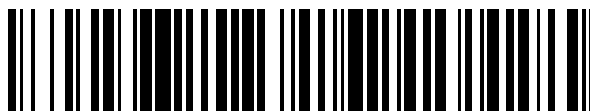


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 293**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06025394 .5**

96 Fecha de presentación: **19.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1764092**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2007**

54 Título: **SELECCIÓN DE COMPUESTOS PARA TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

30 Prioridad:
19.07.2001 GB 0117645

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
**ISIS INNOVATION LIMITED
EWERT HOUSE EWERT PLACE
SUMMERTOWN OXFORD OX2 7LG, GB**

72 Inventor/es:
Nagy, Zsuzsanna

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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).

ES 2 375 293 T3

DESCRIPCIÓN

Selección de compuestos para tratamiento de enfermedad de alzheimer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de exploración que pueden usarse para seleccionar agentes farmacéuticamente activos para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en un paciente.

10 **Antecedentes de la invención**

A medida que aumenta la esperanza de vida la enfermedad de Alzheimer (AD) se está convirtiendo en un importante problema de salud en el mundo occidental. Ha habido una investigación exhaustiva dirigida a identificar una cura fiable o medidas preventivas para la enfermedad, sin éxito hasta el momento.

15 Actualmente existen dos enfoques terapéuticos mayoritarios para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El primero es el tratamiento con inhibidores de acetilcolina esterasa, que reducen los efectos de pérdida neuronal en el sistema nervioso central y por lo tanto proporciona cierto alivio sintomático para los defectos cognitivos. Sin embargo, este enfoque es apropiado solamente en los pacientes en los que existe una reserva funcional sustancial restante en el cerebro.

El segundo enfoque es reducir la cantidad o detener la deposición de placas beta-amiloides en el cerebro. La principal desventaja de este enfoque es que la deposición amiloide no es la causa sino más bien una consecuencia de la enfermedad de Alzheimer y la acumulación de esta proteína no tiene ningún efecto en el estado cognitivo o capacidad funcional del cerebro.

En años recientes se está aceptando de forma más amplia que la base patogénica de la enfermedad de Alzheimer es la reentrada aberrante de poblaciones neuronales diferentes en el ciclo de división celular (Nagy Z, Esiri MM y Smith AD (1998) Neuroscience 84: 731-739). En individuos ancianos sanos a esta reentrada en el ciclo celular puede seguirle una detención rápida y rediferenciación. Por el contrario, en individuos con enfermedad de Alzheimer los mecanismos reguladores parecen fallar y las neuronas progresan hasta las etapas tardías del ciclo celular lo que conduce a la acumulación de patologías relacionadas con AD y/o muerte neuronal (Nagy Z, Esiri MM y Smith AD (1998) Neuroscience 84: 731-739).

35 Estudios por los presentes inventores y otros indican que el fallo regulador del ciclo celular en la enfermedad de Alzheimer se produce en el punto de control de la transición G1/S (Arendt, T Rode L, Gartner U y Holzer M (1996) Neuroreport 7: 3047-9). Anteriores estudios sobre fibroblastos y linfocitos de pacientes con enfermedad de Alzheimer indican que la regulación del ciclo de división celular podría interrumpirse en células distintas de neuronas en esta afección (Eckert a, Hartmann H, Forstl H y Muller WE (1994) Life Sci 55: 2019-29; Fischman HK, Reisberg B, Albu P, Ferris SH y Rainer JD (1984) Biol Psychiatry 19: 319-27; Tatebayashi Y, Takeda M, Kashiwagi Y, Okochi M, Kurumadani T, Sekiyama A, Kanayama G, Hariguchi S y Nishimura T (1995) Dementia 6: 9-12). También se sabe que los pacientes con enfermedad de Alzheimer son más propensos a ciertas formas de cáncer (Burke WJ, McLaughlin JR, Chung HD, Gillespie KN, Grossberg GT, Luque FA y Zimmerman J (1994) Alzheimer Dis Assoc Disord 8: 22-8) y que los pacientes con síndrome de Down, que desarrollan AD en la vida adulta temprana, son más propensos a padecer leucemia de la población general (Drabkin HA y Erickson P (1995) Prog Clin Biol Res 393: 169-76; Fong CT y Brodeur GM; (1987) Cancer Genet Cytogenet 28: 55-76). Por lo tanto es plausible plantear como hipótesis que el fallo regulador del ciclo celular en neuronas, incluso en etapas tempranas (preclínicas) de AD, podría reflejarse en una disfunción reguladora similar del ciclo celular en linfocitos.

50 Los presentes inventores han mostrado que la respuesta *in vitro* de los linfocitos al tratamiento con inhibidores de G1 es significativamente menos eficaz en pacientes con enfermedad de Alzheimer que en los sujetos control. Adicionalmente, en sujetos que muestran señales clínicas de enfermedad de Alzheimer incipiente la respuesta linfocítica es similar a la vista en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Estos hallazgos representan pruebas directas de que el fallo del control de transición G1/S no se restringe a neuronas en pacientes con enfermedad de Alzheimer, sino que también se produce en células periféricas, tales como linfocitos.

Descripción de la invención

60 La invención se refiere a varias estrategias para intervención terapéutica con el fin de detener la progresión de la enfermedad de Alzheimer o evitar su desarrollo.

Las dos dianas principales de la intervención terapéutica identificadas por el inventor son prevenir/inhibir la reentrada en ciclo celular y progresión al punto de transición G1/S o prevenir/inhibir la progresión del ciclo celular al punto de transición G1/S. La reentrada en el ciclo celular neuronal puede evitarse mediante terapias que actúan como factores de diferenciación o mediante intervenciones que refuerzan las conexiones sinápticas y por lo tanto el estado diferenciado de las neuronas. Las terapias dirigidas a detener la progresión del ciclo de división celular en el punto

de transición G1/S incluyen tratamiento con los inhibidores clásicos de división celular, por ejemplo fármacos usados en terapia de cáncer y quimio-prevención.

5 El inventor ha descubierto sorprendentemente que no todos los agentes que evitan la reentrada en el ciclo celular y la progresión al punto de transición G1/S o que evitan la progresión del ciclo celular en el punto de transición G1/S, serán eficaces en todos los pacientes con Alzheimer. La eficacia terapéutica de diferentes agentes depende de la naturaleza del defecto regulador del ciclo celular subyacente presente en el paciente a tratar. El agente preferido para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer variará por lo tanto de paciente a paciente, dependiendo de la naturaleza concreta del defecto regulador del ciclo celular subyacente presente en el paciente particular que se pretende tratar. Aparece un problema, por lo tanto, al seleccionar agentes terapéuticos apropiados por el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

15 La invención proporciona una solución al problema de seleccionar agentes terapéuticos apropiados para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer proporcionando un ensayo *in vitro* que puede usarse para evaluar la actividad de diferentes agentes en células tomadas del paciente que se desea tratar.

20 El hallazgo del inventor de que el fallo del control de transición G1/S no se restringe a neuronas en pacientes con enfermedad de Alzheimer, sino que también se produce en células periféricas, tales como linfocitos, ha conducido al desarrollo de un ensayo *in vitro* que puede usarse para identificar y seleccionar agentes que son eficaces en un paciente particular. La capacidad para seleccionar un agente que funcionará en un paciente dado mediante un ensayo *in vitro* sencillo es un desarrollo importante. Antes del desarrollo de esta exploración *in vitro*, simplemente no habría sido posible seleccionar un agente que tenga utilidad clínica en un paciente particular sin "ensayo y error" prolongado, no aceptable éticamente, en ese paciente.

25 En resumen, el desarrollo de una exploración *in vitro* que puede usarse para identificar agentes capaces de corregir los defectos reguladores del ciclo celular presentes en pacientes con Alzheimer ha hecho posible por primera vez proporcionar tratamiento eficaz y profilaxis para enfermedad de Alzheimer basándose en la prevención/inhibición de la reentrada en el ciclo celular y progresión al punto de transición G1/S o en la prevención/inhibición de la progresión de ciclo celular en el punto de transición G1/S.

30 Por lo tanto, en un primer aspecto la invención proporciona un método *in vitro* de seleccionar un agente farmacéutico para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en un paciente humano, comprendiendo dicho método:

35 (a) exponer células del paciente, siendo dichas células, células no neuronales que muestran un defecto regulador del ciclo celular en la transición de fase G1/S, a un panel de agentes farmacéuticos que son inhibidores conocidos de la reentrada en ciclo celular y progresión a la transición G1/S o inhibidores conocidos de la progresión del ciclo celular hasta el punto de transición G1/S,

40 (b) analizar la regulación de la transición G1/S de las células en presencia y ausencia de los agentes farmacológicos y

(c) identificar un agente que corrige el defecto regulador en la transición G1/S en las células, identificándose dicho agente como probablemente beneficioso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en el paciente.

45 También se describe un método para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer en un paciente humano que comprende administrar a un paciente humano que lo necesite una cantidad eficaz de un inhibidor de la reentrada en el ciclo celular y progresión a la transición G1/S.

50 Los inhibidores de la reentrada en el ciclo celular y progresión a la transición G1/S pueden actuar mediante diversos mecanismos, por ejemplo inhibición de la transición G0/G1 o inducción de detención del ciclo celular en la fase G0/G1.

55 Preferiblemente el inhibidor de la reentrada en el ciclo celular y progresión a la transición G1/S será una sustancia que, cuando se evalúa usando en un ensayo *in vitro* descrito en el presente documento, produce una corrección significativa del defecto regulador del ciclo celular en la transición G1/S en un paciente con Alzheimer, más preferiblemente el paciente con Alzheimer que se pretende tratar usando la sustancia.

60 Los inhibidores adecuados de reentrada en el ciclo celular y progresión a la transición G1/S también incluyen sustancias que causan una reducción significativa en los parámetros indicativos de defectos del ciclo celular (por ejemplo, supervivencia y proliferación celulares, apoptosis, prolongación relativa de la fase G1 del ciclo celular, prolongación relativa de la fase G2 del ciclo celular) y/o en parámetros indicativos de una patología de tipo AD (por ejemplo, expresión de la proteína precursora amiloide (APP), tau hiperfosforilada o PHF tau) en un modelo *in vitro* de AD, tal como la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.

65 Los inhibidores conocidos preferidos de la reentrada en el ciclo celular y progresión a la transición G1/S que pueden usarse de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen los siguientes:

NA22598-un fármaco antineoplásico que inhibe la transición G0/G1 (Kawada, M., Kuwahara, A., *et al.* (1999) *Exp Cell Res*, 249 (2): 240-247).

Valproato sódico y sus derivados-un inhibidor del crecimiento de las células de neuroblastoma humano y agente antiepiléptico conocido (Cinatl., Jr. Cinatl., J., *et al.* (1997) *Anticancer Drugs*, 8 (10): 958-963; Cinatl, J. Jr., Clinatl, J., *et al.* (1996) *Anticancer Drugs*, 7(7): 766-773).

Fasclaplisina-que inhibe específicamente cdk4 inhibiendo por lo tanto la transición G0/G1 (Soni, R., Muller, L., *et al.* (2000). *Biochem Biophys Res Comm*, 275(3): 877-884).

Brefeldina A-que induce detención del ciclo celular en la fase G0/G1 (Nojiri, H., Manya, H., *et al.* (1999) *FEBS Lett*, 453(1-2): 140-144).

También se describe en este documento el uso de al menos una sustancia, que es un inhibidor de la progresión del ciclo celular hasta el punto de transición G1/S, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedad de Alzheimer.

Se describe además un método para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer en un paciente humano que comprende administrar a un paciente humano que lo necesite una cantidad eficaz de un inhibidor de progresión del ciclo celular a través del punto de transición G1/S.

Los inhibidores de progresión del ciclo celular a través del punto de transición G1/S pueden actuar mediante diversos mecanismos. Por ejemplo, pueden bloquear la progresión del ciclo celular en G1, inducir la detención del ciclo celular en G1, inducir la detención del ciclo celular en el punto de control G1/S mediante diversas vías, bloquear la transición G1/S o inhibir la síntesis de ADN.

