



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 810**

51 Int. Cl.:
C07C 69/78 (2006.01)
C07C 69/533 (2006.01)
A61K 36/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98938534 .9**
96 Fecha de presentación : **19.08.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1015413**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2000**

54 Título: **Uso de un compuesto ingenano para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **19.08.1997 AU PO8640**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **Peplin Research Pty. Ltd.**
Level 2, Brisbane Portal
1 Breakfast Creek Road
Newstead, QLD 4006, AU

72 Inventor/es: **Aylward, James, Harrison**

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

ES 2 308 810 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 de un compuesto ingenano para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

5 Esta invención se relaciona con el uso de un compuesto ingenano para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer o de otra condición que involucre células neoplásicas.

Antecedentes de la invención

10 Existe una fuerte asociación entre la exposición de la piel al componente de luz ultravioleta de la luz solar y el desarrollo de cánceres de piel, tal como el melanoma maligno y los cánceres de piel sin melanoma, principalmente los carcinomas de células basal (BCC) y los carcinomas de célula escamosa (SCC). La incidencia de estos cánceres se ha incrementado fuertemente en todo el mundo. En Gran Bretaña, hubo 4.000 nuevos casos diagnosticados de melanoma maligno en 1994, un incremento del 80% con respecto a los diez años anteriores (Wessex Cancer Trust, 1996). En
15 los Estados Unidos, se esperaban aproximadamente 34.100 nuevos casos, un incremento del 4% por año. Queensland, Australia, tiene la incidencia más alta de melanoma en el mundo, pero la detección temprana y campañas masivas de salud pública, y la promoción del uso de protectores solares y la reducción de la exposición a los rayos ultravioleta han ayudado a reducir el número de muertes. Los BCC afectan actualmente a una persona entre 1.000 entre la población del Reino Unido, y su incidencia se ha más que duplicado en los últimos 20 años (Imperial Cancer Research Fund, Reino Unido, 1997). Se espera diagnosticar un millón de nuevos casos de BCC y de SCC en los Estados Unidos en 1997, comparado con los 600.000 en 1990 y los 400.000 en 1980 (National Oceanic and Atmospheric Administration, EUA, 1997). En Australia, no existe razón para sospechar que una incidencia creciente similar no aplicaría también, a pesar de la gran publicidad sobre los peligros de la radiación solar y UV, siendo la población de Queensland la de más alto riesgo.

25 Por encima del 90% d todos los cánceres de piel se presentan sobre áreas de la piel que han estado regularmente expuestas a la luz solar o a otra radiación ultravioleta, siendo la UV tipo B la responsable por las quemaduras de la piel y está asociada con melanomas malignos, y la UV tipo A está asociada con el envejecimiento prematuro de la piel y con el desarrollo de los BCC y SCC (Wessex Cancer Trust, 1996). La exposición de los niños al sol ha sido relacionada con el desarrollo de melanoma maligno en adultos jóvenes. Otros factores de riesgo incluyen una predisposición genética (tez blanca, muchos lunares en la piel), polución química, sobreexposición a los rayos X, y exposición a algunas drogas y pesticidas. El agotamiento de la capa de ozono de la estratósfera se considera que contribuye al incremento a largo plazo en el cáncer de piel.

35 La remoción quirúrgica es con mucho el tratamiento más común para melanomas malignos, los BCC y los SCC. Esta puede tomarla forma de electrodesecación y raspado, criocirugía, extirpación simple completa, cirugía micrográfica o terapia con láser. Otros tratamientos, utilizados cuando se detectan los cánceres en etapa tardía de desarrollo, son la terapia de radiación externa, quimioterapia o en menor medida, bioinmunoterapia o terapia fotodinámica. La escogencia del tratamiento depende del tipo y la etapa de la enfermedad, y de la edad y estado de salud del paciente
40 (National Cancer Institute, EUA, 1997).

Todos los tratamientos actuales sufren de severas limitaciones. La mayor preocupación es el pobre reconocimiento de las células cancerosas en el sitio de la extirpación y la alta probabilidad de recurrencia, necesitando de examen quirúrgico y de tratamiento, con el riesgo de desfiguración posterior y dejar cicatriz. En una publicación, las proporciones reportadas de extirpación incompleta de los BCC fue del 30-67% (Sussman y Liggins, 1996). La inmunosupresión asociada con la cirugía puede provocar que las células remanentes proliferen, y se incrementa el riesgo de metástasis. En pacientes con melanoma existe un alto riesgo de que el cáncer ya haya hecho metástasis al momento de la cirugía inicial, y es común que la recurrencia tardía conduzca a la muerte. Las alternativas actuales a la cirugía, tales como terapia de radiación y quimioterapia, también implican riesgos de inmunosupresión y de pobre especificidad.
50 La inmunoterapia y la terapia génica se constituyen en la promesa principal, pero la aplicación racional de estas está probablemente aún a décadas de distancia.

55 Cuando el tumor pasa la etapa tratable por cirugía, el tratamiento más común para el melanoma o el cáncer metastático de piel de todos los tipos es la quimioterapia, que ha sido en mayor medida no exitoso (Beljanki y Crochet, 1996).

60 En teoría, un medicamento ideal sería uno que cuando se lo aplica en forma tópica a un melanoma expuesto, BCC o SCC, cause necrosis selectiva de las células tumorales o las induzca a sufrir apoptosis, sin causar daño a las células sanas de la piel que las rodean. En la práctica, esto todavía tiene que ser logrado. Los medicamentos actualmente disponibles no son ni selectivos ni penetrantes.

El público en general está también cautivado por el concepto de quimioterapia tópica. Han existido muchos "remedios caseros" documentados para el cáncer de piel, que han tenido consecuencias desastrosas, por ejemplo el uso de betún para zapatos (Adele Green, Queensland Institute of Medical Research, pers. Comm.). El principal peligro es
65 la producción de tejido cicatrizal, por debajo del cual continúan creciendo células tumorales. En Australia se consigue un extracto derivado de plantas del género *Solanum* (manzana de canguro o manzana del diablo) y supuestamente contiene glicósidos de solasodina como una preparación sin prescripción para el tratamiento de manchas solares y queratosis solar, bajo el nombre de "Curaderm". Sin embargo, se probó en un pequeño ensayo clínico contra los BCC

que la preparación era ineficiente, con 14/20 pacientes que mostraban un tumor persistente en el examen histológico del tejido del sitio tratado. En algunos casos, el examen histológico del sitio del tratamiento reveló tejido maligno embebido en el tejido cicatrizal. Los autores alertaron contra el autodiagnóstico y la automedicación, particularmente con sustancias irritantes (Francis y colaboradores, 1989).

5

Sin embargo, los reportes anecdóticos sugieren que los extractos de savia de planta son aún utilizados por el público en general para el tratamiento de manchas solares o queratosis solar, reclamando algún éxito para los mismos.

La savia de las plantas de la familia *Euphorbiaceae*, particularmente el género *Euphorbia*, ha sido utilizada en la medicina tradicional d muchos países. Se dio nombre al género en honor a un médico de la antigua Grecia por sus pretendidas propiedades medicinales (Pearn, 1987). Solamente hasta ahora se han investigado científicamente algunas de estas supuestas propiedades. El género es muy diverso, y va desde plantas herbáceas pequeñas de lento crecimiento hasta arbustos y árboles. Casi todos los reportes de actividad de estas plantas y sus extractos son anecdóticos o derivados de la medicina tradicional, y la naturaleza de las preparaciones utilizadas es frecuentemente o bien desconocida o está muy pobremente descrita. Se ha reivindicado actividad contra una gran variedad de condiciones, que van desde verrugas, “excrecencias”, callosidades, “tumores queloides”, granos, panadizos o uñeros, la “carne sobrante” y similares, hasta una variedad de cánceres (ver, por ejemplo, Hartwell: *Lloydia* 1969 32 153).

Como parte del programa de selección de actividad anticancerosa llevada a cabo sobre 114.000 extractos de 35.000 especies de plantas terrestres por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, se analizaron una cantidad de especies de *Euphorbia*. Se seleccionaron una suspensión acuosa, una suspensión en aceite de oliva, un extracto de alcohol y un extracto de ácido por su actividad contra la línea celular tumoral trasplantable de sarcoma 37. Se analizaron cuatro especies. De estas, la *Euphorbia peplus* no mostró actividad en ninguno los extractos; *Euphorbia drummondii*, *Euphorbia pilulifera*, y *Euphorbia resinifera* mostraron actividad débil de un extracto ácido, un extracto de alcohol, y una suspensión en aceite de oliva, respectivamente (Belkin y Fitzgerald, 1953). Una revisión de la literatura científica y médica de los pasados cinco años reveló una diversidad de potentes principios activos tales como di y tetraterpenos, flavonoides, esteroides y proteínas en este genero, y se han reportado muchos efectos bioactivos, habiéndose observado tanto efectos positivos como adversos. Estos reportes están resumidos en la Tabla 1. En particular, el genero *Euphorbia* es bien conocido por producir promotores tumorales tales como ésteres de forbol (Hecker, E.: “Cocarcinogens from Euphorbiaceae and Thymeleaceae” en “Symposium on Pharmacognosy and Phytochemistry” (Wagner y colaboradores, eds., Springer Verlag 1970 147-165)).

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 308 810 T3

TABLA 1

Espece	Principio activo	Acción	Referencia
<i>Euphorbia aleppica</i>	planta entera: aleplicitinas, diterpén poliésteres, cicloartén triterpenos, escopoletina, kaempferol, ácido 4-hidroxibenzóicos	neoplasmas prostático y de pulmón	Oksuz, S. y colaboradores (1996)
<i>Euphorbia biglandulosa Desf.</i>	cerebrosidades	?	Falsone G y colaboradores (1994)
<i>Euphorbia bougheii</i>	látex	efecto irritante para la piel y promotor de tumores	Gundidza, M. y colaboradores (1993)
<i>Euphorbia characias</i>	látex: lipasa	homología (43,5%) con cadena B de ricina	Moulin, A. y colaboradores (1994)
<i>Euphorbia cooperi</i> NE Br	planta entera: forbol éster	irritante para la piel	Gundidza, M. y colaboradores (1992)
<i>Euphorbia fisheriana</i>	extracto alcalino	tratamiento de epilepsia	Liu Y. y colaboradores (1994)
<i>Euphorbia hirta</i>	planta entera	inhibición de la bacteria <i>Shigella</i> spp.	Vijaya, K. y colaboradores (1995)
<i>Euphorbia hirta</i>	planta entera: flavonoide	actividad antidiarreica	Galvez, J. y colaboradores (1993)
<i>Euphorbia humifusa</i>	planta entera: taninos hidrolizables, polifenol glucósido	?	Yoshida, T. y colaboradores (1994)

ES 2 308 810 T3

TABLA 1 (continuación)

5	Especie	Principio activo	Acción	Referencia
	<i>Euphorbia hylonoma</i>	raíz: ácido 3,3',4-tri-O-metmetileláxico, beta-sitosterol	acción de la medicina herbolaria china ??	Guo, Z. y colaboradores (1995)
10	<i>Euphorbia kansui</i>	planta entera: ingenoles	estimulación de la expresión del receptor Fc del macrófago	Matsumoto, T. y colaboradores (1992)
15	<i>Euphorbia lathyris</i>	material granulado de la planta	rodenticida	Gassling y Landis (1990) patente estadounidense No. 4906472
20	<i>Euphorbia marginata</i>	látex	lectina mitogénica	Stirpe, F. y colaboradores (1993)
25	<i>Euphorbia peplus</i>	? quercetina, hiperósido, kaempferol, sitosterol, alcaloides, glicósidos	remedios tradicionales para verrugas, granos, asma, úlcera de roedor, BCC	Weedon y Chick (1976) y las referencias citadas allí
30	<i>Euphorbia poisonii</i>	diterpenos	selectividad citotóxica para la línea celular A-498 de carcinoma de riñón humano	Fatope, M.O. y colaboradores (1996)
35	<i>Euphorbia splendens</i>	látex	inhibición del molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> (vectores de esquistosomiasis)	Jurberg, P. y colaboradores (1995)
40	<i>Euphorbia tirucalli</i>	planta entera	reduce la inmunidad celular específica de EBV en el linfoma de Burkitt	Imai, S. (1994)
45				

50 La especie de este grupo más estudiada intensivamente es la *Euphorbia pilulifera* L (sinónimos *E. hirta* L.; *E. capitata* Lam.), cuyos nombres comunes incluyen plantas de jugo lechoso que producen pepas, hierba de San Nicolás, pelo de gato, mala hierba causante del asma de Queensland y plantas de jugo lechoso floreadas en la parte superior. La planta está ampliamente distribuida en países tropicales, incluida la India, y el norte de Australia, incluyendo Queensland. De acuerdo con la "Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics" (Leung y Foster, 1996), se utiliza toda la planta en floración o cargada de frutos en remedios herbales, principalmente para preparaciones para la tos, y en medicina tradicional para el tratamiento de condiciones respiratorias tales como asma, bronquitis, toses y fiebre del heno. Esta referencia reporta los constituyentes activos de *Euphorbia pilulifera* que son colina y ácido shiquímico, y que otros compuestos presentes incluyen triterpenos, esteroides, flavonoides, n-alcanos, ácidos fenólicos, L-inositol, azúcares y resinas. De estos componentes, el ácido shiquímico es un intermediario esencial en la síntesis de aminoácidos aromáticos, y se ha reportado que tiene actividad carcinogénica en ratones (Evans y Osman, 1974; Stavric y Stoltz, 1976). Se identificaron jatrofanos, ingenanos, y un diterpeno tetracíclico denominado pepluano en la savia de *Euphorbia peplus* por parte de Jakupovic y colaboradores (1998a). Se estableció que los jatrofanos tienen una conformación diferente de aquellos jatrofanos previamente conocidos. Se ha establecido también que los jatrofanos pertenecen a un grupo de diterpenos no irritantes, que podrían haber sido pasados por alto en estudios anteriores. No existe ninguna descripción o sugerencia de cualquier actividad biológica de los jatrofanos o del nuevo compuesto pepluano; ni se sugiere que cualquiera de estos compuestos pueda ser útil para algún propósito farmacéutico.

Un reciente reporte describe la citotoxicidad selectiva de una cantidad de ésteres diterpeno tigliano del látex de *Euphorbia poisonii*, una planta altamente tóxica encontrada en el norte de Nigeria, que es utilizada como un pesticida de jardín y reputada por ser utilizada en homicidios. Uno de estos compuestos tiene una citotoxicidad selectiva para la línea celular A-498 de carcinoma de riñón humano más de 10.000 veces superior a aquella de la adriamicina (Fatope y colaboradores, 1996).

En una serie de solicitudes de patente, Tamas ha reivindicado el uso de plantas de *Euphorbia hirta* y extractos de las mismas para una variedad de propósitos, incluida la terapia tumoral (EP 330094), un complejo relacionado con el SIDA y SIDA (HU-208790) y una inmunidad creciente y como un agente contra los hongos para el tratamiento de heridas abiertas (DE-4102054).

De esta forma, aunque existen reportes aislados de actividad contra el cáncer de diferentes preparaciones de *Euphorbia* (ver Fatope y colaboradores, 1996; Oksuz y colaboradores, 1996), no solamente están presentes los compuestos en al menos una especie de *Euphorbia* reportada por ser carcinogénica (Evans y Osman, 1974; Stavric y Stolz, 1976; Hecker, 1970; 1977), sino que al menos una especie tiene un efecto irritante para la piel y promotor de tumores (Gundidza y colaboradores, 1993), y otra especie reduce la inmunidad celular específica de EBV en el linfoma de Burkitt (Imai, 1994).

Por lo que sabemos, no existe un reporte confiable o reproducible del uso de cualquier extracto de especie de *Euphorbia* para el tratamiento melanoma maligno o los SCC. Un reporte anecdótico de tratamiento casero de un BCC con el látex de *Euphorbia peplus* (planta pequeña de jugo lechoso o mala hierba lechosa) fue la publicación de Weedon, D. y Chick, J., titulada "Home treatment of basal cell carcinoma" (1976). Los autores establecieron que se han reivindicado las propiedades medicinales para el jugo lechoso de esta planta desde el tiempo de Galeno, y que ha sido ampliamente utilizado como remedio casero para granos, verrugas, y asma. En el umbral del siglo XXI fue utilizado por algunos médicos en Sídney para el tratamiento de úlceras de roedores. El paciente del autor afirmó haberse tratado a sí mismo durante muchos años por BCC múltiples.

"El paciente, un hombre de 54 años, había sido observado esporádicamente en el Hospital real de Brisbane desde 1971. En una visita se observó que él tenía un carcinoma clínico de célula basal sobre la parte anterior de su pecho que fue confirmado por medio de una biopsia de un espécimen diminuto tomado de un borde. Algunos días después, cuando había cicatrizado el sitio de la biopsia se le aplicó al paciente la savia de *Euphorbia peplus* cada día durante 5 días. El área se tornó eritematosa y luego pustular, después de lo cual se libró de la lesión. A su vuelta 6 semanas después del tratamiento, el paciente estuvo de acuerdo en permitirnos extirpar quirúrgicamente la pequeña área de cicatriz residual. Múltiples secciones mostraron tejido dérmico cicatrizal que contenía una pocas células inflamatorias crónicas, pero no mostró evidencia de tumor residual".

Los autores establecieron que "esta comunicación no debe ser tomada de ninguna manera como una recomendación de la forma de terapia". Existen unos pocos reportes que advierten sobre la naturaleza corrosiva de la savia, y un menor daño a los ojos que ha resultado del tratamiento casero de verrugas utilizando *Euphorbia peplus* (Eke, T., 1994). Parece probable que el efecto reportado por Weedon y Chick resultó de la actividad irritante de la savia de *Euphorbia peplus*, y que, como en el caso del extracto de *Solanum* "Curaderm" reportado por Francis y colaboradores (1989), existe un alto riesgo de células tumorales residuales que sobreviven en o bajo el tejido cicatrizal que resulta de tal tratamiento.

