

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 525**

51 Int. Cl.:

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

A61K 31/415 (2006.01)

A61K 31/4174 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2007 E 07870201 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2056827**

54 Título: **Procedimiento de inducción de apoptosis tumoral aumentando los niveles de óxido nítrico**

30 Prioridad:

30.08.2006 EP 06018120

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

10.03.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (100.0%)
HUGSTETTER STRASSE 49
79106 FREIBURG, DE**

72 Inventor/es:

BAUER, GEORG

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 446 525 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

Procedimiento de inducción de apoptosis tumoral aumentando los niveles de óxido nítrico

La presente invención se refiere a un procedimiento de inducción de apoptosis tumoral afectando a la vía de señalización de las ROS (especies de oxígeno reactivas) en células tumorales. El incremento del nivel de ROS conduce a la inactivación selectiva de una catalasa de las células tumorales y, como consecuencia, a la apoptosis de estas células. Los niveles de ROS se pueden aumentar incrementando los niveles de óxido nítrico a través de la inhibición de las enzimas óxido nítrico dioxigenasa o arginasa. De acuerdo con la presente invención se pueden usar inhibidores de la óxido nítrico dioxigenasa o arginasa para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona un procedimiento para identificar compuestos que se pueden usar para el tratamiento del cáncer, en el que el procedimiento permite identificar específicamente compuestos que inducen apoptosis a través de la vía de señalización de ROS. La presente invención también proporciona un kit para identificar compuestos que inducen apoptosis tumoral mediante inactivación de una catalasa sobre la superficie de las células tumorales.

El documento WO 2005/117545 divulga que las vías catabólicas del NO pueden proporcionar resistencia inmunitaria a los carcinomas y, por tanto, sirven como nuevas dianas para la intervención en cáncer. De acuerdo con este documento, se puede influir sobre las vías catabólicas del NO usando inhibidores de la óxido nítrico dioxigenasa en una cantidad suficiente para aumentar la concentración intracelular del óxido nítrico (NO). No obstante, el documento WO 2005/117545 no divulga la apoptosis selectiva de las células tumorales destruyendo la catalasa de las células tumorales y mediando en la vía de señalización de ROS. La presente invención no se basa en un efecto inmunológico de los inhibidores de la óxido nítrico dioxigenasa sino en la destrucción selectiva de células tumorales.

El documento WO 2005/000208 se refiere al uso de una combinación de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa y un azol para el tratamiento de una neoplasia maligna. El uso de una combinación de los dos compuestos se basó en el hallazgo del descubrimiento de que los azoles potencian la actividad antiproliferativa de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa contra las células cancerosas *in vitro*.

Además, el documento WO 2004/073623 se refiere a un procedimiento de tratar a un sujeto que tiene niveles elevados de arginasa como síntoma o causa de un trastorno. Dicho tratamiento comprende administrar un inhibidor de la arginasa con el fin de potenciar la biodisponibilidad de la arginina en el sujeto. No obstante, no existen enseñanzas en este documento sobre que los inhibidores de la arginasa se pueden usar para destruir la catalasa de las células tumorales e inducen una apoptosis celular selectiva de las células tumorales.

El documento WO 03/03990 se refiere al uso de un compuesto que disminuye la producción de una proteína implicada en el metabolismo de la arginina en la preparación de un medicamento para tratar asma o alergias. Cualquier efecto de los inhibidores de arginasa sobre la catalasa de las células tumorales o sobre la vía de señalización de ROSA no se describe en este documento.

Buga et al. (Am. J. Physiol., 1989, páginas 1256-1264) describen el uso de *N^g-hidroxi-L-arginina (NOHA)* para inhibir a proliferación de las células tumorales Caco-2. El efecto de los inhibidores de arginasa sobre la apoptosis selectiva de las células tumorales como se usa en la presente invención no está indicado en dicho documento.

El documento WO 97/05873 también divulga el uso de fluconazol (un inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa) para la inhibición del crecimiento de células tumorales debido a las propiedades del fluconazol para potenciar el efecto de un agente quimioterapéutico. De un modo similar, el documento US5.565.478 se refiere al aumento de la actividad de paclitaxel por ketoconazol cuando se usa para el tratamiento del cáncer.

El documento US 5 795 790 se refiere a procedimientos y composiciones para controlar la distribución celular dentro de un órgano bioartificial exponiendo las células a un tratamiento que inhibe la proliferación celular, estimula la diferenciación celular o efectúa las uniones celulares a una superficie de crecimiento dentro del órgano bioartificial. Los estudios experimentales se llevaron a cabo en células BHK (de riñón de hámster neonato). Además, en la presente publicación no se nombra a la histidina y, por tanto, no se describe ninguna función de la propia histidina.

Franek et al., Immunology letters (1996),139-144 enseña que las células de hibridoma al borde de apoptosis inducida por inanición podrían rescatarse mediante varios aminoácidos (incluyendo histidina) que se han añadido de forma individual. No se divulga una descripción concreta del modo en el que funciona el efecto de prevención de la apoptosis.