Preferiblemente el inhibidor de progresión del ciclo celular a través del punto de transición G1/S será una sustancia que, cuando se evalúa usando el ensayo *in vitro* descrito en el presente documento, produce una corrección significativa del defecto regulador del ciclo celular en la transición G1/S en un paciente con Alzheimer, más preferiblemente el paciente con Alzheimer que se pretende tratar usando la sustancia.

Los inhibidores adecuados de la progresión del ciclo celular a través del punto de transición G1/S también incluyen sustancias que provocan una reducción significativa en los parámetros indicativos de defectos del ciclo celular (por ejemplo, supervivencia y proliferación celular, apoptosis, prolongación relativa de la fase G1 del ciclo celular, prolongación relativa de la fase G2 del ciclo celular) y/o en parámetros indicativos de una patología de tipo AD (por ejemplo, expresión de la proteína precursora amiloide (APP), tau hiperfosforilada o PHF tau) en un modelo *in vitro* de AD, tal como la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.

Los inhibidores conocidos preferidos de la progresión del ciclo celular a través del punto de transición G1/S que pueden usarse de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen los siguientes, sin embargo esto no debe interpretarse como limitante de la invención a estas realizaciones específicas:

Esquamocina-una acetogenina anonácea, que bloquea la progresión del ciclo celular en la fase G1 (Raynaud, S., Nemat, F., *et al.* (1999) *Life Science*, 65(5): 525-533).

Aptámeros peptídicos que antagonizan funcionalmente la actividad E2F - son aptámeros peptídicos adecuados los que se describen y demuestran que son inhibidores del ciclo celular en G1 en Fabbrizio, E., Le Cam, L., *et al.* (1999) *Oncogene*, 18(30): 4357-4363.

Manumicina A-que se muestra que provoca detención en G1 (Wang, W. y Macaulay, R. J. (1999) *Int J Cancer*, 82(3): 430-434).

Indol carbazol K252-a- un compuesto que se ha demostrado que causa la detención del ciclo celular en el punto de control G1/S mediante p21 (Chin, L.S., Murray, S.F., *et al.* (1999) *Cancer Invest.*, 17(6): 391-395).

Oncostatina M e interleucina 6 en combinación-esta combinación de citocinas induce detención de ciclo celular en G1/S mediante p27 (Klausen, P., Pedersen, L., *et al.* (2000) *Oncogene*, 19 (32): 3675-3683).

Fenilbutirato 4 sódico-un agente que se ha usado durante muchos años en el tratamiento de defectos del ciclo de la urea y que se ha demostrado que causa detención del ciclo celular en G1 mediante p21 (McGrath-Morrow, S.A. y Stahl, J.L. (2000) *J Pharmacol Exp Ther*, 294(3): 941-947).

Retinoides y ligandos selectivos del receptor retinoide (por ejemplo ligandos que emulan el efecto de la unión del ácido retinoico al receptor retinoide, por ejemplo, Targretina)-los retinoides adecuados incluyen ácido retinoico, que se ha demostrado que media en la detención del ciclo celular en G1 (Hsu, S.L., Hsu, J.W. *et al.* (2000) *Exp Cell Res*, 258(2): 322-331).

Ansamicinas-se ha demostrado que miembros de la clase de antibióticos ansamicina inhiben el crecimiento de líneas celulares tumorales humanas *in vitro*. Las ansamicinas adecuadas incluyen tiazinotrienomicina B (TT-B), que se ha demostrado que inhibe la progresión del ciclo celular de G0/G1 a S (Hosokawa, N., Yamamoto, S., *et al.* (1999) *J. Antibiot*, 52(5): 485-490; Hosokawa, N., Naganawa, H. *et al.* (2000) *J. Antibiot*, 53(9): 886-894) y compuestos relacionados tales como, por ejemplo, herbimicina y geldanamicina.

Análogos de vitamina D- los análogos adecuados incluyen, sin limitación, los compuestos EB1089 y CB1093, que se ha demostrado que causan detención del ciclo celular en la fase G0/G1 (Pettersson, F., Colston, K.W., *et al.* (2000) *Br J Cancer*, 83 (2): 239-245).

Glucocorticoides-los glucocorticoides adecuados incluyen, sin limitación, el glucocorticoide sintético dexametasona, que se ha demostrado que induce detención del ciclo celular en G1 mediante p27 y p57 (Samuelsson, M.K., Pazirandeh, A., *et al.* (1999) *Mol Endocrinol*, 13(11): 1811-1822).

Antagonistas del receptor alfa adrenérgico-los ejemplos adecuados incluyen el antagonista del receptor alfa1 adrenérgico doxazosina, que se ha demostrado que induce la detención del ciclo celular en G1 mediante p27 (Kintsher, U., Kon, D., *et al.* (2001) *J Cardiovasc Pharmacol*, 37(5): 532-539, Kintsher, U., Wakino, S., *et al.* (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(5): 1216-1224).

Quelantes de hierro-los ejemplos adecuados incluyen EDTA, dextrazoxano, el quelante de hierro sintético O-Trensox y desferrioxamina, ambos de los cuales se ha demostrado que bloquean la transición G1/S (Rakba, N., Loyer, P., *et al.* (2000) *Carcinogenesis*, 21(5): 943-951) y también quelantes de hierro de aroilhidrazona de la clase piridoxal isonicotinoil hidrazona, tales como los que se demuestra en Becker, E. y Richardson, D.R. (1999) *J Lab Clin Med*, 134(5): 510-521 que son mediadores de la detención del ciclo celular en G1/S.

Antagonistas del receptor de angiotensina II-los ejemplos adecuados incluyen bradiquinina, que se sabe que inhibe la síntesis de ADN (Patel, K.V. y Schrey, M.P. (1992) *Cancer Res*, 52(5): 334-340).

Fármacos quimioterapéuticos inmunosupresores-los ejemplos adecuados son Doxorubicina, Adriamicina, Rapamicina, Ciclosporina A, FK506 (Tacrolimus) y compuestos de la familia de prodigiosina. Se sabe que todos estos fármacos inmunosupresores promueven la inhibición de G1 mediante p21 y p27.

Melatonina-que se sabe que induce inhibición de G1/S (Urata, Y., Honma, S., *et al.* (1999) *Free Radic Biol Med*, 27(7-8): 838-847).

Los agentes anteriores también pueden usarse en combinación para conseguir el efecto terapéutico deseado. Ciertas combinaciones de agentes pueden actuar de forma cooperativa, aditiva o sinérgica, cuando se administran juntos o cuando se administran de forma secuencial. Las combinaciones adecuadas de agentes pueden determinarse ensayando en las pruebas *in vitro* descritas en el presente documento. Por ejemplo, pueden identificarse/evaluarse combinaciones que son generalmente eficaces para reducir los indicadores de patología de AD ensayando en células de neuroblastoma SH-SY5Y. Para identificar combinaciones preferidas de agentes que son eficaces en un paciente particular puede hacerse uso de los ensayos *in vitro* descritos en los Ejemplos 1 y 2, basándose en los ensayos con respecto a efectos en la regulación de la transición G1/S en células no neuronales tomadas del paciente que se pretende tratar.

Una combinación preferida de agentes es doxorubicina con rapamicina. Más preferiblemente los dos agentes se administran de forma secuencial, rapamicina seguida de doxorubicina. Como se ilustra en los Ejemplos adjuntos, un tratamiento combinado con rapamicina y doxorubicina tiene un fuerte efecto protector contra la acumulación de proteínas relacionadas con AD. Una combinación preferida adicional es dextrazoxano con doxorubicina. De nuevo los dos agentes se administran preferiblemente de forma secuencial, dextrazoxan seguida de doxorubicina. Como se ilustra en los Ejemplos adjuntos, el tratamiento con dextrazoxano seguido de doxorubicina mejora la protección contra la expresión de proteínas relacionadas con AD. Estas combinaciones preferidas se enumeran únicamente como ejemplo y no se pretende que sean limitantes de la invención.

Se describe adicionalmente en este documento el uso de sales farmacéuticamente aceptables de los agentes enumerados anteriormente y a derivados de los agentes enumerados que conservan la actividad deseada de inhibición de la reentrada en el ciclo celular y progresión al punto de transición G1/S o inhibición de la progresión del ciclo celular en el punto de transición G1/S. Los derivados que conservan sustancialmente la misma actividad que el material de partida o más preferiblemente muestran una actividad mejorada, pueden producirse de acuerdo con los principios convencionales de la química médica, que se conocen en bien en la técnica. Tales derivados pueden mostrar un grado menor de actividad que el material de partida, siempre que conserven suficiente actividad para ser terapéuticamente eficaces. Los derivados pueden mostrar mejoras en otras propiedades que son deseables en los agentes activos farmacéuticos tales como, por ejemplo, solubilidad mejorada, toxicidad reducida, captación en el cerebro potenciada, etc.

Los agentes enumerados anteriormente, o sales o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden formularse en formas de dosificación farmacéuticas, junto con vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, tales como diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, solubilizantes, etc. La forma de dosificación puede contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables para modificar las condiciones tales como pH, osmolaridad, sabor, viscosidad, esterilidad, lipofilia, solubilidad, etc.

Las formas de dosificación adecuadas incluyen formas de dosificación sólidas, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos dispersables, obleas y supositorios, incluyendo formulaciones de liberación prolongada y liberación retardada. Los polvos y comprimidos generalmente comprenderán de aproximadamente 5% a aproximadamente 70% de principio activo. Los vehículos y excipientes sólidos adecuados se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, etc. Los comprimidos, polvos, obleas y cápsulas son todas formas de dosificación adecuadas para administración oral.

Las formas de dosificación líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Las preparaciones de forma líquida pueden administrarse por inyección o infusión intravenosa, intracerebral, intraperitoneal, parenteral o intramuscular. Las formulaciones inyectables estériles pueden comprender una solución o suspensión estéril del agente activo en un diluyente o disolvente no tóxico, farmacéuticamente aceptable. Los diluyentes y disolventes adecuados incluyen agua estéril, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónica, etc. Las formas de dosificación líquida también incluyen soluciones o pulverizaciones para administración intranasal.

Las preparaciones en aerosol adecuadas para inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un gas comprimido inerte.

También se abarcan formas de dosificación para administración transdérmica, incluyendo cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones. Estas formas de dosificación pueden incluirse en parches transdérmicos de tipo matriz o depósito, que se conocen generalmente en la técnica.

Las preparaciones farmacéuticas pueden prepararse convenientemente en forma de dosificación unitaria, de acuerdo con procedimientos convencionales de la formulación farmacéutica. La cantidad de compuesto activo por dosis unitaria puede variarse de acuerdo con la naturaleza del compuesto activo y del régimen de dosificación pretendido. Generalmente ésta estará dentro del intervalo de 0,1 mg a 1000 mg.

“Tratar” o “tratamiento” como se usa en el presente documento en referencia a la enfermedad de Alzheimer describe el tratamiento o cuidado de un paciente con el fin de combatir la enfermedad e incluye la administración del agente activo para evitar la aparición de los síntomas o complicaciones, es decir, profilaxis. La expresión “paciente con enfermedad de Alzheimer” abarca a individuos en todas las etapas de la enfermedad, incluyendo individuos asintomáticos que no manifiestan señales clínicas de AD, pero a los que se les ha diagnosticado como portadores de una anomalía que se espera que conduzca al desarrollo de síntomas clínicos en ausencia de tratamiento preventivo/profiláctico. Esto incluye individuos diagnosticados como portadores de un defecto regulador del ciclo celular en la transición G1/S e individuos identificados como portadores de mutaciones/variaciones genéticas de los genes reguladores del ciclo celular y/o reparadores de ADN asociados con el desarrollo de AD esporádica.