El inventor ha encontrado ahora sorprendentemente que la savia de las plantas de tres diferentes especies de *Euphorbia*, *Euphorbia peplus*, *Euphorbia hirta* y *Euphorbia drummondii*, inhibe específicamente el crecimiento de tres líneas celulares tumorales humanas, incluidos melanoma maligno. Además, en muy bajas concentraciones, la savia de *Euphorbia peplus* y de *Euphorbia hirta* induce la diferenciación de células de melanoma maligno a fin de que ellas adopten la apariencia morfológica de melanocitos normales. En concentraciones similares o incluso menores un extracto estimuló la activación del promotor del gen de la metalotioneína y expresión de un gen reportero en células MM96L de melanoma maligno. Los resultados fueron particularmente notables ya que la línea de células de melanoma que fue utilizada es reacia a la inhibición por todos los agentes quimioterapéuticos convencionales que han sido analizados contra ella (Maynard y Parsons, 1986).

55 Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención provee el uso de un compuesto ingenano para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer u otra condición que involucra células neoplásicas; en donde dicho compuesto:

60 a) puede obtenerse por extracción con etanol al 95% a partir de la savia de *Euphorbia peplus*, *Euphorbia hirta* y/o *Euphorbia drummondii*;

b) es capaz de estimular la activación del gen de la metalotioneína y

65 c) es capaz de matar o inhibir el crecimiento de células cancerosas, pero no afecta significativamente a los fibroblastos neonatales normales, o a los queratinocitos transformados espontáneamente; en donde dicha actividad no es destruida por calentamiento a 95°C durante 15 minutos, o tratamiento con acetona.

ES 2 308 810 T3

Preferiblemente, el(los) compuesto(s) es(son) capaz(es) de inhibir el crecimiento de al menos una línea celular seleccionada del grupo que consiste de MM96L, MM229, MM220, MM237, MM2058, B16, LIM1215, HeLa, A549, MCF7, MCC16 y Colo16 como se definió aquí. Más preferiblemente, el(los) compuesto(s) es(son) capaz(es) de inhibir el crecimiento de, o de inducir la diferenciación en células MM96L.

5

Aún más Preferiblemente, el compuesto es capaz también de inducir la proliferación de melanocitos normales y/o células T.

Preferiblemente, el compuesto está presente en savia de *E. peplus* o *E. hirta*.

10

En un aspecto adicional, el compuesto es 20-acetil-ingenol-3-angelato.

En un aspecto adicional, el cáncer es cáncer de piel, melanoma maligno, carcinoma de célula de Merkel, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal o queratosis solar.

15

En un aspecto adicional, el medicamento es para administración tópica.

En un aspecto aún adicional, el cáncer es un tumor sólido, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer cervical o cáncer de seno.

20

Preferiblemente, el compuesto es utilizado junto con un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos presentes en *Euphorbia* pueden ser jatrofanos, pepluanos, paralianos e ingenanos.

25

Donde el compuesto es un jatrofano, puede ser de Conformación II como lo definieron Jakupovic y colaboradores (1998a). Se observaron sustituyentes adicionales en esqueletos de jatrofano, pepluano y paraliano de ocurrencia natural. Estos incluyen las siguientes sustituciones y análogos.

Los compuestos de este tipo han sido encontrados en una variedad de plantas del género *Euphorbia* (Jakupovic y colaboradores, 1998a, b, c; Marco y colaboradores, 1998).

30

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 308 810 T3

TABLA 2

Sustituciones Naturales Observadas para los Esqueletos de Jatrofano, Pepluano y Paraliano (Jakupovic y colaboradores, 1998a, b, c; Marco y colaboradores, 1998)			
Posición del carbono	Jatrofano	Pepluano	Paraliano
1	H, OAc.	H ₂ , OAc	H & OAc, H ₂ ,
2	OAc & H, CH ₃ & OAc, CH ₃ & H	CH ₃ & H	CH ₃ & H, CH ₃ & OAc
3	OH, OAc, OiBu, OCinn, OBz, OBzOCH ₂ CO, PhCO ₂ CH ₂ CO ₂	OBz	OBz
4	H	H	H
5	OAc, OiBu, Omebu, OAcOAc	OAc	OAc
6	doble enlace exocíclico	CH ₃ , CH ₂ OAc	CH ₃ , CH ₂ OAc
7	H ₂ , OAc, OiBu, OMeBu, OPr, OCOiPr, OCOEt	H ₂ ,	H ₂ ,
8	H ₂ , OH, OAc, OiBu, OMebu, OBz, OAng,	OAc, doble enlace con C12	H, OAc
9	OH, OAc, OCinn, ONic, =O	OAc, 9-18 doble enlace	=O
10	(CH ₃) ₂	CH ₃ & OAc, doble enlace con 11, CH ₃	(CH ₃) ₂
11	doble enlace con 12	H ₂ , doble enlace con 10 & OH	H ₂
12	doble enlace con 11	H, doble enlace con 8	H
13	CH ₃	CH ₃	CH ₃
14	H & OH, H & OAc, =O	OAc	OAc
15	OAc, OH	OH	OH
18		H, H ₂ ,	

Ac = CH₃CO, Me = CH₃, Et = CH₃CH₂, iBu = (CH₃)₂CHCO, Ph = C₆H₅, Cinn = PhCHCHCO, OBz = C₆H₅COO, OMebu = OCH₃CH₂CH(CH₃)CO, ONic = C₅H₄NCO₂, Pr = CH₃CH₂CH₂, iPr = CH(CH₃)₂, Ang = CH₃CHC(CH₃)CO

El compuesto puede ser del grupo que consiste de:

5, 8, 9, 10, 14-pentaacetoxi-3-benzoiloxi-15-hidroxipepluano (pepluano);

15-pentaacetoxi-9-nicotinoiloxi-14-oxojatrofa-6(1), 11E-dieno (jatrofano 1);

2,5,7,9,14-hexaacetoxi-3-benzoiloxi-15-hidroxi-jatrofa-6(17), 11E-dieno (jatrofano 2);

2,5,14-triacetoxi-3-benzoiloxi-8,15-dihidroxi-7-isobutiroiloxi-9-nicotinoiloxijatrofa-6(17), 11E- dieno (jatrofano 3);

2,5,9,14-tetraacetoxi-3-benzoiloxi-8,15-dihidroxi-7-isobutiroiloxijatrofa-6(17), 11E-dieno (jatro-fano 4);

ES 2 308 810 T3

2,5,7,14-tetraacetoxi-3-benzoiloxi-8,15-dihidroxi-9-nicotinoiloxijatrofa-6(17), 11E-dieno (jatro-fano 5);

2,5,7,9,14-pentaacetoxi-3-benzoiloxi-8,15-dihidroxi-6(17), 11E-dieno (jatrofano 6);

5 20-acetil-ingenol-3-angelato;

y sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10 El compuesto puede ser utilizado en una composición que comprende adicionalmente clorhidrato de la betaína β -alanina o t-4-hidroxi-N,N-dimetil prolina.

15 Los compuestos utilizados en la presente invención pueden ser aplicados a un método de tratamiento de un cáncer, que comprende la etapa de administrar una cantidad efectiva de un compuesto contra el cáncer utilizado en la invención a un mamífero que requiera de tal tratamiento.

20 Preferiblemente, el cáncer es un tumor sólido. Más preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de melanoma maligno, otros cánceres de piel incluido el carcinoma de célula de Merkel, el carcinoma de célula escamosa y el carcinoma de célula basal; cáncer de pulmón, cáncer de colón, cáncer de próstata, cáncer cervical y cáncer de seno.

25 Los compuestos utilizados en la presente invención pueden ser aplicados a un método de inhibición de la actividad proliferativa de células neoplásicas, que comprende la etapa de exposición de las células a una cantidad antiproliferativa de un compuesto utilizado en la invención. Las células se pueden tratar ya sea *ex vivo* o *in vivo*.

30 Los compuestos utilizados en la presente invención pueden ser aplicados a un método para prevenir o para aliviar el daño a la piel, causado por irradiación ultravioleta, radiación ionizante, radiación por microondas, exposición a ozono, o similares, que comprende la etapa de administrar en forma tópica una cantidad efectiva de un compuesto utilizado en la invención a un individuo que requiera de tal tratamiento. Esto se puede utilizar en el tratamiento de queratosis solar, daño de la piel causado durante una radioterapia, y similares.

35 Los compuestos utilizados en la presente invención se pueden aplicar a un método para estimulación de la proliferación de células no neoplásicas que comprende la etapa de exponer las células a una cantidad que induce la proliferación de un compuesto utilizado en la invención. Esto es útil en la inducción de la regeneración de tejidos y, ya que los linfocitos T proliferan en respuesta a la composición utilizada en la invención, es útil en promover la respuesta inmune a estados de enfermedad.

40 El mamífero puede ser un humano, o puede ser un animal doméstico o de compañía. Aunque está contemplado particularmente que los compuestos utilizados en la invención son adecuados para el uso en tratamiento médico de humanos, también es aplicable a tratamiento veterinario, incluido el tratamiento de animales de compañía tales como perros y gatos, y animales domésticos tales como caballos, vacas y ovejas, o animales de zoológico tales como félidos, cánidos, bóvidos y ungulados.

45 Los compuestos utilizados en la invención pueden ser administrados por medio de cualquier ruta adecuada, y la persona capacitada en el arte será capaz de determinar fácilmente la ruta más adecuada y la dosis para la condición que va a ser tratada. La dosis será a discreción del médico o veterinario que atiende el caso, y dependerá de la naturaleza y el estado de la condición que va a ser tratada, la edad y el estado general de salud del individuo que va a ser tratado, de la ruta de administración, y de cualquier tratamiento previo que pueda haber sido administrado.

50 El portador o diluyente, y otros excipientes, dependerán de la ruta de administración, y nuevamente la persona capacitada en el arte será capaz de determinar fácilmente la formulación más adecuada para cada caso particular. Está contemplado que los compuestos utilizados en la invención puedan ser administrados en forma oral, tópica, y/o por medio de inyección parenteral, incluida la inyección intravenosa.

55 Los métodos y excipientes farmacéuticos para la preparación de composiciones farmacéuticas son bien conocidos en el arte, como se expone en los libros de texto tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ava Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, EUA.

60 Para los propósitos de esta descripción, se entenderá claramente que las palabras "que comprende" significan "que incluye pero que no se limita a", y que la palabra "comprende" tiene un significado correspondiente.

Breve descripción de las figuras

65 La Figura 1 muestra el efecto de la savia de *E. pepplus* sobre la activación del gen de la metalotioneína, medido por medio de la detección de la actividad de la β -galactosidasa utilizando un sustrato cromogénico.

La Figura 2 muestra la proliferación de células cancerosas de seno MCF7 cultivados en pozos de microtitulación en presencia de savia de *E. pepplus* durante 7 días (expresada como un porcentaje de los valores de control).

ES 2 308 810 T3

La Figura 3 muestra el perfil de absorbancia a 195 nm, después de subfraccionamiento por medio de RP-HPLC de un extracto soluble en etanol de savia de *E. peplus*.

La Figura 4 muestra los resultados de cromatografía repetida por RP-HPLC de la fracción 14 de la Figura 3.

La Figura 5 muestra el espectro constante del arreglo de diodos del pico de la Figura 4.

La Figura 6 muestra los resultados del tratamiento de células de melanoma MM96L con la Fracción 15 del Ejemplo 7. Las células se colorearon con anticuerpo TRP-1, dirigido contra el citoesqueleto A, B: 4 días, C, D: 21 días.

La Figura 7 muestra los resultados de la cromatografía en capa delgada de la fracción soluble en éter del Ejemplo 6 utilizando cloroformo: acetato de etilo (82:18) como el solvente de revelado.

La Figura 8 muestra los resultados de la purificación adicional por medio de TLC bidimensional sobre gel de sílice, utilizando hexano: acetato de etilo (1:1) en la primera dimensión, y tolueno: acetona (9:1) en la segunda dimensión.

A: Se visualizaron las manchas 34-45 sobre una caja de luz UV. Las actividades fueron marcadas hacia MM96L en una dilución de 1 en 500 (+++ = sin efecto, - = muerte celular completa, d = 100% de reversión de las células hasta una apariencia dendrítica.

B: Se visualizaron las manchas 14-20 sobre una caja de luz UV. Las actividades fueron marcadas hacia MM96L en una dilución de 1 en 500 (+++ = sin efecto, - = muerte celular completa, d = 100% de reversión de las células hasta una apariencia dendrítica.

C: Se visualizaron las manchas 21-27 sobre una caja de luz UV. Las actividades fueron marcadas hacia MM96L en una dilución de 1 en 500 (+++ = sin efecto, - = muerte celular completa, d = 100% de reversión de las células hasta una apariencia dendrítica.

La Figura 9 muestra los resultados de la cromatografía ascendente de la savia cruda sobre HPTLC utilizando un sistema solvente de tolueno: acetona (9:1). Se visualizaron las bandas opacas 1-7 sobre una caja de luz UV.

La Figura 10 muestra los resultados de la cromatografía ascendente de la fracción 1 de la Figura 9 sobre HPTLC utilizando un sistema solvente de hexano: acetato de etilo (4:1). Se visualizaron las bandas A-G sobre una caja de luz UV. (La tira lateral coloreada con yodo al 0,1% en cloroformo reveló una Fracción G inactiva contra MM96L).

La Figura 11 muestra los resultados de la cromatografía ascendente de la fracción 1 de la Figura 9 sobre HP-TLC utilizando un sistema solvente de hexano: acetato de etilo (4:1). Se visualizó la banda H sobre una caja de luz UV.

La Figura 12 muestra los resultados de la cromatografía ascendente de la fracción soluble en dietil éter preparada a partir de la savia cruda sobre cromatografía preparativa en capa delgada (PLC, Merck) utilizando un sistema solvente de hexano: acetato de etilo (4:1). Se visualizaron las zonas H y A-F sobre una caja de luz UV, se extrajo, y se utilizó para estudios *in vivo*.

La Figura 13 muestra los resultados del tratamiento de xenoinjertos subcutáneos de melanoma humano MM96L en ratones desnudos con una fracción parcialmente purificada preparada como se describió en el Ejemplo 11. Las flechas denotan la posición de los tratamientos tópicos para un tumor (costado derecho) y para piel normal (parte superior de espalda). No hubo evidencia de crecimiento de tumor residual o de daño duradero a la piel normal 32 días después de comenzado el régimen del tratamiento, y 20 días después de la primera aplicación tópica.

Descripción detallada de la invención

Se describirá la invención en detalle con referencia únicamente a los siguientes ejemplos no limitantes y a las figuras.

Ejemplo 1

Actividad Inhibitoria de la Savia de *Euphorbia* Contra Líneas de Células Tumoraes

Se analizó la habilidad de la savia de tres especies de *Euphorbia*, *Euphorbia peplus*, *Euphorbia hirta* y *Euphorbia drummondii* para inhibir el crecimiento de tres líneas de diferentes de células tumorales humanas. Se analizó la actividad contra fibroblastos de piel normal como control.

Se mantuvieron las líneas celulares en medio RPMI que contenía suero fetal de ternera (FCS) al 5%, y se llevaron a cabo ensayos en el mismo medio.

ES 2 308 810 T3

Se recolectó la savia de plantas que crecen en forma aleatoria sobre suelo cultivado en una granja en Palmwoods, en el área remota de la Sunshine Coast, South-East Queensland. Se lavó en forma rápida la superficie del tallo de la planta con etanol al 70%, y se utilizaron tijeras lavadas en etanol para cortar el tallo y liberar la savia lechosa de látex. Se recogió la savia en tubos plásticos estériles para centrifuga de 10 ml, transportados a 4°C hasta Brisbane y se almacenaron congelados a -20°C. Antes de utilizarla, la savia fue diluida en forma serial 5 veces hasta 1 en 3125 en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml utilizando agua estéril MilliQ. Se añadieron alícuotas de 10 μ l de cada dilución a cada dos pozos de la placa de microtitulación que contenían 100 μ l de las líneas celulares. Los análisis se realizaron por duplicado.

Después de 5 días, se examinaron a ciegas las células, por la inhibición del crecimiento comparada con las muestras de las células de control no tratadas. Los resultados están resumidos en las Tablas 3 a 6, en las cuales las líneas celulares fueron

- NFF fibroblastos de piel normal.
- MM96L melanoma maligno, metástasis en el cerebro.
- HeLa cáncer cervical.
- HACat queratinocitos humanos transformados en forma espontánea.

y la escala es 0 = sin efecto hasta 5 = muerte celular completa.

La dilución en el encabezado de la tabla se refiere a la dilución de la muestra antes de la adición al cultivo. De este modo, la dilución en el cultivo final es aproximadamente 10 veces superior.

TABLA 3

Fibroblastos normales MFF										
Muestra	Dilución									
	Muestra 1					Muestra 2				
	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
<i>E. pepylus</i>	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. hirta</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. drummondii</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sin adición	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLA 4

Melanoma Maligno MM96L										
Muestra	Dilución									
	Muestra 1					Muestra 2				
	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
<i>E. pepylus</i>	5	4	4	0	0	5	3	1	0	0
<i>E. hirta</i>	5	4	1	0	0	4	1	0	0	0
<i>E. drummondii</i>	5	2	1	0	0	5	2	0	0	0
Sin adición	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 308 810 T3

TABLA 5

Células Hela					
Muestra	Dilución				
	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
<i>E. peplus</i>	5	3,5	3	1	1
<i>E. hirta</i>	5	5	5	5	0
<i>F. drummondii</i>	5	0	0	0	0
Sin adición	0	0	0	0	0

TABLA 6

Queratinocitos HACat					
Muestra	Disolución				
	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
<i>E. peplus</i>	4	0	0	0	0
<i>E. hirta</i>	5	0	0	0	0
<i>E. drummondii</i>	5	0	0	0	0
Sin adición	0	0	0	0	0

A partir de estos resultados se puede observar que:

- E. peplus* fue activa contra células HeLa, y en menor medida contra células MM96L.
- E. hirta* fue activa contra células MM96L y con una actividad muy fuerte contra células HeLa.
- E. drummondii* tuvo un efecto menor contra MM96L que las otras dos muestras, e inhibió únicamente a las células HeLa en la concentración más alta analizada.
- Los fibroblastos normales NFF fueron severamente afectados con la dilución 1/5, pero únicamente afectados en forma suave con las otras diluciones. Por ejemplo, con una dilución 1/25, hubo una inhibición suave de las células NFF (evaluación 2), pero inhibición severa de las células MM96L (evaluación 4). Con una dilución de 1/125, no se observó efecto contra las células NFF (evaluación 0), pero se observó inhibición severa de las células MM96L (evaluación 4) para una muestra, e inhibición más suave (evaluación 1) con el duplicado de la muestra. Las células HACat, que podían ser consideradas como representativas de queratinocitos normales, fueron inhibidas únicamente a la concentración más alta.

