

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 762**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07822465 .6**

96 Fecha de presentación: **09.11.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2089711**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2009**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para detectar miméticos de ligandos de receptores**

30 Prioridad:

10.11.2006 US 858033 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.12.2012

73 Titular/es:

**ALPHAPTOSE GMBH (100.0%)
ALSTERCHAUSSEE 13
20149 HAMBURG, DE**

72 Inventor/es:

**KHAZAK, VLADIMIR y
WEBER, LUTZ**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 393 762 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

Procedimientos y composiciones para detectar miméticos de ligandos de receptores

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para determinar la utilidad de moléculas pequeñas como miméticos de ligandos de receptores y a su aplicación terapéutica

10 **Antecedentes de la invención**

Problemas para encontrar miméticos de ligandos de receptores. La modulación de funciones biológicas mediante ligandos de receptores agonistas o antagonistas normalmente tiene como objetivo tanto bloquear como moderar abiertamente rutas bioquímicas activas o activar o restaurar rutas que se cree que se refieren a o son causantes de una cierta enfermedad.

15 A diferencia de proteínas y anticuerpos endógenos o xenobióticos que presentan muy frecuentemente actividades biológicas altamente específicas, las moléculas pequeñas son mucho menos específicas. Debido a su tamaño limitado, las moléculas pequeñas se unen a varias dianas diferentes que pueden conducir a efectos secundarios no deseados y hace que su desarrollo como agentes terapéuticamente útiles sea un reto. Por ejemplo, se necesitan estudios preclínicos y clínicos cuidadosos para establecer una ventana de dosis terapéuticamente útil, para descubrir efectos inespecíficos y sus implicaciones en el desarrollo de fármacos. Particularmente, el descubrimiento de moléculas pequeñas selectivas que son miméticos funcionales de ligandos de receptores de proteínas presenta un reto al descubrimiento de fármacos, ya que los sitios de interacción y sus áreas entre el receptor y su ligando natural están superando con mucho el área de interacción proporcionada por moléculas pequeñas (P. Chene, *Chem. Med. Chem* 2006, **1**: 400-411). Las moléculas prototipo que se han encontrado en cribados biológicos primarios tienen frecuentemente el potencial para también interactuar con otros receptores y que no son específicos en un nivel celular.

20 Además, aunque ha sido posible encontrar moléculas pequeñas que son antagonistas de una interacción receptor/ligando dada, se considera más desafiante identificar agonistas. Por tanto, hay una clara necesidad de un procedimiento que pueda distinguir miméticos de ligandos de receptores de moléculas pequeñas selectivos y funcionales de moléculas que son "promiscuas" uniéndose a múltiples dianas en una forma no deseada.

35 **Problemas para encontrar tratamientos de combinación útiles.** Aunque se han hecho avances significativos en muchas enfermedades y especialmente en la terapia de tumores, frecuentemente todavía se proporciona un beneficio limitado por agentes únicos como monoterapias. Esto no es sorprendente, dado que las rutas moleculares que son responsables de enfermedades son frecuentemente redundantes y variables entre pacientes individuales o entre subclones de células dentro del mismo paciente. Por tanto, frecuentemente es poco probable que un tratamiento que se basa en una única diana ofrezca control o terapia de enfermedad duradero en la mayoría de los pacientes (J.E. Dancey y H.X. Chen, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, **5**: 649-659). El uso de combinaciones de fármacos ofrece un principio de terapia bien establecido, especialmente en terapia contra el cáncer, para proporcionar una mejor terapia y beneficio a pacientes. Con pocas excepciones, los tratamientos con fármacos útiles para cáncer usan una combinación de agentes de actividad conocida y espectros mínimamente solapantes de toxicidad, a sus dosis óptimas y según programas que son compatibles con la recuperación de células normales. Sólo algunas de estas combinaciones quimioterapéuticas han sido críticamente evaluadas pre-clínicamente y todavía pocas de estas combinaciones son sinérgicas, proporcionando mayor beneficio en su combinación que por los efectos aditivos de sus actividades individuales. Muchos tratamientos de combinación presentes han sido probados en estudios clínicos, usando un enfoque de ensayo y error con pacientes humanos.

50 Este enfoque ampliamente empírico en el desarrollo clínico hacia terapias de combinación ha sido justificado por la falta de medios de identificación de qué tumores podrían ser sensibles a una combinación de agentes individuales: hay una falta considerable de correlación entre los resultados de experimentos *in vitro* e *in vivo* de laboratorio y estudios humanos clínicos debido a las limitaciones inherentes de modelos de enfermedad *in vitro* e *in vivo*. Además, líneas de células cancerosas permanentes como, por ejemplo, las proporcionadas por organizaciones como la ATCC o las usadas por el Instituto nacional del cáncer muestran alteraciones considerables en propiedades biológicas y patrones de quimiosensibilidad cuando se comparan con los tumores originales de los que se derivan. Dos estudios han mostrado la correlación limitada entre las pruebas *in vitro* en el panel de 60 líneas celulares en el Instituto nacional del cáncer, xenoinjertos *in vivo* y eficacia clínica de agentes citotóxicos (J.I. Johnson, *Br. J. Cancer* 2001, **84**: 1424-1431; T. Voskoglou-Nomikos y col., *Clin. Cancer Res.* 2003, **9**: 4227-4239).

60 Segundo, también se necesitan procedimientos para proporcionar información sobre secuencias de tratamiento óptimas de la combinación. Por ejemplo, los estudios de laboratorio han revelado que el inhibidor de EGFR gefitinib es más eficaz *in vitro* en combinación con agentes citotóxicos convencionales administrados como un 'pulso' a alta dosis antes de paclitaxel cuando se compara con administración concurrente continua (D.B. Solit, *Clin. Cancer Res.* 2005, **11**: 1983-1989).

En otro enfoque, un panel de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CCPNP) no mutantes y mutantes de EGFR humano se usó para analizar las características moleculares que determinan la respuesta a gefitinib solo o en combinación con quimioterapia (S. Van Schaeybroeck y col., *Mol. Cancer Ther.* 2006, **5(5)**: 1154-1165).

Por tanto, procedimientos para diseñar racionalmente y validar experimentalmente combinaciones de fármacos sinérgicos se necesitan urgentemente ya que se espera que proporcionen beneficio terapéutico prolongado y duradero para pacientes con cáncer.

La apoptosis está mediada por receptores unidos a la membrana. La muerte celular programada, llamada apoptosis, media en el mantenimiento de la homeostasis de tejidos, regulando la eliminación de células de la piel y el tubo gastrointestinal y la remodelación de hueso en respuesta a desencadenantes medioambientales. La apoptosis también previene enfermedades inhibiendo infección vírica sistémica, eliminando linfocitos T y linfocitos B auto-reactivos para prevenir autoinmunidad y extirpando células que adquieren propiedades potencialmente oncogénicas. La desregulación de la apoptosis desempeña una función en muchos procesos de enfermedad. La activación inapropiada de la apoptosis está asociada a trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, o lesión miocárdica observada después de reperfusión de tejido cardíaco tras un infarto. Además, si se detectan epítopes extraños sobre la superficie celular, la apoptosis puede ser inducida selectivamente por linfocitos citolíticos espontáneos (NK) o linfocitos T citotóxicos (CTL) del sistema inmunitario. La resistencia a apoptosis o un mayor umbral en el que las células experimenten apoptosis está asociada a mutaciones en muchos genes, tales como el gen supresor de tumores p53. Las células hiperproliferantes que tienen defectos en las rutas apoptóticas pueden demostrar una ventaja de supervivencia, conduciendo a progresión más maligna y por último lugar a cáncer.

La ruta de apoptosis intrínseca (o mitocondrial) y la extrínseca (o mediada por receptores) son dos mecanismos por los que puede producirse la apoptosis.

En la ruta intrínseca, la consecuencia funcional de la señalización proapoptótica es la perturbación de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c en el citoplasma. Aquí, el citocromo c forma un complejo con el factor 1 activador de proteasa apoptótica (APAF1) y la forma inactiva de caspasa-9, llamada el apoptosoma. Este complejo hidroliza el trifosfato de adenosina para escindir y activar la caspasa-9. Esta caspasa iniciadora avanza para escindir y activar las moléculas ejecutoras, caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7. La liberación de citocromo c de las mitocondrias es un acontecimiento temprano de la apoptosis que precede a la activación de caspasas y endonucleasas. La liberación de citocromo c también conduce a la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO).

La apoptosis inducida por la ruta apoptótica extrínseca está mediada por la activación de receptores de muerte de la superficie celular. Después de la activación mediada por ligando de un receptor de muerte, el dominio de muerte intracelular conservado atrae la molécula adaptadora intracelular, dominio de muerte asociado a Fas (FADD). La molécula adaptadora recluta caspasa-8 y caspasa-10 para el receptor de muerte, formando el complejo de señal inductora de muerte (DISC), en el que se escinden y activan. En algunas células, estas caspasas iniciadoras son suficientes para escindir y activar las moléculas ejecutoras terminales, caspasa-3, caspasa-6, y caspasa-7. Sin embargo, algunas células también requieren la activación del sistema de apoptosis basado en mitocondrias para amplificar la señal de receptores de muerte. La caspasa-8 y la caspasa-10 escinden y activan el dominio que interacciona con el factor proapoptótico citoplásmico Bcl-2 (BID), que transloca a la mitocondria e induce liberación del factor iniciador de apoptosis citocromo c (E. K. Rowinsky, *Clin. Oncol.* 2005, **23**: 9394-9407). Se conocen varios receptores diferentes de la familia de receptores de muerte, además de sus ligandos naturales (Tabla 1.):

Tabla 1: Receptores de muerte y sus ligandos

Receptor	Ligando
TNFR1 (DR1)	TNF- α , LT- α
FAS (CD95, APO-1, DR2)	FasL
TRAIL-R1 (DR4)	TRAIL
TRAIL-R2 (DR5)	TRAIL
DR3 (APO2)	TL1, VEG1
DR6	?
NGFR	NGF
EDAR	Eda

Mientras que muchos agentes citotóxicos como cis-platino o doxorubicina, además de radioterapia, parecen activar la ruta de apoptosis intrínseca, la inducción de apoptosis elegida como diana por la ruta apoptótica extrínseca representa una estrategia terapéutica sin explotar, pero emergente, para destruir células cancerosas. La activación de receptores de la superficie celular por el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) produce la estimulación directa de las rutas de señalización apoptóticas (estimulación extrínseca). Las moléculas que activan directamente estos receptores, tales como anticuerpos monoclonales agonistas para el receptor TRAIL o Fas (tal como CH-11) y ligando TRAIL o Fas recombinante (FasL), están siendo evaluadas como posibles monoterapias y como parte de terapias de combinación con fármacos quimioterapéuticos existentes y otras modalidades terapéuticas.

TRAIL, TNF β , FasL y otros ligandos de la superfamilia TNF demostraron la capacidad para tanto iniciar la apoptosis como destruir células transformadas, células víricamente infectadas y linfocitos T y linfocitos B crónicamente activados (S.R. Wiley y col., *Immunity* 1995, **3**: 673-682; P.T. Daniel y P.H. Krammer, *J. Immunol.* 1994, **152**: 5624-5632).

Sin embargo, la administración terapéutica sistémica de TNF α recombinante (y similarmente TRAIL en estudios de animales) en pacientes con cáncer produce una respuesta inflamatoria masiva, además de hepatotoxicidad directa (A.L. Jones y P. Selby, *Cancer. Surv.* 1989, **8**: 817-836).

Una versión de TRAIL recombinante, Apo2L/TRAIL (PRO1762), está siendo actualmente estudiada en ensayos clínicos de fase I (A. Almasan y A. Ashkenazi, *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003, **14**: 337-348).

HGS-ETR1 (mapatumumab; Human Genome Sciences), un anticuerpo monoclonal agonista completamente humano que elige TRAIL-R1 como diana, está en evaluaciones de fase II en pacientes con tumores malignos avanzados. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos para TRAIL-R2 (HGS-ETR2; Human Genome Sciences), tales como HGS-TR2J, también han entrado en fase clínica y están actualmente en desarrollo clínico de fase I. HGS-ETR2 y HGS-TR2J tienen perfiles fisicoquímicos y cinéticos ligeramente diferentes que garantizan la exploración de ambos en fase clínica (R. Humphreys y col., *Ann. Oncol.* 2004, **15**: iii102, resumen 383PD; R. Humphrey y col., *Presented at the 16th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics*, Ginebra, Suiza, 28 de septiembre-1 de octubre de 2004, resumen 204).