Los agentes activos deben administrarse a sujetos humanos en “cantidades terapéuticamente eficaces”, que pretende referirse a una dosificación suficiente para proporcionar un resultado médico deseable en el paciente. En la enfermedad de Alzheimer, una cantidad eficaz es una cantidad que proporciona una corrección significativa de la transición G1/S con defecto regulador del ciclo celular dentro de las neuronas del paciente. La dosificación exacta y la frecuencia de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de agente activo variará, dependiendo de tales factores como la naturaleza de la sustancia activa, la forma de dosificación y vía de administración. Un facultativo médico generalmente determinará el régimen de dosificación apropiado para un paciente dado teniendo en cuenta tales factores como la gravedad de la enfermedad y la edad, peso y condición física general del paciente y la duración pretendida del tratamiento como apreciarán los expertos en la materia.

En la enfermedad de Alzheimer se prevé que el tratamiento se administrará de forma continua durante un periodo largo de tiempo para evitar o ralentizar el desarrollo de patología de tipo AD en el cerebro. Las formas de dosificación oral se prefieren particularmente para terapia a largo plazo y tratamiento profiláctico debido a su conveniencia para el paciente.

Muchos de los agentes preferidos enumerados anteriormente son fármacos reguladores del ciclo celular que se han conocido previamente para su uso como agentes antineoplásicos/quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer. Para su uso como antineoplásicos, dichos agentes se administran generalmente en dosis muy altas durante un período limitado de tiempo, teniendo en cuenta su citotoxicidad a largo plazo. En el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, dichos agentes generalmente se administrarán a una dosificación mucho menor, puesto que se desea revertir de forma selectiva los defectos reguladores del ciclo celular en las neuronas y no en otras células en división activa. Puede hacerse uso de formulaciones de liberación retardada, lenta o prolongada o formulaciones dirigidas específicamente al cerebro para conseguir la dosificación correcta.

Exploración *in vitro* para identificar compuestos que afectan a la transición G1/S

Para identificar compuestos que tienen un efecto de regulación en la transición G1/S y por lo tanto tienen una utilidad potencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, puede realizarse una exploración *in vitro* sencilla usando células cultivadas que muestran un defecto regulador del ciclo celular en la transición de fase G1/S. Las células se exponen a una muestra del compuesto y después se analiza el efecto del compuesto en la regulación del ciclo celular en G1/S. Los compuestos que corrigen el defecto regulador del ciclo celular en la transición G1/S se puntúan como con actividad farmacológica potencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La exploración puede realizarse usando esencialmente cualquier célula que muestre un defecto regulador del ciclo celular en la transición de fase G1/S análogo al observado en las neuronas en la enfermedad de Alzheimer. Las células adecuadas pueden incluir linfocitos cultivados derivados de un individuo o varios individuos, que tengan la enfermedad de Alzheimer. De este modo, la misma metodología puede usarse como la base de una exploración de compuestos para identificar agentes que tienen utilidad potencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer; o puede usarse para ensayar agentes que se sabe que tienen utilidad potencial en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer contra células tomadas de un paciente con Alzheimer particular para identificar el agente o los agentes que tienen más probabilidad de ser eficaces en ese paciente particular. Como se ha analizado anteriormente, pacientes diferentes responderán al tratamiento con diferentes agentes, dependiendo de la naturaleza concreta del defecto que subyace en la regulación del ciclo celular anómala en ese paciente.

Se describen métodos para ensayar si una célula muestra un defecto regulador en la transición de fase G1/S como se describe en los Ejemplos adjuntos. Se usa metodología similar como la base del método de exploración para analizar la regulación de la transición G1/S en presencia y ausencia de los compuestos candidatos.

Las células que muestran un defecto regulador en la transición G1/S se exponen a compuestos candidatos y se evalúa el efecto del compuesto candidato en la regulación de la transición G1/S en referencia a controles adecuados, por ejemplo, células no expuestas a ningún compuesto de ensayo. En una exploración típica el compuesto candidato se ensayará a una serie de concentraciones diferentes, incluyendo un control de concentración cero. Los compuestos que restaura la regulación "normal" en la transición G1/S son potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer. Este método puede usarse para establecer si los compuestos que son inhibidores conocidos de la reentrada en el ciclo celular y progresión a la transición G1/S o inhibidores conocidos de la progresión del ciclo celular a través del punto de transición G1/S de otros sistemas experimentales son eficaces en células que presentan el defecto presente en la enfermedad de Alzheimer.

La metodología de exploración básica también puede adaptarse para su uso en la evaluación de la eficacia de una forma de tratamiento para la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo para ensayar el efecto de un agente farmacológico particular en la regulación del ciclo celular.

En una variación útil, el método puede usarse específicamente para determinar si es probable que un agente farmacológico dado sea beneficioso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un individuo humano particular. En este caso el ensayo se realiza usando células no neuronales del individuo que muestran un defecto regulador del ciclo celular en la transición de fase G1/S, más preferiblemente linfocitos cultivados. Las células se ensayan con respecto a la presencia del defecto en regulación en la transición de fase G1/S en presencia o ausencia del agente farmacológico. Los agentes farmacológicos que dan como resultado la "corrección" del defecto regulador en la transición G1/S se identifican como probablemente beneficiosos en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en el individuo. Mediante "corrección" se entiende un grado significativo de restablecimiento de la regulación de ciclo celular normal. Esto puede evaluarse en referencia a células control, por ejemplo células del mismo tipo tomadas de un individuo control de la misma edad que no tiene enfermedad de Alzheimer o cualquier prueba de un defecto regulador en la transición G1/S o cualquier defecto genético/variación alélica en los genes reguladores del ciclo celular y/o genes de reparación de ADN de los que se podría esperar que le predispusieran a la enfermedad de Alzheimer.

En una realización específica, la invención proporciona un método para seleccionar un agente farmacéutico para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un paciente humano, comprendiendo dicho método:

(a) exponer las células del paciente, siendo dichas células células no neuronales que muestran un defecto regulador de ciclo celular en la transición de fase G1/S, a un grupo de agentes farmacéuticos que son inhibidores conocidos de la reentrada en ciclo celular y progresión a la transición G1/S o inhibidores conocidos de la progresión del ciclo celular a través del punto de transición G1/S,

(b) analizar la regulación de la transición G1/S de las células en presencia y ausencia de los agentes farmacológicos y

(c) identificar un agente que corrige el defecto regulador en la transición G1/S de las células, identificándose dicho agente como probablemente beneficioso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en el paciente.

Este método puede realizarse usando esencialmente cualquier célula no neuronal que muestre un defecto regulador del ciclo celular en la transición de fase G1/S análogo al observado en las neuronas en la enfermedad de Alzheimer. Las células adecuadas pueden incluir linfocitos cultivados derivados del paciente con Alzheimer del ensayo.

- 5 Puede realizarse el “análisis” de la regulación de la transición G1/S usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento como adecuados para exploración de compuestos que influyen en el defecto regulador del ciclo celular en G1/S. De forma ventajosa, el método usado para el análisis de la regulación de la transición de fase G1/S será uno que pueda realizarse en placas de microtitulación de múltiples pocillos, permitiendo que se ensayen múltiples agentes farmacéuticos y múltiples concentraciones en paralelo en un formato de rendimiento medio-alto. El método más preferido adecuado para su uso en un formato de rendimiento medio-alto es el ensayo de proliferación celular.

También se describe un método para explorar compuestos con respecto a actividad farmacológica potencial en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho método:

- 15 poner en contacto células de neuroblastoma SH-SY5Y con compuestos candidatos y ensayar con respecto al menos a un parámetro indicativo de patología de enfermedad de Alzheimer seleccionado de:

- 20 (i) Supervivencia y proliferación celular
(ii) Apoptosis
(iii) Prolongación relativa de la fase G1 del ciclo celular
(iv) Prolongación relativa de la fase G2 del ciclo celular
(v) Expresión de la proteína precursora amiloide (APP)
(vi) Expresión de la proteína tau hiperfosforilada de tipo AD
25 (vii) Expresión de la proteína PHF tau de tipo AD

en el que los compuestos candidatos que causan una reducción en el parámetro o los parámetros ensayados, en comparación con células control no expuestas al compuesto candidato, se puntúan como con actividad farmacológica potencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

- 30 Las células SH-SY5Y proporcionan un modelo *in vitro* de patología de AD, que puede usarse para identificar compuestos que tienen un efecto significativo en la reducción de patología de AD y por lo tanto son útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El lector experto apreciará que pueden llevarse a cabo exploraciones equivalentes usando células distintas de células SH-SY5Y, particularmente otras células de neuroblastoma, que muestran características similares, por ejemplo expresión de APP y tau hiperfosforilada. Las características preferidas del ensayo se describen en los Ejemplos adjuntos.

- 35 No existe limitación en los tipos de compuestos candidatos a ensayar en los métodos de exploración de la invención. El método puede usarse para ensayar esencialmente cualquier compuesto que se desee explorar por sus efectos en la patología de AD. Los compuestos candidatos pueden incluir compuestos que tienen una actividad farmacológica o bioquímica conocida, compuestos que no tienen dicha actividad identificada y moléculas o bibliotecas de moléculas completamente nuevas tales como las que pueden generarse por química combinatoria.

- 40 En una aplicación preferida, el método puede usarse para ensayar inhibidores conocidos de reentrada en el ciclo celular y progresión a la transición G1/S e inhibidores conocidos de la progresión del ciclo celular a través del punto de transición G1/S en un modelo de AD para confirmar su utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La invención se entenderá adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos experimentales, junto con las Figuras adjuntas en las que:

- 50 La Figura 1 ilustra los efectos de los fármacos inhibidores de ciclo celular y la tensión oxidativa en la supervivencia y proliferación celular, según se midió usando un ensayo de proliferación de MTT. Rapa-células tratadas con rapamicina, Doxo-células tratadas con doxorubicina, DexRaz-células tratadas con dextrazoxano, d1-día 1, d2-día 2. En el panel 1b, las células se someten a tensión oxidativa solamente o después de un pretratamiento con rapamicina o dextrazoxano. En el panel 1c las células se trataron con doxorubicina solamente o después del tratamiento con rapamicina o dextrazoxano.

- La Figura 2 ilustra los efectos de fármacos inhibidores del ciclo celular y tensión oxidativa en la apoptosis, según se midió usando un análisis de FACS.

- 60 La Figura 3 ilustra los efectos de los fármacos inhibidores del ciclo celular y la tensión oxidativa en la duración de la fase G1 del ciclo celular, el eje y es la prolongación relativa de la fase G1 del ciclo celular expresada como porcentaje.

- 65 La Figura 4 ilustra los efectos de los fármacos inhibidores del ciclo celular y la tensión oxidativa en la duración de la fase G2 del ciclo celular, el eje y es la prolongación relativa de la fase G3 del ciclo celular expresada

como porcentaje.

La Figura 5 ilustra los efectos de los fármacos inhibidores del ciclo celular y la tensión oxidativa en la expresión de APP, el eje y es el aumento porcentual de la cantidad de proteína en relación con el cultivo control no tratado. Los valores absolutos usados para realizar este análisis derivaron de medidas de densidad óptica (DO) obtenidas del ensayo ELISA realizado.

La Figura 6 ilustra los efectos de fármacos inhibidores del ciclo celular y tensión oxidativa en la expresión de tau hiperfosforilada de tipo AD, el eje y es el aumento porcentual en la cantidad de proteína en relación con cultivo control no tratado. Los valores absolutos usados para realizar este análisis derivaron de medidas de densidad óptica (DO) obtenidas del ensayo ELISA realizado.

La Figura 7 ilustra los efectos de los fármacos inhibidores del ciclo celular y la tensión oxidativa en la expresión de PHF tau de tipo AD, el eje y es el aumento porcentual en la cantidad de proteína en relación con cultivo control no tratado. Los valores absolutos usados para realizar este análisis derivaron de medidas de densidad óptica (DO) obtenidas del ensayo ELISA realizado.

Ejemplo 1 - Procedimientos usados para ensayar con respecto a la presencia de un defecto regulador del ciclo celular en la transición G1/S

Los siguientes métodos para ensayar con respecto a la presencia de un defecto regulador del ciclo celular en la transición G1/S pueden usarse "de forma diagnóstica" para ensayar si una célula dada muestra el defecto regulador y puede también formar la base de los métodos de exploración de compuestos. Para las aplicaciones de exploración de compuestos, los compuestos candidatos pueden añadirse antes de tratar las células para inducir división celular y provocar la detención del ciclo celular.