A concentraciones altas de savia de *E. peplus*, parece que hubo muerte directa de las células MM96L. Sin embargo, en concentraciones menores (por debajo de una dilución de 1/625), aunque no se observó inhibición en el crecimiento, las células sobrevivientes fueron dendríticas, y tenían la apariencia de melanocitos normales. Sin desear estar limitado por ninguno de los mecanismos propuestos, parece que la savia de *E. peplus* puede contener al menos un agente que promueve la diferenciación, en vez de los agentes directamente citotóxicos que dañan el ADN.

Ejemplo 2

Efecto del Calor o del Tratamiento con Acetona sobre la Actividad de la Savia de Euphorbia

El experimento descrito en el Ejemplo 1 fue repetido para *E. peplus* y para *E. hirta* en una persona diferente, utilizando preparaciones de diferentes líneas celulares, diferentes muestras de plantas y una escala de evaluación diferente.

ES 2 308 810 T3

Las muestras fueron o bien preparadas como se describe en el Ejemplo 1, o fueron sometidas a tratamiento con calor o acetona. Los extractos no diluidos de la savia de la planta fueron calentados a 95°C durante 15 minutos. Para el tratamiento con acetona, se suspendieron 40 µl del extracto en 400 µl de acetona, y se agitó el tubo en un mezclador de vórtice. Se centrifugaron los contenidos a 10.000 g durante 3 minutos y se removió el sobrenadante (fracción soluble en acetona) hasta un tubo separado. Tanto el precipitado como el sobrenadante fueron dejados en tubos abiertos a temperatura ambiente en la cámara extractora durante la noche con el ventilador operando a toda capacidad para evaporar la acetona residual.

Los resultados se muestran en las Tablas 7 a 9, en las cuales +++ indican sin efecto, y - indica 100% de muerte celular. "C" indica que el cultivo estaba contaminado. Utilizando esta escala de evaluación, los resultados fueron aún más notables que en el Ejemplo 1, observándose una fuerte actividad inhibitoria hasta una dilución de 1:3125. Sin embargo, se observó alguna inhibición en el crecimiento de células NFF en este experimento.

Ni el calor ni la acetona afectaron significativamente la actividad antitumoral. Con el tratamiento con acetona, la mayor parte de la actividad se encontró en el precipitado, particularmente en el caso de *E. hirta*, aunque también estaba presente alguna actividad en la fracción soluble. Esto sugiere que los compuestos responsables no son de naturaleza proteica, y que al menos un componente puede ser un lípido.

TABLA 7

Muestra	Dilución									
	Muestra 1					Muestra 2				
	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
<i>E. peplus</i>	-	-	±	±	±	-	-	±	+	+
<i>E. hirta</i>	-	++	++	+++	+++					
<i>E. hirta</i> caliente	±	+	+	+++	+++					
<i>E. peplus</i> soluble en acetona	±	+	+	+++	+++					
<i>E. hirta</i> soluble en acetona	±	++	+++	+++	+++					
<i>E. peplus</i> precipitado en acetona	-	+	+	+++	+++					
<i>E. hirta</i> precipitado en acetona	-	-/±	++	+++	+++	-	-	++	+++	+++
<i>E. peplus</i> caliente	-	+	+/+++	+/+++	+/+++	-	+	++	++	++

ES 2 308 810 T3

TABLA 8

Muestra	Dilución									
	Muestra 1					Muestra 2				
	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
<i>E. peplus</i>	-	+	c	+ / ++	++	-	c	+	++	++
<i>E. hirta</i>	-	+	+	+	++	-	+	++	++	++
<i>E. hirta</i> caliente	+	+	++	++	++					
<i>E. peplus</i> soluble en acetona	±	++	++	++	++					
<i>E. hirta</i> soluble en acetona	+	++	++	++	++					
<i>E. peplus</i> precipitado en acetona	±	+	+	++	++					
<i>E. hirta</i> precipitado en acetona	-	±	+	++	+					
<i>E. peplus</i> caliente	-	+	++	+	++					

TABLA 9

Células HeLa					
Muestra	1/5	1/25	1/125	1/625	1/3125
<i>E. peplus</i>	±	+	+++	+++	+++
<i>E. hirta</i>	-	+++	+++	+++	+++
<i>E. hirta</i> caliente	+	++	+++	+++	+++
<i>E. peplus</i> soluble en acetona	+++	+++	+++	+++	+++
<i>E. hirta</i> soluble en acetona	+++	+++	+++	+++	+++
<i>E. peplus</i> precipitado en acetona	++	++	+++	+++	+++
<i>E. hirta</i> precipitado en acetona	±	+++	+++	+++	+++
<i>E. peplus</i> calcaliente	-	+++	+++	+++	+++

Ejemplo 3

Análisis Adicionales Utilizando *E. peplus*

Ya que *E. peplus* es la más abundante de las tres plantas analizadas en estos estudios, los experimentos adicionales utilizaron extractos de esta especie. Esto no quiere decir que la actividad no este presente en las otras dos especies.

Se repitió el Ejemplo 2, utilizando células humanas de melanoma maligno MM229 y MM220 y líneas celulares de melanoma maligno de ratón B16, además de las células NFF y MM96L. Los ensayos fueron realizados por duplicado, utilizando la adición de una cantidad equivalente de agua como control, y diluciones de las fracciones de precipitado y sobrenadante después de tratamiento con acetona desde 1/20 hasta 1/12.500. Los resultados están resumidos en la Tabla 10.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 10

Muestra	DILUCIÓN										
	Control H ₂ O	1/20	1/100	1/500	1/2.500	1/12.500	1/20	1/100	1/500	1/2.500	1/12.500
Muestra											
Precipitado de NFF	+++	+	+++	+++	+++	+++	+/++	+++	+++	+++	+++
Sobrenadante de NFF	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
Precipitado de MM96L	+++	-	+	+/++	+++	+++	.	+++	+++	+++	+++
Sobrenadante de MM96L	+++	±	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
Precipitado de HeLa	+++	-	+	+/+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
Sobrenadante de HeLa	+++	-	±	++	++	++	-	++	++	++	++
Precipitado de MM229	++	-	+	+	++	++	-	+	++	++	++
Sobrenadante de MM229	++	-	+	+/++	+	++	++	+	+	+	+
Precipitado de MM220	++	-	++	++	++	-	+	++	++	++	++
Sobrenadante de MM220	++	-	+	+	++	++	-	++	++	++	++
Precipitado de B16	++	-	-	++	++	-	-	++	++	++	++
Sobrenadante de B16	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

ES 2 308 810 T3

Los resultados confirman aquellos obtenidos en el Ejemplo 2. Con una dilución de 1/100 hasta 1/50 no existió el efecto sobre las células NFF, pero se observó una inhibición significativa de las células MM96L. Las células de melanoma que sobreviven a estas diluciones tenían la apariencia de melanocitos normales. También se observó inhibición de las otras dos líneas celulares de melanoma humano y de la línea celular de melanoma de ratón.

Se obtuvieron resultados similares utilizando células de carcinoma de célula de Merkel (MCC 16) o de carcinoma de célula escamosa (Colo 6). Los resultados se muestran en la Tabla 11.

La morfología de las células dendríticas estaba representada por el carcinoma de célula escamosa, aún con una dilución de 1 en 500.000. Esta potencia extrema del extracto crudo fue también evidente para la inhibición de célula de Merkel, que fue también evidente aún con una dilución de 1 en 500.000.

TABLA 11

Efecto de la savia cruda de <i>E. peplus</i> sobre el carcinoma de célula de Merkel (MCC16) y el número de células de carcinoma de célula escamosa (Colo 16)						
Línea celular	Muestra	1/50	1/500	1/5.000	1/50.000	1/500.000
Colo 16	Solvente (control)	+++	+++	+++	+++	+++
	Savia cruda de <i>E. peplus</i>	-	++d*	+++d*	+++d*	+++d*
MCC16	Solvente (control)	+++	+++	+++	+++	+++
	Savia cruda de <i>E. peplus</i>	-	±*	+	+	++

Escala: +++ = sin efecto,
 - = muerte celular completa
 *d = indica cambio de morfología dendrítica de las células;
 La dendricidad no registrada para evaluaciones de MCC16

Ejemplo 4

Extracto en Etanol de E. peplus

Se sometió una preparación fresca de savia de *E. peplus* a extracción con etanol acuoso al 95%. Se removió el etanol de la fracción soluble después de extracción por medio de centrifugación al vacío, y se reconstituyó la fracción a su volumen original en medio de cultivo de tejido (RPMI1640) que contenía suero fetal de ternera al 5% y antibióticos. El precipitado que permaneció después de la extracción con etanol fue secado por medio de centrifugación al vacío y reconstituido hasta su volumen original en medio de cultivo de tejido como se describió anteriormente. La savia cruda (C), la fracción soluble (S) y el precipitado (P) fueron analizados como se describió anteriormente contra células NFF, las líneas celulares de melanoma MM96L, MM537, MM229 y MM2058, y también contra la línea celular de cáncer de colon LIM1215 y la línea celular de cáncer de pulmón A549. Los ensayos fueron realizados por triplicado, y fueron evaluados después de cuatro días de cultivo después de la adición de la muestra. Los resultados se muestran en la Tabla 12, en la cual + indica apariencia normal de las células, ++ indica un posible incremento en el número de células, y - indica muerte celular.

TABLA 12

Dilución	1/20			1/100			1/500			1/2.500		
	C	S	P	C	S	P	C	S	P	C	S	P
NFF	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MM 96L	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+
MM 537	-	-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
MM229	-	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+

ES 2 308 810 T3

TABLA 12 (continuación)

Dilución	1/20			1/100			1/500			1/2.500		
	C	S	P	C	S	P	C	S	P	C	S	P
Línea celular												
MM 2058	-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
HeLa	-	+/-		+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
LIM 1215	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	++
A 549	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+

Los resultados obtenidos fueron consistentes con aquellos de los experimentos anteriores. Nuevamente, con bajas dosis las células MM96L tuvieron una apariencia dendrítica. Todas las líneas celulares tumorales así como la línea celular NFF de fibroblastos normales fueron eliminadas por la savia cruda y por la fracción soluble obtenida por extracción en etanol con una dilución de 1/20. Pareció que la mayor parte de la actividad se repartió con la fracción soluble en etanol. La línea celular de cáncer de pulmón A459 pareció ser particularmente susceptible, siendo afectada con una dilución de hasta 1/2.500 tanto por la savia cruda como por la fracción soluble.

Ejemplo 5

Ensayo del Reportero para la Expresión Génica en la Línea Celular de Melanoma Maligno Transfectada MM96L

Se añadió savia de *E. peplus* en diluyente salino amortiguado con fosfato a pozos que contenían células MM96L o la línea celular de cáncer de seno MCF7 transfectada con una construcción que consiste del promotor de metalotioneína de oveja, secuencia arriba de un gen reportero de β -galactosidasa que había sido sustituido por el gen de la metalotioneína. El ensayo se convirtió por lo tanto en una medida de la expresión génica y en particular, de transcripción potencial, traducción y expresión del gen de metalotioneína. Las células fueron tratadas con extracto en placas de microtitulación durante 20 horas, se añadió ZnSO_4 100 μM y se incubaron las placas durante 5 h adicionales, y se removió el medio. Se midió entonces de la β -galactosidasa por medio de incubación de las células durante 1-2 h a 37°C con un sustrato cromogénico. Este ensayo es utilizado como un análisis sensible para activación transcripcional de genes.

Los resultados se muestran en la Figura 1.

Esto muestra que existió una marcada estimulación de la activación del gen de metalotioneína, como se midió por medio de la expresión incrementada del gen reportero de la β -galactosidasa, que sorprendentemente se hizo más evidente en la medida en que la muestra se diluyó adicionalmente. El mecanismo por medio del cual la savia de *E. peplus* media este efecto no está entendido. Mientras que las drogas conocidas específicas para la inhibición de la actividad de la histona desacetilasa demuestran una expresión creciente del gen reportero con concentraciones crecientes de la droga, *E. peplus* exhibe una respuesta inversa a la dosis. Sin embargo, los resultados indican que este ensayo puede ser utilizado para monitorear la purificación del(los) agente(s) en savia de *E. peplus* o la planta por sí misma.

La proteína metalotioneína tiene actividad antioxidante, y está implicada en un papel protector contra los cánceres inducidos por metales pesados. La activación del promotor de metalotioneína ocurrió con concentraciones de savia de *E. peplus* muy bajas para matar directamente las células, excepto por la línea celular MCF7 de cáncer de seno extremadamente sensible (Figura 2). El cambio en la apariencia de las células de melanoma MM96L a la morfología dendrítica de melanocitos normales con estas diluciones posiblemente implica al gen de la metalotioneína en estos efectos.

Ejemplo 6

Subfraccionamiento del Extracto Soluble en Etanol

La fracción soluble obtenida por extracción con etanol al 95%, llevada a cabo como en el Ejemplo 4, fue sometida a cromatografía líquida de alto desempeño en fase reversa isocrática (RP-HPLC).

Se disolvieron 100 μl de extracto crudo en 1 ml de etanol al 95% y se agitó periódicamente a 4°C durante la noche. Se centrifugó el extracto a 10.000 x g durante 4 minutos, y se removió el sobrenadante y se secó por medio de centrifugación al vacío. Se reconstituyeron los sólidos en 100 μl de amortiguador de ejecución centrifugado en forma rápida, y se aplicó el material soluble a una columna Brownie Aquapore RP-300 (C8), 220 x 4 mm, con un guarda columna RP-300 de 30 x 4 mm.

ES 2 308 810 T3

El amortiguador de ejecución fue acetonitrilo: agua 50:50 (V/V), y la velocidad de flujo fue de 0,75 ml/min. Se recolectaron las fracciones en intervalos de 0,5 min, y se monitoreó el perfil de absorbancia a 195 nm. El perfil de absorbancia es mostrado en la Figura 3.

5 Se secaron las fracciones por medio de centrifugación al vacío, reconstituidas en 500 μ l de PBS, y analizadas contra células MM96L y en el ensayo de del reportero de metalotioneína como se describió anteriormente. Las fracciones 13 a 28 indujeron todas inversión completa de las células MM96L hasta una apariencia dendrítica, pero no se observó muerte celular. El efecto fue mucho más notable en el ensayo del reportero, en el cual se observó aún actividad con una dilución de 1/10.000 (esto es, con una concentración final en el cultivo de 1/100.000).

10 Además de los resultados anteriores, el inventor ha encontrado que después de la ultracentrifugación, la actividad contra células MM96L es encontrada tanto en el sobrenadante como en el precipitado, y que la actividad no puede ser removida pasando una muestra a través de una membrana que aísla un peso molecular. Además de las líneas celulares analizadas anteriormente, se inhibió la proliferación de células de la línea celular de cáncer de seno MCF7 por medio de la savia de *E. peplus* con una dilución final de hasta 1/100.000. El número de células fue evaluado utilizando como reactivo el ácido bicinoconíico (Pierce). Los resultados se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 7

20 *Fraccionamiento del Solvente*

Se efectuó el fraccionamiento adicional en un solvente del látex crudo de *E. peplus* por medio de una serie de solventes de polaridad creciente. Se añadieron 20 ml de éter dietílico a 1 ml de látex crudo en un tubo de centrífuga. Se agitó el tubo y se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos hasta partición de las capas. Se removió la capa superior de éter dietílico y se repitió el procedimiento dos veces. Se combinaron las fracciones de éter, se concentró hasta sequedad sobre un evaporador rotatorio y se reconstituyó en 1 ml de DME para un bioensayo. En forma similar, se extrajo el residuo con acetato de etilo, seguido por cloruro de metileno. El extracto inicial de éter obtuvo la mayoría de la actividad como se midió por medio de la disminución en el número de células de células de cáncer de seno MCF7 y la reversión hasta una apariencia dendrítica. Sin embargo, se demostró también la actividad a partir de las fracciones derivadas de las capas de acetato de etilo y cloruro de metileno. No se observó actividad en la fracción final soluble en agua (acuosa). Los resultados están resumidos en la Tabla 13.

TABLA 13

Línea celular*		1/50	1/500	1/5.000	1/50.000	1/500.000
NFF	fracción en dietil éter de látex	-	±	+	+	+
	crudo de <i>E. peplus</i> fracción en	-	±	+	+	+
	acetato de etilo fracción en	±	+	+	+	+
	cloruro de metileno fracción acuosa	+	±	+	+	+
		+	+	+	+	+
HT144	fracción en dietil éter de látex	-	-	+	+	+
	crudo de <i>E. peplus</i> fracción en	-	±	+	+	+
	acetato de etilo fracción en	±	+	+	++	++
	cloruro de metileno fracción acuosa	+	+	++	++	++
		+	++	++	++	++
MCF7	fracción en dietil éter de látex	-	-	±	±	±
	crudo de <i>E. peplus</i> fracción en	-	-	±	±	±
	acetato de etilo fracción en	-	±	±	±	±
	cloruro de metileno fracción acuosa	±	±	±	+	+
		+	+	+	+	+

* = NFF: fibroblastos normales, HT144: melanoma humano, MCF7: cáncer de seno humano

Se analizó la actividad del promotor CMV en células HeLa infectadas con una construcción de adenovirus deficiente en replicación, en la cual el gen Ela había sido remplazado por el promotor CMV que dirige a la β -galactosidasa. Los resultados, mostrados en la Tabla 14, están expresados como un porcentaje de los valores de control de las células infectadas no tratadas.

TABLA 14

Muestra	Dilución		
	1/50	1/500	1/5.000
látex crudo de <i>E. peplus</i>	170	175	400
fracción de dietil éter	240	250	345
fracción de acetato de etilo	630	550	360
fracción de cloruro de metileno	746	420	170
fracción acuosa	180	100	100
solvente de control*	100	aprox. 100	100
* Etilen glicol dimetil éter (DME)			

Los resultados obtenidos son cualitativamente similares a aquellos mostrados con otros agentes que inducen la diferenciación, tales como los inhibidores de la histona desacetilasa o butirato, aunque con actividad más potente que la observada con estos agentes. La menor actividad del promotor observada con el crudo y los extractos de dietil éter en concentraciones más altas probablemente refleja efectos de eliminación de células contra células HeLa observadas con aquellas concentraciones.

