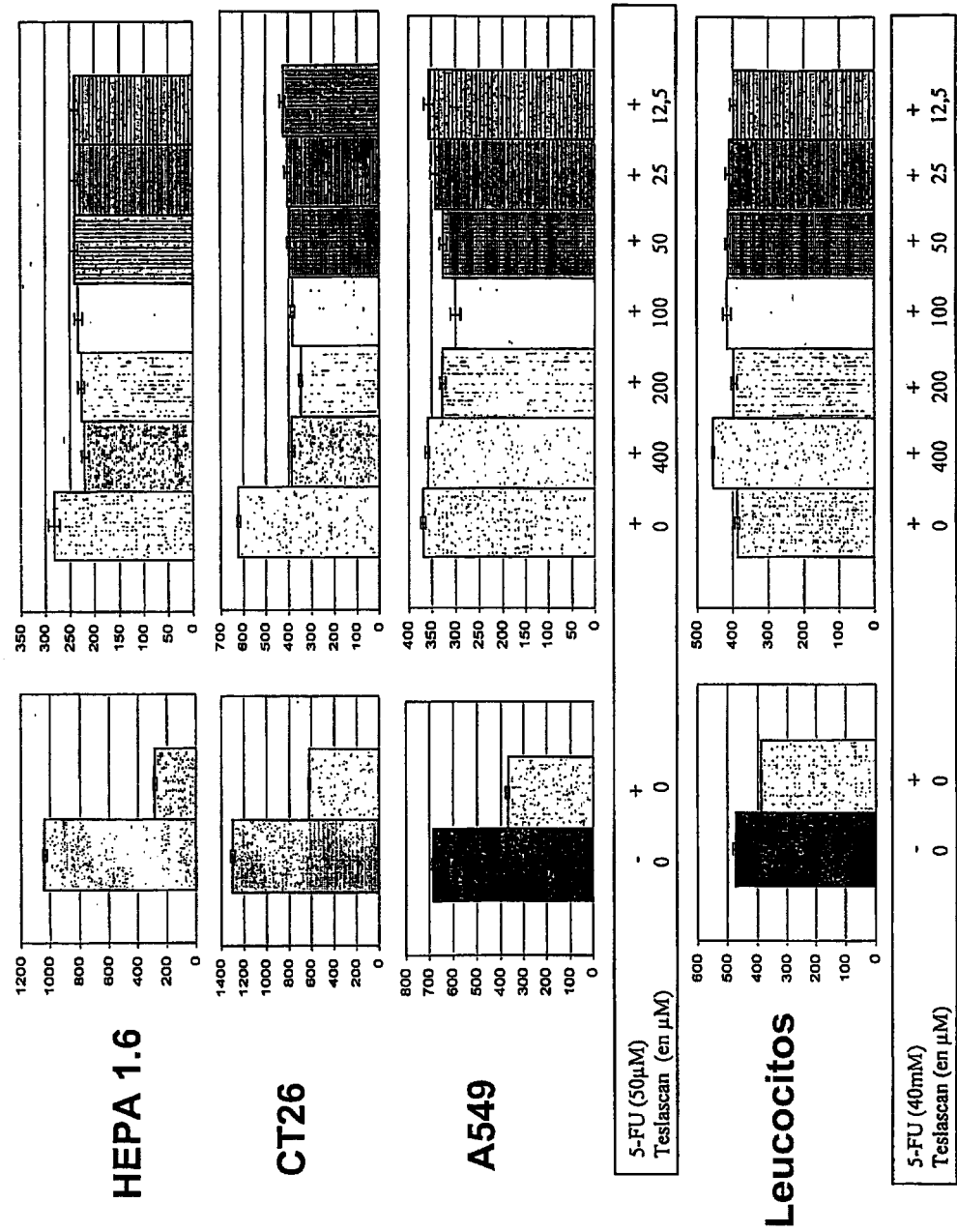


Figura 32