Método (A): (i) inducir la división de las células (por ejemplo, añadiendo un estímulo mitogénico, por ejemplo uno o más factores de crecimiento), después (ii) provocar la detención del ciclo celular añadiendo una sustancia inhibidora de la división celular (más preferiblemente un inhibidor específico de G1, por ejemplo rapamicina) y (iii) ensayar la respuesta de los mecanismos reguladores del ciclo celular de G1/S de las células a la adición de la sustancia inhibidora de la división celular, en presencia o ausencia de un compuesto candidato.

o

Método (B): (i) inducir la división de las células (por ejemplo, mediante la adición de un estímulo mitogénico, por ejemplo uno o más factores de crecimiento), después (ii) exponer las células a un estímulo que induce detención del ciclo celular en G1 (por ejemplo, radiación ionizante, hipoxia, radiación UV, etc.) y (iii) ensayar la respuesta de los mecanismos reguladores del ciclo celular G1/S de las células a la adición del estímulo que provoca la detención del ciclo celular, en presencia o ausencia de un compuesto candidato.

La lógica detrás de (A) y (B) es estimular primero las células para que se dividan, después intentar detener el ciclo celular en la etapa G1 usando un inhibidor de división celular (método (A)) u otro estímulo que provoque detención del ciclo celular (método (B)) y después evaluar el efecto de dicho tratamiento en el sistema regulador del ciclo celular. El efecto en la regulación del ciclo celular puede evaluarse mediante una diversidad de medios diferentes, como se discute posteriormente. El tratamiento con un inhibidor de división celular (método (A)) u otro estímulo que induce la detención del ciclo celular (método (B)) se denomina en el presente documento "tratamiento inhibidor del ciclo celular" o "tratamiento inhibidor". Si está presente un defecto regulador del ciclo celular en la transición G1/S entonces éste afectará a la capacidad de respuesta de las células al intento de detención del ciclo celular. En general, la presencia de un defecto regulador del ciclo celular en G1/S da como resultado una respuesta reducida al "tratamiento inhibidor" con un inhibidor de división celular u otro estímulo que induce la detención de ciclo celular en G1, es decir, el tratamiento inhibidor es menos eficaz en la detención del ciclo celular en el punto de control G1/S en células con dicho defecto.

Pueden implementarse diversos enfoques antes y después de la adición del estímulo mitogénico para inducir división celular o antes y después del intento de detención del ciclo celular, para ensayar la capacidad de respuesta de las células al tratamiento inhibidor del ciclo celular. Se enumeran a continuación enfoques preferidos como ejemplo:

(1) Ensayo de proliferación realizado para evaluar si la detención del ciclo celular se ha producido y hasta qué punto como resultado del tratamiento inhibidor.

El ensayo de proliferación puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquiera de los protocolos convencionales conocidos en la técnica. Un ejemplo particularmente adecuado es el ensayo de supervivencia de MTT (disponible en el mercado de Chemicon International Ltd, véase Mosmann, T. en J. Immunol. Methods, 1983, vol.: 65, 55-63).

En una exploración típica, los ensayos de proliferación se realizan en ambas células tratadas con un inhibidor

de división celular (método (A)) u otro estímulo que induce una detención del ciclo celular (método (B)) y células control no tratadas del mismo sujeto, en presencia de concentraciones diversas del compuesto candidato. Puesto que el tratamiento inhibitor (usando un método (A) o (B)) será eficaz solamente en presencia de un sistema regulador G1/S intacto, la diferencia en el grado de proliferación entre las células tratadas y no tratadas será significativamente menor en los pacientes con enfermedad de Alzheimer (que carecen de una regulación eficaz en G1/S) que en individuos control de la misma edad. En general, un cambio pequeño o inexistente en la actividad proliferativa de células del sujeto en presencia del tratamiento inhibitor indica una respuesta reducida a inhibición del ciclo celular en la fase G1 y, por lo tanto, la presencia de un defecto regulador en la transición G1/S. Los compuestos candidatos que causan una reducción de la actividad proliferativa en células de un paciente particular con Alzheimer en presencia de un tratamiento inhibitor se puntúan como potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en ese paciente, debido a que son capaces de evitar la progresión a través del ciclo celular en células del paciente con Alzheimer.

(2) Calcular la prolongación relativa de la fase G1 del ciclo celular en células del sujeto como resultado de exposición a un inhibitor de división celular o estímulo que induce la detención del ciclo celular.

La prolongación relativa de la fase G1 como resultado de exposición a un inhibitor de división celular (método (A)) o estímulo que induce detención de ciclo celular (método (B)) se calcula usando la fórmula $R_L = 100f/100$ (expresado como un porcentaje). "f" es la relación del tiempo en G1 para células (células no neuronales del sujeto ensayado) expuestas a tratamiento inhibitor con el inhibitor de división celular o estímulo que induce la detención del ciclo celular ($TG1_{tr}$) frente al tiempo en G1 para células control no tratadas (es decir, también células no neuronales del sujeto del ensayo) no expuestas a tratamiento inhibitor ($TG1_c$). f puede calcularse de acuerdo con la siguiente relación:

$$f = TG1_{tr}/TG1_c = [\ln 2 - \ln (2 - G1_{tr})] [\ln (2 - G1_c)] / [\ln (2 - G1_{tr})] [\ln 2 - \ln (2 - G1_c)]$$

(Darzynkiewicz, Z. (1993) en Fantes P y Brooks R (eds.) The cell cycle. Oxford University Press, Oxford, págs. 43-68). Pueden emplearse diversas técnicas para obtener los valores de $TG1_{tr}$ y $TG1_c$. En una realización preferida $TG1_{tr}$ y $TG1_c$ pueden obtenerse determinando la proporción de células en las diversas fases del ciclo celular para células tratadas (células no neuronales del sujeto de ensayo tratadas con la sustancia inhibitor de división celular o estímulo que induce detención del ciclo celular) y células control no tratadas (células no neuronales del mismo sujeto no expuestas a la sustancia inhibitor de división celular o estímulo que induce detención del ciclo celular), en presencia de diversas concentraciones del compuesto candidato. La proporción de células en las diversas fases del ciclo celular puede determinarse fácilmente mediante la incorporación de un análogo de nucleótido marcado, preferiblemente bromodesoxiuridina (BrdU), seguido de clasificación celular activada por fluorescencia (análisis FACS) o equivalente, como se describe en detalle en el Ejemplo 2.

La presencia de un detector regulador del ciclo celular en la transición de fase G1/S está indicada por una reducción de la prolongación relativa de la fase G1 en presencia de la sustancia o estímulo inhibidores de la división celular en células del sujeto con Alzheimer, en comparación con células control que no tienen un defecto regulador del ciclo celular en la transición de fase G1/S (por ejemplo, células del mismo tipo tomadas de un individuo control de la misma edad que no tiene enfermedad de Alzheimer o cualquier prueba de un defecto regulador en la transición G1/S o cualquier defecto genético/variación alélica que podría esperarse que le predisponga a la enfermedad de Alzheimer). Las células control que no tienen un defecto regulador del ciclo celular en la transición de fase G1/S no deben confundirse con las células "control no tratadas" usadas para el cálculo de R_L , que son células del sujeto de ensayo que no se han expuesto al tratamiento inhibitor.

Los compuestos candidatos que provocan un aumento en la prolongación relativa de la fase G1 en células de un paciente particular con Alzheimer en presencia de tratamiento inhibitor se puntúan como potencialmente útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en ese paciente, debido a que son capaces de evitar la progresión a través del ciclo celular en células del paciente con Alzheimer.

(3) Evaluación de la proteína reguladora del ciclo celular o expresión de ARNm.

La expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular puede evaluarse usando técnicas convencionales bien conocidas en la materia, tales como, por ejemplo, inmunotransferencia, transferencia de western, ELISA o métodos relacionados. La evaluación de la expresión de los ARNm correspondientes que codifican las proteínas reguladoras del ciclo celular también puede conseguirse por medio de métodos convencionales tales como, por ejemplo, técnicas de hibridación, análisis de "microplaca de ADN" o métodos relacionados o técnicas basadas en amplificación tales como RT-PCR, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), etc. Los expertos en la materia conocerán bien los métodos adecuados para la detección/cuantificación de ARNm que pueden usarse de acuerdo con la invención. Algunos de estos métodos, por ejemplo RT-PCR, se basan en la detección/cuantificación de una copia de ADNc del ARNm pertinente.

El defecto regulador del ciclo celular presente en la enfermedad de Alzheimer puede dar como resultado cambios en el patrón de expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular y sus ARNm correspondientes. La exploración con respecto a cambios en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular particulares y/o los ARNm correspondientes puede usarse por lo tanto de forma diagnóstica para indicar la presencia de un defecto regulador del ciclo celular en G1/S. Además, la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular puede usarse como un marcador de la progresión a través del ciclo celular. Por lo

tanto, la respuesta de células al tratamiento inhibitor (usando método (A) o método (B), descritos anteriormente) puede evaluarse observando la expresión de una o más proteínas reguladoras del ciclo celular, para determinar hasta que punto el tratamiento inhibitor provoca detención del ciclo celular en células del sujeto de ensayo. Las proteínas reguladoras del ciclo celular adecuadas incluyen, sin limitación, CDKN3, p15ink4B, p16ink4A, p19ink4D, p27kip1, p21cip1, p57kip2 y TP53. Las secuencias completas de ADNc y aminoácidos para estas proteínas están disponibles públicamente: una lista de los números de acceso OMIM para estas proteínas se proporciona posteriormente. Los anticuerpos útiles en la detección de cada una de estas proteínas están disponibles en el mercado o pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la materia.

Los compuestos candidatos que provocan que el perfil de expresión de proteínas y/o de ARNm para proteínas reguladoras del ciclo celular en células de un paciente particular con Alzheimer se asemeje al de una célula "normal" con regulación intacta en la transición G1/S, se puntúan como potencialmente útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en ese paciente, debido a que son capaces de evitar la progresión a través del ciclo celular en células del paciente con Alzheimer.

(4) Evaluación de la viabilidad celular y muerte celular por cualquier método conocido en la técnica.

Cuando se detiene una célula proliferativa en la transición G1/S puede aparecer uno de dos posibles fenómenos "cadena bajo", diferenciación o muerte celular programada. Estos fenómenos cadena abajo pueden usarse como una indicación de la presencia en una población celular de un defecto regulador en la transición G1/S, puesto que si la regulación de la transición G1/S es defectiva entonces los efectos cadena abajo de la detención del ciclo celular en G1/S también serán anómalos. Un grado menor de muerte celular o grado mayor de viabilidad celular en respuesta al tratamiento inhibitor (usando método (A) o método (B)) en células de un sujeto de ensayo, en comparación con células control, se toma como una indicación de que el sujeto tiene enfermedad de Alzheimer. Los compuestos candidatos que causan un mayor grado de muerte celular o menor grado de viabilidad celular en respuesta a tratamiento inhibitor (usando método (A) o método (B)) en células de un paciente particular con Alzheimer se puntúan como potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en ese paciente.

(5) Evaluación de la expresión de proteínas o ARNm relacionados con muerte celular (que la inducen o la evitan) usando técnicas convencionales conocidas en la materia.

En este enfoque, la expresión de proteínas relacionadas con muerte celular, o los ARNm correspondientes, se usa como una valoración indirecta de los efectos cadena bajo del tratamiento inhibitor con un inhibitor de la división celular (método (A)) o un estímulo que induce la detención del ciclo celular en la transición G1/S (método (B)). Las proteínas relacionadas con muerte celular adecuadas incluyen, por ejemplo, miembros de la familia bcl-2 de proteínas, de las que muchas se conocen en la técnica. El anticuerpo monoclonal para Bcl-2 está disponible en el mercado de Sigma Corp o puede prepararse de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la materia.