En Franek et al., Archives of Biochem. Biophys.(2002),141-146, se estudia la actividad antiapoptótica sobre células de hibridoma en las que la apoptosis se induce por inanición. Se ha sugerido que los aminoácidos que evitan la apoptosis actúan como moléculas señal en lugar de los nutrientes y que la señal tenía un carácter de factor de supervivencia.

El documento US5.565.478 se refiere al tratamiento del cáncer, más precisamente a composiciones y procedimientos para la inhibición del crecimiento de células cancerosas de ovario humano. Las composiciones divulgadas, que son, por ejemplo, combinaciones de azoles y derivados de taxano proporcionan efectos

anticancerosos potenciados. No obstante, el documento no menciona nada sobre la apoptosis de las células tumorales. Los denominados efectos anticancerosos potenciados son, obviamente, solo efectos de inhibición sobre el crecimiento de células cancerosas.

5 Además, el documento DE 199 63 052 divulga el uso de azoles para la prevención del cáncer de piel mediado por radiación UV. Ninguno de los documentos anteriores divulga una apoptosis selectiva de células tumorales. Especialmente, no hay enseñanzas sobre el uso de una combinación de un inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa y un inhibidor de la arginasa para el tratamiento del cáncer.

10 También se sabe por el trabajo experimental de Irani et al. (Science 1997; 275:1649-1652) que la transformación oncogénica de las células produce la generación constitutiva de aniones superóxido extracelulares a través de una NADPH oxidasa asociada a la membrana. A continuación, las células tumorales se distinguen de las células transformadas. Las células transformadas se pueden definir como células que se ha transformado *in vitro*, bien mediante la expresión de oncogenes específicos, mediante cambios carcinogénicos químicos o físicos o transformación espontánea, y poseen potencial para la formación tumoral. Las células tumorales, así como las células transformadas, producen aniones superóxido extracelulares. Los aniones superóxido reaccionan al peróxido de hidrógeno en una distancia cercana a la superficie celular. El peróxido de hidrógeno es duradero y extenso, pero, no obstante, mucho más reactivo que los aniones superóxido. Por ejemplo, los aniones superóxido no inducen la apoptosis directamente, pero el peróxido de hidrógeno sí lo hace si se alcanza una concentración determinada.

15 Además, de Engelmann y Bauer (Anticancer Research 2000; 20:2297-2306) se sabe que los fibroblastos no transformados, que se han estimulado con TGF (factor de crecimiento transformante)-beta o FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), pueden servir como células efectoras intercelulares e inducir la apoptosis en las células transformadas. Los fibroblastos no transformados no están dañados.

20 Por De Bauer et al. (Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2002; 66:41-56) se conoce que las células transformadas liberan aniones superóxido, que exhiben funciones de señalización tales como la regulación de la proliferación y el mantenimiento del estado transformado. El producto de la dismutación, peróxido de hidrógeno, regula los niveles intracelulares de la catalasa cuya actividad se ha observado que está regulada por aumento en determinadas células transformadas. Después de la depleción del glutatión, las especies de oxígeno reactivas (ROS) derivadas de células transformadas exhiben potencial inductor de la apoptosis mediante la reacción de Haber-Weiss catalizada con metal, que convierte el peróxido de hidrógeno en la forma del radical hidroxilo altamente reactiva, de vida extremadamente corta y de corto alcance.

25 Además, las ROS derivadas de células transformadas representan elementos clave de la inducción selectiva y eficiente de la apoptosis por sistemas antitumorales naturales (como fibroblastos, granulocitos y macrófagos). Estas células efectoras liberan peroxidasa, que usa peróxido de hidrógeno derivado de las células diana para la síntesis de HOCl. En una segunda etapa, HOCl interacciona con los aniones superóxido derivados de las células y forma radicales hidroxilo inductores de apoptosis (vía de HOCl). En una vía de señalización paralela, el NO derivado de células efectivas interacciona con los aniones superóxido derivados de las células diana y genera el inductor de la apoptosis peroxinitrito. Por tanto, las ROS derivadas de las células transformadas determinan las células transformadas como dianas selectivas de la inducción de la apoptosis por estos sistemas efectores. Por tanto, se ha propuesto que las ROS derivadas de las células transformadas interaccionan con las células asociadas para exhibir funciones de señalización dirigidas y específicas, algunas de las cuales son beneficiosas y algunas de las cuales pueden ser perjudiciales para las células transformadas.

30 El documento WO 2005/056048 divulga que los aniones superóxido reaccionan con óxido nítrico y producen el peroxinitrito altamente reactivo a corta distancia de las células transformadas. Además, las células tumorales comprenden una catalasa sobre la superficie celular que desactiva el peroxinitrito y, por tanto, inhibe la apoptosis. Se descubrió que la inhibición de esta catalasa previene, en consecuencia, la descomposición del peroxinitrito y conduce a la apoptosis en células tumorales.