En un experimento adicional de fraccionamiento con solventes, se repartió la savia cruda entre metanol: agua (17:3) y n-hexano, una partición con solvente esperada con base en los reportes previos para separa diterpenos (fase polar) de los triterpenos (fase de heptano) (Evans y Kinghom, 1977). Inesperadamente, sin embargo, se detectó actividad en ambas fases, sugiriendo que los principios activos se comportan en forma anómala en este sistema.

Se sugirió otra aproximación de fraccionamiento con solvente por la necesidad de clarificar las muestras antes de análisis por HPLC. Se mezcló látex crudo con etanol hasta 70-95% y se agitó durante la noche a 4°C. Se centrifugó la muestra a 1.000 x g durante 10 min, y se removió el sobrenadante y se lo concentró hasta aproximadamente un tercio del volumen original de savia cruda. Al concentrado se le añadió acetonitrilo al 100% hasta 30-60%. Se removió el precipitado blanco resultante por medio de centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos. Se enriqueció el sobrenadante en diterpenos macrocíclicos (jatrofanos y peplano), como se determinó por medio de TLC y de espectroscopía de masas. Esta observación señala el camino para un proceso adecuado a gran escala para enriquecimiento de los principios activos.

Ejemplo 8

Subfraccionamiento adicional guiado por la actividad del extracto soluble en etanol

Las fracciones 14 y 15 del subfraccionamiento por HPLC descrito en el Ejemplo 7 y en la Figura 3 fueron purificadas adicionalmente por medio de cromatografía repetida, seleccionando el pico simétrico dominante con espectros constantes de arreglo de diodos (por ejemplo, fracciones 14 y 15; los resultados para la fracción 14 se muestran en las Figuras 4 y 5). La actividad de las fracciones purificadas para causar la reversión de MM96L hasta la apariencia dendrítica fue confirmada por medio de un ensayo celular.

Las características del cambio a células MM96L después de la adición de la Fracción 15 se muestran en la Figura 6. Las células fueron visualizadas como fotomicrografías, utilizando un procedimiento de acoplamiento de anticuerpo. El primer anticuerpo, uno monoclonal de ratón dirigido hacia la proteína 1 relacionada con tirosinasa (TRP-1), fue detectado con un segundo anticuerpo, conjugado de fosfatasa alcalina antiratón de oveja, utilizando bromo-cloro-indolil fosfato y nitroblu de tetrazolio (BCIP/NBT) como sustratos de revelado. Después de cuatro días de incubación (Figuras 6A y 6B) hubo una marcada reducción en el número de células de melanoma y un cambio pronunciado en su morfología. Las células se habían revertido hasta una apariencia larga y delgada (dendrítica), característica de melanocitos maduros normales. Todas las células en el campo parecen haber adoptado esta morfología alterada, que proporciona sorprendentemente la naturaleza heterogénea de la población de células MM96L. Después de 21 días de incubación, se observó que las células tratadas se alineaban en forma un tanto paralela entre sí en racimos, como se muestra en las Figuras 6C y 6D, una característica de melanocitos maduros normales. Se han observado características similares con todas las fracciones que inducen células dendríticas de *E. peplus*, incluyendo la savia cruda.

Los análisis de espectroscopía de masas por electrospray para las fracciones 14 y 15 indicaron la presencia de 2,5,7,14-tetraacetoxi-3-benzoiloxi-8,15-dihidroxi-9-nicotinoiloxijatrofa-6(17),11E-dieno (jatrofano 5, Jakupovic y colaboradores, 1998a) con un m/z de 780 (calculado 779,315). El análisis por resonancia magnética nuclear (RMN), utilizando RMN 1D, sobre la fracción 14 produjo señales de campo bajo entre 7 y 9,4 ppm que son consistentes con una fracción como la piridina, como está presente en el grupo nicotinoato en la posición 9 del anillo. También, se

evidenció un doble enlace trans por medio de la gran constante de acoplamiento en 5-6 ppm, de acuerdo con el doble enlace interno 11, 12 en la estructura dl anillo de jatrofano. También se identificó en la fracción 14 por medio de electrospray en el modo de ión negativo al 2,5,7,9,14-pentaacetoxi-3-benzoiloxi-8,15-dihidroxi-jatrofa-6(17),11E-dieno (jatrofano 6, Jakupovic y colaboradores, 1998a), con m/z 716 (calculado 716,304), 673 (M-ceteno), 656 (M-AcOH).

La fracción 15 contenía 2,3,5,7,15-pentaacetoxi-9-nicotinoiloxi-14-oxojatrofa-6(17),11E-dieno (jatrofano 1, Jakupovic y colaboradores, 1998a) con m/z 597 (M-ceteno-AcOH). De este modo, por medio de análisis espectroscópico, las fracciones de elución temprana en 7-7,5 minutos sobre HPLC con actividad asesina y dendrítica de células contenían una mezcla de jatrofanos 5, 6, y 1. Este resultado es consistente con el comportamiento de las fracciones 14 y 15 por HPLC cuando se las sometió a cromatografía sobre HPTLC, utilizando tolueno: acetona 9:1 como el solvente de revelado. Las manchas positivas por UV no se movieron del origen, R_f 0,0 (aprox.), en contraste con las fracciones de elución tardía (por ejemplo las fracciones 20-22, R_f 0,3-0,5). Esto indica el comportamiento relativamente polar de los jatrofanos 5, 6, y 1, en comparación con los jatrofanos 3, 2 y 4, como se demostró por medio de cromatografía sobre HPTLC, utilizando ya sea tolueno: acetona 9:1 o hexano: acetato de etilo 4:1 como solventes de revelado. Estos resultados son similares a aquellos obtenidos por Jakupovic y colaboradores, 1998a, utilizando petróleo: metil-tert-butil éter (1:1) como el solvente de revelado, por ejemplo: jatrofano 5: R_f 0,04, jatrofano 6: R_f 0,10 (3X), y jatrofano 1: R_f 0,11. No hubo evidencia en los datos espectroscópicos de masas de las fracciones tempranas por HPLC de la presencia de derivados de ingenano (ver más adelante), u otros componentes reportados a partir de la literatura y presentados en la Tabla 1, en extractos crudos de *E. peplus*.

Ejemplo 9

Purificación Guiada de la Actividad Biológica de Extractos Crudos y Solubles en Éter sobre Cromatografía de Capa Delgada (TLC) y Cromatografía en Capa Delgada de Alto Desempeño (HPTLC)

- (a) La fracción soluble en éter, preparada como en el Ejemplo 7, fue reconstituida en etilén glicol dimetil éter (DME) y sometida a cromatografía sobre placas de gel de sílice de 20 x 20 cm, utilizando cloroformo: acetato de etilo (82:18) como el solvente de revelado (Figura 7). La placa fue vista sobre una caja de luz UV y se identificaron las bandas positivas por UV, se las cortó del gel, se eluyó con DME, y se analizó la actividad inhibidora y la morfología inversa contra la línea celular de melanoma MM96L. Cortando en rodajas el gel entero en fracciones que absorben en el UV y las que no absorben en el UV, se demostró en experimentos preliminares que la actividad estaba asociada con las bandas que absorben en el UV. La coloración de las tiras laterales del gel con yodo al 0,1% en cloroformo reveló otras bandas positivas fuertemente yodadas. Sin embargo, se encontró que poseían actividad despreciable. Las bandas que absorben en el UV con un R_f 0,0 (A), R_f 0,16-0,18 (B1), R_f 0,22-0,24 (B2), R_f 0,73-0,80 (C), R_f 0,80-0,96 (D) fueron biológicamente activas, con una disminución observable en el número de células y la reversión completa hasta la apariencia de células dendríticas con una dilución de 1/5.000.

Se purificaron adicionalmente las zonas B1, C y D por medio de cromatografía sobre placas de gel de sílice 60, utilizando un sistema de solvente en dos dimensiones con hexano: acetato de etilo (1:1) en la primera dimensión y tolueno: acetona (9:1) en la segunda dimensión (Figuras 8A hasta 8C, respectivamente). Las manchas que absorben en el UV con actividad inhibitoria hacia MM96L superior al 30% del número de células y con reversión completa hasta apariencia de células dendríticas con una dilución de 1/500 están indicadas sobre las figuras. Las manchas 22 y 23 que absorben fuertemente en el UV derivadas de la zona D (ver Figura 8C), fueron cortadas del gel, eluidas con DME y secadas por centrifugación al vacío. El análisis espectroscópico de masas de las fracciones 22 y 23 reveló la presencia de 5,8,9,10,14-pentaacetoxi-3-benzoiloxi-15-hidroxipepluano, m/z 639,5 [M-AcOH]⁺, esto es pepluano.

- (b) Se sometió a cromatografía la savia cruda completa sobre placas de gel de sílice 60 para HPTLC de 10 x 10 cm con zonas de concentración (Merck Cat No. 013748.1000), utilizando tolueno: acetona (9:1) como el solvente de revelado, como se muestra en la Figura 9. Las zonas positivas para UV (1, R_f 0,14; 2, R_f 0,23; 3, R_f 0,49; 4, R_f 0,54; 5, R_f 0,57; 6, R_f 0,63; y 7, R_f 0,73) fueron cortadas del gel y eluidas con DME/dietil éter. Las fracciones fueron analizadas contra MM96L como se describió anteriormente, y se demostró que las fracciones 1, 3, 4, 5 y 6 poseían actividad inhibitoria celular y actividad de reversión celular. Estas fracciones fueron sometidas a cromatografía en forma separada sobre placas de HPTLC utilizando hexano: acetato de etilo (4:1) como el solvente de revelado, produciendo bandas positivas por UV A, R_f 0,17; B, R_f 0,24; C, R_f 0,42; D, R_f 0,48; E, R_f 0,52; F, R_f 0,58; G, R_f 0,62 (Figura 10) y H, R 0,02 (Figura 11). Todas las fracciones excepto G (positivas al yodo, ver Figura 10) fueron activas contra las células MM96L, en términos de inhibición del crecimiento celular y de la reversión hasta morfología dendrítica completa, con una dilución de 1 en 5000.

ES 2 308 810 T3

Los análisis espectroscópicos de masas de las fracciones A-F (estando B ausente) y H son mostrados en la Tabla 15, con una asignación tentativa de compuestos de los iones de masa molecular conocidos de los constituyentes publicados de *E. peplus*:

5

TABLA 15

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Análisis espectroscópico de masa de fracciones de HPTLC	
Fracción	m/z, Abundancia Relativa (%) y asignación tentativa
A	495,2357 (100) [C ₂₇ H ₃₆ O ₇ Na ⁺ (acetato de ingenol)], 433,3799 (51), 579,2916 (39) [pepluano -2AcOH] ⁺ , 679,2754 (16), 691,4046 (16)
B	N.D,
C	579,2846 (100) [pepluano -2AcOH] ⁺ , 691,4073 (50), 747,47 (8) [jatrofano 3 - AcOH] ⁺ 803,53 (11)
D	579,2827 (100) [pepluano -2AcOH] ⁺ , 691,4025 (23), 715,3686 (38) [jatrofano 2-ceteno] ⁺
E	437,2254 (100), 619,5287 (18), [jatrofano 4, 638 - ceteno ⁺ Na ⁺], 647,5615 (18) [jatrofano 4 - 2AcOH ⁺ Na ⁺]
F	591,4996 (55), 619,5299 (100) [jatrofano 4, 638 - ceteno ⁺ Na ⁺], 647,5635 (77) [jatrofano 4 - 2AcOH ⁺ Na ⁺], 691,4183 (49)
H	830,3216 (100) [jatrofano 3 + Na ⁺]
pepluano = 5,8,9,10,14-pentaacetoxi-3-benoiloxi-15-hidroypepluano jatrofano 2 = 2,5,7,9,14-hexaacetoxi-3-benzoyloxy-15-hidroxi-jatrofa-6(17), 11 <i>E</i> -dieno jatrofano 3 = 2,5,14-triacetoxi-3-benzoitoxi-8,15-dihidroxi-7-isobutiroiloxi-9-nicotinoiloxijatrofa-6(17), 11 <i>E</i> -dieno jatrofano 4 = 2,5,9,14-tetraacetoxi-3-benzoiloxi-8,15-dihidroxi-7-isobutiroxijatrofa-6(17), 11 <i>E</i> -dieno	

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 308 810 T3

De este modo, la espectroscopía de masas reveló una mezcla de 20-acetil-ingenol-3-angelato (fracción A), pepluano (fracciones A, C & D) y jatrofanos 2 (fracción D) 3 (fracciones C & H), y 4 (fracciones E & F). Los datos de desplazamiento químico del ^1H para la fracción H son mostrados en la Tabla 16.

TABLA 16

Datos del Desplazamiento Químico del $^1\text{H}^*$ para la Fracción H		
H	ppm	Multiplicidad
Señales Indicativas de la Columna Vertebral del Anillo de Jatrofano		
1 α	2,816	brd
1 β	2,056	d
3	5,918	d
4	3,731	brd
5	5,730	brd
7	5,390	d
8(OH)	2,948	d
9	4,971	s
11	6,145	d
12	5,640	dd
13	2,840	cm
14	5,110	s
15(OH)	3,645	s
16	1,489	s
17	4,438	d
17'	4,788	d
18	1,052	s
19	1,152	s
20	1,353	d
Señales del Éster Sustituyente		
Onic	9,290	brd
	8,340	ddd
	8,805	brdd
	7,390	brd
Onic	9,079	brd
	8,202	ddd
	8,767	brdd
	7,327	brd
OBz	8,040	AA'
	7,403	BB'
	7,541	C
OiBu	1,972	qq
	0,912	d
	0,449	d
	0,450	d
* Los desplazamientos químicos están medidos a 295K con relación al cloroformo a 7,24 ppm.		

ES 2 308 810 T3

Estas asignaciones indicaron la presencia de una estructura de anillo de jatrofano como la determinada a partir de los espectros bidimensionales DQF-COSY, NOESY y TOCSY. El espectro de la Fracción H fue consistente con la presencia de Jatrofano 3 en dos conformaciones diastereoméricas (consideradas las más probables), una mezcla de dos o más jatrofanos sustituidos en forma similar, o un nuevo jatrofano con dos nicotinas, un benzoato, y una fracción de isobutirato. La configuración probable del anillo fue II, como para Jakupovic y colaboradores (1998a), con un J_{4,5} de aproximadamente 6 Hz y un NOE's fuerte entre 5 y 8, y 4 y 7; con J_{7,8} y J_{8,9} prácticamente cero - como se evidenció por la carencia total de picos cruzados en el espectro DFQ COSY. No hubo señales consistentes con la presencia de alguna estructura de ingenol. La muestra fue recuperada del imán, y una alícuota demostró una potente actividad contra MM96L, evidenciada por la muerte celular completa con 20 µg/ml, y la reversión completa hasta una apariencia dendrítica de al menos de 20 pg/ml.

Ejemplo 10

15 *Análisis de RMN*

La Fracción A fue purificada adicionalmente por medio de cromatografía sobre HPTLC utilizando hexano: acetato de etilo (4:1) como el solvente de revelado. Como un adjunto a la absorbancia sobre una caja de luz de UV, se coloreó una tira lateral rociando el gel con ácido fosfórico al 70% en metanol, y desarrollando por medio de calentamiento de gel con un secador de pelo se reveló una intensa banda de color azul bajo luz UV, separable de la banda principal de absorción de UV. Se cortó la región no coloreada equivalente a esta banda, se eluyó con éter y se secó por medio de centrifugación al vacío. Se acumuló aproximadamente 1 mg de este material a partir de 4 ml de látex. Se sometió el material a análisis de RMN, y se bioanalizó posteriormente y se demostró que era activo en términos de la reversión hasta morfología dendrítica completa con una dilución de 1 en 5 x 10⁶, representando una concentración final de 1 ng/ml. Este material fue identificado por medio de RMN como C₂₇H₃₆O₇, 20-acetil-ingenol-3-angelato como se muestra en la Tabla 17. Este hallazgo es consistente con la evidencia espectroscópica de masas presentada en la Tabla 15.

TABLA 17

Datos de RMN obtenidos sobre la fracción bioactiva A2 para soportar la estructura química del 20-acetil-ingenol-3-angelato:						
RMN ¹ H			RMN ¹³ C			
H	ppm/multiplicidad		#	C	Hz	[PPM]
1	6,106		1	9	25933,898	206,2210
3	5,396	s	2	26	21513,854	171,0737
5	3,875	d	3	21	21165,912	168,3070
7	6,024	d	4	23	17626,074	140,1589
8	4,076		5	2	17086,838	135,8710
11	2,4783	m	6	6	17082,062	135,8330
12	2,222	ddd	7	1	16614,730	132,1169
12'	1,743	ddd	8	7	16301,014	129,6223
13	0,681	m	9	22	15976,620	127,0428
14	0,936	m	10	4	10668,691	84,8352
16	1,033	s	11	3	10395,504	82,6629
17	1,062	s	12	5	9411,686	74,8398
18	0,952	d	13	10	9059,148	72,0365
19	1,785	brs	14	20	8404,062	66,8274
20	4,745	d	15	8	5481,686	43,5892
20'	4,467	d	16	11	4841,115	38,4955
23	6,153	qq	17	12	3911,906	31,1067
24	1,906	brs	18	?	3735,577	29,7045

ES 2 308 810 T3

TABLA 17 (continuación)

Datos de RMN obtenidos sobre la fracción bioactiva A2 para soportar la estructura química del 20-acetil-ingenol-3-angelato:						
RMN ¹ H			RMN ¹³ C			
H	ppm/multiplicidad	#	C	Hz	[PPM]	
25	1,996	brdd	19	16	3585,756	28,5132
27	2,042		20	15	3018,427	24,0019
40H	3,4308		21	13	2924,308	23,2535
50H	3,514	d	22	14	2892,863	23,0035
			23	27	2655,734	31,1179
			24	24	2612,189	20,7716
			25	18	2171,913	17,2706
			26	25	2007,760	15,9653
			27	19	1698,690	15,6546
			28	17	1951,372	15,5169

5 Sin embargo, la ausencia de 20-acetil-ingenol-3-angelato del espectro de masas de las purificaciones guiadas de la actividad por medio de HPLC, y en otras fracciones por TLC a parte de la fracción A, indica que esta no es la única fracción activa. Antes bien, los jatrofanos 1-6 y el pepluano están también implicados por deducción de los datos espectroscópicos de masa y de RMN. Esto es particularmente cierto de fracciones H como las preparadas por medio de TLC (jatrofano 3 Na⁺ m/z 380; ver también los resultados de RMN 1D en la Tabla 16) y las fracciones 13 y 14 como las preparadas por medio de HPLC (jatrofano 5, m/z 779 y RMN 1D; jatrofano 6, m/z 716; jatrofano 1 o derivado de jatrofano 6, m/z 597).