Los compuestos candidatos que provocan que el perfil de expresión de proteínas y/o ARNm para proteínas relacionadas con muerte celular en células de un paciente particular con Alzheimer se asemejen al de una célula "normal" con regulación intacta en la transición G1/S, se puntúan como potencialmente útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en ese paciente.

(6) Evaluación de la expresión de proteínas de elementos de respuesta al daño de ADN o los ARNm correspondientes usando técnicas convencionales.

Este enfoque puede usarse cuando el estímulo usado para inducir la detención del ciclo celular en G1/S es daño de ADN, por ejemplo tratamiento con un agente químico que causa daño de ADN o exposición a radiación UV. En circunstancias normales la presencia de daño de ADN inducirá la detención de la célula en la transición de fase G1/S y la tentativa de reparación del ADN dañado mediante activación de vías de respuesta a daño de ADN. Las alteraciones en el patrón de expresión en las proteínas implicadas en la respuesta normal a daño de ADN o los ARNm correspondientes, en respuesta a la presencia de ADN dañado puede por lo tanto usarse como una indicación de la presencia de un defecto regulador del ciclo celular en la transición de fase G1/S. Los elementos de respuesta a daño de ADN adecuados incluyen, por ejemplo, TP53, Gadd34, Gadd45A (126335), Gadd45B(604948), Gadd45G(604949), Gadd153(126337) y PCNA (176740). Posteriormente se proporciona una lista de los números de acceso OMIM para estos elementos de respuesta al daño de ADN. Los anticuerpos específicos para estas proteínas están disponibles, o pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la materia.

Los compuestos candidatos que provocan que el perfil de expresión de proteínas y/o ARNm para elementos de respuesta de daño de ADN en células de un paciente particular con Alzheimer se asemeje al de una célula "normal" con regulación intacta en la transición G1/S, se puntúan como potencialmente útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en ese paciente.

(7) Evaluación del contenido de ADN de las células no neuronales, con o sin análisis de ciclo celular.

En este enfoque, la medida del contenido de ADN de las células del sujeto de ensayo tratado con un inhibitor de la división celular (método (A) u otro estímulo que induce la detención del ciclo celular (método (B)) proporciona una indicación indirecta de la presencia de un defecto regulador en la transición G1/S en dichas células. La lógica detrás de este método es la diferencia del contenido de ADN entre las células en la fase G1 y las células en la fase G2 que han pasado a través de la etapa de replicación de ADN del ciclo celular. Cuando una población de células normales (es decir, sin un defecto regulador en G1/S) se tratan para inducir una detención del ciclo celular en G1 o en G1/S, la mayoría de las células permanecerán en la fase G1. Sin embargo, si las células tienen un defecto regulador en

G1/S, una proporción de las células pasará a través del punto de control G1/S y experimentará replicación de ADN. De este modo un contenido de ADN aumentado en células de un sujeto de ensayo, en comparación con células control que no tienen un defecto regulador en G1/S, después del tratamiento para inducir detención del ciclo celular en G1 se toma como un indicio de la presencia de un defecto regulador en G1/S.

- 5 Los compuestos candidatos que provocan una disminución del contenido de ADN en células de un paciente particular con Alzheimer expuesto a tratamiento inhibitor (en comparación con células control no expuestas a un compuesto candidato control o compuesto candidato control cero), se puntúan como potencialmente útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en ese paciente, porque son capaces de evitar la progresión a través del ciclo celular en las células del paciente con Alzheimer.
- 10

Números de acceso OMIM para proteínas reguladoras del ciclo celular ejemplares y elementos de respuesta a daño de ADN:

Gen/proteína	Número de acceso
CDKN3	123832
p15ink4B	600431
p16ink4A	600160
p19ink4D	600927
p27kip1	600778
p21cip1	116899
p57kip2	600856
TP53	191170
Gadd45A	126335
Gadd45B	604948
Gadd45G	604949
Gadd153	126337
PCNA	176740
Ku70	152690
KU80	194364
Ku86	604611
NDHII	603115
BLM	604610
RECQL	600537
RECQL4	603780
RECQL5	603781

- 15 La bibliografía clave para estas proteínas es la siguiente:

CDKN3: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 3, también conocido como interaccionador de quinasa dependiente de ciclina 1 (CDI1), Gyuris, J. *et al.* Cell 75: 791-803, 1993; Hannon, G.J. *et al.* Proc Natl Acad. Sci. Estados Unidos 91: 1731 -1735,1994.

- 20 p15ink4B: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2B, también conocido como CDKN2B, MTS2, TP15, Hannon, G.J. y Beach, D. Nature 371: 257-261, 1994; Quelle, D.E. *et al.* Oncogene 11: 635-645, 1995; Stone, S. *et al.* Oncogene 11: 987-991, 1995. El anticuerpo para P15 está disponible en el mercado de BD Biosciences Clontech.

- 25 p16ink4A: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A, también conocido como CDKN2A, MTS1, TP16, Quelle, D.E. *et al.* Oncogene 11: 635-645, 1995; Kamb, A. *et al.* Science 264: 436-440, 1994; Kamb, A. *et al.* Nature Genetics 8: 22-26, 1994. El anticuerpo monoclonal para p16ink4A está disponible en el mercado de Sigma Corp.

- 30 p19ink4D: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2D, también conocido como CDKN2D, Hirai, H. *et al.* Mol Cell Biol 15:2672-2681, 1995; Okuda, T. *et al.* Genomics 29: 623-630, 1995. El anticuerpo para p19 está disponible en el mercado de BD Biosciences Clontech.

- 35 TP53: proteína tumoral p53, o p53, Levine, A.J. *et al.* Nature 351: 453-456, 1991; Levine, A.J. Cell 88: 323-331, 1997. El anticuerpo monoclonal para TP53 está disponible en el mercado de Sigma Corp.

- p27kip1: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1B, también conocido como CDKN1B, KIP1, Toyoshima, H. y Hunter, T. Cell 78: 67-74, 1994. Los anticuerpos para p27 están disponibles en el mercado de BD Biosciences Clontech y Sigma Corp.

- 40 p21cip1: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A, también conocido como CDKN1A, WAF1, Harper, J.W. *et al.* Cell 75: 805-816, 1993. El anticuerpo para p21 cip1 está disponible en el mercado de BD Biosciences Clontech.

p57kip2: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1c, también conocido como CDKN1C, KIP2, Lee, M-H. *et al.* Genes Dev 9:639-649, 1995. Gadd45A: gen inducible por detención el crecimiento y daño a ADN alfa, también

conocido como DDIT1, Carrier, F. *et al.* J Biol Chem 269: 32672-32677, 1994; Kearsley, J.M. *et al.* Oncogene 11:1675-1683, 1995; Smith, M.L. *et al.* Science 266: 1376-1380, 1994.

Gadd45B: gen inducible por detención el crecimiento y daño a ADN beta, De Smeale, E. *et al.* Nature 414: 308-313, 2001.

Gadd45C: gen inducible por detención el crecimiento y daño a ADN gamma, Takekawa, M. y Saito, H. Cell 95: 521-530, 1998.

Gadd153: transcrito inducible por daño a ADN, también conocido como CHOP, Ron, D. y Habener, J. F. Genes Dev 6:439-453, 1992; Park, J.S. *et al.* Gene 116: 259-267, 1992.

PCNA: antígeno nuclear de células proliferativas, Travali, S. *et al.* J Biol Chem 264: 7466-7472, 1989. El anticuerpo para PCNA está disponible en el mercado de Sigma Corp.

Ku70: autoantígeno tiroideo, también conocido como G22P1, p70, TLAA, Chan, J.Y.C. *et al.* J Biol Chem 264:3651-3654, 1989.

Ku80: reparación de rayos X, reparación de defecto en complementación, en hámster chino 5, también conocido como XRCC5.

Ku86: Cooper, M.P. *et al.* Genes Dev 14: 907-912, 2000.

NDH1: proteína de DEAD/H BOX 9, también conocida como DDX9, helicasa de ARN A, helicasa de ADN nuclear II, Lee, C.G. y Hurwitz, J. J Biol Chem 268:16822-16830 1992; Zhang, S. y Grosse, F. J Biol Chem 272: 11487-11494, 1993.

BLM: gen del síndrome de Bloom, también conocido como de tipo proteína RECQ 3, RECQL3, RECQ2, Ellis, N.A. *et al.* Cell 83: 655-666, 1995.

RECQL: tipo proteína RECQ, también conocido como RECQL1, Puranam, K.L. y Blackshear, P.J. J Biol Chem 269: 29838-29845, 1994; Puranam, K.L. *et al.* Genomics 26: 595-598, 1995.

RECQL4: tipo proteína RECQ 4, también conocido como RECQ4, Kitao, S. *et al.* Genomics 443-452, 1998.

RECQL5: tipo proteína RECQ 5, también conocido como RECQ5, Kitao, S. *et al.* Genomics 443-452, 1998.

Ejemplo 2

Los siguientes son protocolos específicos para la separación y cultivo de linfocitos, inducción de la división celular, inducción de la detención del ciclo celular por tratamiento con un inhibidor de la división celular o hipoxia inducida por H₂O₂, incorporación de BrdU/análisis de FACS y ensayo de supervivencia de MTT. Estos protocolos, o pequeñas adaptaciones de los mismos, pueden usarse todos de forma diagnóstica para ensayar con respecto a la presencia de un defecto regulador en la transición G1/S y en ensayos de exploración de compuestos.

Separación de linfocitos

Se recoge sangre en vacutainer de heparina de litio o EDTA. Los linfocitos se aíslan de acuerdo con un protocolo convencional usando Ficoll (Sigma). Para normalizar los métodos de cultivo para todos los pacientes los linfocitos separados se congelan y almacenan para su análisis posterior. Cuando se necesitan los linfocitos para cultivo, se descongelan en un baño de agua a 37°C y se lavan dos veces en RPMI (puede usarse cualquier medio o tampón que permita la supervivencia de los linfocitos para lavar las células con efecto equivalente). La viabilidad celular (exclusión de Azul de Tripano) es típicamente de aproximadamente 80-90%.

Cultivo de linfocitos, inducción de la división celular, inducción de la detención del ciclo celular con el inhibidor de ciclo-ciclo, incorporación de BrdU y análisis de FACS.

Los cultivos de linfocitos se preparan por duplicado en medio de RPMI complementado con FCS al 10% a una concentración de 1x10⁶ células en 1 ml de medio de cultivo. Se añade fitohemaglutinina (PHA) a los cultivos a una concentración final de 22 µg/ml para activar los linfocitos. Los cultivos se incuban durante 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene CO₂ al 5%. Después de 48 horas de incubación se trata un cultivo con rapamicina 100 ng/ml, mientras que el otro cultivo no tratado se mantiene como un control.

Después de otras 23 horas de incubación se añade BrdU a una concentración de 10 µg/ml a todos los cultivos. Después de otra hora, los cultivos se "recogen" y se fijan en etanol helado al 70%.

La incorporación de BrdU se evalúa usando inmunohistoquímica, seguida de análisis de FACS. La proporción de células en diversas fases del ciclo celular se determina y se realiza la transformación de los datos para obtener la prolongación relativa de la fase G1.

- 5 Los cálculos de la prolongación relativa de la fase G1 del ciclo celular en cultivos tratados en relación con cultivos control se basan en las suposiciones de que las células están en la fase exponencial de proliferación y que el factor de crecimiento en los cultivos (relación de células en división frente a células quiescentes) es de 1,0 (Darzynkiewicz Z (1993) en Fantes P y Brooks R (eds.) The cell cycle. Oxford University Press, Oxford, pág. 43-68). También se asume que la rapamicina sólo altera la duración de la fase G1 (Wagner EF, Hleb M, Hanna M y Sharma S (1998) J Immunol 161: 1123-31). Basándose en estas suposiciones se calcula la prolongación relativa de la fase G1 usando la fórmula: $RL = 100f - 100$ (expresado en porcentaje). La relación del tiempo en G1 en cultivos tratados contra control:

$$f = TG1_{tr} / TG1_c = [\ln 2 - \ln (2 - G1_{tr})] / [\ln (2 - G1_c)]$$

- 15 (Darzynkiewicz, Z., 1993, igual que la referencia anterior)

Cultivo de linfocitos, inducción de división celular, inducción de la detención del ciclo celular con hipoxia inducida por H_2O_2 , ensayo de supervivencia de MTT.