35 El documento WO 2005/056048 divulga además que la generación de peróxido de hidrógeno a partir de aniones superóxido sobre la superficie no es suficiente para inducir apoptosis en estas células. Como se ha descrito anteriormente, el peróxido de hidrógeno se transforma en ácido hipocloroso y mediante una peroxidasa y la posterior interacción del ácido hipocloroso con aniones superóxido tiene como resultado la formación de radiales hidroxilo. Se descubrió que la inhibición de una catalasa de las células tumorales que también reacciona con peróxido de hidrógeno conduce a una concentración más alta del peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo, respectivamente. Los mayores niveles de inductores de apoptosis conducen después a una apoptosis selectiva de las células tumorales. El documento WO 2005/056048 proporciona un procedimiento para aumentar específicamente la sensibilidad de las células tumorales contra la apoptosis inhibiendo la catalasa de las células tumorales.

40 Al contrario que la inhibición de la catalasa, la presente invención se basa en resultados experimentales, que han demostrado que la catalasa de las células tumorales también se puede inactivar con el fin de inducir la apoptosis selectiva de las células tumorales. Aunque la catalasa de las células tumorales puede inactivar el peroxinitrito, en los presentes estudios experimentales se encontró que la propia catalasa se puede inactivar si los niveles de

peroxinitrito aumentan significativamente. Esto se explicará a continuación.

El peroxinitrito se forma mediante la reacción del óxido nítrico con aniones superóxido. La arginina es un sustrato de la arginasa y de la NO sintasa, mientras que la inhibición de la arginasa proporciona más sustrato para la NO sintasa y, por tanto, aumenta la producción de NO.

- 5 La NO dioxigenasa tiene NO como sustrato, mientras que la inhibición de la NO dioxigenasa aumenta los niveles de NO evitando que esta enzima inactive el óxido nítrico. Aumentando niveles de NO (óxido nítrico) cerca de la superficie celular inhibiendo la enzima arginasa o la enzima NO dioxigenasa conduce a una concentración mayor de peroxinitrito (vía de NO/peroxinitrito),

10 Los experimentos que se han realizado durante la presente invención demuestran que el peroxinitrito puede reaccionar con peróxido de hidrógeno para formar una especie de oxígeno reactiva, Esta especie de oxígeno reactiva es oxígeno singlete que reacciona con histidina. La histidina desempeña un papel importante en el centro activo de la catalasa específica del tumor, de modo que la reacción del oxígeno singlete con histidina inactiva la catalasa que después no es capaz de inactivar más el peroxinitrito o el peróxido de hidrógeno. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para una inactivación selectiva de la catalasa sobre la superficie de las células tumorales.

15 En consecuencia, el nivel elevado de peroxinitrito conduce a la apoptosis de las células tumorales. El mecanismo de aumentar los niveles de óxido nítrico mediante inhibición de enzimas, la formación de peroxinitrito, la formación de peróxido de hidrógeno y la formación de radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno se divulga en la figura 1 con más detalle. Además, el ejemplo 1 comprende pruebas experimentales de que la especie de oxígeno reactiva oxígeno singlete puede inactivar la catalasa de las células tumorales. Los experimentos muestran que la adición de histidina previene la apoptosis en células tumorales secuestrando el oxígeno singlete. La histidina, como la histidina de la catalasa, reacciona con el oxígeno singlete y, por tanto, evita la inactivación de la catalasa y la consiguiente señalización de ROS intercelular. La inhibición de la apoptosis por la adición de histidina permite determinar si la apoptosis se basa o no en la inactivación de la catalasa dependiente de oxígeno singlete seguida de señalización de ROS intercelular.

20 Además, sorprendentemente se ha descubierto que la apoptosis basada en la señalización de ROS puede inducirse directamente en células tumorales sin que sea necesaria ninguna señalización de las células efectoras no transformadas. Por tanto, fue posible desarrollar un procedimiento para analizar las propiedades de inducción de apoptosis de compuestos usando células tumorales sin el requisito de que tengan que estar presentes células efectoras no transformadas.

25 El procedimiento de acuerdo con la presente invención se basa en el hallazgo de que la apoptosis mediada por ROS puede inhibirse mediante la adición de histidina debido a la preservación de la catalasa frente a la inactivación. También es posible inhibir la vía de señalización de ROS disminuyendo los niveles de, por ejemplo, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, radicales hidroxilo, óxido nítrico o peroxinitrito, que también participan en el mecanismo de señalización basada en ROS o mediante la inhibición de la peroxidasa. Por tanto, el nuevo procedimiento se puede usar para identificar compuestos que inducen apoptosis mediante la vía de señalización de ROS. Esto se describe con más detalle a continuación.