25 Jakupovic y colaboradores (1998a) han propuesto que la clase de compuestos paraliano son intermedios en la ruta entre los jatrofanos y el pepluano. Ya que se ha demostrado en esta invención que la actividad de las células anticancerosas y de las células dendríticas se invierte tanto por jatrofanos como por pepluano, parece razonable concluir que los paralianos también exhibirán estas propiedades.

Ejemplo 11

40 *Preparación de Material para los Experimentos con Ratonos por medio de Cromatografía Preparativa en Capa Delgada*

Se extrajeron 15 ml de savia cruda en etanol al 70% con éter dietílico como se describe en el Ejemplo 6. Se concentró el extracto por medio de centrifugación al vacío y se resuspendió en aproximadamente 5 ml de DME. El extracto en DME fue sometido a cromatografía sobre placas preparativas de TLC (Merck PLC, Gel de Sílice 60, Cat. No. 005745.1000) utilizando hexano: acetato de etilo (4:1) como el solvente de revelado. Las zonas correspondientes a las regiones "H" y "A-F" como se muestra en la Figura 12 fueron cortadas y combinadas, eluidas con éter/DME, y secadas por medio de centrifugación al vacío. Se enriqueció el extracto en jatrofanos 2, 3 y 4, pepluano, y el acetato de ingenano. Se suspendió el precipitado en etanol al 95% y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos. Se distribuyó el sobrenadante (6,0 ml, 10 mg/ml) en alícuotas de 0,2 ml y se almacenó a -20°C. Se analizó este extracto contra la línea celular de melanoma MM96L, y mostró alta potencia, con morfología de células dendríticas aún evidente con una dilución de 1 en 5 x 10⁶; esto replicó la potencia de la savia cruda. El extracto así preparado se enriqueció en jatrofanos 2, 3 y 4, pepluano, y el acetato de ingenano. Justo antes de la inyección, se diluyeron 20 µl hasta 1 ml con medio de cultivo para tejidos RPMI 1640 que contenía suero fetal de ternera al 5% para inyección de 0,1-0,2 ml. Se absorbió la solución de etanol (10 mg/ml) sobre un copo de algodón (0,2-0,4 ml) y se utilizó para aplicación tópica en ratones.

55 Ejemplo 12

Inhibición del Crecimiento de Implantes Subcutáneos de Células Tumorales

60 (a) Se inyectaron 5 ratones desnudos de 4 semanas de edad en forma subcutánea en 4 sitios diferentes con 0,1 ml de medio de cultivo para tejidos que contenía 2 x 10⁶ células de melanoma humano MM96L. Los tres ratones tratados fueron inyectados los días 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8 con 0,1 ml de medio RPMI que contenía suero fetal de ternera al 5% y 20 µg de extracto en etanol. Además, los ratones tratados recibieron hasta cuatro aplicaciones tópicas de aproximadamente 5-10 µl de 10 mg/ml de extracto en etanol o de savia cruda no diluida. Dos sitios separados en cada ratón tratado recibieron tratamiento tópico ya sea con extracto en etanol o con savia cruda. Un ratón recibió tratamiento tópico los días 12, 13 y 14, y los otros dos ratones tratados recibieron tratamiento tópico los días 15, 19, 20 y 22. Se midió el volumen del tumor el día 32.

ES 2 308 810 T3

Antes de las aplicaciones tópicas, la inyección de extracto no tuvo efecto aparente sobre el volumen del tumor. Después de la aplicación tópica del extracto en etanol hubo durante la noche un cambio en la apariencia del tumor. Los tumores se tornaron de color grisáceo oscuro, luego desarrollaron una apariencia grumosa negra seguido por la formación de costra. Los tumores tratados con savia cruda mostraron cambios similares un día después. Con el tiempo, los efectos totales del extracto de etanol y de la savia cruda fueron similares, ya que las mediciones para las lesiones tópicamente tratadas habían sido combinadas. En los ratones que recibieron inyección más tratamiento tópico, el volumen del tumor se redujo en un 76% ($p < 0,2$). Un tumor que había sido tratado con el extracto en etanol había desaparecido completamente, como se muestra en la Figura 13, y otros ocho se redujeron hasta costras lisas negras. Los otros tres tumores tratados inicialmente mostraron cambios similares de color y regresión tumoral, pero habían crecido nuevamente después de cesar el tratamiento tópico 10 días antes de tomar las mediciones.

- (b) Se inyectaron seis ratones C57 Black (C57B1) de 4 semanas de edad con 0,1 ml de medio de cultivo para tejidos que contenía 10^5 células cancerosas de melanoma B16 en dos sitios sobre el bajo vientre. Se permitió el desarrollo de los tumores durante 4 días, y luego se los sometió a un régimen de tres inyecciones (20 μ g de extracto en etanol en 0,1 ml de medio RPMI que contenía suero fetal de ternera al 5%) (días 1, 2 y 4) y un tratamiento tópico (5-10 μ l de 10 mg/ml de extracto en etanol el día 4). Ocho días después de la primera inyección, se midieron las áreas de los tumores utilizando una regla. El tratamiento redujo el tamaño de los tumores de melanoma B16 en un 64% ($p < 0,05$) sobre los tres ratones tratados por comparación con el tamaño de los tumores sobre los tres ratones de control.

Los resultados están resumidos en la Tabla 18.

TABLA 18

Inhibición del Crecimiento del Tumor <i>In vivo</i> por medio de Extractos de <i>E. peplus</i>					
Modelo	Régimen de tratamiento	No. de tumores	Tamaño del tumor*		% de inhibición
			control	tratado	
Línea celular de melanoma humano MM96L, sobre ratones desnudos	(a)	12	$89,8 \pm 37$	$21,5 \pm 3,6$	76 ($p < 0,20$)
Melanoma de ratón B16 sobre ratones C57B1 Black	(b)	6	$58,5 \pm 9,5$	$21,2 \pm 10,6$	64 ($p < 0,05$)
* (a) volumen, mm^3 , (b) área, mm^2 .					

Ejemplo 13

Cambios en la Expresión Génica Inducidos en una Línea Celular de Melanoma Humano (MM96L) por medio de un Extracto Purificado

Las células de melanoma humano de la línea celular MM96L, cultivadas en placas de 150 cm^2 en medio RPMI 1640 que contenía suero fetal de ternera al 10%, fueron incubadas con extracto purificado durante 4 horas a 37°C en 5% de CO_2 /aire. Se lavaron las células con solución salina amortiguada con fosfato (PBS), raspadas en PBS, precipitadas, resuspendidas en 1 ml de PBS, precipitadas y recogidas en 300 μ l de amortiguador de lisis NP-40, dejadas sobre hielo durante 15 minutos, precipitadas y tratado el sobrenadante con proteinasa K y SDS a 37°C durante 15 minutos, extraídas con cloroformo y fenol y precipitado el ARN total por medio de acetato de amonio/etanol a -20°C durante la noche. Se utilizó el kit de aislamiento de ARNm de Promega para aislar el ARNm, que fue luego transcrito en forma inversa en presencia de dCTP marcado con ^{33}P para generar ADNc. Este fue hidrolizado sobre un Genome Systems Human Gene Discovery Array 1.2 (GDA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El arreglo fue cuantificado con un Molecular Dynamics Phosphoimager, y analizado con ImageQuant y software Excel.

Se calculó la proporción de volúmenes de manchas por duplicado de las células tratadas y no tratadas, y se la utilizó para definir el nivel de activación génica (proporción > 1) o de inhibición (< 1). Los antecedentes fueron recuentos típicamente de 500-1000, pero no fueron restados; de este modo, las proporciones establecidas tenderán a ser desestimados de los cambios reales.

El arreglo contenido en las manchas de ADNc por encima de 18.000 secuencias únicas, llamadas etiquetas de secuencia expresada (EST), de las cuales aproximadamente 3.000 fueron de genes expresados identificables de células humanas. Se favoreció o se redujo la expresión de muchas secuencias de EST en las células de melanoma humano analizadas por el tratamiento del extracto. Únicamente los cambios basados en los duplicados que tenían desviaciones estándar $< 30\%$ de la proporción fueron considerados por ser biológicamente significativos en esta etapa. Se debe

ES 2 308 810 T3

observar también que se utilizó un período de tratamiento relativamente corto de 4 horas con el propósito de identificar los objetivos más tempranos y críticos para el agente. Es probablemente que cambios mayores adicionales en la expresión génica, que dependen de la respuesta primaria ocurrirán después de este período.

5 Los resultados de los cambios en el nivel de las transcripciones de algunos genes conocidos relevantes, que se considera que son beneficiosos ya sea directa o indirectamente para el control de las células cancerosas, están resumidos en la Tabla 19.

10 Se puede esperar que los cambios en la morfología celular observados en los Ejemplos resulten de una reducción mayor en la expresión de una cantidad de proteínas que se enlazan a actina, una proteína principal del citoesqueleto. Un incremento en la proteína de enlazamiento de retinol puede también estar involucrado aquí, así como en la inducción del fenotipo diferenciado a través del incremento del nivel intracelular de retinoides.

15 La reparación de los daños actuales y futuros del ADN inducida por irradiación de UV solar puede ser reforzada por medio de la inducción observada de las proteínas de reparación XP. Además, la disminución en GADD45 y de la proteína de resistencia a la radiación ionizante (DAP3) puede ser útil en sensibilizar al tejido tumoral a la radioterapia. El último cambio es también notable debido a que esta fuertemente favorecida la expresión en células MM96L por la UVB, la causa del cáncer de piel y del melanoma.

20 Se indujeron una cantidad de moléculas relevantes para reforzar la respuesta inmune, particularmente de G-CSF. Algunas de éstas, tal como proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), se considera que son atributos útiles para inmunoterapia, reforzando la actividad asesina de las células T.

25 Los cambios más significativos para el control del crecimiento de las células se relacionan con las alteraciones detectadas de la proteína G y las rutas PKC, y el reforzamiento de la actividad del proteosoma. El señalamiento intracelular es crítico para muchos procesos celulares, incluida la proliferación y las alteraciones en el equilibrio normal de las rutas e interacciones de las rutas, tales como aquellas mediadas por la señalización de Ras, probablemente tienen consecuencias adversas para la célula. El nivel de inducción del componente del proteosoma LAMP7-E1 estuvo entre los más altos encontrados para cualquier gen en el experimento, y se esperaba que alterara grandemente el procesamiento de muchas proteínas a través de la ruta de la ubiquitina.

Con base en los datos del ordenamiento de la expresión génica, se espera que los compuestos utilizados en esta invención tengan actividad:

- 35 1. En la modulación de la expresión génica en la proteína G, en las rutas de señalización PKC y Ras, en una forma que conduce a la actividad anticancerosa *in vivo*.
- 40 2. En el mejoramiento del daño de la UV solar y agentes similares, reforzando la reparación del ADN y la respuesta inmune, ya sea en las células efectoras u objetivo.
- 45 3. Como un adyuvante para radioterapia o para terapia con otros agentes que dañan el ADN, con base en la reducción de la expresión de las proteínas protectoras (GADD45 y DAP3).

TABLA 19

Función	Gen	EGAD No.	Regulación por el Extracto	Referencia
Respuesta inmune	Proteínas clase 1 de la sialiltransferasa del MHC	HT4978	2,16	Li y colaboradores, 1998
	Receptor G-CSF	HT3059	2,64	
		HT2680	1,39	
		HT4313	11,68	
Regulación del crecimiento celular	80H-K Factor 9 de crecimiento de fibroblastos	HT1772	2,11	Kanai y colaboradores, 1997
		HT2447	0,59	
Diferenciación	Proteína 1 de enlazamiento de retinol celular	HT2520	2,69	Perozzi y colaboradores, 1998

ES 2 308 810 T3

TABLA 19 (continuación)

Función	Gen	EGAD No.	Regulación por el Extracto	Referencia
Rutas de la proteína G	Beta polipéptido 3 Proteína de enlazamiento de G Proteína G pequeña TTF	HT484 HT3752 HT5016	2,27 0,35 0,47	
Rutas PKC	Fosfolipasa D PKC zeta	HT2473 HT21136	4,04 0,67	Bosch y colaboradores, 1998
Genes supresores tumorales	Proteína relacionada con el tumor de Wilm	HT3751	1,99	
Daño del ADN y proteínas de reparación	C p58 del grupo XP Hsp 27/28 C HHR2 del grupo XP GADD45 Proteína de resistencia a la radiación ionizante (DAP3)	HT4209 HT2997 HT4247 HT3135 HT5168	2,36 2,36 2,09 0,63 0,46	
Proteólisis	LAMP7-E1	HT3850	26,91	Mimnaugh y colaboradores, 1997
Morfología celular	Profilina II Cofilina Ciclofilina B Tubulina alfa k1	HT928 HT1657 HT1953 HT1813	0,62 0,56 0,36 0,61	Djafarzadeh, 1997
Oncogenes	TAX	HT3360	0,32	Pise-Masison y colaboradores, 1998

55 Ejemplo 14

Tratamiento de una Queratosis Solar en un Voluntario Humano

60 La aprobación del comité de ética se obtuvo del Queensland Institute of Medical Research para un ensayo clínico supervisado del uso de una savia cruda de *E. peplus* para el tratamiento de una queratosis solar facial en un individuo humano.

65 El extracto crudo obtenido de las plantas cultivadas en Australia y almacenado en glicerol al 50% durante dos semanas a -20°C fue aplicado con un aplicador de copo de algodón a la superficie de una queratosis solar diagnosticada clínicamente, aproximadamente de 5 mm diámetro, sobre la sien izquierda de la cara de un voluntario humano. Se suministraron aproximadamente 50 µl a la superficie. Un día después, se hizo una segunda aplicación en el mismo sitio. Después de la primera aplicación, no se observó reacción durante 4-5 horas, después de las cuales apareció una

ES 2 308 810 T3

- reacción inflamatoria en el sitio y se extendió por un área de 80-100 mm de diámetro. Un día después se observó un hinchamiento localizado, y la formación de una ampolla en el sitio de aplicación y sobre parches localizados distanciados del área de aplicación, como si nuevos sitios premalignos fueran también blancos. Después de cuatro días luego del primer tratamiento, disminuyó la hinchazón y fue evidente la formación de costra en los sitios afectados.
- 5 Después de catorce días, las costras mudaron de piel, dejando nueva piel por debajo. Después de seis semanas, las áreas tratadas tenían aún un matiz ligeramente rosado, pero no hubo señales de la queratosis solar original. Como control se trató en forma similar un parche de 1 cm² de piel normal sobre el antebrazo del mismo voluntario. Hubo inflamación suave localizada, que desapareció 7-10 días después del tratamiento.
- 10 La fuerte reacción inflamatoria asociada con el tratamiento de la queratosis solar podría reflejar un recrudecimiento y proliferación de las células T asesinas, como lo sugieren los resultados para la respuesta inmune obtenidos de la selección del arreglo génico en el Ejemplo 13, y la observación de la proliferación *in vitro* de las células T por la savia cruda de *E. peplus* en el Ejemplo 15 más abajo. El reforzamiento de la actividad asesina de las células T se considera que es una etapa clave en la destrucción de células cancerosas por el sistema inmune y puede ayudar a explicar el reconocimiento y el ataque de las lesiones premalignas distantes del sitio del tratamiento original.
- 15

Ejemplo 15

20 *Efecto de la Savia Cruda y de las Fracciones Purificadas "A" y "H" del TLC Sobre Cantidades de Células Normales de Melanocito*

El 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) es esencial para el cultivo de melanocitos normales *in vitro*, ya que estas células crecieron muy pobremente sin TPA. En un experimento preliminar, se añadieron fracciones de *E. peplus* al medio sin añadir TPA desde el principio del experimento. Se añadieron fracciones de *E. peplus* al medio fresco, y el recuento del número de células fue comparable con el medio fresco sin fracciones de *E. peplus* o TPA. Bajo este régimen, se obtuvo un número mayor de melanocitos con el crecimiento de las células de "control" en medio deficiente en TPA. De manera muy interesante, las células en el medio con fracciones de *E. peplus* parecieron más sanas que aquellas células cultivadas en el así llamado medio "estándar" con TPA. De este modo, los compuestos derivados de *E. peplus* pueden proveer una alternativa superior que el uso de TPA como herramienta en el cultivo celular.

25

30

En un segundo experimento, se sembraron en placa melanocitos normales a razón de 5.000 células por pozo, en medio RPMI 1640 que contenía suero fetal de ternera al 10%, toxina del cólera, antibióticos, y TPA. Después de 24 horas, se removió el medio de las células por succión, y se los reemplazó con medio fresco sin la adición de TPA, pero con las adiciones especificadas. Se hizo recuento de las células después de 10 días adicionales de incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 20. Es evidente que aún con una dilución de 1 en 5.000.000 se observó un efecto de proliferación celular con una fracción cruda y otra purificada, en contraste con los efectos de inhibición celular observados con estas concentraciones contra las líneas celulares cancerosas como se muestra en los ejemplos anteriores. En un ensayo separado, se obtuvo también proliferación *in vitro* de células T después de tratamiento de las células T con savia cruda de *E. peplus*.

35

40

TABLA 20

Muestra	1/50	1/500	1/5.000	1/50.000	1/500.000	1/5.000.000
Solvente (control)	+	+	+	+	+	+
Savia cruda de <i>E. peplus</i>	-	+	+	++	++	++
Fracción "A" (enriquecida en acetato de ingenol)	+	++	++	++	++	+
Fracción "H" (enriquecida en jatrofano 3)	±	++	++	++	++	++
Escala: + = crecimiento normal, ++ = aproximadamente 50% superior que el crecimiento normal						

45

50

55

60

Ya que tanto los melanocitos normales como las células T fueron inducidos para proliferar por medio de fracciones de savia de *E. peplus*, este agente puede tener amplia aplicación como agente de proliferación celular para células normales, ya sea *in vivo* o *in vitro*, en cualquier condición médica donde la regeneración de células normales sería ventajosa, incluyendo, pero sin limitarse a:

65

- a) multiplicación de células de la piel (queratinocitos) para cicatrización rápida de heridas en casos de trauma y después de cirugía, y en la recuperación de quemaduras.