Especialmente prometedoras aparecen las estrategias terapéuticas en las que se combinan agentes que activan tanto la ruta extrínseca como intrínseca. Así, ETR1 o ETR2 muestran sinergias con cis-platino, camptotecina, topotecan, doxorubicina, gemcitabina, FU, vincristina, o paclitaxel *in vitro*, que muestran incluso actividad en líneas celulares que no entran en apoptosis mediante tratamiento con cualquier de los agentes individuales (E.K. Rowinsky, *Clin. Oncol.* 2005, **23**: 9394-9407).

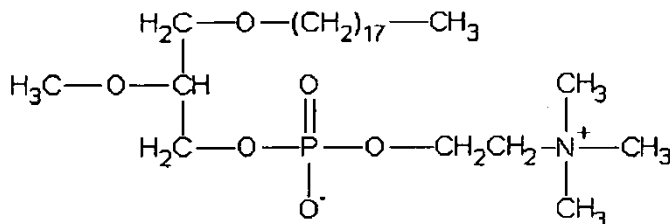
Por tanto, parece altamente deseable encontrar moléculas pequeñas que sean agonistas del receptor FAS y este receptor y su anticuerpo agonista CH-11 deben proporcionar un ejemplo de validación del procedimiento para encontrar miméticos de ligandos de receptores moléculas pequeñas según la presente invención.

Resistencia a múltiples fármacos (RMF). La RMF es un obstáculo importante para el tratamiento eficaz de cáncer. Los cánceres resistentes a fármacos son tanto inherentemente intratables (resistencia intrínseca) como han progresado hasta desarrollar resistencia a una amplia variedad de agentes anticancerígenos durante el transcurso del tratamiento (resistencia adquirida). El término RMF se usa para describir la capacidad de células tumorales expuestas a un único agente citotóxico a desarrollar resistencia a una amplia gama de fármacos estructuralmente y funcionalmente sin relacionar. Se conocen numerosos mecanismos para contribuir a este fenómeno, que incluyen expresión en exceso de bombas de expulsión de fármaco, aumento de la actividad de mecanismos de reparación de ADN, alteración de enzimas diana para fármaco y expresión en exceso de enzimas que participan en la desintoxicación y eliminación de fármacos. Debido a que la mayoría de los enfoques de quimioterapia provocan en último lugar sus efectos por apoptosis, las alteraciones al nivel del control de la apoptosis proporcionan todavía otro mecanismo por el que puede producirse resistencia a fármacos. Esta revisión se basará en algunas de las estrategias que se han usado en un intento por quimiosensibilizar tumores resistentes manipulando rutas de apoptosis desreguladas.

Los mecanismos de resistencia a fármacos pueden mediarse por alteraciones en las rutas de apoptosis: la decisión en cuanto a si una célula experimenta apoptosis o continúa progresando por el ciclo celular depende de la interacción de un complejo conjunto de genes y proteínas que interaccionan para regular la progresión del ciclo celular. La resistencia a fármacos puede emerger si las células alteran la expresión de proteínas que regulan la propagación de señales que se producen a partir de lesiones celulares tales como quimioterapia para proteger contra apoptosis. Aunque todavía no se entienden completamente muchos detalles de la ruta apoptótica, se sabe que varias proteínas son reguladores importantes de este proceso.

Un prototipo de molécula pequeña. Para validar el procedimiento para encontrar miméticos de ligandos de receptores de moléculas pequeñas según la presente invención y para demostrar su utilidad, los inventores seleccionaron adicionalmente una molécula pequeña bien establecida en la materia. Esta molécula se denomina

aquí AP-121" (designaciones alternativas son edelfosina, ET-18-OCH₃, 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina, rac-1-O-octadecil-2-O-metilglicero-3-fosfocolina o algunas veces alquil-lisofosfolida o ALP). AP-121 es un éter-lípido, más precisamente un alquil-lisofosfolípido, que tiene la siguiente fórmula química:



5

AP-121 es un análogo sintético del factor activador de las plaquetas (PAF; 1-O-alquil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina), que globalmente se cree que participa en una variedad de procesos fisiológicos tales como inflamación, respuesta inmunitaria, reacciones alérgicas, reproducción y también se ha mostrado que es eficaz como agente antitumoral en mamíferos.

10

La quimioterapia contra el cáncer globalmente tiene como objetivo ralentizar el crecimiento de o destruir células cancerosas, a la vez que evita la lesión a células y tejidos de alrededor. Por consiguiente, los agentes anticancerígenos más eficaces son aquellos que pueden elegir selectivamente como diana células cancerosas, mientras que dejan células normales relativamente sin afectar.

15

Los éter-lípidos son conocidos por ser agentes anticancerígenos eficaces *in vitro* y en modelos animales. Se han propuesto varios mecanismos de acción para la toxicidad de éter-lípidos hacia células cancerosas, que incluyen la falta de células de enzimas de escisión de alquilo. La incapacidad resultante para metabolizar los éter-lípidos conduce a su acumulación intracelular y a la consecuente lesión a la organización de lípidos de la membrana celular. Otros posibles mecanismos de la acción de éter-lípidos incluyen efectos sobre niveles de fosforilación de proteína intracelular, y la rotura del metabolismo de lípidos celulares. Las células normales normalmente poseen los medios para prevenir o vencer los posibles efectos tóxicos de los éter-lípidos, pero no las células cancerosas.

20

AP-121 parece presentar múltiples actividades biológicas, que incluyen inhibición de la ruta de supervivencia de PI3K-Akt/PKB, interacción con proteína cinasa C, activación intracelular del receptor de muerte Fas/CD95, acidificación intracelular, promoción de la producción de citocinas y alteración de la función de la membrana plasmática y síntesis de lípidos (G. Arthur y R. Bittman, *Biochim. Biophys. Acta* 1998, **1390**: 85-102; D Berkovic, *Gen. Pharmacol.* 1998, **31**: 511-517).

25

Se encontró que una formulación liposómica de AP-121, ELL-12, era más eficaz que AP-121 libre contra leucemia, metástasis de cáncer de pulmón y melanoma en programas de dosificaciones menores y no tóxicas (I. Ahmad y col., *Cancer Res.* 1997, **57**: 1915-1921).

30

En otro ejemplo, AP-121 se ha administrado por vía oral disuelto en leche a pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado en un ensayo de fase II (P. Drings y col., *Onkologie* 1992, **15**: 375-382).

En particular, los datos *in vitro* y algunos datos de animales sugieren una actividad "no específica" muy amplia en una gama de tumores, que claramente no podrían demostrarse en los ensayos humanos publicados. Además, algunos de los datos biológicos obtenidos también son contradictorios, que pueden atribuirse a los diferentes sistemas de ensayo tales como diferentes líneas celulares que se han usado, o las diferentes condiciones experimentales o la experiencia de los científicos implicados.

35

Por ejemplo, AP-121 se ha descrito y se comercializa como una molécula experimental que es un activador de proteína cinasa C unida a membrana (PKC) en células HL-60 a una concentración de 20 µg/ml (E.C. Heesbeen y col., *FEBS Lett.* 1991, **290**: 231-4). Se ha encontrado que AP-121 es competitivo con fosfatidilserina que se une al dominio regulador de PKC. AP-121 también se describió como un inhibidor de PKC (L.W. Daniel y col., *Cancer Res.* 1995, **55**: 4844-9). Otros encontraron que PKC se inhibe a concentraciones de AP-121 medias, pero se activó a bajas y altas concentraciones (J. D. Aroca y col., *Eur. J. Biochem.* 2001, **268**: 6369-78). Otros describen que PKC no participa en la acción citotóxica de AP-121 en células HL-60 y K562 (E.C. Heesbeen y col., *Biochem. Pharmacol.* 1994, **47**: 1481-8). AP-121 inhibió progresivamente la actividad de PKC alta a medida que aumentó la concentración hasta el 30% en moles del lípido total, por encima de la cual el efecto fue uno de activación. Sobre PKC épsilon, AP-121 tuvo un efecto trifásico, activando la enzima a bajas concentraciones, inhibiéndola a concentraciones ligeramente mayores y luego activándola de nuevo a mayores concentraciones (P. Conesa-Zamora y col., *Biochim. Biophys. Acta* 2005, **1687**: 110-9).

40

También se ha descrito que AP-121 inhibe la asociación entre Ras y Raf-1, una interacción de proteínas conocida que promueve el crecimiento tumoral (P. Samadder y col., *Anticancer Research* 2003, **23**: 2291-5). Las dosis inferiores a micromolares de AP-121 indujeron la rápida internalización, pero no la activación, del receptor de factor

de crecimiento epidérmico (EGFR), un agente anticancerígeno conocido, y la activación de MAPK/ERK concomitante en células A431 (G.A. Ruiter y col., *Int. J. Cancer* 2002, **102**: 343-50). AP-121 redujo el número de sitios de receptor sin afectar la afinidad de receptores de EGF en las líneas celulares MCF-7 y ZR-75-1 de cáncer de mama. Cuando se añadió a concentraciones micromolares (5-25 μ M), AP-121 inhibe la activación de MAPK/ERK inducida por el factor de crecimiento, a dosis nM (10-500 nM). La activación de la ruta de MAPK/ERK por AP-121 en células A431 sin estimular la proliferación celular: sorprendentemente, AP-121 (500 nM) también desencadenó el rápido agrupamiento e internalización de EGFR en células A431 (H. Kosano y O. Takatani, *Cancer Research* 1988, **48**: 6033-6).

También se ha descrito que AP-121 inhibe la fosforilación y activación de cinasa p70 S6 en células MCF-7 (G. Arthur y col., *Anticancer Research* 2005, **25**: 95-100). La inhibición de Na,K-ATPasa y la bomba de sodio por AP-121 se describió por otros (K. Oishi y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, **157**: 1000-6). Se describió la activación de cinasa del extremo NH2 de c-Jun y la posterior estimulación de apoptosis por A-121 (C. Gajate y col., *Mol. Pharmacol.* 1998, **53**: 602-12).

La inhibición de la ruta de PI3K-AKT/PKB por AP-121 parece importante, ya que la elevada actividad de Akt y PI3K y las mutaciones en PTEN, su regulador negativo, están asociadas a tumor maligno y convierten las células en insensibles a inducción por apoptosis (M.I. Berggren, y col., *Cancer Research* 1993, **53**: 4297-302). Así, AP-121 pueden inhibir la activación de PI3K funcional por insulina. En la dirección 3' de AKT, AKT desactiva SEK-1, que es un activador de la cascada de SAPK/JNK. Así, la desactivación de AKT con AP-121 permite activar las proteínas de SAPK/JNK pro-apoptósicas (véase la Tabla 2., G.A. Ruiter, y col., *Anticancer Drugs* 2003, **14**: 167-73).

Tabla 2: Valores de DE₅₀ (μ M) para la inducción de apoptosis por AP-121 de ALP, HePC y perifosina en las líneas celulares de carcinoma epitelial humano A431 y HeLa (media \pm DE de tres experimentos independientes).

	AP-121	HePC	Perifosina
A431	15,47 \pm 2,9	17,27 \pm 3,0	23,17 \pm 2,7
HeLa	5,17 \pm 1,6	8,17 \pm 0,4	9,27 \pm 1,8

Se describió la inhibición de fosfolipasa C por AP-121, conduciendo a un bloque de receptor 1 muscarínico y receptor δ de opiodes, con una posible aplicación de AP-121 en antinocicepción. (L.F. Horowitz y col., *J. Gen. Physiol* 2005, **126**: 243-62).

La apoptosis desencadenada por AP-121 es prevenida por el aumento de la expresión de fosfocolina citidiltransferasa (CTP) (I. Baburina y S. Jackowski, *J. Biol. Chem.* 1998, **279**: 2169-2173), sugiriendo CTP como diana primaria de AP-121.