30 El procedimiento de identificar compuestos adecuados comprende una primera etapa de determinar si un compuesto induce o no apoptosis en células tumorales. Una segunda etapa es necesaria para determinar si la inducción de apoptosis se basa o no en la formación de oxígeno singlete, seguido de la inactivación de la catalasa y la señalización de ROS intercelular. Esto se consigue mediante la adición de histidina, que puede secuestrar el oxígeno singlete (Tyrrell et al, Methods 1997; 11: 313-138). Si la histidina disminuye la inducción de la apoptosis en células tumorales, se proporciona prueba de que el compuesto induce la apoptosis mediante la formación de oxígeno singlete. Adicionalmente, se determina si los compuestos que inducen apoptosis basada en la vía de señalización de ROS son tóxicos para los fibroblastos diploides normales.

35 Los compuestos que inducen apoptosis en células tumorales, en base a la formación de especies ROS, se pueden analizar en una tercera etapa. Esta tercera etapa es opcional y se puede realizar con el fin de determinar si la inducción de la apoptosis, que se puede inhibir mediante la adición de histidina, se basa en la vía de señalización de ROS específica de células tumorales. Este es el caso si la inactivación de otras especies que participan en la vía de señalización de ROS previene la apoptosis en las células tumorales.

40 Por tanto, la presente invención proporciona un nuevo enfoque para tratar el cáncer aumentando el nivel de especies de oxígeno reactivas aumentando los niveles de NO y, de este modo, inactivando la catalasa de las células tumorales, que normalmente inactiva la apoptosis en peroxinitrito. El peroxinitrito o ácido hipocloroso / radicales hidroxilo derivados de peróxido de hidrógeno dañan específicamente las células tumorales.

45 Otros datos experimentales indicaron, sorprendentemente, que el compuesto bien conocido taxol ejerce actividad anticancerosa a través de la vía de señalización de ROS. Por consiguiente, una combinación de taxol con inhibidores de arginasa o inhibidores de NO dioxigenasa proporciona un tratamiento anticanceroso más eficaz debido a una inhibición más eficiente de la señalización de ROS inactivando especies diferentes que participan en la

vía de señalización de ROS.

Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en el que el un inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa reduce la actividad enzimática para catalizar la formación de nitrato a partir de óxido nítrico.

- 5 En una realización preferida de la invención, el inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa se selecciona del grupo que consiste en itraconazol, fluconazol, econazol, bifonazol, ketoconazol, sulconazol, miconazol, hidraconazol, exonazol y zilconazol, más preferidos son itraconazol, fluconazol, econazol, bifonazol, ketoconazol, sulconazol y miconazol.

Incluso es más preferido usar itraconazol o miconazol como el inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa.

- 10 En otra realización de la invención, el medicamento comprende además un inhibidor de la arginasa, en el que el inhibidor de la arginasa reduce la actividad enzimática para catalizar la formación de citrulina a partir de arginina.

Se prefiere que el inhibidor de la arginasa se seleccione del grupo que consiste en (S)-(2-boronoetil)-L-cisteína (BEC), ácido 2(S)-amino-6-boronoheptanoico (ABHA), NOHA/ L-HO-Arg (N^G-hidroxi-L-arginina), nor-NOHA/ ácido L-2-amino-(4-(2'-hidroxiguanidino)butírico (N^{omega}-hidroxi-nor-L-arginina) y DL-alfa-difluorometilornitina (DFMO). El inhibidor de la arginasa más preferido es norNOHA.

- 15 Además, se prefiere que la proporción molar del inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa / arginasa está entre 10:1 y 1:10, preferentemente en el intervalo de 10:1- 4:1; 4:1 - 1:1; 1:1-1:4 y 1:4-1:10.

En una realización adicional, el medicamento comprende adicionalmente Taxol.

- 20 La presente invención también proporciona un procedimiento para identificar compuestos que inducen apoptosis tumoral mediante inactivación de una catalasa sobre la superficie de las células tumorales, que comprende una primera etapa de:

poner en contacto los compuestos con células tumorales o células transformadas, preferentemente células tumorales, y seleccionar compuestos que inducen apoptosis, y

una segunda etapa de:

- 25 poner en contacto compuestos inductores de la apoptosis identificados en la primera etapa con células tumorales o células transformadas, preferentemente células tumorales, en un medio que comprende L-histidina, preferentemente, 1-10 mM, más preferida 1-5 mM, incluso más preferida 2-4 mM, y lo más preferida 2 mM (a partir de una solución madre de 20 mM en medio de cultivo tisular) y seleccionar compuestos que no inducen apoptosis en las células en esta condición.

Se prefiere que la primera etapa comprenda suministrar TGF- β a las células.

- 30 También se prefiere realizar el procedimiento sin que estén presentes células no tumorales o no transformadas.

En otra realización, el procedimiento comprende la etapa de determinar si los compuestos son tóxicos para las células no tumorales.

Se prefiere que el procedimiento comprenda además la etapa de determinar si la inhibición de la apoptosis tumoral por la histidina se basa en la señalización de ROS (especie de oxígeno reactiva).