- 20 Se preparan cuatro conjuntos de cultivos de linfocitos como se indica anteriormente. Los cultivos control se dejan sin ningún tratamiento, un conjunto de cultivo se trata con rapamicina 100 ng/ml, el tercer conjunto se trata con doxorubicina 1 μM , mientras que el cuarto conjunto se trata con H_2O_2 120 μM . La doxorubicina induce daño de ADN, lo que conduce a detención en G2/M, en lugar de G1/S. El tratamiento con H_2O_2 produce tensión oxidativa, lo que conduce a una detención del ciclo celular reversible y temporal en G1/S.

- 25 Después de 20 horas de incubación se prepara un ensayo de supervivencia de MTT de 4 horas de duración (Chemicon International Ltd). Los resultados se leen usando un lector de microplacas (filtro de 570, filtro de referencia 630). La relación entre los números de células en los cultivos tratados frente a los controles se expresa como un porcentaje.

- 30 Ejemplo 3 – Examen de los efectos de los fármacos inhibidores del ciclo celular en la cinética de división celular y la expresión de proteínas de tipo Alzheimer en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y

- 35 El objeto de este estudio fue demostrar que los fármacos inhibidores de ciclo celular ejemplares son capaces de reducir los indicadores de patología de la enfermedad de Alzheimer en un modelo *in vitro* de enfermedad de Alzheimer. Actualmente no existe un modelo animal disponible para enfermedad de Alzheimer esporádica. Sin embargo, la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (número de acceso de ATCC CRL-2266) se acepta como un modelo *in vitro* adecuado.

- 40 Las células SH-SY5Y se trataron con tres agentes candidatos: rapamicina (Rapa) a 100 ng/ml, doxorubicina (Doxo) a 1 μM y Dexrazoxano (DexRaz) a (200 μM) y a continuación se ensayaron un día (d1) y dos días (d2) después del tratamiento con respecto a los siguientes 7 parámetros, que son indicativos de defectos del ciclo celular y patología de “tipo AD”:

- 45 Parámetros indicativos de cambios en la cinética de ciclo celular/división celular:

- 1) Supervivencia y proliferación celular
 - 2) Apoptosis
 - 3) Prolongación relativa de la fase G1 del ciclo celular
 - 4) Prolongación relativa de la fase G2 del ciclo celular
 - 5) Expresión de las proteínas relacionadas con AD:
 - 5) Expresión de la proteína precursora amiloide (APP)
 - 6) Expresión de la proteína tau hiperfosforilada de tipo AD
 - 7) Expresión de la proteína PHF tau de tipo AD
- Los resultados se muestran en las Figuras 1 a 7.

- 65 Para evaluar el efecto del pretratamiento con el fármaco en la protección contra los efectos de la tensión oxidativa, las células se sometieron a tensión oxidativa (por tratamiento con H_2O_2 120 μM) en ausencia de tratamiento farmacológico y después del tratamiento con rapamicina o dexrazoxano y después se ensayaron con respecto a los

mismos parámetros. Los resultados se muestran en las Figuras 1-7, panel b.

Finalmente las células se trataron con doxorrubicina después del tratamiento con rapamicina o dexrazoxano y se ensayaron después con respecto a los mismos parámetros, para evaluar los efectos del tratamiento combinado. Los resultados se muestran en las Figuras 1-7, panel c.

Métodos

Se cultivaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/F12 complementado con suero de ternero fetal al 10% (FCS, PAA Laboratories, Austria), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100 µg/ml (Gibco) en un incubador humidificado a 37°C y con CO₂ al 5%.

Después de 24 h de incubación el medio de cultivo se reemplazó con DMEM/F12 con FCS al 10% que contenía diversas concentraciones de fármaco. Las células se incubaron durante otras 24 ó 48 horas.

La proliferación y supervivencia celular se evaluó mediante proliferación de MTT y ensayo de supervivencia celular, realizados de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes (Chemicon International, Ltd.) en las últimas 4 horas del periodo de 24 horas. Los resultados del ensayo se evaluaron usando un lector de placas de ELISA Optsys MR a 570 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm.

Los cultivos celulares se repitieron en condiciones idénticas para analizar la cinética del ciclo celular mediante citometría de flujo y para estudiar la expresión proteica.

Los cultivos preparados para citometría de flujos se recolectaron después de una incubación corta con Tripsina EDTA (Sigma) en PBS. Las células se fijaron en alcohol helado al 70%. Antes de teñir con yoduro de propidio (PI) las muestras se lavaron dos veces en PBS que contenía tritón-X al 0,1%. Se midió por citometría de flujo la relación de células G1 y G2. Las células con contenido de ADN sub-G1 se consideraron la fracción apoptótica.

Los cultivos preparados para los ensayos de expresión proteica se recolectaron después de un corto lavado con PBS frío mediante raspado. Las células recogidas se lisaron en 150 µl de tampón de lisis que contenía Tri3-HCL 50 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 al 0,5% (v/v), NaF 50 mM, Na3VO4 0,2 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 20 µg/ml y leupeptina 5 µg/ml y se incubaron en hielo durante 30 min. El lisado celular se centrifugó a 14.000 g durante 20 min. a 4°C para eliminar los sedimentos insolubles. La concentración proteica se determinó mediante el ensayo de Bradford. Se realizaron ensayos de ELISA usando un grupo de anticuerpos. Se usaron anticuerpos secundarios (anti conejo o anti ratón según fuera apropiado) conjugados con peroxidasa de rábano rusticano.

Anticuerpos usados en este estudio:

Fuente de Dilución de Antígeno Anticuerpo
Tau fosforilada AT8 1:1000 Insight Biotechnology PHF tau Tau2 1:1000 Novocastra
APP APP 1:1000 Novocastra

Resultados

La adición de Rapamicina 100 ng/ml al cultivo de neuroblastoma SH-SY5Y dio como resultado números de células significativamente más bajos en el cultivo que en los cultivos control (Fig. 1a). Esta reducción en el número de células no se debió a apoptosis, puesto que la rapamicina también protegió las células de neuroblastoma contra apoptosis (Fig. 2a). La reducción de los números de células se debió a la prolongación de los procesos de división celular, principalmente la fase G2 del ciclo celular (Fig. 4a). Esto se asoció con un pequeño aumento en la producción de APP (Fig. 5a) y formación de PHF-tau (Fig. 7a). El tratamiento también aumentó la cantidad de tau hiperfosforilada después de un día (Fig. 6a). El efecto en el ciclo celular de la rapamicina desapareció después de 1 día. Aunque se aceleró el ciclo celular después de que las células escaparan a la inhibición de la rapamicina después de 1 día, la reducción de las proteínas relacionadas con AD se mantuvo.

Después del tratamiento con rapamicina, la muerte celular apoptótica inducida por tensión oxidativa en la línea celular aumentó significativamente (Fig. 2b). Sin embargo, esto también estuvo acompañado por una prolongación significativa de la fase G1 del ciclo celular (Fig. 3b). Este efecto también fue de corta duración y las células escaparon a la inhibición después de 1 día (Fig. 3b, compárese d1 con d2). Los cultivos pretratados con rapamicina también mostraron un aumento de la fosforilación de tau y formación de PHF en tensión oxidativa (Fig. 6b; Fig. 7b). De forma interesante, este aumento se siguió de una disminución de estas proteínas, aunque la reducción de APP inicial se siguió por un ligero aumento en el día 2.

La adición de Dexrazoxano a los cultivos celulares dio como resultado números de células reducidos solamente después de 2 días de tratamiento (Fig. 1a). Este efecto retardado fue más interesante debido a que el Dexrazoxano no parecía proteger las células contra muerte celular apoptótica tan eficientemente como lo hizo la Rapamicina (Fig.

2a). Los efectos del fármaco se debieron a una aceleración de la fase G1 del ciclo celular que se acompañó con poco cambio en el tiempo de G2 el día uno y una prolongación muy grande de G2 el día 2 (Figs. 3a y 4a). Aunque el fármaco aumentó la expresión de las tres proteínas relacionadas con AD el primer día, el día dos las tres proteínas se redujeron en los lisados celulares (Figs. 5a, 6a, 7a).

El tratamiento con doxorubicina causó por sí mismo una reducción en el número de células (Fig. 1a) principalmente debido a su efecto inhibidor del ciclo celular, puesto que pareció ser protector contra apoptosis (Fig. 2a). El efecto inhibidor del ciclo celular se debió principalmente a la prolongación de la fase G2 del ciclo celular (Fig. 4a). El efecto en G1 se invirtió después del día 1 (Fig. 3a), aunque el efecto inhibidor de G2 disminuyó (Fig. 4a). Este fenómeno condujo a la expresión elevada de APP (Fig. 5a) y PHF tau (Fig. 7a) a pesar de la reducción de fosfo-tau (Fig. 6a).

El pretratamiento con rapamicina alteró los efectos de la doxorubicina, en tanto que causó más apoptosis y condujo a una prolongación significativa de las fases G1 y G2 del ciclo después del día 1 (Fig. 3c; Fig. 4c). Ambos efectos eran reversibles y desaparecieron el día 2. El pretratamiento con rapamicina también condujo a una formación reducida de APP y PHF tau que permaneció después de que desaparecieran los efectos en el ciclo celular (Fig. 5c; Fig. 7c), la reducción de fosfo tau por pretratamiento con rapamicina desapareció después del día 1.

El pretratamiento con Dexrazoxano aumentó el efecto de prolongación de G2 de la doxorubicina (Fig. 4c) y condujo a la reducción de la producción de APP y PHF-tau aunque no logró significativamente la producción de fosfo-tau.

En resumen, la prolongación de la fase G2 bajo el efecto de la Doxorubicina, aunque parece ser protectora contra la muerte celular apoptótica, también conduce a la elevación de la expresión de proteínas relacionadas con AD.

La rapamicina no parece ser un inhibidor de G1 eficaz en esta línea celular causando solamente un ligero cambio en el tiempo de G1 por sí solo. Provoca un retardo de G2 más fácilmente. Esto a su vez se asocia con la protección contra apoptosis y cambios ligeros en la expresión de las proteínas relacionadas con AD, lo que reduce la producción de tau hiperfosforilada y aumenta ligeramente la producción de APP. El pretratamiento con rapamicina no protege contra el daño inducido por tensión oxidativa pero lo acelera. Sin embargo, en combinación con doxorubicina tuvo un fuerte efecto protector contra la acumulación de proteínas relacionadas con AD, aunque los efectos inhibidores de G1 de dicho tratamiento fueron de corta duración.

El Dexrazoxano redujo de forma eficaz la expresión de proteínas relacionadas con AD después de dos días en cultivo, sin embargo no otorgó protección contra muerte celular por sí solo. Adicionalmente, cuando se sigue de una inhibición de G2 inducida por doxorubicina sus efectos protectores contra la expresión de proteínas relacionadas con AD se hace más fuerte.

Conclusión

Los resultados de este estudio proporcionan pruebas de la eficacia de los fármacos reguladores del ciclo celular o combinaciones de los mismos, en la reducción de los parámetros de patología de la enfermedad de Alzheimer y la protección contra daño inducido por tensión oxidativa en un modelo de cultivo celular de AD.