Se hizo una conexión con la inhibición del receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P) S1P1 que media en la supresión de la migración de linfocitos T (G. Dorsam y col., *J. Immunol.* 2003, **171**: 3500-7). S1P previene los contrastes de la apoptosis resultante de niveles elevados de ceramida inducida por TNF α , anticuerpo anti-Fas, esfingomielinasa o ceramida permeable a células. La regulación por incremento de la enzima esfingosina cinasa responsable de su producción puede contribuir a RMF protegiendo la célula de apoptosis (O. Cuvillier y col., *Nature* 1996, **381**: 800-3). Células de Jurkat tratadas con anticuerpo monoclonal anti-Fas (clon CH-11) se sometieron a amplia muerte celular en el plazo de 3 h. La ligación de Fas induce activación de SAPK/JNK en linfocitos T de Jurkat. La ligación de Fas induce escisión de PARP mediante un aumento significativo en la actividad de PARP proteolítica de caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7, S1P disminuyó marcadamente la actividad de caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7 (O. Cuvillier y col., *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**: 2910-16).

Gajate publicó la capacidad de AP-121 para inducir el agrupamiento del receptor FAS en montones de lípidos razonando que esto produce la capacidad de AP-121 para inducir apoptosis (C. Gajate y col., *J. Exp. Med.* 2004, **200**: 353-365). Esta diana AP-121 putativa también se mostró en células de linfoma y líneas celulares (C. Gajate y F. Mollinedo, *Blood* 2001, **98**: 3860-3863). Por otra parte, Spiegel y colaboradores atribuyen estas propiedades pro-apoptósicas a la liberación de citocromo c de mitocondrias (O. Cuvillier y col., *Blood* 1999, **94**: 3583-3582), independiente del receptor FAS. AP-121 es internalizado en montones de lípidos de células tumorales mediante endocitosis (A.H. van der Luit y col., *J. Biol. Chem.* 2002, **277**: 39541; A.H. van der Luit, y col., *J. Biochem.* 2003, **374**: 747). Una vez en la célula, AP-121 desencadena el reclutamiento de la proteína del dominio de muerte asociado a Fas, procaspasa-8 y procaspasa-10, cinasa c-Jun del extremo N y Bid, las moléculas críticas para la iniciación de la apoptosis (C. Gajate y col., *Exp. Med.* 2004, **200**: 353). Así, el receptor de muerte (FAS-R) y las rutas apoptósicas mitocondriales están espaciosamente unidos, produciendo rotura del potencial transmembrana mitocondrial, producción de especies reactivas del oxígeno, activación de caspasa-3, escisión de poli(ADP-ribosa) polimerasa y fragmentación de ADN (C. Gajate y col., *Int. J. Cancer* 2000, **86**, 208.).

En comparación con las actividades biológicas informadas de AP-121 en líneas celulares que están en el intervalo

micromolar bajo, el efecto más potente descrito hasta la fecha a nuestro presente conocimiento es la actividad antiangiogénica de 60 nanomolar en células endoteliales HMEC1 (D. Candal, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1994, **34**: 175-178).

5 Basándose en estos datos biológicos de diversas células y líneas celulares, parece que se necesita un procedimiento para descubrir un efecto biológico de AP-121, si lo hay, que sea de relevancia terapéutica para una indicación terapéutica específica.

10 A pesar de la incertidumbre de su efecto biológico, el documento US 5.149.527 describe composiciones inmunopotenciadoras que comprenden éter-lípidos como agentes adecuados que dan lugar a necrosis tumoral y/o regresión en sujetos que previamente han recibido terapia satisfactoria, que destruye tumores y estimula macrófagos citotóxicos. Los agentes deben administrarse en un momento en el que la formación de macrófagos específicamente citotóxicos para el tumor ha sido generada por terapia previa. Sin embargo, no se ha proporcionado ningún dato para soportar esta actividad de AP-121.

15 AP-121 se ha descrito como un compuesto útil para tratar cáncer (documento DE 02 619 686) administrando a los mamíferos una cantidad farmacéuticamente eficaz de AP-121 para reducir el tamaño de tumores y también se ha descrito en los documentos US 6.514.519 y EP 1 079 838, siendo especialmente adecuado para el tratamiento de tumores cerebrales malignos primarios y secundarios.

20 El documento US 6.235.729 se refiere a un procedimiento para inhibir la progresión tumoral ralentizando o inhibiendo la invasividad y metástasis tumoral que comprende la etapa de administrar a dicho individuo una dosis farmacológicamente eficaz de un inhibidor de fosfolipasa C tal como AP-121. Preferentemente, el inhibidor de fosfolipasa C disminuye la fosfolipasa C γ . Globalmente, un inhibidor de fosfolipasa C tal se administraría en una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg. Aunque no se proporcionan datos para soportar la reivindicación, la dosis informada no reflejará la baja actividad de AP-121, encontrada en pruebas *in vitro* en cualquier parte.

25 También se ha informado que AP-121 es útil para tratar esclerosis múltiple (EM; documentos EP 2 363 901, DE 03 530 767) o artritis reumatoide (AR) o espondilitis anquilosante (EA; documento EP 474 712), por inhibición de linfocitos T citotóxicos CD4+ o CD8+ activados (CTL).

Resumen de la invención

35 La presente invención comprende un procedimiento para determinar si una molécula pequeña es un mimético funcional de ligandos de receptores terapéuticamente útil. La presente divulgación también se refiere a procedimientos de tratamiento y de diagnóstico terapéuticamente útiles y composiciones que contienen AP-121 tanto solo como en combinación con otros compuestos terapéuticamente útiles y procedimientos para establecer su utilidad terapéutica.

40 Según la presente invención, el efecto biológico de un ligando de receptores funcionales tal como una proteína, péptido o anticuerpo endógeno o artificialmente preparado se mide contra un panel de al menos tres células humanas primarias diferentes o líneas celulares permanentes solas y en combinación con un panel de otros compuestos que dan lugar a una matriz de resultados biológicos. En paralelo, el mimético de ligando de moléculas pequeñas putativo también se mide contra el mismo panel de al menos tres células humanas primarias diferentes o líneas celulares permanentes solas y en combinación con el mismo panel de otros compuestos para dar una segunda matriz de resultados biológicos. Si la similitud, como se calcula por un algoritmo matemático tradicional, de estas dos matrices es superior a un umbral predefinido, la molécula pequeña puede considerarse un mimético de ligandos de receptores verdadero que va a usarse como agente terapéutico. Además, el procedimiento según la

50 presente invención también administra combinaciones terapéuticamente útiles de moléculas pequeñas que pueden actuar sinérgicamente en enfermedades en las que la modulación de dicho receptor proporciona un efecto terapéutico.

55 En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar si una molécula pequeña es una sustitución funcional para un ligando de proteína o péptido de un receptor celular en el tratamiento de enfermedades en las que la modulación de este receptor conducirá a un efecto terapéutico, procedimiento que comprende:

60 medir los efectos biológicos de tanto el ligando de proteína o de péptido como la molécula pequeña en un panel de al menos 3 líneas celulares permanentes y/o líneas primarias diferentes que expresan dicho receptor celular; y

65 a condición de que los efectos biológicos sobre este panel de células de ambos compuestos sean cualitativamente similares, guardando relación los resultados con la presencia cuantitativa del receptor celular en la célula respectiva del panel.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento novedoso para determinar si una molécula pequeña es un mimético funcional y terapéuticamente útil de un ligando de receptor.

5 Una "molécula pequeña", como se usa aquí, comprende, entre otros, péptidos, proteínas, moléculas de ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, además de compuestos químicos de bajo peso molecular.

10 Los péptidos y proteínas que pueden usarse en la presente invención comprenden moléculas que se produce naturalmente, además de diseñadas artificialmente, por ejemplo, por medio de tecnología de ADN recombinante o por síntesis química. Tienen una longitud de normalmente al menos 800 aminoácidos, preferentemente de al menos 600 aminoácidos, más preferentemente de al menos 400 aminoácidos, y lo más preferentemente de al menos 200 aminoácidos.

15 Ejemplos de ácidos nucleicos que pueden usarse en la presente invención incluyen ácidos nucleicos que se producen naturalmente tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), además de análogos de ácido nucleico. Tales ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud y pueden ser moléculas tanto monocatenarias como bicatenarias.

20 Ejemplos de hidratos de carbono que pueden usarse en la presente invención incluyen monosacáridos tales como glucosa o fructosa, disacáridos tales como lactosa o sacarosa, además de oligosacáridos y polisacáridos tales como almidón, prefiriéndose monosacáridos.

25 Ejemplos de lípidos que pueden usarse en la invención incluyen ácidos grasos, triacilglicéridos, esfingolípidos y fosfolípidos. En realizaciones preferidas de la invención, las moléculas pequeñas están seleccionados de éter-lípido, preferentemente alquil-lisofosfolípidos, prefiriéndose particularmente AP-121.

30 El término "compuesto químico de bajo peso molecular", como se usa aquí, denota una molécula, preferentemente una molécula orgánica, que comprende al menos dos átomos de carbono, pero preferentemente no más de siete enlaces de carbono, que tiene un peso molecular en el intervalo entre 100 y 2.000 Dalton, preferentemente entre 100 y 1.000 Dalton, y que opcionalmente incluye uno o dos átomos de metal. Ejemplos de tales moléculas incluyen, entre otros, imidazoles, indoles, isoxazoles, oxazoles, piridinas, pirimidinas y tiazoles.

35 Como primera etapa del procedimiento según la presente invención tiene que seleccionarse un receptor diana terapéuticamente relevante, además de un ligando adecuado que ejerza un efecto modulador, en el cual el término "efecto modulador", como se usa aquí, comprende tanto un efecto antagonista (es decir, bloqueo o inhibición) como agonista (es decir, activación) sobre la señalización en la dirección 3' del receptor seleccionado. Este ligando seleccionado puede ser el ligando endógeno del receptor seleccionado o cualquier otra proteína o péptido, tal como un anticuerpo, que se sabe que presenta este efecto. Este ligando no necesita presentar propiedades que sean
40 útiles para moléculas tipo fármaco, sino que es importante que el ligando presente su efecto selectivamente y carezca de propiedades que dificulten o hagan imposible su uso como herramienta para el cribado basado en células. Además, tiene que seleccionarse una molécula pequeña que sea un mimético de ligandos de receptores putativo, junto con un panel de al menos una, preferentemente al menos dos, y más preferentemente al menos tres
45 otras moléculas que se sabe que presentan un efecto biológico.

En una segunda etapa del presente procedimiento tiene que seleccionarse un panel de al menos tres líneas primarias de origen humano diferente y/o líneas celulares derivadas de ser humano permanentes. Estas líneas celulares expresarán preferencialmente el receptor seleccionado en diferentes niveles, y/o con un estado de mutación diferente y/o diferente concentración en la membrana celular, asegurando que una correlación del efecto biológico con tales niveles de receptor pueda derivarse del efecto biológico medido.
50

En una tercera etapa se miden los efectos biológicos de los diversos compuestos seleccionados. Según la presente invención, bajo el término "efecto biológico" puede usarse una variedad de ensayos biológicos basados en células para medir tal efecto. Por ejemplo, pueden medirse, pero no se limitan a, expresión génica tal como RT-PCR, detección del nivel de proteínas o acontecimientos biológicos más complejos tales como inhibición de la proliferación, formación de colonias, angiogénesis o apoptosis.
55

El "efecto biológico" según la presente invención también puede ser un resumen o resultado promedio de varios ensayos biológicos, tanto por experimentación repetida, usando diferentes concentraciones, como implicando ensayos de diferente naturaleza. Así, un efecto biológico puede ser una concentración inhibidora del 50% (CI₅₀), dosis eficaz (DE₅₀), índice de combinación (IC) o similar. Según el presente procedimiento, los compuestos se miden ahora del siguiente modo para obtener dos matrices de resultados biológicos: primero se miden los efectos biológicos del ligando de receptor en cada línea celular individual (de 1 a N, siendo N el número de células diferentes), preferencialmente repitiendo el mismo experimento múltiples veces para obtener resultados fidedignos.
60 A continuación, el ligando de receptor se combina en relaciones predefinidas con cada uno de los otros compuestos individualmente para obtener mezclas de dos compuestos.
65

5 Estas mezclas de dos compuestos también pueden contener mezclas del mismo ligando y compuesto, pero en diferentes relaciones (1 a M, siendo M el número de mezclas de compuestos diferentes). Tras esto se miden los efectos biológicos de cada mezcla en cada línea celular individual (de 1 a N, siendo N el número de diferentes células), preferencialmente repitiendo el mismo experimento múltiples veces para obtener resultados fidedignos. Como resultado, los inventores obtienen una matriz de dos dimensiones (A1) de resultados biológicos.