- 35 En otra realización, la etapa de analizar el efecto sobre la señalización de ROS se realiza poniendo en contacto los compuestos con las células tumorales y suministrando un compuesto, que es capaz de disminuir el nivel de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, HOCl, radical hidroxilo, óxido nítrico y peroxinitrito. Esto se consigue mediante la adición de sequestrantes o inactivadores específicos o mediante inactivación genética de las enzimas clave como la NADPH oxidasa, la NO sintasa o la peroxidasa usando ARN de interferencia pequeño (siARN). Los aniones superóxido son sequestrados por la superóxido dismutasa (100 U / ml). La generación de aniones superóxido mediante la NADPH oxidasa se inhibe mediante fluoruro de 4-(2-aminoetil)benzenosulfonilo (AEBSF, 100 μ M). El peróxido de hidrógeno se destruye por acción de la catalasa (100 U / ml). El ácido hipocloroso es sequestrado por la taurina (50 mM). Los radicales hidroxilo son sequestrados por tereftalato sódico 400 μ M o manitol 10 mM. El peroxinitrito es sequestrado por FeTPPS 40 μ M (5,10,15,20-TETRAKIS (4-sulfonatofenil)profirinato de hierro(III), cloruro). La síntesis de NO se bloquea mediante la adición de L-NAME 2,4 mM. La reacción de la peroxidasa, que conduce a la formación de ácido hipocloroso, se inhibe mediante by aminobenzoil hidrazida 150 μ M, un inhibidor de la peroxidasa basada en un mecanismo. La transfección del siARN para iNOS (NOS= óxido nítrico sintasa) o nNOS (en el caso de células tumorales neuronales) inhibe la expresión de la NO sintetasa y, por tanto, anula la síntesis de NO. La transfección con siARN contra *duox* evita la expresión de la peroxidasa crucial y, por tanto, evita la síntesis de HOCl. La transfección con siARN contra Nox-1 (NADPH oxidasa 1) evita la expresión de NADPH oxidasa y, por tanto, evita la generación de aniones superóxido. Si los compuestos son adecuados para analizar el efecto sobre la señalización de ROS depende de las células tumorales específicas usadas en el ensayo. Las células tumorales pueden usar la
- 50

vía de señalización de HOCl, la vía de señalización de NO sola o ambas vías de señalización. Un compuesto que disminuye el nivel de los compuestos indicados anteriormente es adecuado para la etapa de analizar el efecto sobre la señalización de ROS si el compuesto bloquea al menos una de las vías usadas por la célula tumoral. Si el compuesto inhibe las propiedades inductoras de apoptosis tumoral, se dan pruebas de que los compuestos de ensayo inducen la apoptosis tumoral participando en la vía de señalización de ROS. Los compuestos que inducen apoptosis tumoral participando en la vía de señalización de ROS podrían ser eficaces como medicamentos antitumorales.

En una realización preferida, la etapa de analizar el efecto sobre la señalización de ROS se realiza poniendo en contacto los compuestos con células tumorales y suministrando un compuesto del grupo de compuestos que inhiben la síntesis de los aniones superóxido o secuestrar los aniones superóxido (es decir, AEBSF (100 μ M) o SOD (100 U / ml)) en combinación con al menos un compuesto del grupo de compuestos que interfieren en la vía de señalización de HCOL (es decir, el inhibidor de la peroxidasa (ABH, 150 μ M; catalasa (100 U / ml), la taurina secuestradora de HOCl (50 mM) y el manitol secuestrador de radicales hidroxilo (10 mM) o un compuesto del grupo de compuestos que interfieren en la vía de señalización de NO (es decir, el inhibidor de la NO sintasa L-NAME (2,4 mM) u otros inhibidores de la sintasa conocidos y el catalizador de la descomposición del peroxinitrito FeTPPS (40 μ M)). La señalización de ROS intracelular específica se confirma cuando la inducción de la apoptosis por el compuesto de ensayo es inhibida por la aplicación de un inhibidor de los compuestos que interfiere en los aniones superóxido en combinación con al menos uno de los compuestos que interfieren en la vía de señalización HOCl o la vía de señalización NO. La combinación adecuada de compuestos para una determinada célula tumoral en el ensayo se tiene que determinar antes de comenzar el ensayo. Las células tumorales pueden usar 1) ambas vías de señalización, 2) la vía de señalización de HOCl sola o 3) la vía de señalización de NO sola en función del escenario enzimático. El ensayo se tiene que realizar con un inhibidor de la síntesis de aniones superóxido o secuestrante de aniones superóxido en combinación con al menos un inhibidor de la vía de señalización de HOCl (indicada anteriormente), si las células usan la vía de señalización de HOCl. Si la célula tumoral usa la vía de señalización de HOCl, se usa un inhibidor de la vía de señalización de NO (indicada anteriormente) en lugar del vía de señalización de HOCl. Si la célula tumoral usa ambas vías de señalización, se pueden usar inhibidores de la vía de señalización HOCl o NO, preferentemente se usa al menos un inhibidor de las dos vías de señalización.