Las células SH-SY5Y pueden usarse como un modelo de AD para ensayar la eficacia de inhibidores de progresión del ciclo celular a través del punto de transición G1/S e inhibidores de reentrada en el ciclo celular y progresión a la transición de G1/S en la reducción de los indicadores de patología de AD y, por lo tanto, evaluar la utilidad de dichos agentes en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para seleccionar un agente farmacéutico para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en un paciente humano, comprendiendo dicho método:

- 5 (a) exponer células del paciente, siendo dichas células, células no neuronales que muestran un defecto regulador del ciclo celular en la transición de fase G1/S, a un panel de agentes farmacéuticos que son inhibidores conocidos de la reentrada en ciclo celular y progresión a la transición G1/S o inhibidores conocidos de la progresión del ciclo celular hasta el punto de transición G1/S,
- 10 (b) analizar la regulación de la transición G1/S de las células en presencia y ausencia de los agentes farmacológicos y
- (c) identificar un agente que corrija el defecto regulador en la transición G1/S en las células, identificándose dicho agente como probablemente beneficioso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en el paciente.

- 15 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el panel de agentes farmacéuticos incluye uno o más inhibidores de progresión del ciclo celular hasta el punto de transición G1/S seleccionados del grupo que consiste en: inhibidores que bloquean la progresión del ciclo celular en G1, inhibidores que inducen detención del ciclo celular en G1, inhibidores que inducen detención del ciclo celular en el punto de control G1/S, inhibidores que bloquean la transición G1/S, inhibidores de síntesis de ADN, aptámeros peptídicos que inhiben específicamente la actividad de
- 20 unión de E2F, manumicina A, indol carbazol K252a, fenil butirato 4 sódico, retinoides o ligandos selectivos del receptor de retinoides, ansamicinas, herbimicina, geldamicina, TT-B, análogos de vitamina D, esteroides, glucocorticoides, antagonistas del receptor alfa adrenérgico, doxazosina, oncostatina M e interleucina 6 en combinación, quelantes de hierro, O-Trensox, desferrioxamina, ligandos de aroilhidrazona, dextrazoxano, EDTA, antagonistas del receptor de angiotensina II, bradiquinina, fármacos quimioterapéuticos inmunosupresores,
- 25 doxorubicina, adriamicina, rapamicina, ciclosporina A, FK506, prodigiosinas, doxorubicina y rapamicina usadas en combinación, dextrazoxano y doxorubicina usados en combinación y melatonina;
- y/o uno o más inhibidores de la reentrada en ciclo celular y progresión a la transición G1/S seleccionados del grupo que consiste en: inhibidores de la transición G0/G1, inhibidores que inducen detención del ciclo celular en la fase G0/G1, valproato sódico, NA22598, brefeldina A y faspaplisina.
- 30

Fig. 1a. El efecto de diferentes fármacos en la supervivencia y proliferación celular

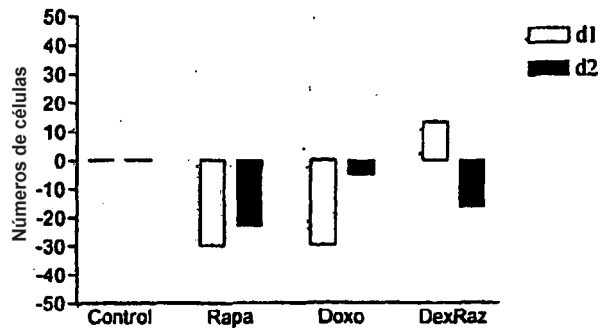


Fig. 1b. Los efectos de la tensión oxidativa en la supervivencia y proliferación celular

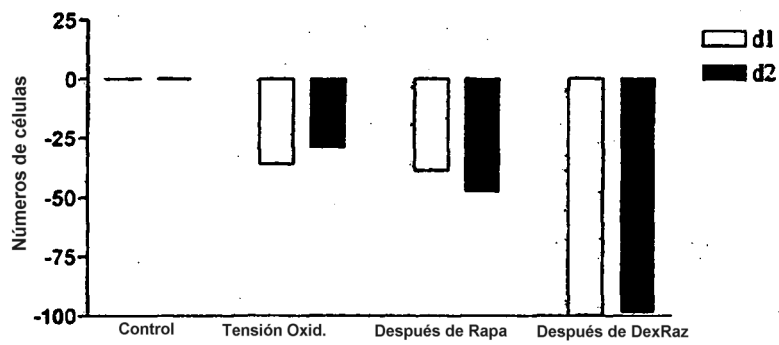


Fig. 1c. Los efectos de Doxorubicina en la supervivencia y proliferación celular

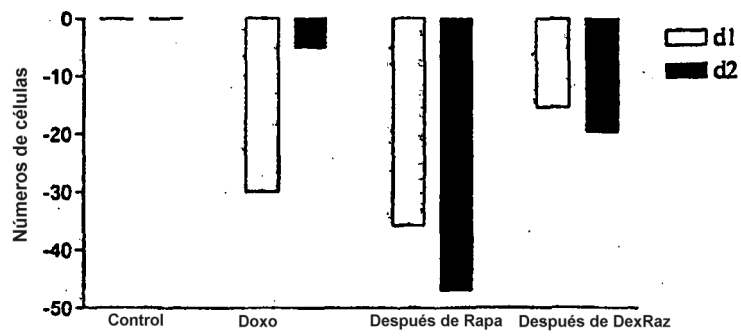


Fig. 2a. El efecto de fármacos reguladores del ciclo celular en la apoptosis

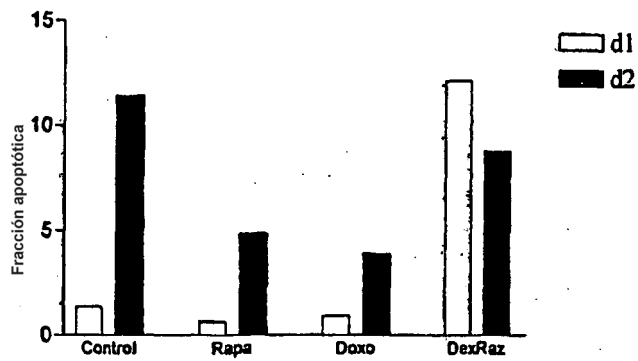


Fig. 2b. Los efectos de la tensión oxidativa en la apoptosis

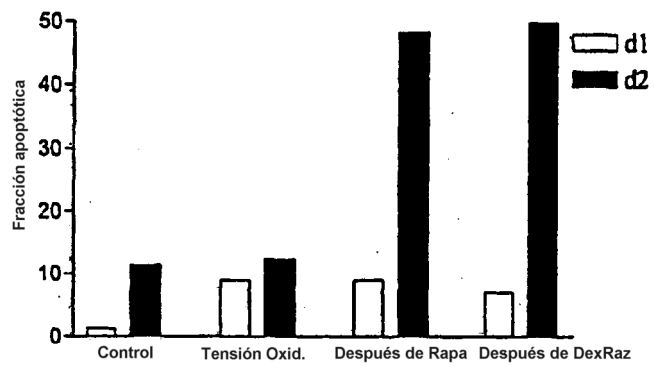


Fig. 2c. Los efectos de la doxorrubicina en la apoptosis

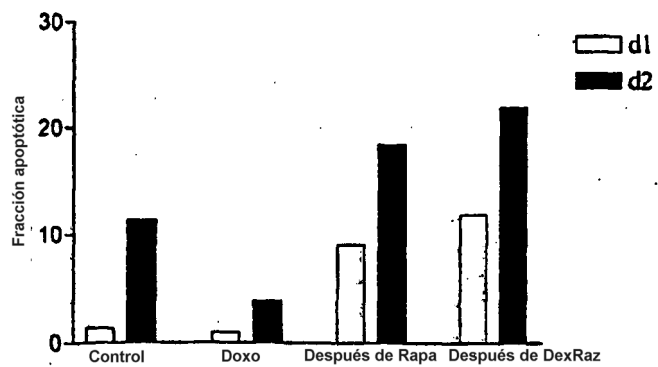


Fig. 3a. El efecto de diversos fármacos en la duración de la fase G1 del ciclo celular.

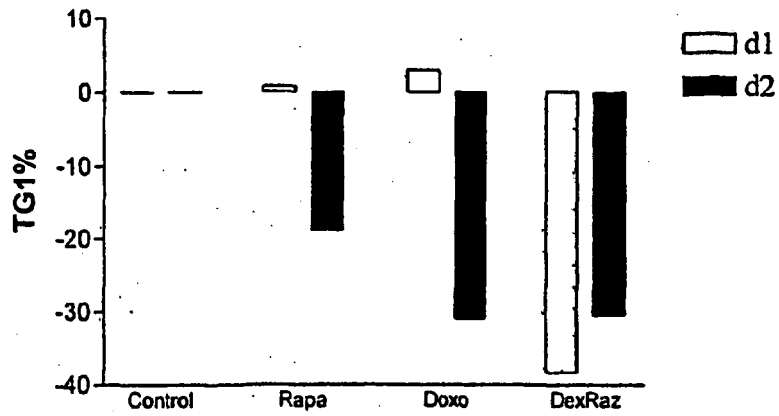


Fig. 3b. El efecto de tensión oxidativa subletal en la duración de la fase G1 del ciclo celular

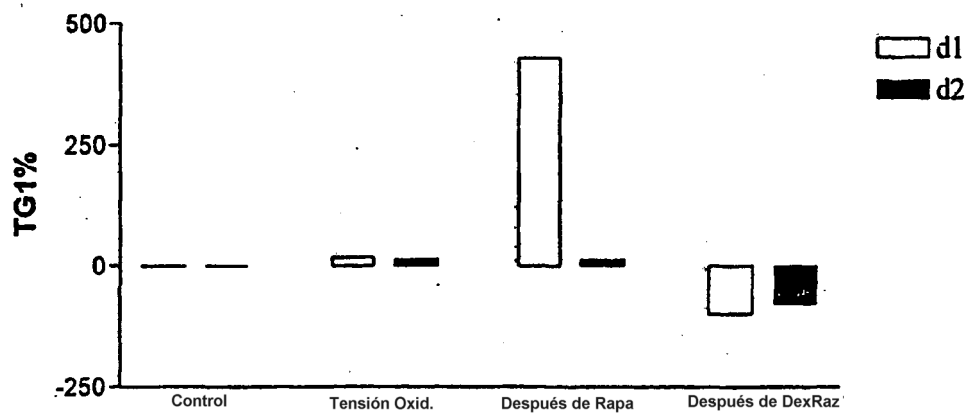


Fig. 3c El efecto de la doxorubicina en la duración de la fase G1 del ciclo celular

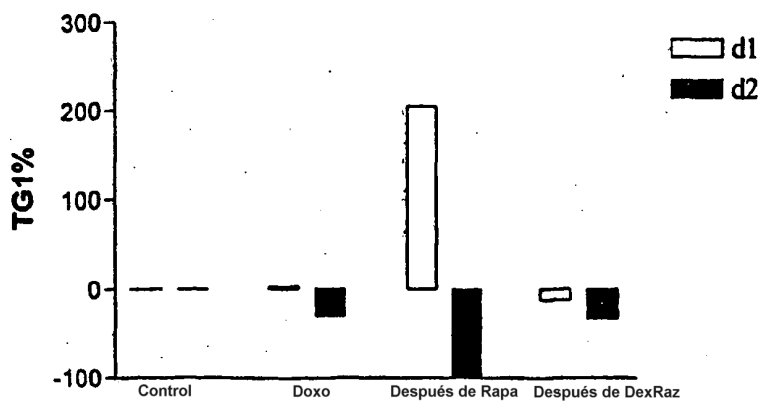


Fig. 4a. El cambio relativo de la duración de G2 bajo el efecto de inhibidores del ciclo celular

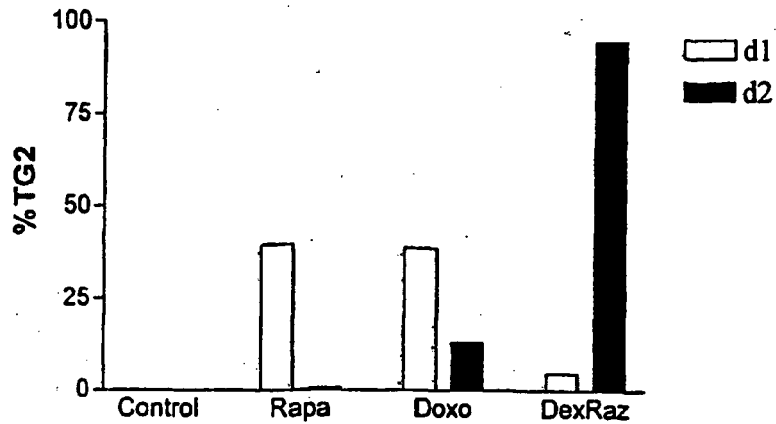


Fig. 4b. El cambio relativo de la duración de G2 bajo el efecto de tensión oxidativa