10 En una cuarta etapa, la tercera etapa se repite reemplazando el ligando de receptor con la molécula pequeña putativa que también se mide de la misma forma contra el mismo panel de al menos tres líneas primarias humanas o líneas celulares permanentes diferentes solas y en combinación con el mismo panel de otros compuestos para dar una segunda matriz bidimensional (A2) de resultados biológicos. Para fines de ilustración, las matrices A1 y A2 pueden tomar el siguiente formato:

15

A1

	Ligando (L)	Ligando + Comp 1	Ligando + Comp 2	...	Ligando + Comp M
Célula 1	0,50	0,40	0,30		0,30
Célula 2	1,80	2,90	0,40		5,00
...					
Célula N	0,10	0,10	0,00		0,20

A2

	Mol peq (MP)	MP + Comp 1	MP + Comp 2	...	MP + Comp M
Célula 1	0,40	0,30	0,35		0,40
Célula 2	1,20	3,00	0,20		4,00
...					
Célula N	0,40	0,20	0,20		0,40

20 En una quinta etapa del procedimiento según la presente invención, las matrices A1 y A2 se normalizan de tal forma que cada efecto biológico se exprese como su relación con el mayor efecto biológico observado en cada una de las diferentes células, conduciendo a matrices B1 y B2 derivadas.

Estas matrices B1 y B2 bidimensionales normalizadas pueden tomar la siguiente forma:

25

B1

	Ligando (L)	Ligando + Comp 1	Ligando + Comp 2	...	Ligando + Comp M
Célula 1	0,17	0,14	0,10		0,10
Célula 2	0,62	1,00	0,14		1,72
...					
Célula N	0,03	0,03	0,00		0,07

B2

	Mol peq (MP)	MP + Comp 1	MP + Comp 2	...	MP + Comp M
Célula 1	0,10	0,08	0,09		0,10
Célula 2	0,30	0,75	0,05		1,00
...					
Célula N	0,10	0,05	0,05		0,10

30 En una sexta etapa del procedimiento según la presente invención se establece la similitud entre la matriz B1 y B2. Hay muchos algoritmos matemáticos tradicionales para calcular tal similitud, estos algoritmos no son parte de la presente invención, pero pueden derivarse de cualquier libro de texto matemático del estado de la técnica o herramientas de software establecidas para evaluar la similitud de perfiles de expresión génica. También pueden

usarse diferentes índices de similitud para calcular tal similitud tal como, por ejemplo, el coeficiente de Cosine, Dice, Euclid, Forbes Hamman, Jaccard, Kulczynski, Manhattan, Pearson, Rogers-Tanimoto, Russel-Rao, Simpson, Tanimoto o Yule descrito en (J.D. Holliday y col., *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 2002, **5**: 155-166).

5 Como etapa intermedia de este cálculo, los inventores pueden obtener una matriz de similitud unidimensional (S) a partir de la que puede determinarse la similitud contra cada línea celular:

S	similitud
Célula 1	0,96
Célula 2	0,65
...	
Célula N	0,960

10 Si la similitud calculada es superior a un umbral predefinido, la molécula pequeña puede considerarse como un mimético de ligandos de receptores verdadero que va a usarse como agente terapéutico. Este umbral predefinido puede determinarse tanto midiendo una molécula pequeña que se sabe que tiene actividad biológica, pero que no es un ligando de receptor.

15 Además, el procedimiento según la presente invención también administra combinaciones terapéuticamente útiles de moléculas pequeñas que pueden actuar sinérgicamente en enfermedades en las que la modulación de dicho receptor proporciona un efecto terapéutico.

20 La presente divulgación también se refiere a tratamientos terapéuticamente útiles, procedimientos de diagnóstico y composiciones que contienen AP-121 como mimético de ligandos de receptores FAS de CH-11, tanto solos como en combinación con otros compuestos terapéuticamente útiles y procedimientos para establecer su utilidad terapéutica. Preferentemente, las composiciones de la presente divulgación son formas de dosificación farmacéuticas administrables por vía oral, particularmente preferentemente formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, píldoras, cápsulas y gránulos. Además, y diferente a CH-11, AP-121 proporciona beneficio terapéutico a pacientes cuando se compara con CH-11 o un anticuerpo similar ya que está biodisponible por vía oral y es bien tolerado (P. Drings y col., *Onkologie* 1992, **15**: 375-382).

30 La invención se describe adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos, que son únicamente con el fin de ilustrar realizaciones específicas de la presente invención, y no deben interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la invención. Los materiales usados en las siguientes pruebas están tanto comercialmente disponibles como se preparan fácilmente a partir de materiales comercialmente disponibles por aquellos expertos en la materia.

Figuras

35 **Figura 1** representa los efectos *in vitro* de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina (concentración final 10 μ M), radiación (ionizante) (dosis absorbida de 5 unidades de Gray; indicada como "RT") y una combinación de las mismas sobre la muerte celular programada (apoptosis) y la tasa de supervivencia de células de adenocarcinoma de próstata humano sensible a andrógenos LNCaP. La apoptosis se determinó usando el ensayo Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7, Promega, Inc., Madison, WI, EE.UU., según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células cancerosas vivas se estimó por medio de exclusión con colorante de azul de tripano como se ha descrito (Freshney, R.I. (1994) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 3ª ed. Wiley-Liss. Nueva York. EE.UU.) Las células se expusieron a radiación seis horas después (**Fig. 1A**), concomitantemente con (**Fig. 1B**) o seis horas antes de la administración de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina (**Fig. 1C**). El ensayo de caspasa se realizó 12 horas después de la exposición a radiación. Los datos respectivos mostrados representan el promedio de dos experimentos independientes.

50 **Figura 2** representa los efectos *in vitro* de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina (30 mg/kg de peso corporal/día administrada intraperitonealmente durante 15 días; **Fig. 2A**), radiación (ionizante) (dosis absorbida de 5 unidades de Gray administrada en el día 7; **Fig. 2C**) y una combinación de las mismas (**Fig. 2B**) sobre células LNCaP cultivadas ortotópicamente en las próstatas de ratones sin pelo (siete ratones/grupo). El crecimiento tumoral se evaluó determinando el nivel en suero del antígeno prostático específico (PSA) usando un kit de prueba comercialmente disponible, además del volumen tumoral por medio de resonancia magnética nuclear.

55

Ejemplos y procedimientos experimentales

Ejemplo 1: Etapa de selección

- 5 Para demostrar la utilidad práctica del procedimiento, los inventores han elegido como ejemplo el receptor FAS para el que se busca un ligando pequeño activante, el anticuerpo agonista CH-11 como ligando de receptor adecuado, además de AP-121 como mimético de CH-11 putativo. Los fármacos conocidos camptotecina, temozolamida, adriamicina y tarceva se eligieron como panel de compuestos adicionales para las mediciones de combinación.
- 10 Como panel de prueba biológica, los inventores seleccionaron las líneas celulares de tumor cerebral U87MG, A172, LN-18, LN-229, U118MG y T98G que tienen diferentes niveles de mutaciones en p53 y PTEN, además de la expresión del receptor FAS:

Nº	Línea celular	p53	pTEN	FasL	Fas	ATCC Nº
1	U87	no mut	mut. (delección)	+	no mut	HTB- 14
2	A172	no mut	mut. (delección)	+	no mut	CRL-1620
3	LN18	mut	no mut	+	no mut	CRL-2610
4	LN299	mut	no mut	+	no mut	CRL-2611
5	T98G	mut	mut. (delección)	+	no mut	CRL-1690
6	U-118MG	mut	mut. (delección)	?	no mut	HTB-15

- 15 Se han identificado receptores de muerte Fas en la mayoría de las células de glioblastoma y los niveles de expresión se corresponden con el grado de tumor maligno (O. Tachibana y col., *Cancer Res.* 1995, **55**: 5528-30). La apoptosis y la supervivencia en astrocitomas de alto grado como se relaciona con la expresión de Fas de tumor (APO-1/CD95) (Frankel y col., *Neurooncol.* 2002, **59**: 27-34).
- 20 La expresión de proteínas del receptor Fas, ligando de Fas (FasL), Bcl-2 y TGFh2 establece una correlación con la supervivencia en gliomas humanos iniciales y recurrentes (R.J. Stregre y col., *J. Neurooncol.* 2004, **67**: 29-39). La co-expresión de Fas y ligando de Fas se ha descrito en tumores de la glía malignos y líneas celulares (N. Husain y col. *Acta Neuropathol.* (Berl) 1998, **95**: 287-90).
- 25 Sin embargo, debido a que la mayoría de las células de glioblastoma son resistentes a apoptosis inducida por ligando de Fas, el aprovechar la ruta inductora de muerte en gliomas requerirá la sensibilización por otros medios: los tumores cerebrales pediátricos *ex vivo* expresan Fas (CD95) y FasL (CD95L) y son resistentes a inducción de apoptosis. (C.D. Riffkin y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, **96**: 14871-14876). La regulación por incremento de Fas de tumor (APO-1/CD95) produce un aumento de los tiempos de apoptosis y supervivencia para ratas con gliomas malignos intracraneales (B. Frankel y col., *Neurosurgery* 2001, **49**: 168-75).

El clon del anticuerpo anti-Fas humano activante CH-11 de Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EE.UU. (catálogo N°05-201), la IgM purificada por inmutafinidad de ratón; el anticuerpo reconoce Fas (43kD) y tiene actividad citolítica en células humanas que expresan Fas. Células WR19L y L929 murinas transfectadas con ADNc que codifica FasL humano experimentan apoptosis en respuesta al anticuerpo. El anticuerpo no reconoce TNF y no reacciona de forma cruzada con FasL de ratón. Después de 24 h se destruye el 86% de las células Jurkat humanas.

35 En un documento fundamental (A. Algeciras-Schimmich y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, **100**: 11445-50), líneas celulares humanas se clasificaron como tipo II si FasL soluble fue citotóxico o como tipo I si no fue. Sin embargo, CH-11, diferente a FasL soluble, también es citotóxico para algunas células de tipo II. Tanto FasL como CH-11 pueden ejercer una actividad sinérgica sobre células.

40 Por tanto, los inventores concluyen que el hallazgo de una molécula pequeña que es un mimético de CH-11 podría ser de uso terapéutico en situaciones en las que las células tumorales no son sensibles a todas o no son suficientemente sensibles a FasL endógeno o en situaciones en las que no se expresa FasL suficiente en el tejido enfermo.

Ejemplo 2: Líneas celulares y reactivos

50 Se compraron U-118MG (glioblastoma/astrocitoma, p53 mut, PTEN mut), T98G (glioblastoma multiforme, p53 mut, PTEN mut), A172 (glioblastoma, p53 no mut, PTEN mut) y U87MG (glioblastoma/astrocitoma p53 no mut, PTEN mut) de ATCC.

55 U-118MG y A172 se incubaron en medio DMEM complementado con 10% de SBF y P/S, T98G y U87MG se incubaron en medio DMEM complementado con disolución 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco), 10% de

5 SBF y P/S según recomendaciones de ATCC. AP-121 se preparó como disolución madre 5 mM en agua estéril destilada; temozolomida (TMZ) (Haorui Pharma-Chem, Inc., Edison, NJ) se preparó como 100 mM en DMSO filtrado estéril; adriamicina (ADR) (Sigma) se preparó como 1 mM en agua estéril destilada; camptotecina (CTP) (Sigma) se preparó como disolución 10 mM en NaOH 0,1 N; tarceva (Proteinkinase, Alemania) se preparó como disolución 5 mM en DMSO estéril. Todas las mezclas madres se mantuvieron a -20°C.

Ejemplo 3: Ensayo de proliferación WST-1

10 2000 células se sembraron en cada pocillo de placas de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C en 5% de CO₂. El crecimiento de las células sembradas en placa se midió añadiendo 7,5 µM de reactivo WST-1 (Roche Applied Sciences, Alemania) a 3 pocillos de control y midiendo la absorbancia a 650 nm y a 450 nm, respectivamente, con un lector de placas SpectraMax250. Si los valores de DO₆₅₀-DO₄₅₀ fueron superiores a 0,5, el resto de la placa se usó para incubación con AP-121, otros agentes farmacológicos o control de disolvente durante 96 horas.