Todavía se prefiere más usar al menos un inhibidor de cada una de las dos vías de señalización, si la célula tumoral usa ambas vías o si el ensayo se realiza son saber qué vía(s) de señalización son usadas por las células tumorales.

Si las combinaciones indicadas anteriores de los compuestos bien o reducen las propiedades inductoras de la apoptosis de los compuestos de ensayo, se proporcionan pruebas de que la inducción de la apoptosis está mediada por la señalización de ROS.

La presente invención también se refiere a un kit para identificar compuestos de acuerdo con el procedimiento como se ha descrito anteriormente, que induce apoptosis tumoral inactivando una catalasa sobre la superficie de las células tumorales, que comprende células tumorales, TGF-beta, histidina y un compuesto que es capaz de disminuir los niveles de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, radical hidroxilo, óxido nítrico y peroxinitrito.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención se basa en incrementar los niveles de especies de oxígeno reactivas. Esto conduce a la inactivación de la catalasa sobre la superficie de las células tumorales, que posteriormente aumenta la concentración de peroxinitrito y conduce a apoptosis de las células tumorales. La producción de especies de oxígeno reactivas se puede conseguir aumentando los niveles de óxido nítrico en las células tumorales inhibiendo la enzima arginasa o la NO dioxigenasa.

La expresión "inhibidor de arginasa" se refiere a los compuestos que disminuyen la efectividad de la enzima arginasa para catalizar la formación de citrulina a partir de arginina y, de este modo, aumentan la cantidad de arginina disponible para la óxido nítrico sintasa. Los experimentos para identificar compuestos adecuados para la inhibición de la arginasa son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad de la arginasa se puede determinar mediante sistemas de ensayo disponibles comercialmente que determinan la actividad de la arginasa mediante la medición de la generación de urea a partir de arginina. Este ensayo estándar se puede modificar para la detección de inhibidores de arginasa cuando se aplica una concentración definida de arginasa y se determina la disminución de la generación de urea.

La expresión "inhibidor de la óxido nítrico desoxigenasa se refiere a los compuestos que disminuyen la efectividad de la enzima óxido nítrico desoxigenasa para catalizar la formación de nitrato a partir de óxido nítrico y, de este modo, aumentan los niveles de óxido nítrico. Los experimentos para identificar compuestos adecuados para la inhibición de la óxido nítrico desoxigenasa son bien conocidos en la técnica. La actividad de la óxido nítrico desoxigenasa se mide mediante el consumo de óxido nítrico, en función de la presencia de oxígeno molecular y HADPH (Hallstrom et al., Free Radical Biology & Medicine, 37: 216-228, 2004). Los inhibidores de la óxido nítrico desoxigenasa se definen como compuestos que reducen el consumo de óxido nítrico en las condiciones del sistema de ensayo descrito anteriormente.

Se puede usar cualquier inhibidor de la arginasa conocido de acuerdo con la presente invención con el fin de

inactivar la catalasa y, después, la célula tumoral. Ejemplos de inhibidores de arginasa adecuados son, entre otros:

(S)-(2-boronoetil)-L-cisteína (BEC), ácido 2(S)-amino-6-boronoheptanoico (ABHA), NOHA/ L-HO-Arg (N^G-hidroxi-L-arginina), nor-NOHA/ ácido L-2-amino-(4-(2'hidroxiguanidino)butírico (N^{omega}-hidroxi-nor-L-arginina) y DL-alfa-difluorometilornitina (DFMO). El inhibidor de la arginasa preferido es norNOHA.

- 5 Ejemplos de inhibidores de la óxido nítrico desoxigenasa son: itraconazol, ketoconazol, miconazol, fluconazol, bifonazol, econazol y sulconazol. Inhibidores de la óxido nítrico desoxigenasa preferidos son itraconazol y miconazol.

Se entiende que la presente invención no se limita a estos ejemplos y se puede llevar a cabo usando cualquier inhibidor conocido de la arginasa o de la NO-dioxigenasa.

- 10 La inducción de la apoptosis y la destrucción de las células tumorales puede conseguirse también mediante una combinación de un inhibidor de la arginasa seleccionado del grupo que consiste en: (S)-(2-boronoetil)-L-cisteína (BEC), ácido 2(S)-amino-6-boronoheptanoico (ABHA), NOHA/ L-HO-Arg (N^G-hidroxi-L-arginina), nor-NOHA/ ácido L-2-amino-(4-(2'hidroxiguanidino)butírico (N^{omega}-hidroxi-nor-L-arginina) y DL-alfa-difluorometilornitina (DFMO) en combinación con un inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa seleccionado del grupo que consiste en: itraconazol, fluconazol, econazol, bifonazol, ketoconazol, sulconazol y miconazol.

- 15 En una realización preferida, la combinación de inhibidores comprende el inhibidor de la arginasa norNOHA y un inhibidor de la NO-dioxigenasa seleccionados del grupo que consiste en itraconazol, fluconazol, econazol, bifonazol, ketoconazol, sulconazol y miconazol.