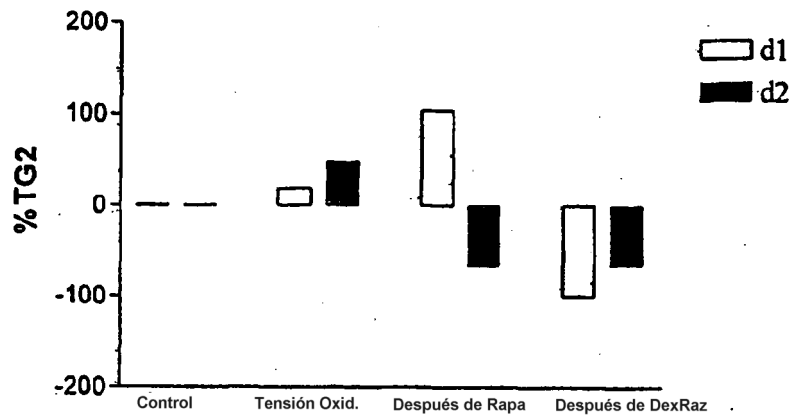


Fig. 4c. El cambio relativo de la duración de G2 bajo el efecto de la doxorubicina

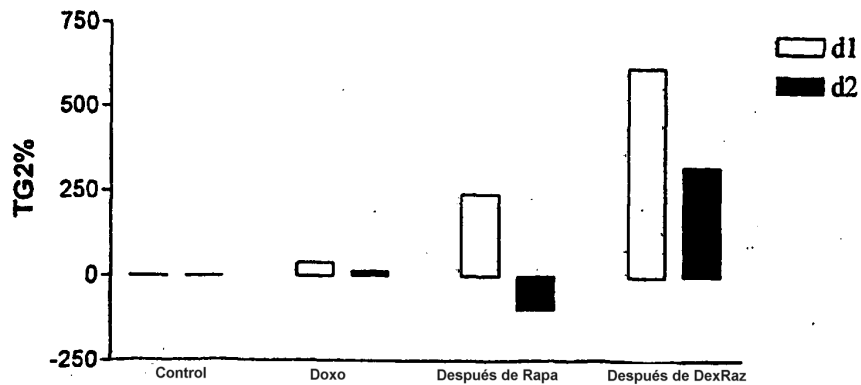


Fig. 5a. El efecto de fármacos inhibidores del ciclo celular en la expresión de APP

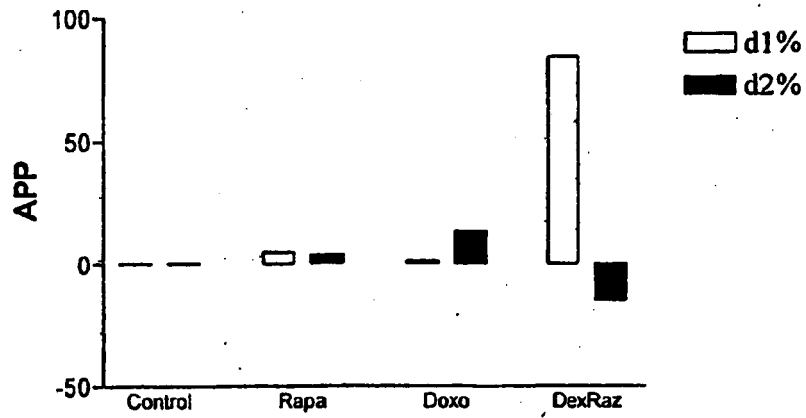


Fig. 5b. El efecto de la tensión oxidativa en la expresión de APP

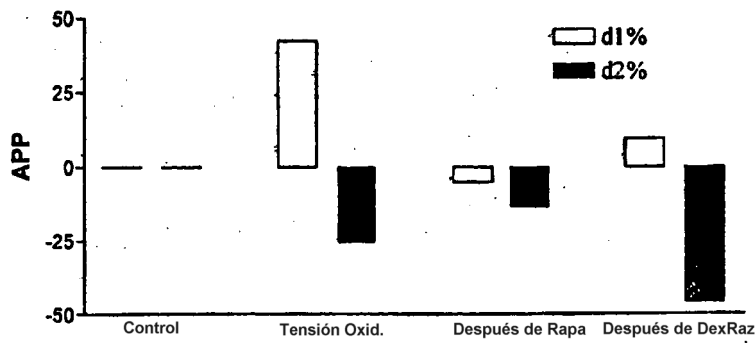


Fig. 5c. El efecto de la doxorubicina en la expresión de APP

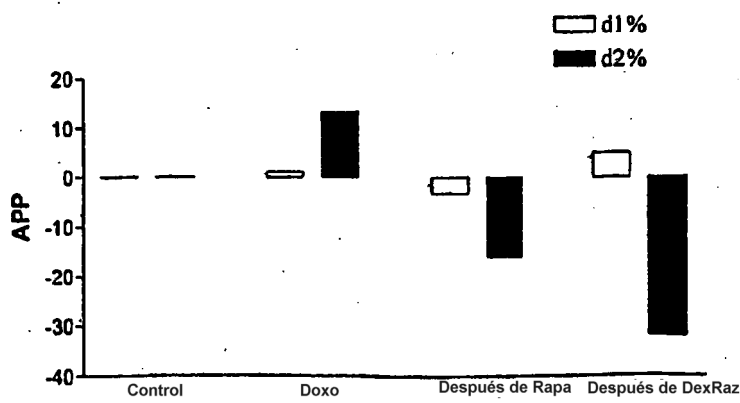


Fig. 6a. El efecto de fármacos inhibidores del ciclo celular en la expresión de tau hiperfosforilada de tipo AD

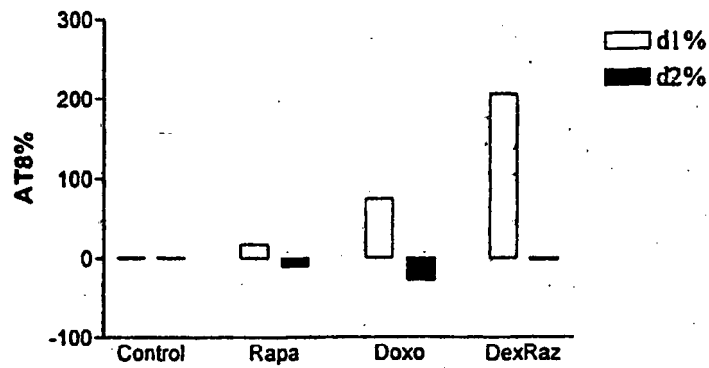


Fig. 6b El efecto de la tensión oxidativa en la expresión de tau hiperfosforilada de tipo AD

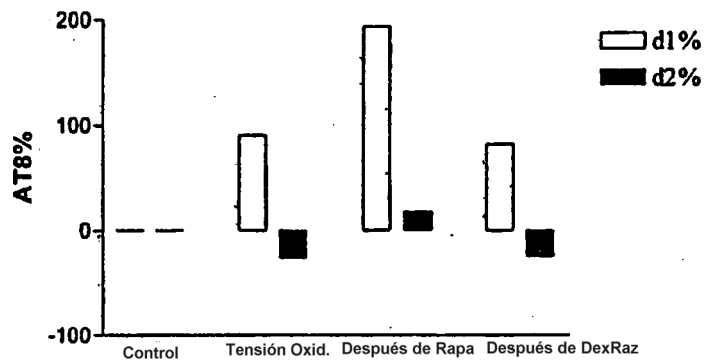


Fig. 6c El efecto de la doxorrubicina en la expresión de tau hiperfosforilada de tipo AD

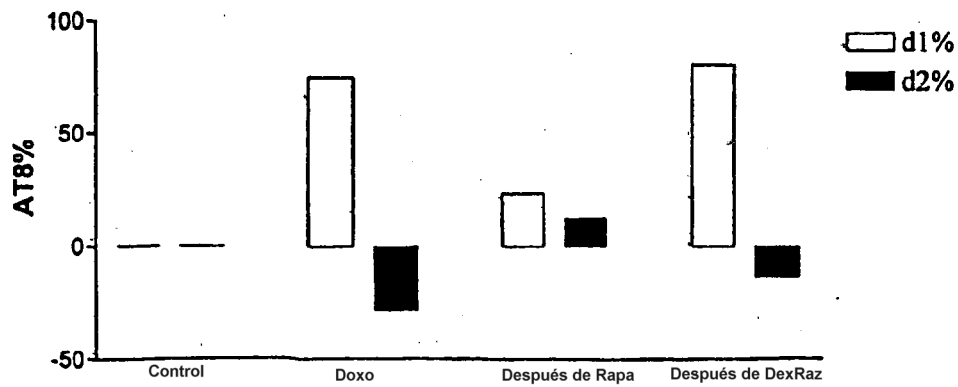


Fig. 7a El efecto de fármacos inhibidores del ciclo celular en la expresión de PHF tau de tipo AD

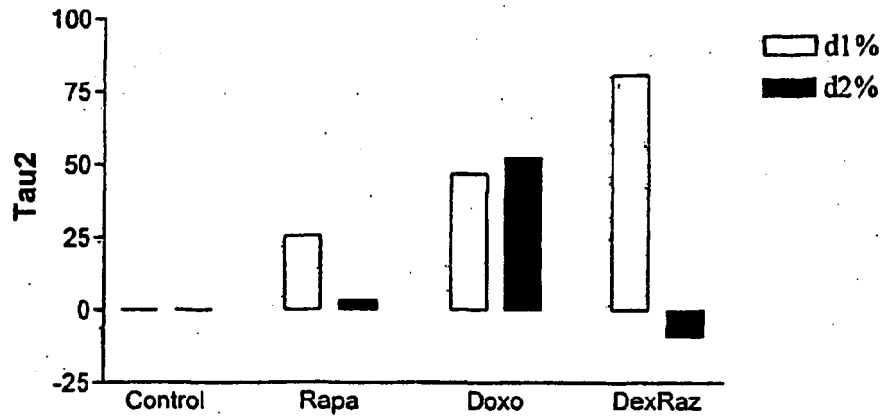


Fig. 7b El efecto de la tensión oxidativa en la expresión de PHF tau de tipo AD

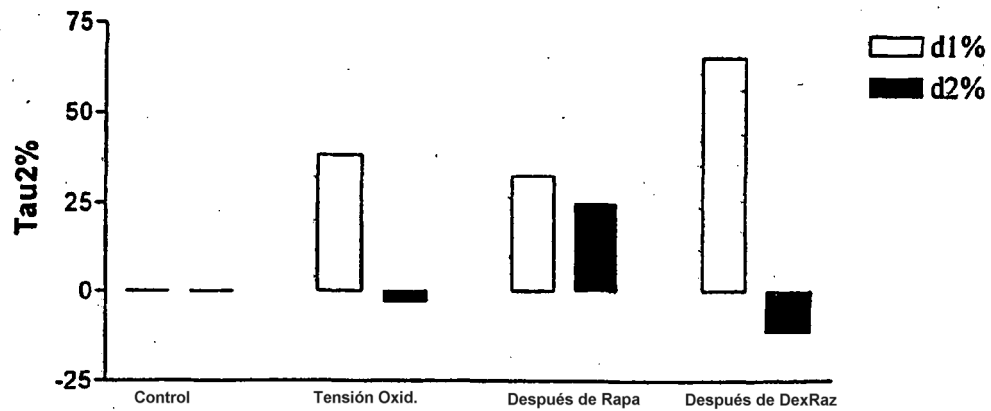


Fig. 7c El efecto de la doxorrubicina en la expresión de PHF tau de tipo AD