15 Después de esta incubación, el reactivo WST-1 se añadió a los pocillos y los valores de DO₆₅₀-DO₄₅₀ se calcularon como antes. Se ensayaron seis pocillos para cada condición y se determinó la desviación estándar: todos los experimentos se realizaron al menos tres veces independientemente. Después de la elucidación de valores individuales de CI₅₀ para cada compuesto se realizó el tratamiento de combinación simultánea de AP-121 y el agente quimioterapéutico a su relación de CI₅₀; el índice de combinación (IC) se determinó por el paquete de software Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO). Los datos se evaluaron calculando las medias del índice de combinación (IC) en el que un IC de <0,3 indica un fuerte efecto sinérgico, 0,3<IC<0,7 un efecto sinérgico, 0,7<IC<0,9 sinergia moderada, 0,9<IC<1 efecto aditivo e IC>1 efecto antagonista, respectivamente.

20 Para las medidas de la combinación de fármacos de proliferación de células con AP-121, la DE₅₀ se determinó para cada fármaco. Se usaron 6 concentraciones diferentes de cada fármaco en las mediciones del índice de combinación y en comparación con +/- células, y en comparación con controles sin compuesto. Cada combinación se repitió 6 veces a 2 momentos de tiempo diferentes (24 y 96 horas), cada uno de los experimentos anteriores se repitió 3 veces para obtener resultados válidos.

30 Por ejemplo, una medición tal se muestra a continuación, midiéndose la línea celular U118, y una mezcla de AP-121 y temozolamida (TMZ), como la diferencia de absorción óptica a 450 frente a 650 nm. Las dos filas superiores denotan las concentraciones micromolares de AP-121 o TMZ en seis relaciones diferentes, la fila A contiene los medios con compuestos, pero sin añadir células, la fila B a G células y se añade la mezcla de compuestos respectiva, la fila H1-H3 son con células, pero sin la mezcla de compuestos, añadiendo agua en lugar de la mezcla de compuestos, H4-H6 es la misma que H1-H3, pero con agua que contiene 1% de DMSO, se añade reactivo WST a todos los pocillos, con excepción de H1-H3.

AP-121	20	10	5	2,5	1,25	0,625
TMZ	1000	500	250	125	62,5	31,2500
A	0,172	0,19	0,183	0,184	0,191	0,201
B	0,22	0,309	0,368	0,362	0,457	0,494
C	0,229	0,322	0,39	0,383	0,451	0,437
D	0,251	0,339	0,397	0,418	0,461	0,478
E	0,253	0,333	0,421	0,424	0,417	0,482
F	0,254	0,322	0,384	0,426	0,456	0,475
G	0,258	0,327	0,4	0,392	0,447	0,444
H	0,896	0,926	0,97	0,39	0,383	0,398

40 De este experimento, y la DE₅₀ previamente determinada de cada compuesto individual contra cada línea celular, el índice de combinación se calculó como se muestra a continuación en el resumen experimental para cada mezcla de compuestos y línea celular usando el programa Calcsyn.

RESUMEN EXPERIMENTAL: A continuación sólo se describen algunos datos seleccionados del experimento completo.

Ejemplo 4: Índices de combinación (IC) de AP-121

5

Fecha: 15 de agosto de 2006

LÍNEA CELULAR	U87MG	glioblastoma/astrocitoma: p53 no mut, pTEN mut				
Valores de IC a						
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA		
AP-121-TMZ (1:40)	0,477	0,418	0,396	0,431	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
AP-121-CPT (250:1)	0,849	0,652	0,502	0,668	0,5<IC<0,75	SINERGIA
AP-121-ADR (100:1)	0,945	0,695	0,536	0,725	0,5<IC<0,75	SINERGIA
AP-121-Tarceva (2:1)	1,610	1,985	2,460	2,018	IC>1,0	ANTAGONISMO
AP-121-CH-11 (1:100)	1,328	1,888	2,684	1,967	IC>1,0	ANTAGONISMO

Fecha: 24 de agosto de 2006

LÍNEA CELULAR	U87MG	glioblastoma/astrocitoma: p53 no mut, pTEN mut				
Valores de IC a						
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA		
AP-121-TMZ (1:50)	0,608	0,702	0,838	0,716	0,5<IC<0,75	SINERGIA
AP-121-CPT (200:1)	1,057	0,608	0,378	0,681	0,5<IC<0,75	SINERGIA
AP-121-ADR (50:1)	0,525	0,447	0,470	0,481	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
AP-121-Tarceva (1:2)	1,448	1,103	0,934	1,162	IC>1,0	ANTAGONISMO

Fecha: 7 de septiembre de 2006

LÍNEA CELULAR	U87MG	glioblastoma/astrocitoma: p53 no mut, pTEN mut				
Valores de IC a						
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA		
AP-121-TMZ (1:50)	0,311	0,485	0,870	0,555	0,5<IC<0,75	SINERGIA
AP-121-CPT (250:1)	2,076	2,269	2,579	2,308	IC>1,0	ANTAGONISMO
AP-121-ADR (50:1)	0,671	0,857	1,098	0,875	IC<0,5	SINERGIA
AP-121-Tarceva (1:2)	2,122	2,550	3,248	2,640	IC>1,0	ANTAGONISMO

ES 2 393 762 T3

Fecha: 15 de agosto de 2006

LÍNEA CELULAR	A172	glioblastoma: p53 no mut, pTEN mut				
Valores de IC a						
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA		
AP-121-TMZ (1:10)	0,659	0,216	0,073	0,316	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
AP-121-CPT (250:1)	0,554	0,378	0,284	0,405	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
AP-121-ADR (50:1)	0,622	0,472	0,402	0,499	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
AP-121-Tarceva (1:5)	1,157	0,662	0,406	0,742	0,5<IC<0,75	SINERGIA
AP-121-CH-11 (1:200)	0,260	0,357	0,529	0,382	IC<0,5	SINERGIA FUERTE

Fecha: 24 de agosto de 2006

LÍNEA CELULAR	A172	glioblastoma: p53 no mut, pTEN mut				
Valores de IC a						
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA		
AP-121-TMZ (1:10)	0,602	0,360	0,238	0,400	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
AP-121-CPT (250:1)	0,634	0,492	0,382	0,503	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
AP-121-ADR (50:1)	1,410	1,013	0,734	1,052	IC=1,0	ADITIVO
AP-121-Tarceva (1:2)	0,971	0,628	0,407	0,669	0,5<IC<0,75	SINERGIA

Fecha: 7 de septiembre de 2006

LÍNEA CELULAR	A172	glioblastoma: p53 no mut, pTEN mut				
Valores de IC a						
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA		
AP-121-TMZ (1:10)	0,529	0,463	0,480	0,491	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
AP-121-CPT (250:1)	0,893	0,874	0,872	0,880	IC<0,5	SINERGIA
AP-121-ADR (50:1)	0,770	0,767	0,775	0,771	IC<0,5	SINERGIA
AP-121-Tarceva (1:5)	0,612	0,589	0,588	0,596	0,5<IC<0,75	SINERGIA

ES 2 393 762 T3

Fecha: 15 de agosto de 2006

LÍNEA CELULAR	U118MG	glioblastoma/astrocitoma: p53 mut, pTEN mut					
Valores de IC a							
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA			
AP-121-TMZ (1:40)	0,756	0,595	0,560	0,637	0,5<IC<0,75	SINERGIA	
AP-121-CPT (2500:1)	0,541	16,227	613,210	209,992	IC>1,0	ANTAGONISMO	
AP-121-ADR (100:1)	0,380	0,766	1,793	0,980	IC=1,0	ADITIVO	
AP-121-Tarceva (1:2)	0,598	0,408	0,336	0,448	IC<0,5	SINERGIA FUERTE	
AP-121-CH-11 (1:100)	0,561	1,038	2,089	1,230	IC>1,0	ANTAGONISMO	

Fecha: 24 de agosto de 2006

LÍNEA CELULAR	U118MG	glioblastoma/astrocitoma: p53 mut, pTEN mut					
Valores de IC a							
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA			
AP-121-TMZ (1:50)	0,637	0,450	0,514	0,534	0,5<IC<0,75	SINERGIA	
AP-121-CPT (2000:1)	1,178	1,805	4,051	2,345	IC>1,0	ANTAGONISMO	
AP-121-ADR (50:1)	0,804	0,381	0,222	0,469	IC<0,5	SINERGIA FUERTE	
AP-121-Tarceva (1:2)	2,498	1,561	1,717	1,925	IC>1,0	ANTAGONISMO	

Fecha: 7 de septiembre de 2006

LÍNEA CELULAR	U118MG	glioblastoma/astrocitoma: p53 mut, pTEN mut					
Valores de IC a							
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA			
AP-121-TMZ (1:50)	0,578	0,462	0,381	0,474	IC<0,5	SINERGIA FUERTE	
AP-121-CPT (1000:1)	1,644	1,996	2,446	2,028	IC>1,0	ANTAGONISMO	
AP-121-ADR (50:1)	1,231	1,025	0,857	1,038	IC=1,0	ADITIVO	
AP-121-Tarceva (1:5)	1,391	0,949	0,677	1,005	IC=1,0	ADITIVO	

Fecha: 24 de agosto de 2006

LÍNEA CELULAR	LN-18	glioblastoma: p53 mut, pTEN no mut					
Valores de IC a							
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA			
AP-121-TMZ (1:50)	4,735	5,368	6,090	5,397	IC>1,0	ANTAGONISMO	
AP-121-CPT (10:1)	29,352	16,143	9,274	18,256	IC>1,0	ANTAGONISMO	
AP-121-ADR (5:1)	1,944	2,691	3,732	2,789	IC>1,0	ANTAGONISMO	
AP-121-Tarceva (1:10)	6,529	6,744	7,022	6,765	IC>1,0	ANTAGONISMO	

Fecha: 7 de septiembre de 2006

LÍNEA CELULAR	LN-18	glioblastoma: p53 mut, pTEN no mut					
Valores de IC a							
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA			
AP-121-TMZ (1:100)	1,026	1,030	1,043	1,033	IC=1,0	ADITIVO	
AP-121-CPT (20:1)	1,146	1,073	1,022	1,080	IC>1,0	ADITIVO	
AP-121-ADR (10:1)	1,235	1,188	1,147	1,190	IC>1,0	ANTAGONISMO	
AP-121-Tarceva (1:20)	1,589	1,684	1,990	1,754	IC>1,0	ANTAGONISMO	

Ejemplo 5: Índices de combinación de CH-11

Fecha: 1 de septiembre de 2006

LÍNEA CELULAR	U87MG	glioblastoma/astrocitoma: p53 no mut, pTEN mut					
Valores de IC a							
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA			
CH-11/TMZ (1:100)	0,015	0,006	0,004	0,008	IC<0,5	SINERGIA FUERTE	
CH-11/CPT (71:1)	0,247	0,141	0,201	0,196	IC<0,5	SINERGIA FUERTE	
CH-11/ADR (10:1)	0,326	0,305	0,485	0,372	IC<0,5	SINERGIA FUERTE	
CH-11/Tarceva (1:2,5)	0,144	0,071	0,076	0,097	IC<0,5	SINERGIA FUERTE	

ES 2 393 762 T3

Fecha: 24 de agosto de 2006

LÍNEA CELULAR	A172	glioblastoma: p53 no mut, pTEN mut				
Valores de IC a						
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA		
CH-11/TMZ (1:8)	0,125	0,126	0,151	0,134	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
CH-11/CPT (143:1)	0,872	2,992	10,439	4,768	IC>1,0	ANTAGONISMO
CH-11/ADR (26:1)	0,831	1,430	2,477	1,579	IC>1,0	ANTAGONISMO
CH-11/Tarceva (1:8)	0,608	0,636	0,683	0,643	0,5<IC<0,75	SINERGIA

Fecha: 1 de septiembre de 2006

LÍNEA CELULAR	A172	glioblastoma: p53 no mut, pTEN mut				
Valores de IC a						
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA		
CH-11/TMZ (1:8)	0,046	0,055	0,079	0,060	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
CH-11/CPT (143:1)	1,049	1,475	2,110	1,545	IC>1,0	ANTAGONISMO
CH-11/ADR (26:1)	1,629	3,368	7,003	4,000	IC>1,0	ANTAGONISMO
CH-11/Tarceva (1:8)	0,272	0,310	0,361	0,314	IC<0,5	SINERGIA FUERTE

Fecha: 1 de septiembre de 2006

LÍNEA CELULAR	U118MG	glioblastoma/astrocitoma: p53 mut, pTEN mut				
Valores de IC a						
COMBINACIÓN	DE50	DE75	DE90	MEDIA		
CH-11/TMZ (1:100)	5,723	10,152	19,618	11,831	IC>1,0	ANTAGONISMO
CH-11/CPT (30:1)	7,937	6,804	6,764	7,168	IC>1,0	ANTAGONISMO
CH-11/ADR (10:1)	0,612	0,166	0,102	0,293	IC<0,5	SINERGIA FUERTE
CH-11/Tarceva (1:8)	0,708	0,163	0,144	0,338	IC<0,5	SINERGIA FUERTE

ES 2 393 762 T3

En otro análisis, los siguientes valores de CI_{50} (μM) se determinaron para las diferentes combinaciones de AP-121 empleadas.