ES 2 308 810 T3

- b) multiplicación de células de islotes pancreáticos por implantación.
- c) multiplicación de células T y de otras células del sistema inmune.
- 5 d) es interesante observar que la expansión de la acción después del punto de aplicación en el ensayo con el voluntario humano sobre el tratamiento de la queratosis solar puede ser explicada por medio de un reclutamiento de las células T asesinas naturales para la región de aplicación.
- 10 e) regeneración del tejido envejecido o necrótico del hígado, el riñón, el colón, el pulmón y el ojo.
- f) multiplicación del tejido huésped como una alternativa para el trasplante de órganos.

Ejemplo 16

15

Efecto de las betaínas sobre el número de células MM96L de melanoma maligno

20 Se solubilizaron diferentes tipos de betaínas en agua estéril MilliQ™ hasta una concentración final de 1 mg/ml, y se diluyó en 0,1 ml de un medio de cultivo de tejido que contenía 5.000 células MM96L como se describió previamente. Se hizo recuento de las células después de 4 días de incubación. Los resultados se muestran en la Tabla 21.

25 Mientras que la mayoría de las betaínas analizadas no tuvo efecto sobre el número de células, el clorhidrato de la betaína β -alanina (homobetaína) disminuyó el número de células hasta una concentración final de 20 μ g/ml, y las células tenían una apariencia dendrítica. La 1-4 hidroxil N,N-dimetil prolina también inhibió el número de células hasta una concentración final de 20 μ g/ml; sin embargo, la morfología celular cambió hasta aquella de formas polidendríticas, cuyo significado es desconocido.

30 Se cree que el clorhidrato de la betaína β -alanina (homobetaína) puede ser un agente de formulación adecuado para la savia cruda de *E. peplus* o sus principios activos purificados, incluidos ingenol, peplano, y los jatrofanos 1-6, ya sea separadamente o en combinación. Esto podría ser utilizado para aplicación tópica contra lesiones premalignas de la piel con diluciones bajas de el(los) principio(s) de *E. peplus*, o formulado como una droga contra el cáncer con concentraciones más altas del(los) principio(s) de *E. peplus*. Se ha sugerido que las betaínas por sí mismas son útiles como agentes contra el cáncer; ver por ejemplo la patente estadounidense No. 5.545.667 de Wiersema y colaboradores.

35 Debido a sus propiedades tensoactivas, las betaínas son ampliamente utilizadas como ingredientes en la formulación de cosméticos. Debido a sus propiedades como zwitterión, las betaínas podrían también ayudar al transporte de otros ingredientes dentro de las capas más profundas de la piel. Una betaína que es utilizada en una preparación cosmética para la piel junto con extractos muy diluidos de savia de *E. peplus* o fracciones purificadas derivadas de allí, tal como jatrofanos, peplano, paraliano, o ingenano, en forma separada o en combinación, deben tener deseablemente propiedades complementarias. De todas las betaínas analizadas, incluyendo la betaína glicina, únicamente el clorhidrato de la betaína β -alanina (homobetaína) tuvo un efecto inversor del fenotipo aunque modesto, comparado con la savia y las fracciones de *E. peplus*.

45

TABLA 21

50

55

60

65

Muestra	1/50	1/500	1/5.000
Betaína glicina	+++	+++	+++
N-metil prolina, base libre	+++	+++	+++
1-4-hidroxil N-metil prolina base libre	+++	+++	+++
Estaquidrina (betaína prolina), base libre	+++	+++	+++
1-3-hidroxil N-metil prolina, base libre	+++	+++	+++
Clorhidrato de la betaína β -alanina (homobetaína)	++d	+++	+++
1-4-hidroxil N,N-dimetil prolina, base libre	+pd	+++	+++
d = morfología dendrítica pd = morfología polidendrítica Escala: +++ = sin efecto, - = muerte celular completa			

Referencias

- Beljanski M y Crochet, S.** *Int. J. Oncol.*, 1996 8 1143-1148
- 5 **Belkin, M. y Fitzgerald, D.B.J.** *Natl. Cancer Inst.*, 1952 13 139
- Bosch, R.R., Patel, A.M., Van Emst-de Vries, S.E., Smeets, R.L., De Pont, J.J., Willems, P.H., Pont, J.J.** *Eur J Pharmacol* 1998 346 345-351
- 10 **Djafarzadeh, S.** *Exp Cell Res.* 1997 Nov 1; 236(2) 1997, 236 427-435
- Eke, T.** *Eye*, 1994 8 694-696
- Evans, F.J. y Kinghorn, A. D.** *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1977 74 23-35
- 15 **Evans, I.A. y Osman, M. A.** *Nature*, 1974 250 348
- Falsone G y colaboradores,** *Farmaco.*, 1994 49 167-174
- 20 **Fatope, M.O. y colaboradores** *J. Med. Chem.*, 1996 39 1005-1008
- Francis, D. B., Hart, L. V., Wilson, P.R. y Beardmore, G.L.** *Med J. Aust.*, 1989 6 541-542
- Galvez, J. y colaboradores** *Planta Med.*, 1993 59 333-336
- 25 **Gundidza, M. y colaboradores** *Cent. Afr. J. Med.*, 1992 38 444-447
- Guo, Z. y colaboradores** *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 1995 20 744-745
- 30 **Hartwell, J. L.** *Lloydia* 1969 32 153
- Hecker**, "Cocarcinogens from Euphorbiaceae and Thymeleaceae" en "Symposium on Pharmacognosy and Phytochemistry", 147-165 (Wagner y colaboradores, eds., Springer Verlag 1970).
- 35 **Imai, S.** *Anticancer Research*, 1994 14 933-936
- Jakupovic, J., Morgenstern, T., Bitner, M. y Silva, M.** *Phytochemistry*, 1998a 47 1601-1609
- Jakupovic, J., Jeske, F., Morgenstern, T., Tschritzis, F., Marco, J.A. y Berendsohn, W.** *Phytochemistry*, 1998b
- 40 47 1583-1600
- Jakupovic, J., Morgenstern, T., Marco, J. A. y Berendsohn, W.** *Phytochemistry*, 1998c 47 1611-1619
- Jurberg, P. y colaboradores** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1995 90 191-194
- 45 **Kanai, M., Goke, M., Tsunekawa, S. y Podolsky, D. K.** *J Biol Chem* 1997 272 6621-6628
- Leung, A.Y. y Foster, A.** *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used Food, Drugs and Cosmetics*, John Wiley & Sons, Inc. 2nd edition, 1996
- 50 **Li, M., Vemulapalli, R., Ullah, A., Izu, L., Duffey, M.E. y Lance, P.** *Am. J. Physiol.*, 1998 274 G599-G606
- Liu. Y y colaboradores** *Chung Kuo Chung His Chieh Ho Tsa Chih*, 1994 14 282-284
- 55 **Marco, J. A., Sanz-Cervera, J. F., Yuste, A., Jakupovic, J. y Jeske, F.** *Phytochemistry*, 1998 47 1621-1630
- Matsumoto, T. y colaboradores** *Planta Med.*, 1992 58 255-258
- Maynard, K. y Parsons, P. G.** *Cancer Res*, 1986 46 5009-5013
- 60 **Mimnaugh, E. G., Chen, H. Y., Davie, J. R., Celis, J. E. y Neckers, L.** *Biochemistry* 1997 36 14418-14429
- Moulin, A. y colaboradores** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994 91 11328-11332
- 65 **Oksuz, S. y colaboradores** *Phytochemistry*, 1996 42 473-478
- Pearn, J.** *Med. J. Aust.*, 1987 147 568-572

ES 2 308 810 T3

- Perozzi, G., Barila, D., Plateroti, M., Sambuy, Y., Nobili, F. y Gaetani, S. Z. *Ernahrungswiss*, 1998 37 29-34**
- Pise-Masison, C. A., Radonovich, M., Sakaguchi, K., Appella, E. y Brady, J. N. J. *J. Virol.*, 1998 72 6348-6355**
- 5 **Stavric, B. y Stoltz, D. R. *Food Cosmet. Toxicol.*, 1976 14 141**
- Stirpe, F. y colaboradores *Biochim. Biophys. Acta*, 1993 1158 33-39**
- Sussman, L. A. E. y Liggins, D. F. Australian and New Zealand Journal of Surgery, 1996 66 276-278**
- 10 **Vijaya, K. y colaboradores *J. Ethnopharmacol.*, 1995 49 115-118**
- Weedon, D. y Chick, J. *Med. J. Aust.*, 1976 928 1-24**
- 15 **Yoshida, T. y colaboradores *Chem. Pharm. Bull.* (Tokio), 1994 42 1803-1807**

Referencias citadas en la descripción

- 20 Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- 25
- US 4906472 A [0011]
 - DE 4102054 [0014]
 - EP 330094 A [0014]
 - US 5545667 A, Wiersema [0109]
 - HU 208790 [0014]
- 30

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- 35
- **HARTWELL**. *Lloydia*, 1969, vol. 32, 153 [0010]
 - Cocarcinogens from Euphorbiaceae and Thymeleaceae. **HECKER**, E. y colaboradores Symposium on Pharmacognosy and Phytochemistry. *Springer Verlag*, 1970, 147-165 [0011]
 - Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company [0042]
 - 40 • **BELJANSKI M; CROCHET, S.** *Int. J. Oncol.*, 1996, vol. 8, 1143-1148 [0111]
 - **BELKIN, M.; FITZGERALD, D.B.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1952, vol. 13, 139 [0111]
 - 45 • **BOSCH, R.R.; PATEL, A.M.; VAN EMST-DE VRIES, S.E.; SMEETS, R.L.; DE PONT, J.J.; WILLEMS, P.H.; PONT, J.J.** *Eur J Pharmacol*, 1998, vol. 346, 345-351 [0111]
 - **DJAFARZADEH, S.** *Exp Cell Res.*, 01 November 1997, vol. 236 (2), 427-435 [0111]
 - 50 • **EKE, T.** *Eye*, 1994, vol. 8, 694-696 [0111]
 - **EVANS, F.J.; KINGHORN, A.D.** *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1977, vol. 74, 23-35 [0111]
 - **EVANS, I.A.; OSMAN, M.A.** *Nature*, 1974, vol. 250, 348 [0111]
 - 55 • **FALSONE G** y colaboradores *Farmaco.*, 1994, vol. 49, 167-174 [0111]
 - **FATOPE, M.O.** y colaboradores *J. Med. Chem.*, 1996, vol. 39, 1005-1008 [0111]
 - 60 • **FRANCIS, D.B.; HART, L.V.; WILSON, P.R.; BEARDMORE, G.L.** *Med J. Aust.*, 1989, vol. 6, 541-542 [0111]
 - **GALVEZ, J.** y colaboradores *Planta Med.*, 1993, vol. 59, 333-336 [0111]
 - 65 • **GUNDIDZA, M.** y colaboradores *Cent. Afr. J. Med.*, 1992, vol. 38, 444-447 [0111]
 - **GUO, Z.** y colaboradores *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 1995, vol. 20, 744-745 [0111]

ES 2 308 810 T3

- **HARTWELL**, J.L. *Lloydia*, 1969, vol. 32, 153 [0111]
- Cocarcinogens from Euphorbiaceae and Thymeleaceae. **HECKER** y colaboradores Symposium on Pharmacog-
nomy and Phytochemistry. *Springer Verlag*, 1970, 147-165 [0111]
- 5 • **IMAI**, S. *Anticancer Research*, 1994, vol. 14, 933-936 [0111]
- **JAKUPOVIC**, J.; **MORGENSTERN**, T.; **BITNER**, M.; **SILVA**, M. *Phytochemistry*, 1998, vol. 47, 1601-1609
[0111]
- 10 • **JAKUPOVIC**, J.; **JESKE**, F.; **MORGENSTERN**, T.; **TSICHRITZIS**, F.; **MARCO**, J.A.; **BERENDSOHN**,
W. *Phytochemistry*, 1998, vol. 47, 1583-1600 [0111]
- **JAKUPOVIC**, J.; **MORGENSTERN**, T.; **MARCO**, J.A.; **BERENDSOHN**, W. *Phytochemistry*, 1998, vol. 47,
15 1611-1619
- **JURBERG**, P. y colaboradores *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1995, vol. 90, 191-194 [0111]
- **KANAI**, M.; **GOKE**, M.; **TSUNEKAWA**, S.; **PODOLSKY**, D.K. *J Biol Chem*, 1997, vol. 272, 6621-6628
20 [0111]
- **LEUNG**, A.Y.; **FOSTER**, A. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used Food, Drugs and Cosmetics.
John Wiley & Sons, Inc, 1996 [0111]
- 25 • **LI**, M.; **VEMULAPALLI**, R.; **ULLAH**, A.; **IZU**, L.; **DUFFEY**, M.E.; **LANCE**, P. *Am. J. Physiol.*, 1998, vol.
274, G599-G606 [0111]
- **LIU**. Y y colaboradores *Chung Kuo Chung His Chieh Ho Tsa Chih*, 1994, vol. 14, 282-284 [0111]
- 30 • **MARCO**, J. A.; **SANZ-CERVERA**, J. F.; **YUSTE**, A.; **JAKUPOVIC**, J.; **JESKE**, F. *Phytochemistry*, 1998,
vol. 47, 1621-1630 [0111]
- **MATSUMOTO**, T. y colaboradores *Planta Med.*, 1992, vol. 58, 255-258 [0111]
- 35 • **MAYNARD**, K.; **PARSONS**, P.G. *Cancer Res*, 1986, vol. 46, 5009-5013 [0111]
- **MIMNAUGH**, E.G.; **CHEN**, H.Y.; **DAVIE**, J.R.; **CELIS**, J.E.; **NECKERS**, L. *Biochemistry*, 1997, vol. 36,
14418-14429
- 40 • **MOULIN**, A. y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 11328-11332 [0111]
- **OKSUZ**, S. y colaboradores *Phytochemistry*, 1996, vol. 42, 473-478 [0111]
- **PEARN**, *J. Med. J. Aust.*, 1987, vol. 147, 568-572 [0111]
- 45 • **PEROZZI**, G.; **BARILA**, D.; **PLATEROTI**, M.; **SAMBUY**, Y.; **NOBILI**, F.; **GAETANI**, S. *Z. Ernahrungs-*
wiss, 1998, vol. 37, 29-34 [0111]
- **PISE-MASISON**, C.A.; **RADONOVICH**, M.; **SAKAGUCHI**, K.; **APPELLA**, E.; **BRADY**, J.N. *J. Virol.*,
50 1998, vol. 72, 6348-6355 [0111]
- **STAVRIC**, B.; **STOLTZ**, D.R. *Food Cosmet. Toxicol.*, 1976, vol. 14, 141 [0111]
- **STIRPE**, F. y colaboradores *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, vol. 1158, 33-39 [0111]
- 55 • **SUSSMAN**, L.A.E.; **LIGGINS**, D.F. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 1996, vol. 66, 276-278
- **VIJAYA**, K. y colaboradores *J. Ethnopharmacol.*, 1995, vol. 49, 115-118 [0111]
- 60 • **WEEDON**, D.; **CHICK**, *J. Med. J. Aust.*, 1976, vol. 928, 1-24 [0111]
- **YOSHIDA**, T. y colaboradores *Chem. Pharm. Bull.* (Tokio, 1994, vol. 42, 1803-1807) [0111]

65

ES 2 308 810 T3

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de un compuesto ingenano para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer o de otra condición que involucre células neoplásicas; en donde dicho compuesto:

a) puede obtenerse por extracción con etanol al 95% a partir de la savia de *Euphorbia peplus*, *Euphorbia hirta* y/o *Euphorbia drummondii*;

10 b) es capaz de estimular la activación del gen de la metalotioneína y

c) es capaz de matar o inhibir el crecimiento de células cancerosas, pero no afecta significativamente a los fibroblastos neonatales normales, o a los queratinocitos transformados espontáneamente; en donde dicha actividad no es destruida por calentamiento a 95°C durante 15 minutos, o tratamiento con acetona.

15 2. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el compuesto es capaz de inhibir el crecimiento de al menos una línea celular seleccionada del grupo que consiste de MM96L, MM229, MM220, MM537, MM2058, HeLa, B16, LIM1215, A549, MCF7, MCC16 y Colo16, como se definió aquí.

20 3. El uso de acuerdo a la reivindicación 2, en donde el compuesto es capaz de inhibir el crecimiento de, o de inducir la diferenciación de las células MM96L.

4. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es capaz de inducir melanocitos normales y/o la proliferación de células T.

25 5. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el compuesto es 20-acetil-ingenol-3-angelato.

6. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el cáncer es cáncer de piel, melanoma maligno, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales o queratosis solar.

30 7. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el medicamento es para administración tópica.

8. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el cáncer es un tumor sólido, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer cervical o cáncer de seno.