- 20 Es especialmente preferido que la combinación de inhibidores sea una combinación de itraconazol o miconazol con un inhibidor de la arginasa seleccionado del grupo que consiste en: (S)-(2-boronoetil)-L-cisteína (BEC), ácido 2(S)-amino-6-boronoheptanoico (ABHA), NOHA/ L-HO-Arg (N^G-hidroxi-L-arginina), nor-NOHA/ ácido L-2-amino-(4-(2'hidroxiguanidino)butírico (N^{omega}-hidroxi-nor-L-arginina) y DL-alfa-difluorometilornitina (DFMO). Además, se prefiere que la proporción molar del inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa / arginasa esté entre 10:1 y 1:10, más preferido entre 10:1- 4:1; más preferido 4:1 - 1:1, incluso más preferido 1:1-1:4 y lo más preferido 1:4-1:10.

- 25 En una realización especial de la invención, una combinación de taxol como una sustancia activa anticancerosa con un inhibidor de la NO-dioxigenasa o un inhibidor de la arginasa se usa para inducir de forma selectiva la apoptosis en células tumorales. Se prefiere usar una combinación de taxol con un inhibidor de la NO-dioxigenasa seleccionado del grupo que consiste en: itraconazol, fluconazol, econazol, bifonazol, ketoconazol, sulconazol, miconazol, para el tratamiento del cáncer. Lo más preferentemente, se usa una combinación de taxol con itraconazol para inducir específicamente la apoptosis en las células tumorales.

- 30 En otra realización de la presente invención, se usa una combinación de taxol y un inhibidor de la arginasa y/o un inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa para el tratamiento del cáncer. En esta realización, el inhibidor de la arginasa y el inhibidor de la NO dioxigenasa pueden ser cualquier inhibidor como se especifica anteriormente. Se prefiere que taxol se use en combinación con un inhibidor de la NO dioxigenasa.

- 35 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para identificar compuestos que inducen apoptosis en las células tumorales basada en la vía de señalización de ROS. El procedimiento para identificar compuestos comprende dos etapas esenciales, mientras que también se puede incluir una tercera etapa adicional.

- 40 Las células tumorales se pueden usar para el ensayo de acuerdo con la presente invención pueden ser, por ejemplo, células murinas, especialmente células L929, células tumorales humanas como SISO o SHEP, pero no se limitan a estos ejemplos. Se debe destacar que cada célula tumoral tiene una preferencia específica para las vías de señalización intercelular mediada por ROS tras la inhibición o inactivación de su catalasa. Por ejemplo, en las células L929 y SISO, la vía de HOCl es dominante, mientras que en las células de neuroblastoma como SHEP, la vía de NO/peroxinitrito es dominante. Otros muestran las vías con actividad similar. En las líneas celulares en las que domina la vía de señalización de HOCl, se puede producir un desplazamiento a la dominancia de la vía de NO a concentraciones relativamente bajas de compuestos inductores de la apoptosis.

- 45 La preferencia de una línea de células tumorales dada para las vías de señalización mediadas por ROS intercelular específicas se define por la concentración de la peroxidasa liberada por las células y sobre la velocidad de generación de aniones superóxido que define la velocidad de formación espontánea del peróxido de hidrógeno mediante dismutación. Si la liberación de peroxidasa es baja (como en el caso de las líneas celulares de neuroblastoma, células de carcinoma de mama, células de carcinoma ovárico y otras) la vía de HOCl no será eficaz y la vía de NO dominará. Por tanto, los inhibidores de la síntesis de aniones superóxido, secuestrantes de aniones superóxido, inhibidores de la NO sintasa y secuestrantes de peroxinitrito inhibirán la inducción de la apoptosis, pero los inhibidores de peroxidasa, secuestrantes de HOCl o radicales de hidroxilo no tendrán efecto o tendrán un efecto únicamente mínimo. Si la liberación de la peroxidasa es alta, los inhibidores de la generación de aniones superóxido o secuestrantes de aniones superóxido, inhibidores de la peroxidasa, secuestrantes de HOCl o radicales hidroxilo pueden bloquear la apoptosis. Si la vía de señalización de NO desempeña un papel detectable en paralelo a la vía de HOCl o no dependerá del uso completo del peróxido de hidrógeno por la peroxidasa. En este caso, el NO

reaccionará con los aniones superóxido en paralelo con la vía de HOCl y contribuirá a la inducción de la apoptosis. Esto se refleja por la inhibición a través de inhibidores de la NO sintasa o secuestrantes de peroxinitrito. Si existe un exceso relativo de peróxido de hidrógeno en el sistema, el consumo de NO a través del peróxido de hidrógeno modulará por disminución la vía de señalización de NO.