Línea celular	AP-121	CPT	TMZ	ADR	CH11	Tarceva	Estado de mutación
U87MG	8,5	0,04	425,2	0,11	854	5,9	p53no mut , pTEN-mut
A172	4,6	0,02	38,3	0,07	>1000	18,8	p53no mut , pTEN-mut
LN-18	1,3	0,04	553,5	0,09	<31,25	20	p53mut, pTEN-no mut
LN-229	4,3	0,02	278,4	0,13	521,5	3,9	p53mut, pTEN-no mut
U118MG	3,6	0,004	381,5	0,12	490,7	18,8	p53mut, pTEN-mut
T98G	4,1	0,02	608,3	0,17	517,8	14,4	p53mut, pTEN-mut

- 5 Para el cálculo de los valores de CI_{50} , las combinaciones de AP-121 administradas a las líneas celulares respectivas fueron del siguiente modo:

Combinaciones de U87MG

AP-121/	1	250:1	1:40	100:1	1:100	2:1
Compuesto	AP-121	CPT	TMZ	ADR	CH11	Tarceva
6	0,625	0,0025	25	0,00625	62,5	0,3125
5	1,25	0,005	50	0,0125	125	0,625
4	2,5	0,01	100	0,025	250	1,25
3	5	0,02	200	0,05	500	2,5
2	10	0,04	400	0,1	1000	5
1	20	0,08	800	0,2	2000	10

10

Combinaciones de A172

AP-121/	1	250:1	1:10	50:1	1:200	1:5
Compuesto	AP-121	CPT	TMZ	ADR	CH11	Tarceva
6	0,3125	0,00125	3,125	0,00625	62,5	1,5625
5	0,625	0,0025	6,25	0,0125	125	3,125
4	1,25	0,005	12,5	0,025	250	6,25
3	2,5	0,01	25	0,05	500	12,5
2	5	0,02	50	0,1	1000	25
1	10	0,04	100	0,2	2000	50

15

Combinaciones de LN-18

AP-121/	1	20:1	1:100	10:1	1:100	1:20
Compuesto	AP-121	CPT	TMZ	ADR	CH11	Tarceva
6	0,15625	0,00781	15,625	0,01562	31,25	3,125
5	0,3125	0,01562	31,25	0,03125	62,5	6,25
4	0,625	0,03125	62,5	0,0625	125	12,5
3	1,25	0,0625	125	0,125	250	25
2	2,5	0,125	250	0,25	500	50
1	5	0,25	500	0,5	1000	100

Combinación de LN-229

AP-121/	1	200:1	1:50	50:1	1:100	1:1
Compuesto	AP-121	CPT	TMZ	ADR	CH11	Tarceva
6	0,3125	0,00156	15,625	0,00625	31,25	0,3125
5	0,625	0,00313	31,25	0,0125	62,5	0,625
4	1,25	0,00625	62,5	0,025	125	1,25
3	2,5	0,0125	125	0,05	250	2,5
2	5	0,025	250	0,1	500	5
1	10	0,05	500	0,2	1000	10

5

Combinación de U118MG

AP-121/	1	2500:1	1:40	100:1	1:50	1:2
Compuesto	AP-121	CPT	TMZ	ADR	CH11	Tarceva
6	0,625	0,00025	25	0,00625	31,25	1,25
5	1,25	0,0005	50	0,0125	62,5	2,5
4	2,5	0,001	100	0,025	125	5
3	5	0,002	200	0,05	250	10
2	10	0,004	400	0,1	500	20
1	20	0,008	800	0,2	1000	40

Combinación de T98G

AP-121/	1	200:1	1:100	25:1	1:100	1:5
Compuesto	AP-121	CPT	TMZ	ADR	CH11	Tarceva
6	0,3125	0,0015625	31,25	0,0125	31,25	1,5625
5	0,625	0,003125	62,5	0,025	62,5	3,125
4	1,25	0,00625	125	0,05	125	6,25
3	2,5	0,0125	250	0,1	250	12,5
2	5	0,025	500	0,2	500	25
1	10	0,05	1000	0,4	1000	50

10 **Resumen: Sinergia de AP-121 con compuestos adicionales con respecto al estado mutacional de las células usadas**

	Combinaciones de AP121	p53	PTEN	línea celular
1	Sinergia/aditivo	no mut	mut	U87MG, A172
2	Sinergia/aditivo/antagonista	mut	mut	U118MG, T98G
3	Antagonista	mut	no mut	LN229, LN18

Ejemplo 6. Matriz de datos de DE₅₀ biológicos para el ligando de receptor y la molécula pequeña

15

A partir de estos datos, las siguientes matrices de datos A2 y A1 pueden derivarse usando los datos de DE₅₀ respectivos para AP-121 y las mezclas de compuestos correspondientes:

Células/ED50, µM	AP-121	CPT+AP121	TMZ+AP121	ADR+AP121	Tarceva+AP121
U87MG	6,8	0,016	75,3	0,04	4,9
A172	4,2	0,009	9,3	0,04	9,6
U118MG	4,8	0,002	176	0,04	15,5

5 y para CH-11:

Células/DE50, µM	CH11	CPT+CH11	TMZ+CH11	ADR+CH11	Tarceva+CH11
U87MG	854	0,007	4,1	0,026	0,54
A172	1055	0,007	1,7	0,025	3,3
U118MG	320,6	0,004	83,6	0,02	4,6

Por consiguiente, las matrices normalizadas B2:

Células/DE50, µM	AP-121	CPT+AP121	TMZ+AP121	ADR+AP121	Tarceva+AP121
U87MG	1,00	1,00	0,43	1,00	0,32
A172	0,62	0,56	0,05	1,00	0,62
U118MG	0,71	0,13	1,00	1,00	1,00

10

y B1 se calculan:

Células/DE50, µM	CH11	CPT+CH11	TMZ+CH11	ADR+CH11	Tarceva+CH11
U87MG	0,81	1,00	0,05	1,00	0,12
A172	1,00	1,00	0,02	0,96	0,72
U118MG	0,30	0,57	1,00	0,77	1,00

15

A partir de B1 y B2 puede calcularse una matriz S de similitud promediando simplemente los valores de similitud para cada compuesto o mezcla de compuestos por célula

Células/DE50, µM	similitud
U87MG	0,85
A172	0,80
U118MG	0,78
similitud total:	0,81

20

en la que un valor de similitud de 1,00 se corresponde con la mayor similitud posible y 0,00 con el menor solapamiento posible de actividad biológica.

25

En conjunto, los datos del Ejemplo 6 demuestran que usando el procedimiento según la presente invención, un anticuerpo agonista específico contra el receptor Fas CH-11 como ligando de receptor selectivo y AP-121 como mimético de ligandos de receptores putativo de moléculas pequeñas, además de varios compuestos adicionales en las mezclas de compuestos respectivas, pueden mostrar que el efecto biológico de AP-121 es similar al ejercido por CH-11.

30

El mismo procedimiento de evaluación también puede aplicarse a las matrices de índices de combinación del Ejemplo 4 y 5 en lugar de las DE₅₀ como efectos biológicos, que proporciona un valor de alta similitud de aproximadamente 0,6 entre CH-11 y AP-121.

Además, se observó un fuerte efecto sinérgico en las tres líneas celulares junto con temozolamida, la presente terapia convencional para glioblastoma multiforme y astrocitoma anaplásico.

Ejemplo 7:

5 Usando el procedimiento explicado brevemente en el Ejemplo 4 y 5 también se observó un fuerte efecto sinérgico para cisplatino (DDP)/AP-121 y gemcitabina (GMZ)/AP-121 en líneas de células de cáncer de pulmón no pequeño. DDP y GMZ se compraron ambos de Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU. Se usaron las siguientes líneas celulares: A549 (negativa para FAS), NCI-H460 (positiva para FAS) y HCC827 (positiva para FAS), todas obtenidas de ATTC, Rockville, MD, EE.UU.

A549							CI50 μ M		
IC	Relación	DE50	DE75	DE90	Media de IC	Efecto	AP-121	GMZ	DDP
AP-121-GMZ combi	2500:1	1,778	1,542	1,343	1,6	Antagonismo	8	0,009	
AP-121-GMZ combi	5000:1	48,906	18,706	7,465	25,0	Antagonismo	6	0,0006	
AP-121-GMZ combi	1000:1	200,939	68,248	23,399	97,5	Antagonismo			
AP-121-96 h- GMZ-48 h	2000:1	0,721	0,642	0,576	0,65	Sinergia			
GMZ-48 h- AP-121-96h	1:2000	0,290	0,286	0,284	0,29	Fuerte sinergia			
AP-121-48 h- GMZ-96 h	2000:1	>100	>100	>100	>100	Antagonismo			
GMZ-96 h- AP-121-48 h	1:2000	>100	>100	>100	>100	Antagonismo			
AP-121-DDP combi	1:3	54,199	217,923	886,111	386,1	Antagonismo	8		155,4
AP-121-DDP combi	1:5	0,231	0,386	0,652	0,42	Fuerte sinergia	6		12,7
AP-121-DDP combi	1:10	0,200	0,336	0,570	0,37	Fuerte sinergia	6		12,7
AP-121-DDP combi	1:5	0,582	0,665	0,761	0,67	Sinergia	6,9		3,8
AP-121-DDP combi	01:10	0,537	0,601	0,673	0,60	Sinergia	6,9		3,8

10

NCI-H460						CI50 μ M			
IC	Relación	DE50	DE75	DE90	Media de IC	Efecto	AP-121	GMZ	DDP
AP-121-GMZ combi	20:1	7,954	5,736	4,182	6,0	Antagonismo	1,5	0,003	
AP-121-GMZ combi	50:1	4,248	2,696	1,793	2,9	Antagonismo	1,4	0,006	
AP-121-GMZ combi	250:1	2,002	1,605	1,391	1,7	Antagonismo	1,4		
AP-121-96 h- GMZ-48 h	100:1	0,660	0,728	0,851	0,75	Sinergia			

ES 2 393 762 T3

NCI-H460							CI50 μ M		
IC	Relación	DE50	DE75	DE90	Media de IC	Efecto	AP-121	GMZ	DDP
GMZ-48 h- AP-121-96 h	1:100	0,193	0,334	0,611	0,38	Fuerte sinergia			
AP-121-48 h- GMZ-96 h	100:1	0,573	0,570	0,598	0,58	Sinergia			
GMZ-96 h- AP-121-48 h	1:100	0,776	0,742	0,726	0,75	Sinergia			
AP-121-DDP combi	1:3	1,966	2,138	2,325	2,1	Antagonismo	1,5		51,7
AP-121-DDP combi	1:5	2,650	1,870	1,368	2,0	Antagonismo	1,4		2,5
AP-121-DDP combi	1:10	2,372	1,785	1,373	1,8 g	Antagonismo			
AP-121-DDP combi	1:5	0,860	0,822	0,786	0,82	Sinergia	2		1,3
AP-121-DDP combi	1:10	0,881	0,852	0,824	0,85	Sinergia	2		1,3