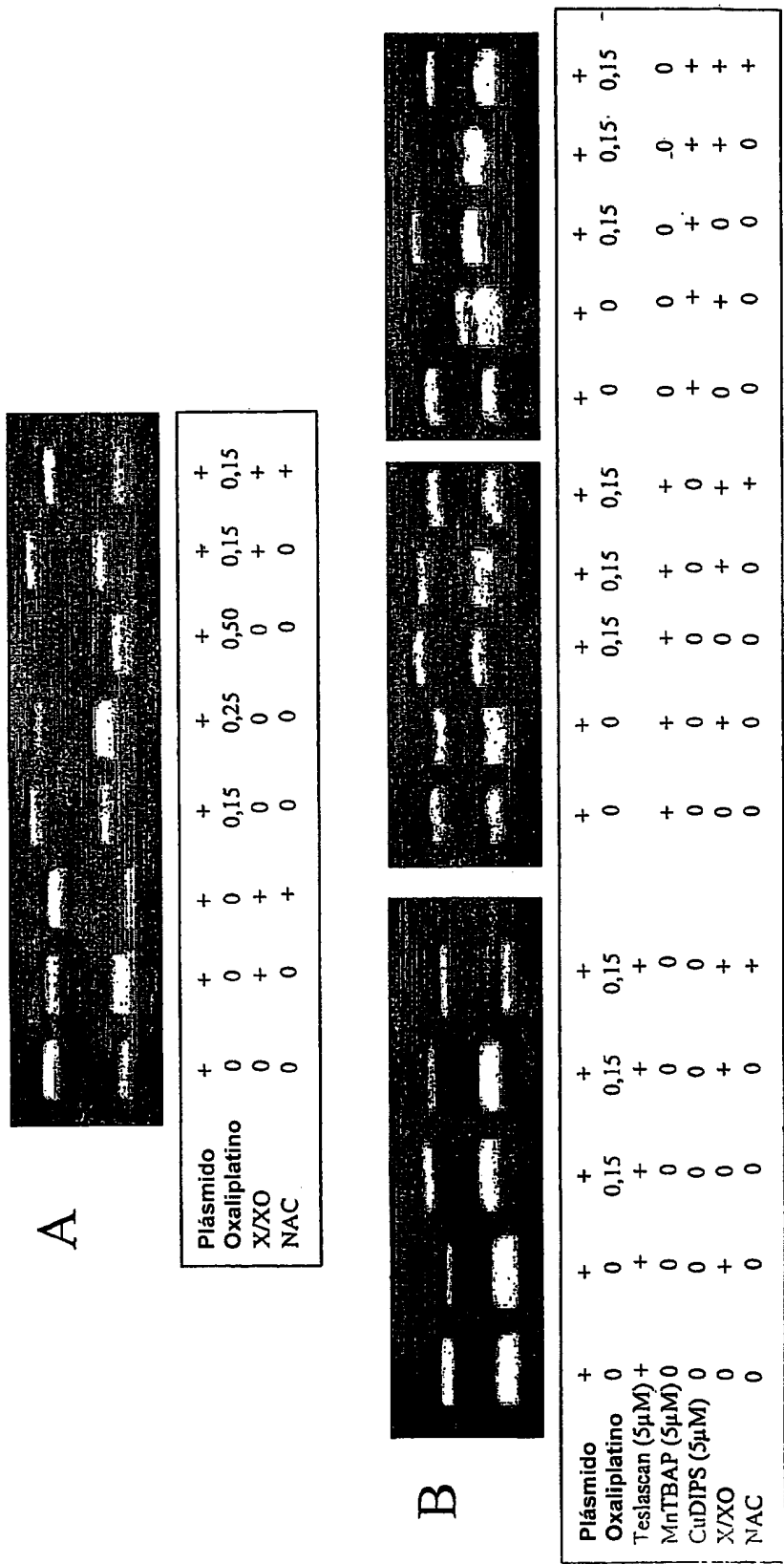


Figura 33