Efecto de la Sustancia A sobre la activación del gen
de la metalotioneína

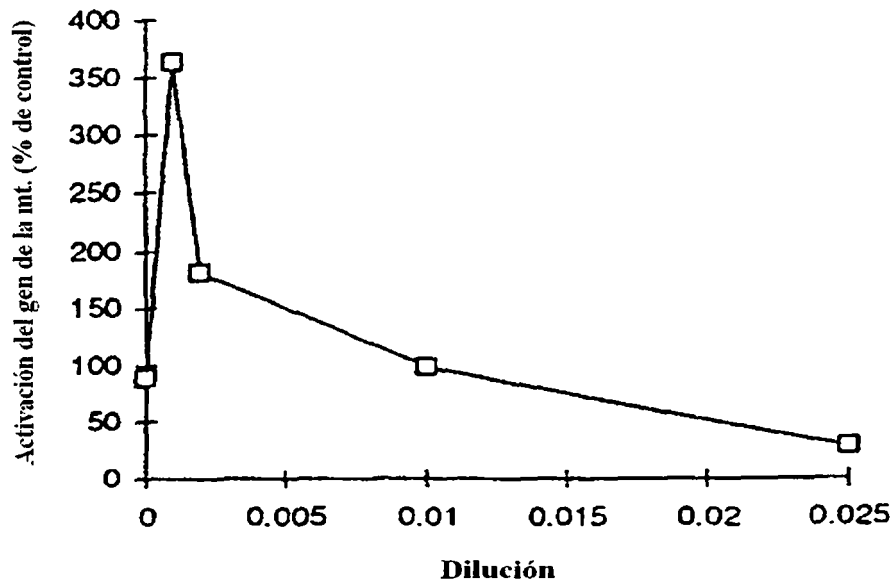


FIGURA 1

Proteína (% de las células de control) de las células de cáncer de seno MCF7 después de 7 días de exposición a la savia de *E. peplus* a diferentes diluciones