HCC827							CI50 μ M		
IC	Relación	DE50	DE75	DE90	Media de IC	Efecto	AP-121	GMZ	DDP
AP-121-GMZ combi	20:1	0,967	1,912	3,780	2,2	Antagonismo	0,85	0,078	
AP-121-GMZ combi	10:1	19,894	2,935	0,493	7,8	Antagonismo	1,6	0,002	
AP-121-GMZ combi	50:1	28,988	3,856	0,805	11,2	Antagonismo	1,6		
AP-121-96 h- GMZ-48 h	100:1	0,653	0,737	0,841	0,74	Sinergia			
GMZ-48 h- AP-121-96 h	1:100	0,183	0,274	0,416	0,29	Fuerte sinergia			
AP-121-48 h- GMZ-96 h	100:1	1,072	0,964	0,870	0,97	Aditivo			
GMZ-96 h- AP-121-48 h	1:100	0,743	0,532	0,383	0,55	Sinergia			
AP-121-DDP combi	1:5	2,696	3,172	3,735	3,2	Antagonismo	0,85		>50
AP-121-DDP combi	1:10	0,668	0,668	0,667	0,67	Sinergia	1,6		3,4
AP-121-DDP combi	1:50	0,566	0,627	0,695	0,63	Sinergia	1,6		3,4
AP-121-DDP combi	1:10	1,348	1,150	0,981	1,16	Antagonismo	2,4		3,5

HCC827						CI50 μ M			
IC	Relación	DE50	DE75	DE90	Media de IC	Efecto	AP-121	GMZ	DDP
AP-121-DDP combi	1:50	0,190	0,251	0,331	0,26	Fuerte sinergia	2,4		3,5

Ejemplo 8:

5 Se sabe que las líneas de células de cáncer de próstata expresan receptor FAS, que algunas de ellas no son sensibles a FAS (O.W. Rokhlin y col., *Cancer Res.* 1997, **57**: 1758-68). LNCaP es una línea de células de cáncer de próstata que tiene sensibilidad reducida a irradiación, mientras que el anticuerpo Fas agonista CH-11 sensibiliza células a apoptosis inducida por irradiación (K. Kimura y E.P. Gelmann, *Cell Death and Differentiation* 2002, **9**: 972-980; véase también el siguiente ejemplo). Por tanto, los inventores han realizado experimentos en animales inyectando células LNCaP en la próstata de ratones y, después del crecimiento tumoral, administraron AP-121 con diferentes dosis de 0-30 mg/kg de inyecciones intraperitoneales e irradiación concomitante.

10 En los animales tratados se observó un efecto dependiente de la dosis, reduciéndose los niveles de PSA (antígeno prostático específico) después de algunos días de tratamiento y encogimiento del tamaño del tumor después de una semana de tratamiento, que muestra la efectividad de AP-121 para imitar el efecto biológico del anticuerpo agonista CH-11 en un experimento *in vivo* terapéuticamente relevante.

Ejemplo 9: Efectos de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina en el tratamiento de cáncer de próstata

20 El cáncer de próstata es un tipo de cáncer que se desarrolla en la próstata, una glándula en el aparato reproductor masculino. El cáncer de próstata se descubre casi siempre por examen físico o cribando análisis de sangre tales como el análisis de PSA (antígeno prostático específico). El análisis de PSA mide el nivel en sangre de antígeno prostático específico, una serina proteasa similar a calicreína. Su función normal es licuar el semen gelatinoso después de la eyaculación, permitiendo que los espermatozoides naveguen más fácilmente por el cuello uterino. Niveles de PSA superiores a aproximadamente 4 ng/ml se consideran globalmente indicativos de un riesgo de desarrollar cáncer de próstata. Sin embargo, el PSA no es un análisis perfecto y así debe corroborarse por análisis adicionales tales como la detección de ARNm de PCA-3 asociado a células en la orina.

30 Los dos tratamientos más comunes para cáncer de próstata localmente avanzado o de alto riesgo son radioterapia (RT) y privación de andrógenos (AD), que es terapia hormonal.

Se investigaron, respectivamente, los efectos de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina sola y en combinación con RT, AD o RT+AD sobre el grado de muerte celular programada (apoptosis) y la supervivencia de células de cáncer de próstata.

35 Primero se midieron los efectos *in vitro* de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina, radiación (ionizante) y una combinación de las mismas sobre la muerte celular programada (apoptosis) y la tasa de supervivencia de células de adenocarcinoma de próstata humano sensible a andrógenos LNCaP. La línea celular LNCaP se estableció a partir de una lesión metastásica de adenocarcinoma. Las células se trataron con una concentración final de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina 10 μ M y radiación (ionizante) correspondiente a una dosis absorbida de 5 unidades de Gray.

45 La apoptosis se determinó usando el ensayo Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7, Promega, Inc., Madison, WI, EE.UU., según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células tumorales vivas se estimó por medio de exclusión con colorante de azul de tripano como se ha descrito (Freshney, R.I. (1994) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 3ª ed. Wiley-Liss. Nueva York. EE.UU.)

50 Las células se expusieron a radiación seis horas después (Fig. 1A), concomitantemente con (Fig. 1B) o seis horas antes de la administración de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina (Fig. 1C). El ensayo de caspasa se realizó 12 horas después de la exposición a radiación. Los datos respectivos mostrados representan el promedio de dos experimentos independientes.

55 Cuando 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina se administró seis horas antes de exponer las células a radiación, el tratamiento combinado produjo una supervivencia de sólo aproximadamente el 45% de las células tumorales en comparación con aproximadamente el 85% en los controles sin tratar. Por consiguiente, en las células tratadas se observó un aumento significativo (> 2,5 veces) en la respuesta apoptótica (como se determina por ensayo de caspasa-3/7). El tratamiento individual con radiación o 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina produjo tasas de supervivencia intermedias de aproximadamente el 75% y aproximadamente el 60%, respectivamente (Fig. 1A).

60 En el caso de una administración concomitante de radiación y 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina a las

células se determinó que la tasa de supervivencia era aproximadamente el 55%, que está en el mismo intervalo que se observa para el tratamiento químico individual (aproximadamente el 50%). La exposición de las células sólo a radiación produjo una tasa de supervivencia de aproximadamente el 80%, que es comparable a los controles sin tratar (aproximadamente el 86%). Sorprendentemente, los resultados de los ensayos de caspasa-3/7 fueron similares para el tratamiento individual y combinado (Fig. 1B).

Cuando 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina se administró seis horas después de exponer las células a radiación, el tratamiento combinado produjo una supervivencia de aproximadamente el 40% de las células, que está en el mismo intervalo que se observa para el tratamiento químico individual (aproximadamente el 45%). La exposición de las células sólo a radiación produjo una tasa de supervivencia de aproximadamente el 70%. El grado de apoptosis observado aumentó aproximadamente el 25% en las células sólo expuestas a tratamiento químico con respecto a las células expuestas al tratamiento combinado (Fig. 1C).

Basándose en los resultados anteriores parece como si la administración de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina antes de exponer las células a radiación produjera el efecto más significativo sobre las tasas de supervivencia de células y respuesta apoptótica.

En otro enfoque, 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina 10 µM (concentración final; "CHEM") y radiación (ionizante) (5 unidades de Gray; "RT") se administraron simultáneamente a las células LNCaP, pero el posterior periodo de incubación se prolongó a 24 horas. La apoptosis se midió usando el ensayo Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 como se ha descrito anteriormente y se expresó como unidades de fluorescencia relativa (UFR). El porcentaje de células apoptóticas se determinó por análisis de citometría de flujo de células teñidas positivas para anexina V-PE y teñidas negativas para 7-AAD (7-aminoactinomicina D) (ambos comprados de BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) según protocolos convencionales establecidos. Los resultados se resumen en la siguiente tabla. Los datos representan medias ± EEM para tres experimentos independientes.

Tratamiento	% de células positivas para anexina V-PE	Actividad de caspasa-3/7 (UFR)
Control	3,6 ± 0,2	193 ± 39
CHEM	18,6 ± 1,0	580 ± 207
RT	5,0 ± 0,6	242 ± 36
CHEM+RT	31,7 ± 1,0*	1514 ± 102*

La significancia estadística de los resultados se calculó usando la ANOVA unidireccional, prueba de LSD. * p < 0,0001 en comparación con cada uno de los tratamientos individuales CHEM y RT, respectivamente.

El potenciamiento de la apoptosis en las células tratadas con "CHEM+RT" también se observó en células NCaP C4-2 y LNCaP-Res insensibles a andrógenos (datos no mostrados).

A continuación se investigó la interacción de la administración de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina ("CHEM") y la privación de andrógenos ("PA"). Células LNCaP se privaron de andrógeno durante dos días por absorción con carbón vegetal de suero según procedimientos establecidos muy conocidos en la técnica. CHEM se añadió en una concentración final de 5 µM y 10 µM, respectivamente. Además, se probó si la adición del andrógeno sintético R1881 ("R1881") dos días antes de la administración de CHEM produjo la inversión del efecto.

La apoptosis se midió usando el ensayo Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 como se ha descrito anteriormente y se expresó como unidad de fluorescencia relativa (UFR). El porcentaje de células apoptóticas se determinó por tinción con anexina V-PE/7-AAD como se ha descrito anteriormente. El ensayo de caspasa-3/7 y la tinción con anexina se realizaron 22 horas después del tratamiento con CHEM. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tratamiento	% de células positivas para anexina V-PE	Actividad de caspasa-3/7 (UFR)
Contr.	9,6	235
Contr. + CHEM 5 µM	13,0	380
Contr. + CHEM 10 µM	17,5	436
PA	12,6	81
PA + CHEM 5 µM	15,4	126
PA + CHEM 10 µM	27,4	115
PA + R1881	7,0	130
PA + R1881 + CHEM 5 µM	14,6	453

Tratamiento	% de células positivas para anexina V-PE	Actividad de caspasa-3/7 (UFR)
PA + R1881 + CHEM 10 μ M	21,6	962

Como es evidente de los resultados anteriores, la administración de 1-O-octadecil-2-O-metilglicero-3-fosfocolina a células LNCaP privadas de andrógenos produjo un aumento significativo dependiente de la dosis en la respuesta apoptósica. Además, este efecto no se invirtió añadiendo un andrógeno sintético al medio antes del tratamiento con 1-O-octadecil-2-O-metilglicero-3-fosfocolina.

Adicionalmente, en un estudio preliminar se investigaron los efectos *in vivo* de 1-O-octadecil-2-O-metilglicero-3-fosfocolina, radiación (ionizante) y una combinación de las mismas sobre células LNCaP cultivadas ortotópicamente en las próstatas de ratones sin pelo (siete ratones/ grupo).

Se administró 1-O-octadecil-2-O-metilglicero-3-fosfocolina intraperitonealmente en una dosis de 30 mg/kg de peso corporal/día administrada intraperitonealmente durante 15 días (Fig. 2A; actualmente están en marcha estudios usando diferentes vías de administración tales como por vía oral o por sonda nasogástrica). La radiación (ionizante) se corresponde con una dosis absorbida de 5 unidades de Gray administrada en el día 7 (Fig. 2B). El tratamiento combinado se ilustra en la Fig. 2C. El crecimiento tumoral se evaluó determinando el nivel en suero del antígeno prostático específico (PSA) usando un kit de prueba comercialmente disponible, además del volumen tumoral por medio de resonancia magnética nuclear.

Como puede apreciarse, el tratamiento combinado produjo una disminución significativa de los niveles en suero de PSA con respecto a cualquier tratamiento individual ("PBS" representa solución salina tamponada con fosfato) que demuestra que los resultados *in vitro* también pueden transferirse a un entorno *in vivo*.

La presente invención descrita ilustrativamente aquí puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no específicamente desvelados aquí. Así, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc., deben leerse ampliamente y sin limitación. Adicionalmente, los términos y expresiones empleados aquí se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Así, debe entenderse que, aunque la presente invención se ha desvelado específicamente por realizaciones preferidas y características opcionales, modificaciones y variaciones de las invenciones plasmadas en las mismas desveladas aquí pueden ser recurridas por aquellos expertos en la materia, y que tales modificaciones y variaciones se consideran que están dentro del alcance de la presente invención.

La invención se ha descrito ampliamente y genéricamente aquí. Cada una de las especies y agrupaciones subgenéricas más estrechas que se encuentran dentro de la divulgación genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimina cualquier materia del género, independientemente de si el material suprimido se cita o no específicamente aquí.

Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones. Además, si las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush, aquellos expertos en la materia reconocerán que la invención también se describe así en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar si una molécula pequeña es una sustitución funcional para un ligando de proteína o péptido de un receptor celular en el tratamiento de enfermedades en las que la modulación de este receptor conducirá a un efecto terapéutico, procedimiento que comprende:
- 5 medir los efectos biológicos de tanto el ligando de proteína o de péptido como la molécula pequeña sobre un panel de al menos 3 líneas celulares permanentes y/o líneas primarias diferentes que expresan dicho receptor celular; y a condición de que los efectos biológicos sobre este panel de células de ambos compuestos sean cualitativamente similares, guardando relación los resultados con la presencia cuantitativa del receptor celular en la célula respectiva del panel.
- 10
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el cual los efectos biológicos de tanto la molécula pequeña como el ligando de receptor de proteína o péptido sobre el panel de células se miden individualmente y en combinación.
- 15
3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el cual los efectos biológicos de tanto la molécula pequeña como el ligando de receptor de proteína o péptido se miden en presencia de al menos un compuesto adicional, en el cual el al menos un compuesto adicional está seleccionado del grupo que consiste en una proteína, un péptido o una molécula pequeña.
- 20
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el cual los efectos biológicos de tanto la molécula pequeña como el ligando de receptor de la proteína o péptido, además de sus combinaciones respectivas con el al menos un compuesto adicional, son similares.
- 25
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el cual determinar la similitud de los efectos biológicos de los compuestos medidos comprende una matriz de datos biológicos de al menos tres líneas celulares y/o líneas primarias y al menos tres compuestos, medidos individualmente y/o en combinaciones de dos y/o combinaciones de tres o más compuestos, y en el cual la similitud entre la molécula pequeña y el ligando de receptor de la proteína o péptido se calcula a partir de esta matriz de datos biológicos.
- 30
6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el cual la similitud de la molécula pequeña y el ligando de receptor como se calcula a partir de la matriz de datos biológicos es mayor que un umbral para diferenciar combinaciones a posteriori al azar a partir de compuestos terapéuticamente útiles y/o combinaciones de compuestos.
- 35
7. El procedimiento según la reivindicación 3, que comprende además:
determinar si la combinación de la molécula pequeña con el al menos un compuesto adicional produce un efecto biológico sinérgico.
- 40
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual la molécula pequeña es un fosfolípido, y en particular AP-121.
- 45
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual el ligando de la proteína o péptido es un ligando de receptor FAS seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo FAS agonista y una proteína de unión a FAS.
- 50
10. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además identificar una molécula pequeña como activador del receptor FAS, que comprende:
medir los efectos de tanto un ligando de proteína o péptido del receptor FAS como una molécula pequeña sobre un panel de al menos 3 líneas celulares permanentes y/o líneas primarias diferentes con diferentes niveles de expresión del receptor FAS, en el cual los efectos biológicos respectivos sobre este panel de células de ambos compuestos son cualitativamente similares y establecen directamente una correlación con la presencia cuantitativa del receptor FAS en la célula respectiva del panel.
- 55
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el cual los efectos biológicos de tanto la molécula pequeña como el ligando de proteína o péptido del receptor FAS son cada uno medidos solos y en combinación con al menos un compuesto adicional, siendo dicho compuesto una proteína, un péptido u otra molécula pequeña.
- 60
12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el cual la molécula pequeña es AP-121 y el al menos un compuesto adicional está seleccionado del grupo de agentes antitumorales que consiste en 16-aza-epotilona B, aldesleucina, amifostina, aranosa, bevacizumab, bleocina, bleomicina, BMS-184476, bortezomib, calcitriol, camptotecina, canertinib, canfosfamida, capecitabina, carboplatino, carmustina, cefixima, ceftriaxona, celecoxib, celmoleucina, cetuximab, ciclosporina, cisplatino, clodronato, ciclofosfamida, citarabina, dasitinib, deoxorubicina, desoxiepotilona B, dietilestilbestrol, diflomotecan, docetaxel, doxorubicina, edatrexato, efaproxiral, EKB-569, epirubicina, epratuzumab, erlotinib, etopósido, exatecan, fludarabina, fluorouracilo, ácido folínico, galarubicina, gefinitib, gemcitabina, gemtuzumab, gimatecan, glufosfamida, granisetron, homoharringtonina, ácido hialurónico,
- 65

ibandronato, ibritumomab, ifosfamida, imatinib, interferón alfa, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, irinotecan, isoflavona, isotretinoína, ixabepilona, ketoconazol, lapatinib, leflunomida, lenograstim, leucovorin, lexicidronam, linezolid, lometrexol, lurtotecan, MEN10755, melfalan, metrotrexato, mitomicina, neridronato, neuradiab, nimesulida, nitroglicerina, 06-bencilguanina, omeprazol, ortataxel, oxaliplatino, paclitaxel, patupilona, pegfilgrastim, pelitinib, pemetrexed, pentostatina, perifosina, plevitrexed, ácido poliprenoico, quinupristina, raloxifeno, raltitrexed, ramosetron, ácido retinoico, risedronato, rituximab, rofecoxib, rubitecan, S-9788, sabarubicina, sargramostim, satraplatino, SN-38, sorafenib, ácido suberanolhidroxámico, sutent, tamoxifeno, taxotero, tazaroteno, tegafur, temozolamida, tesmilifeno, tetrodotoxina, talidomida, tipifarnib, topotecan, trabectedin, trastuzumab, traszutumab, treosulfan, tretinoína, vatalanib, vincristina, vinorelbina, ZD-6474, zoledronato y zosuquidar.

5

10

13. El procedimiento según la reivindicación 11, en el cual la molécula pequeña es AP-121 y el al menos un compuesto adicional está seleccionado del grupo de agentes antivíricos que consisten en 3TC, abacavir, adefovir dipivoxil, aciclovir, amprenavir, amantadina, amoxovir, AZT, clevidina, delavirdina, d4T, emtricitabina, entecavir, famciclovir, ganciclovir, indinavir, lamivudina, nelfinavir, nevirapina, oseltamavir, rimantadina, ritonavir, saquinavir, septrina, telbivudina, tenofovir, valaciclovir, valtorcitabina, valopicitabina o zanamivir.

15

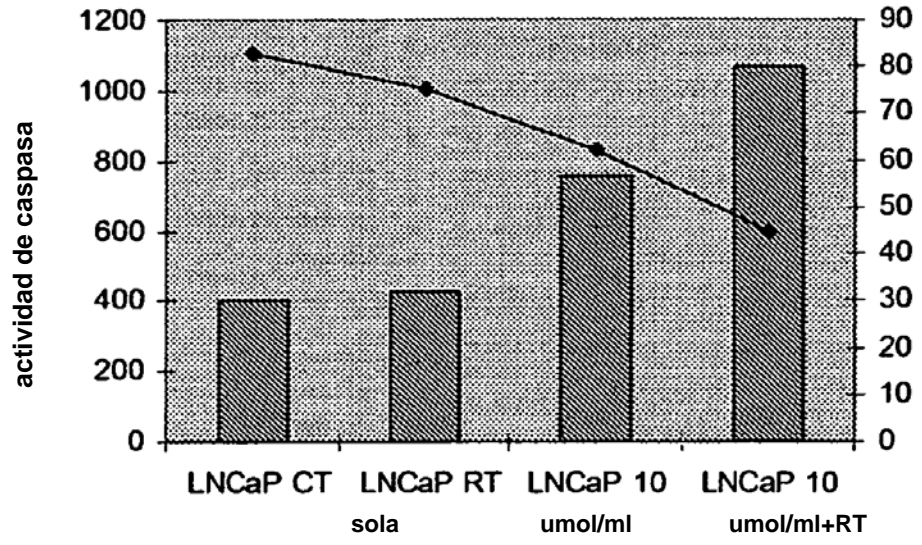
14. El procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, que comprende además:

medir el efecto biológico de la combinación de AP-121 con el al menos un compuesto adicional; y
determinar si un efecto biológico sinérgico está afectado por dicha combinación sobre el panel de células.

20

FIG. 1

A



B

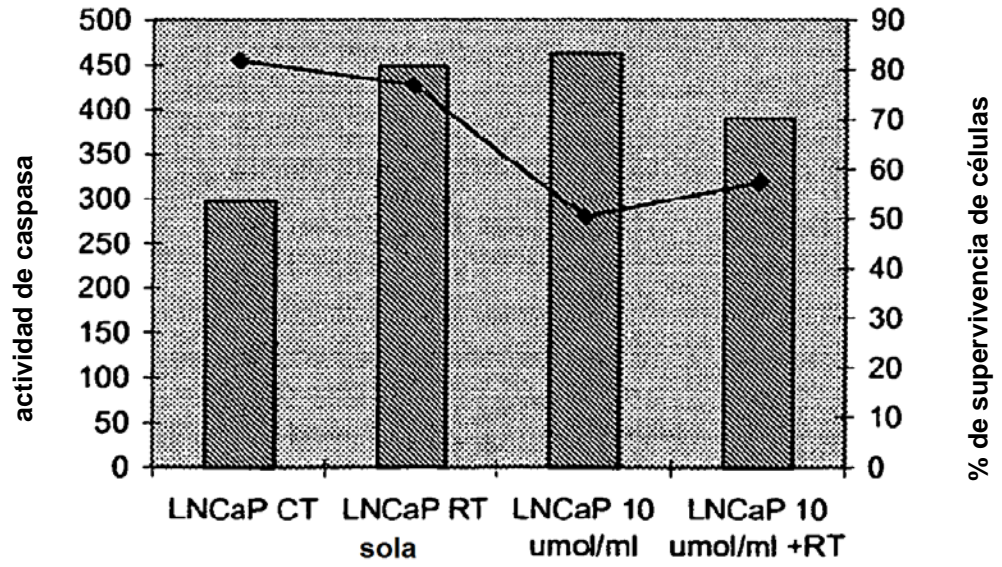


FIG. 1 (Cont.)

C

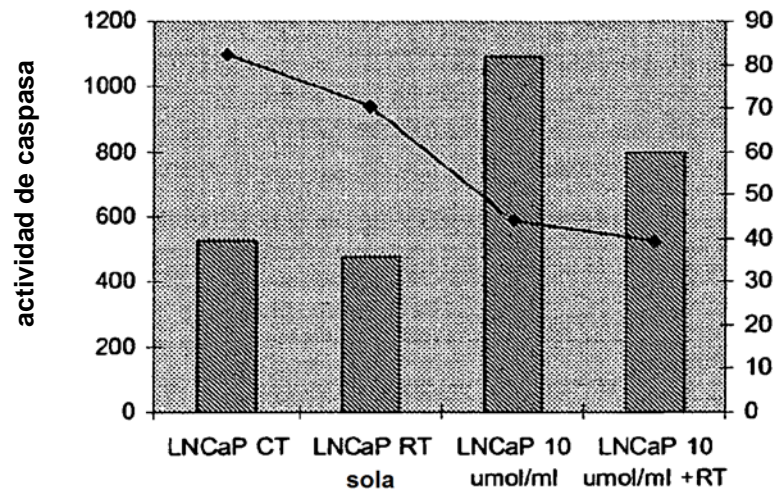
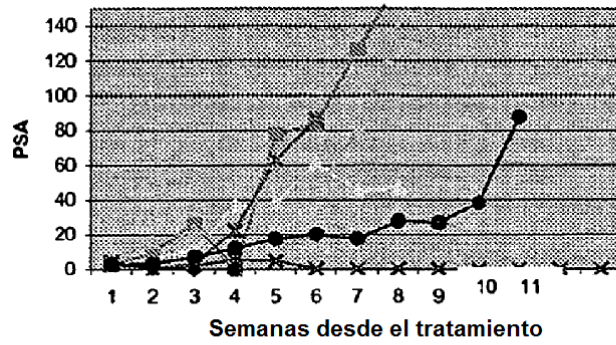


FIG. 2

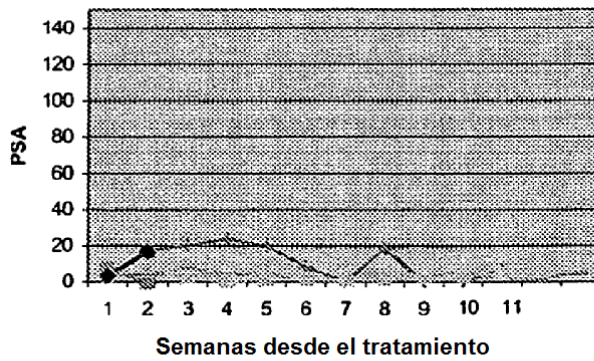
A

30 mg de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina



B

30 mg de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina + 5 Gy de radiación



C

PBS + 5 Gy de radiación