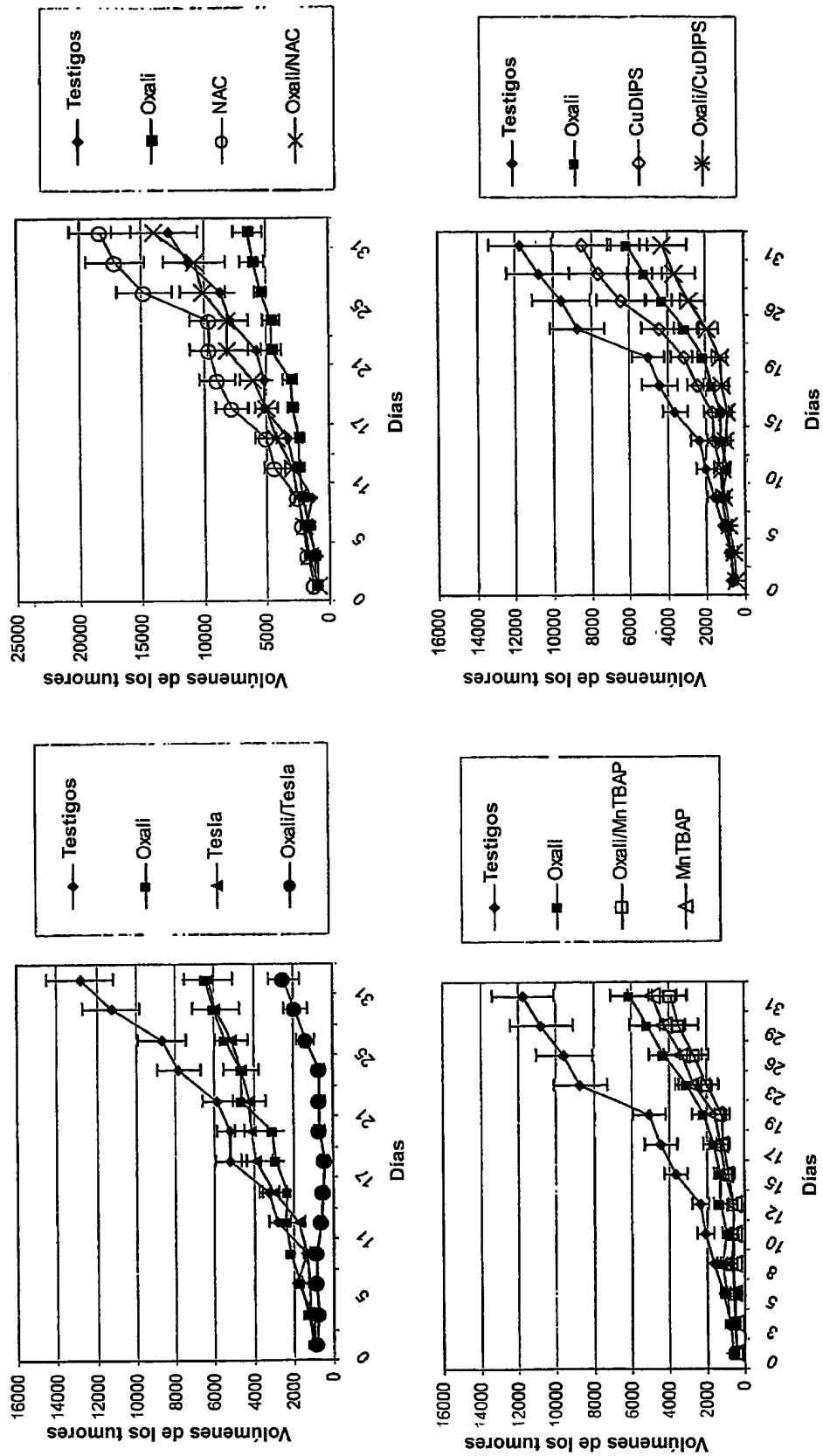


Figura 34