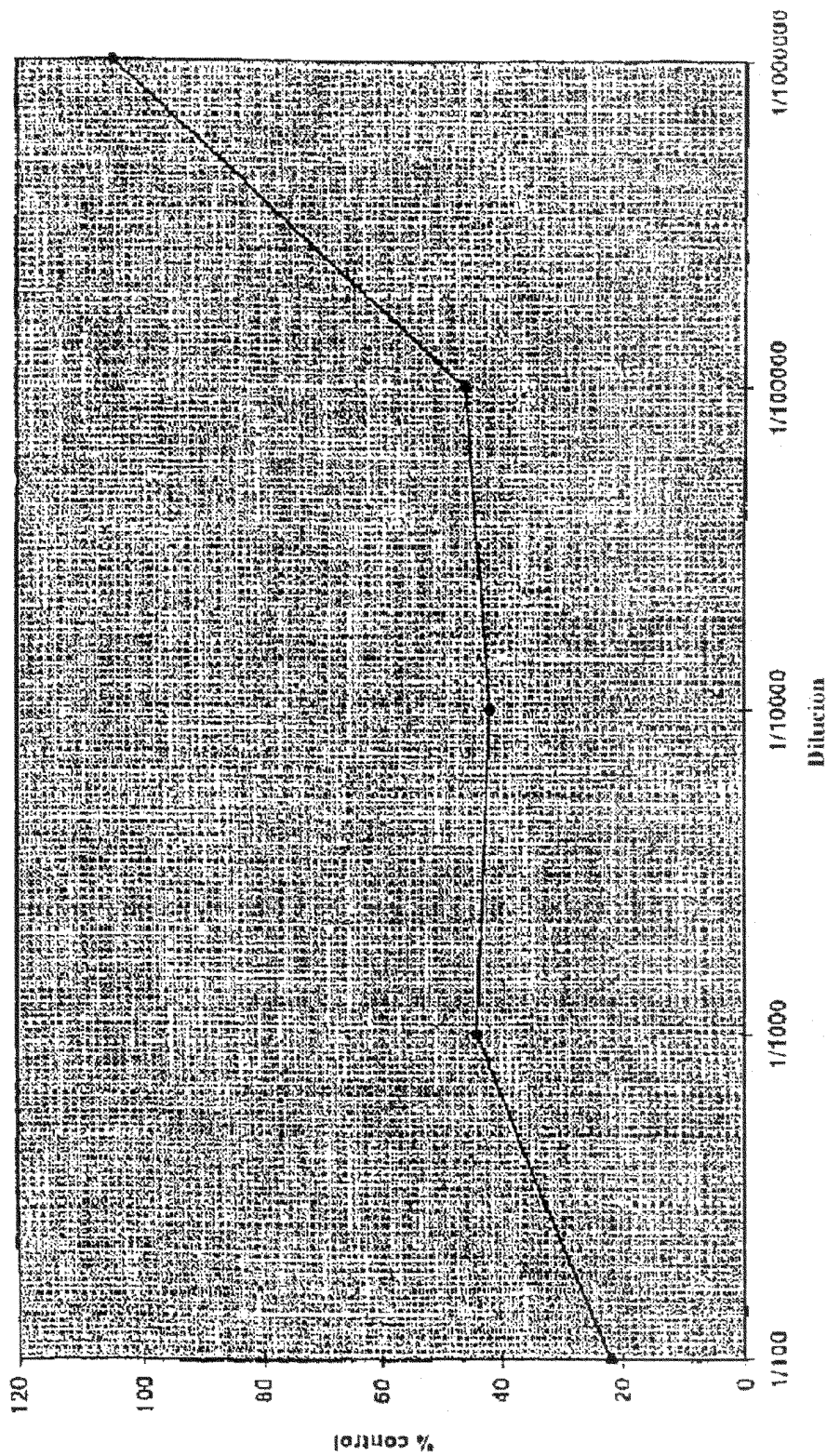


FIGURA 2

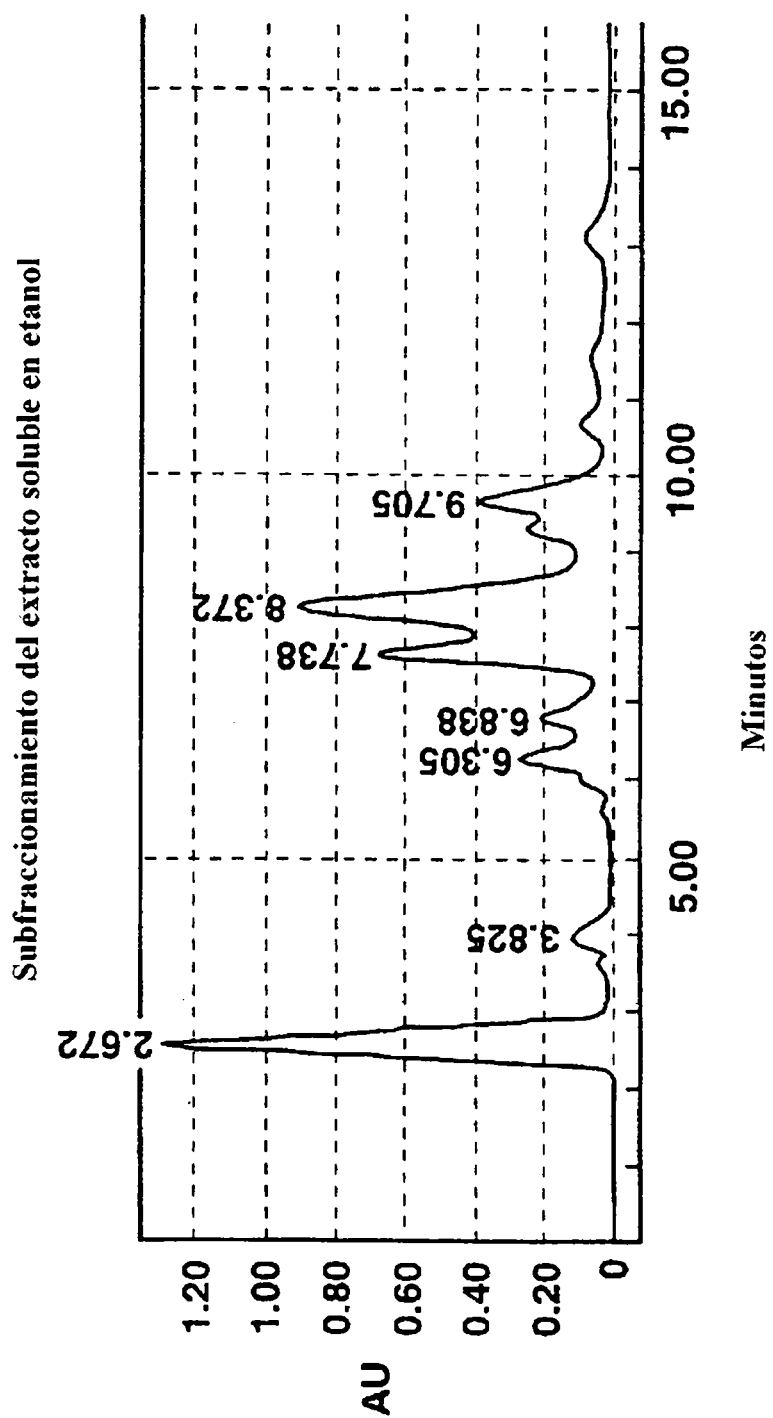


FIGURA 3

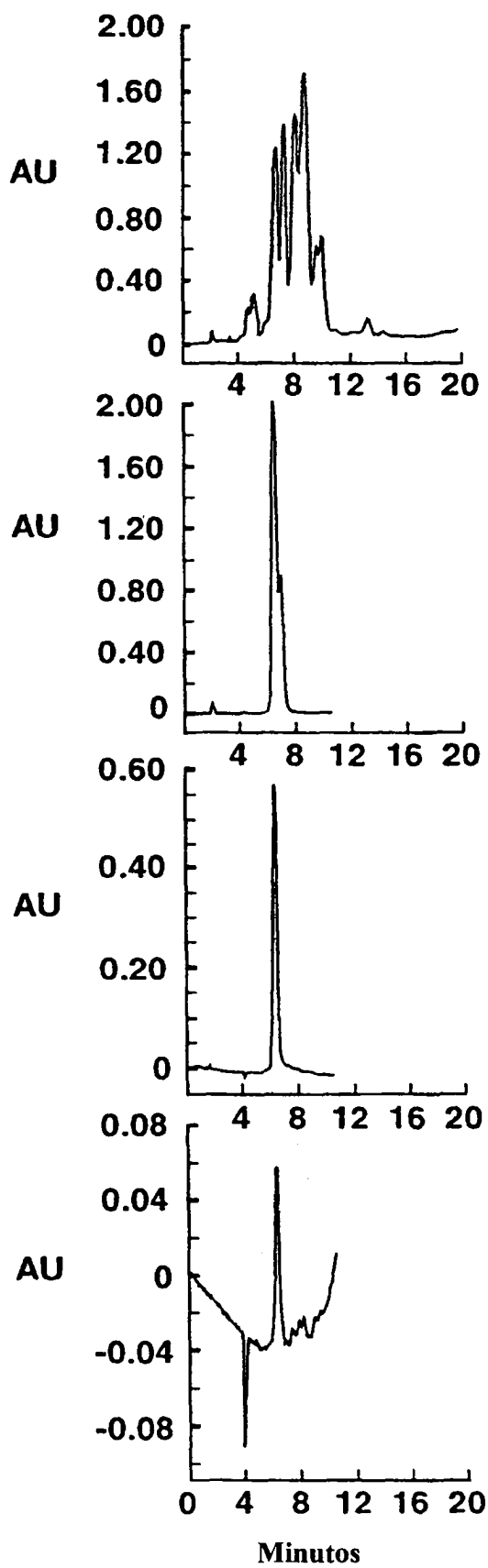


FIGURA 4

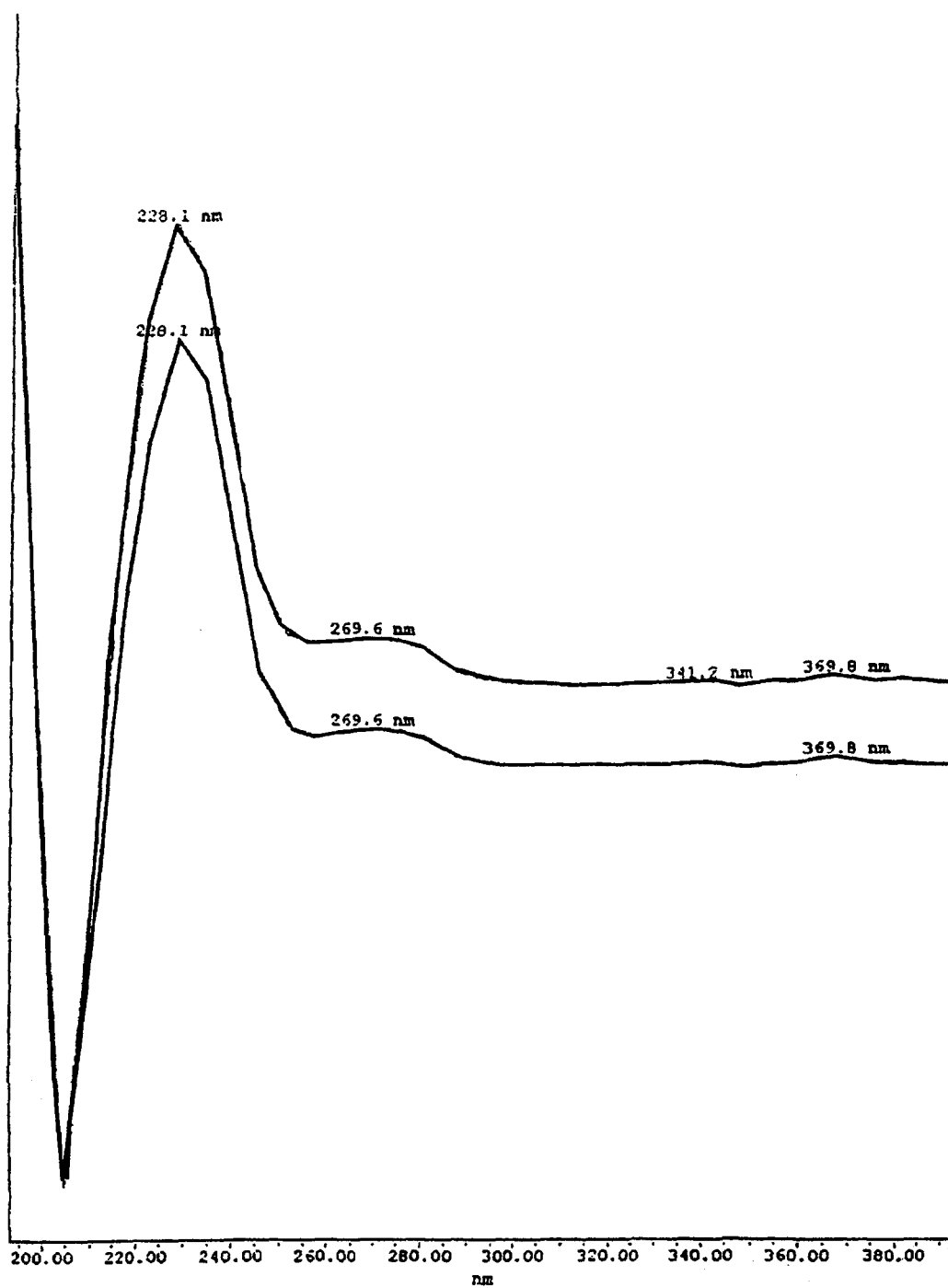


FIGURA 5

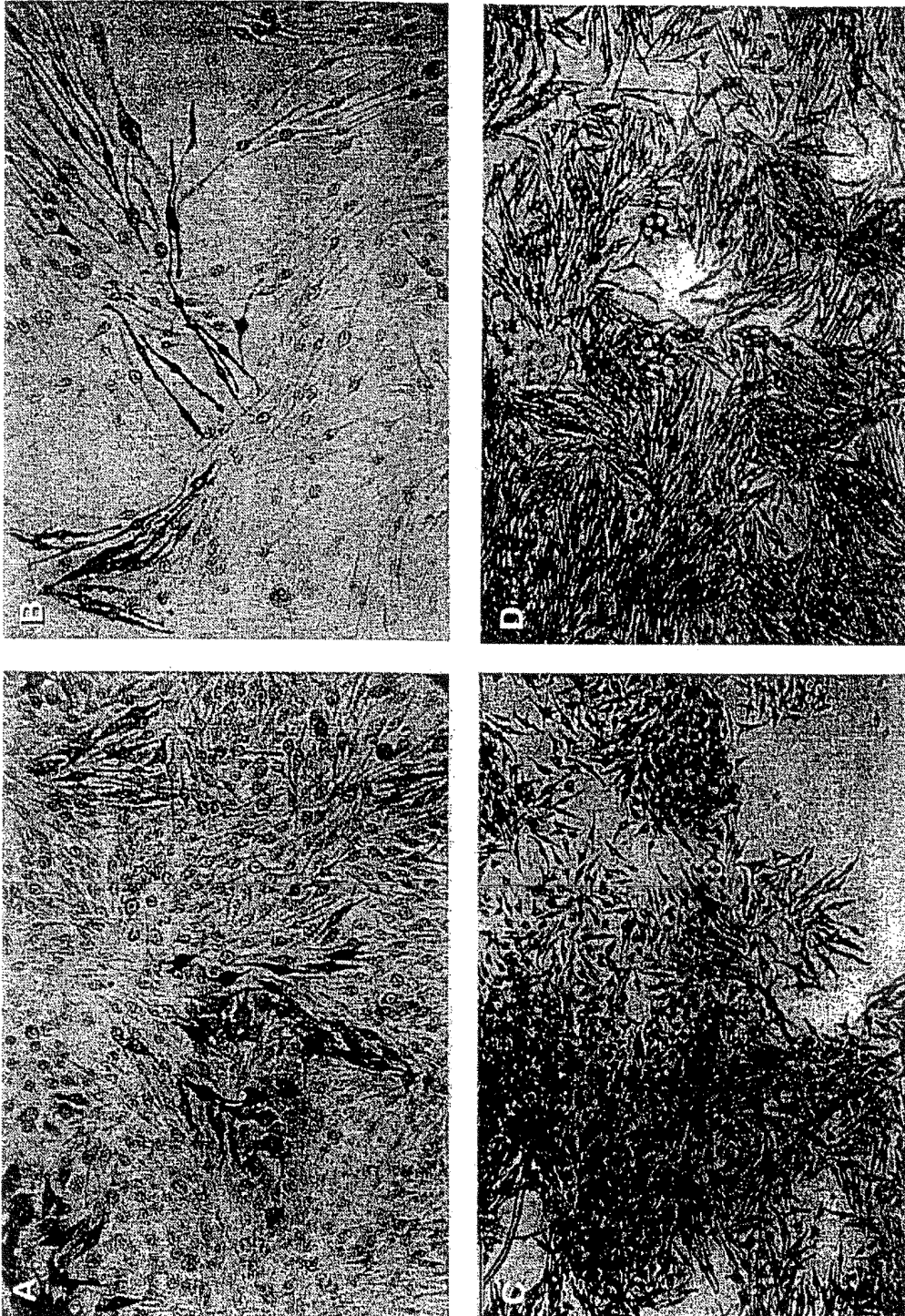


FIGURA 6

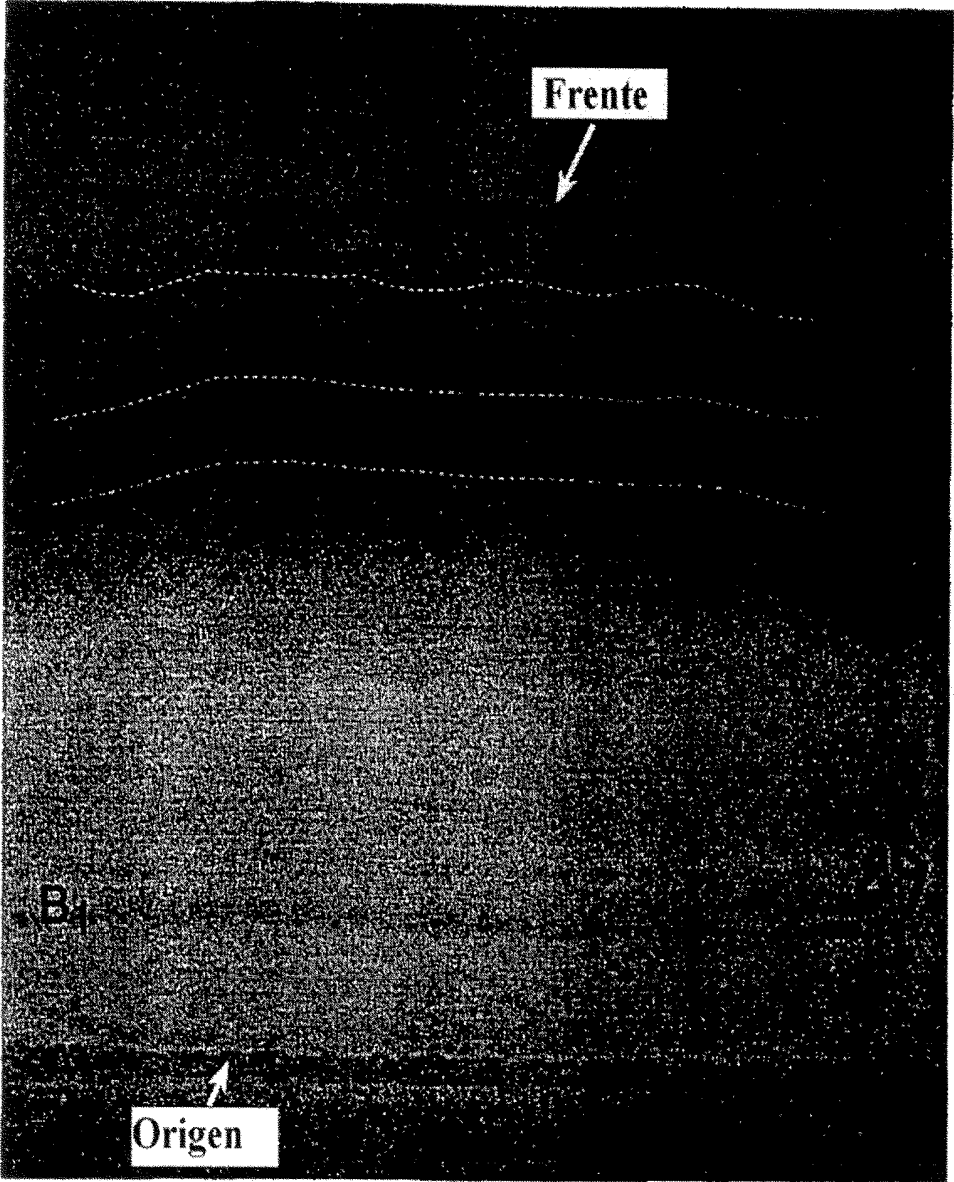


FIGURA 7

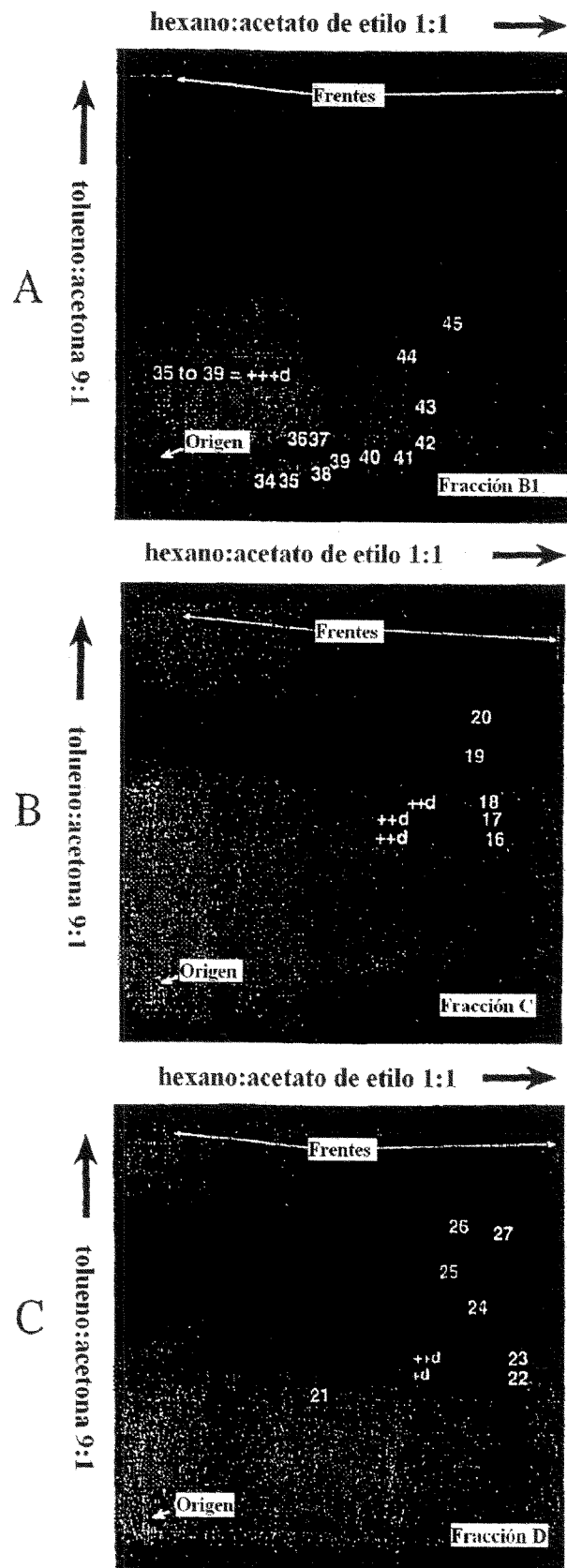


FIGURA 8

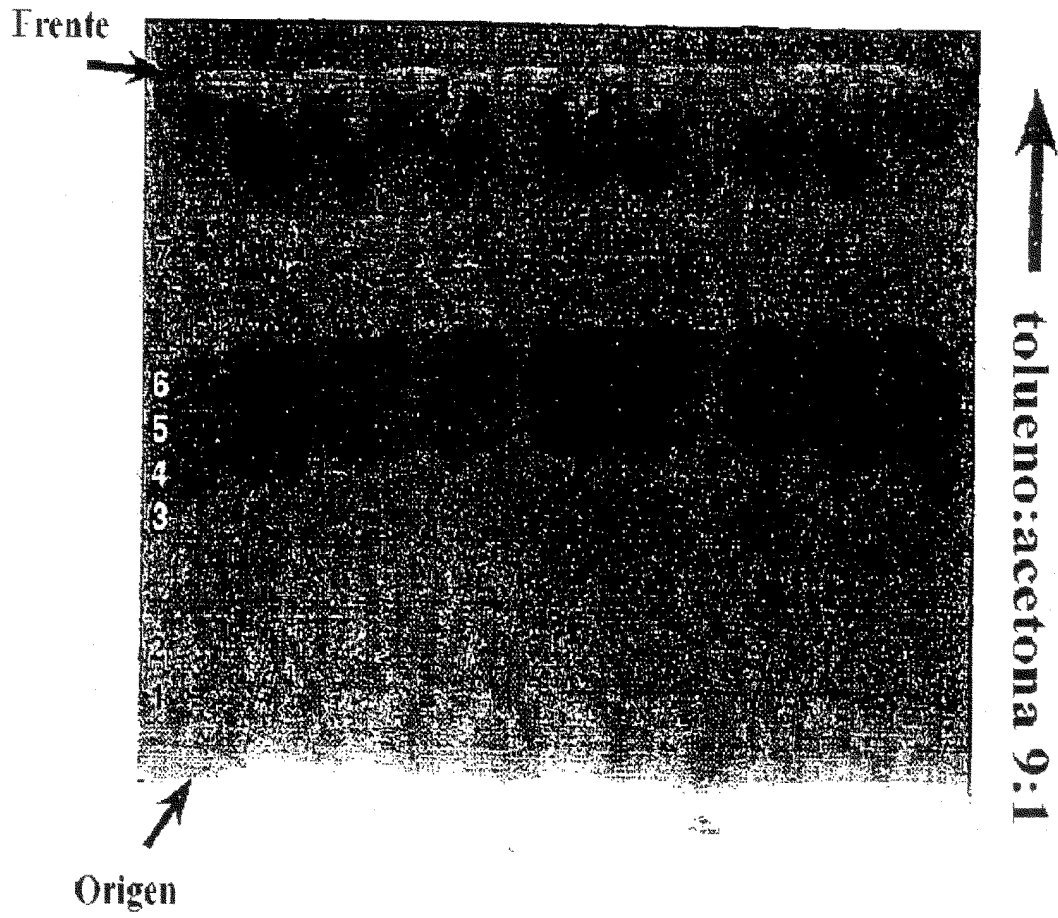


FIGURA 9

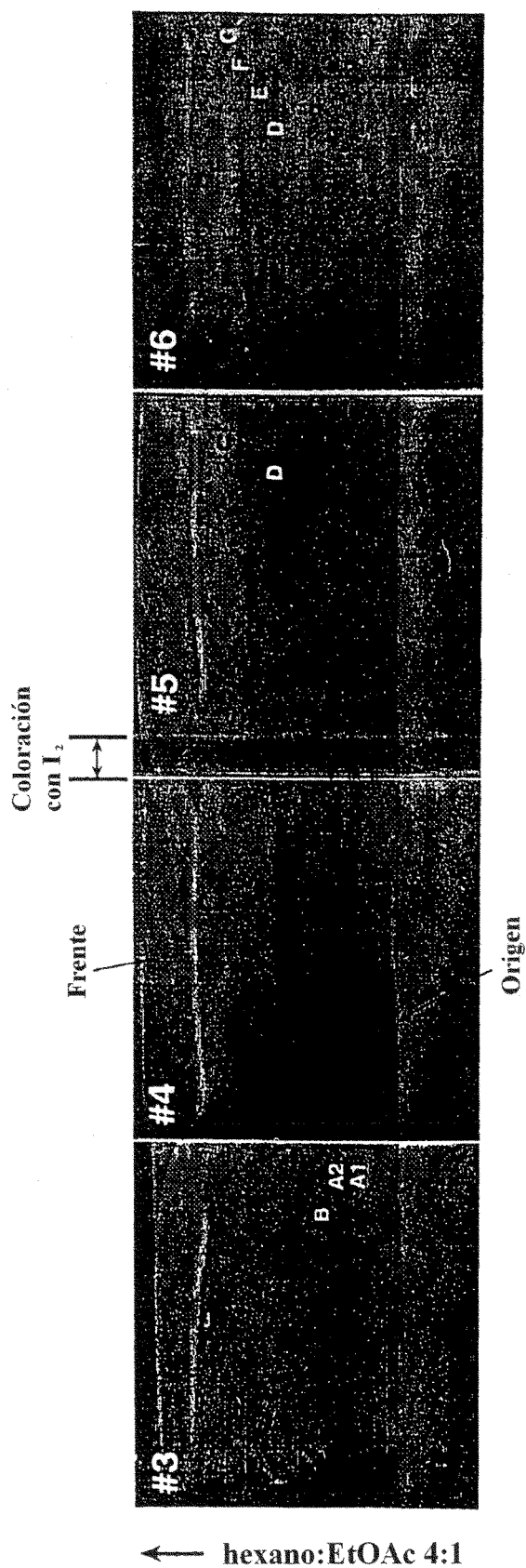


FIGURA 10

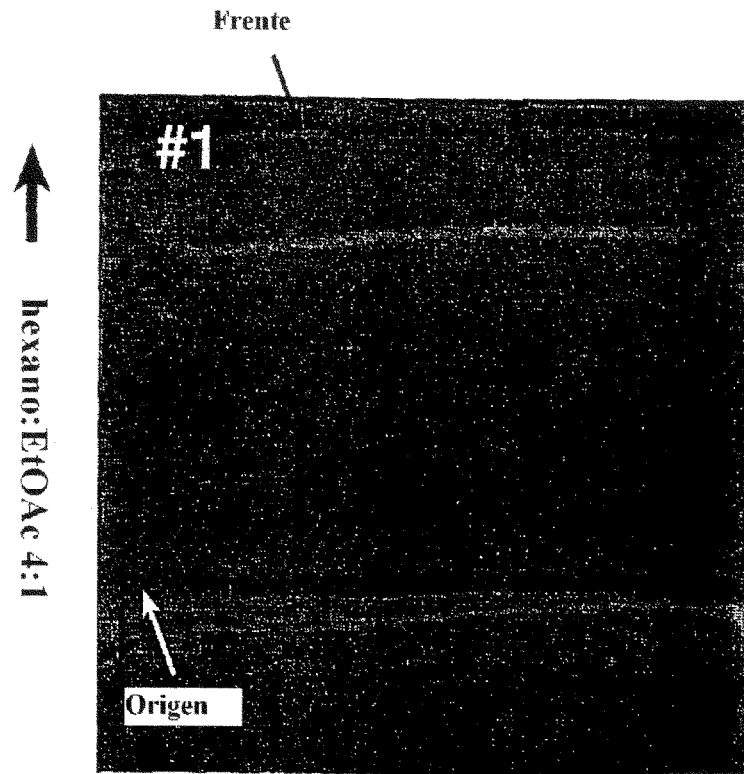


FIGURA 11

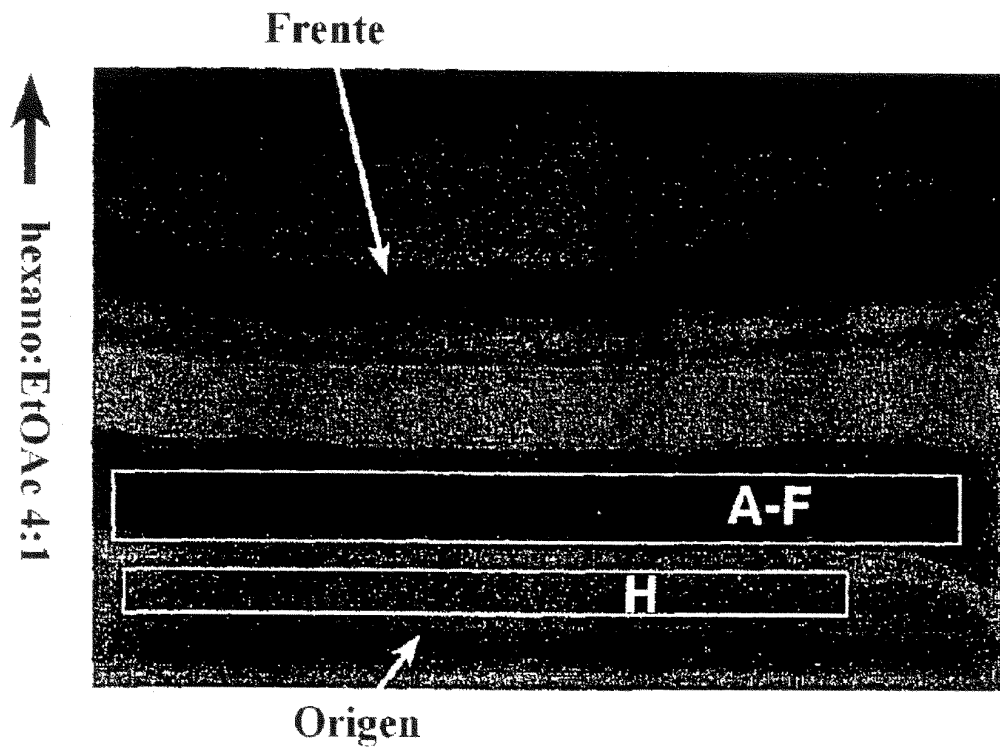


FIGURA 12

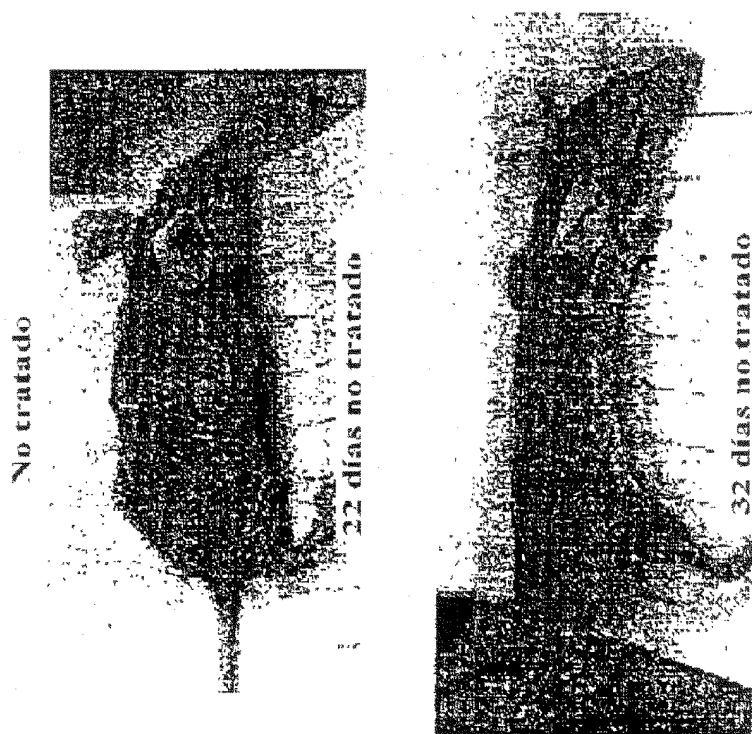


FIGURA 13