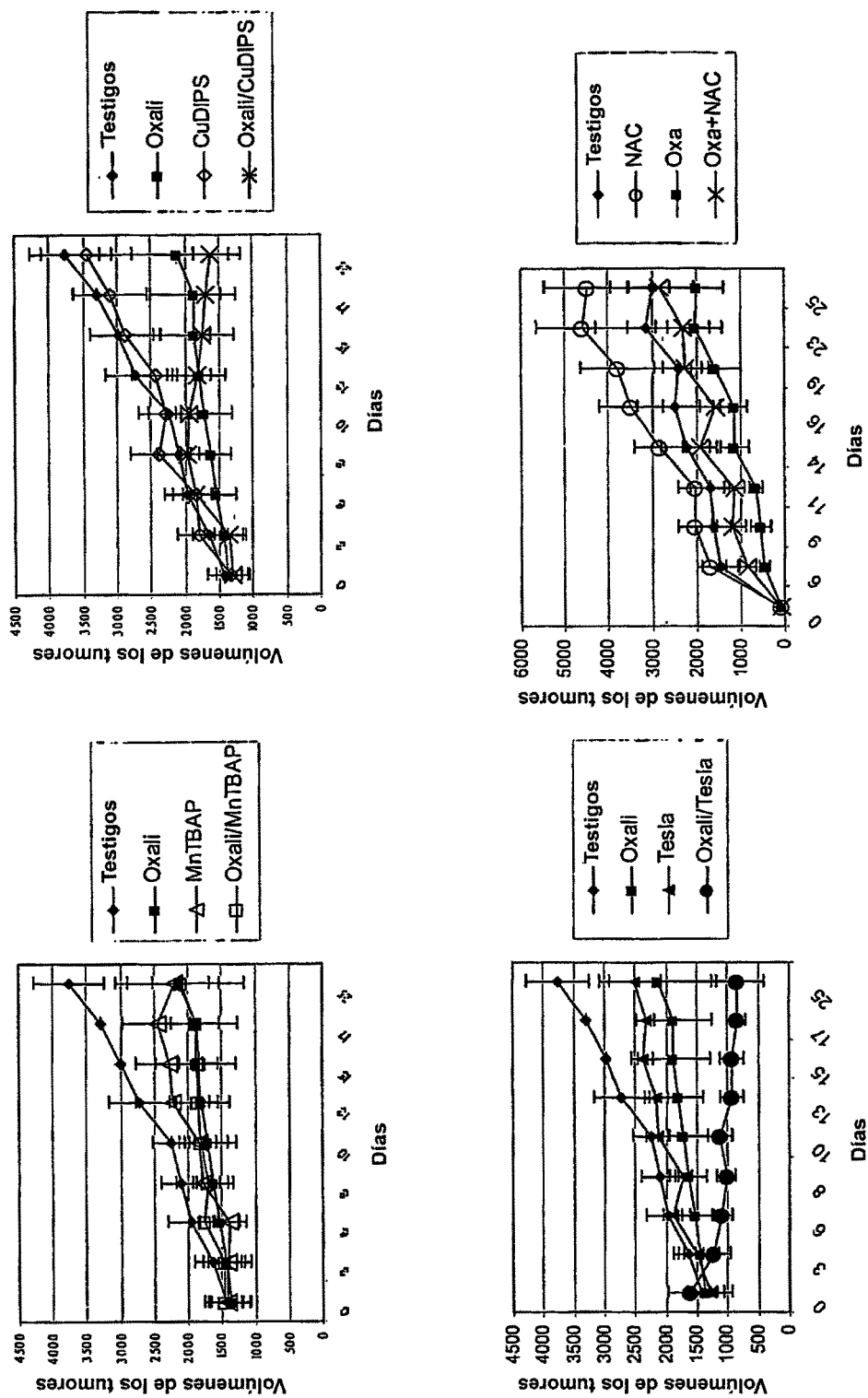


Figura 35