- 5 La preferencia por ciertas vías tiene que evaluarse antes de usar una línea de células tumorales por actividad o especificidad de los controles en este contexto. La preferencia se puede determinar mediante la inhibición de la catalasa con 3-aminotriazol y el uso de secuestrantes dirigidos contra los componentes de señalización esenciales como se indica en la Figura 1. Esta determinación mostrará si los inhibidores específicos de la vía de HOCl (inhibidores de la peroxidasa, secuestrantes de HOCl, secuestrantes de los radicales hidroxilos) y/o inhibidores de la
10 vía de señalización de NO (inhibidores de la NO sintasa, secuestrantes de peroxinitrito) bloquean la apoptosis. La inhibición por inhibidores de la NADPH oxidasa y secuestrantes de aniones superóxido, dado que los aniones superóxido desempeñan un papel central en ambas vías de señalización. Por tanto, la inhibición de la apoptosis por los inhibidores de la NADPH oxidasa o los secuestrantes de aniones superóxido en combinación con al menos uno de los inhibidores del grupo de inhibidores de la vía de señalización de HOCl o NO permite concluir que la
15 señalización intercelular mediada por ROS es eficaz.

Cualquier densidad inicial de las células tumorales es adecuada para el procedimiento de acuerdo con la invención, aunque la cinética de la inducción de la apoptosis se determina mediante la densidad inicial. Una densidad inicial de 25.000 células por placa de 48 pocillos permite un ensayo de consumo de menos tiempo.

- 20 Se prefiere que las células tumorales estén presentes en una densidad inicial de 25.000 células por placa de 48 pocillos (p. ej., Costar) en 200 μ l de medio de formulación. Las mezclas de reacción comprenden TGF-beta, que potencia la liberación de peroxidasa. La peroxidasa es necesaria para la señalización intracelular en estas células. Preferentemente, las mezclas de reacción comprenden al menos 20 ng/ml de TGF-beta.

- 25 La primera etapa comprende poner en contacto las células tumorales en medio que comprende TGF-beta con los compuestos de ensayo cuyas propiedades de inducción de apoptosis se van a analizar. Después de un tiempo de incubación específico, la extensión de la inducción de apoptosis se determina, por ejemplo, tras dos días. En la técnica se conocen bien los procedimientos para determinar la apoptosis en células de un modo cuantitativo y se describen en, por ejemplo, Jürgensmeier et al. (Cancer Research 1994; 54:393-398). Se basa en la determinación del porcentaje de células que muestran ampollas en la membrana y condensación y fragmentación nuclear, los rasgos característicos de la apoptosis. Estas características de las células apoptóticas se pueden determinar
30 mediante microscopía de contraste de fases o después de la tinción de la cromatina con pigmentos fluorescentes, seguido de microscopía de fluorescencia. Los compuestos inductores de apoptosis conducirán a un incremento significativo de células con los signos morfológicos de apoptosis en comparación con los cultivos control sin tratar.

- 35 Por comparación, las muestras control sin el compuesto de ensayo se someten a las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Después de la primera etapa se seleccionan los compuestos que muestran una inducción de la apoptosis significativamente mayor que las muestras control. El análisis de las muestras control se puede llevar a cabo con medio control o con disolvente control.

- 40 La segunda etapa comprende poner en contacto los compuestos de la etapa 1 con células tumorales y medios que comprenden TGF-beta de acuerdo con las condiciones descritas en la etapa 1. Además, se añade histidina a estas mezclas de reacción con el fin de determinar si la inducción de la apoptosis se basa en la acción de oxígeno singlete. Se prefiere que la cantidad de histidina en la mezcla de reacción no sea superior a 2 mM. Para comparar, la etapa 2 comprende realizar las mismas reacciones con muestras control sin histidina. La extensión de la inducción de la apoptosis se determina, de nuevo, después de un tiempo de incubación específico, por ejemplo, dos días. En la etapa 2, se seleccionan los compuestos que no inducen apoptosis tumoral si se añade histidina.

- 45 El procedimiento para identificar compuestos adecuados puede comprender además una tercera etapa. La tercera etapa comprende poner en contacto los compuestos identificados de la etapa 2 con fibroblastos diploides normales con el fin de determinar si estos compuestos inducen apoptosis u otras reacciones tóxicas y, por tanto, no son adecuados para uso médico. Los compuestos que no ejercen efectos negativos sobre los fibroblastos diploides normales se pueden someter a otros experimentos.

- 50 Un experimento adicional puede comprender determinar si el efecto inhibidor de la histidina sobre la apoptosis inducida en la etapa 2 se basa en uno o dos de las dos vías principales de señalización de ROS específicas de las células tumorales, ese decir la vía de señalización de HOCl o de NO/peroxinitrito (Figura 1). Este experimento se puede realizar poniendo en contacto los compuestos con las células tumorales de acuerdo con las condiciones de la etapa 1 y, además, suministrando un compuesto, que es capaz de disminuir el nivel de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, radical hidroxilo, óxido
55 nítrico y peroxinitrito. Esto se consigue mediante la adición de secuestrantes o inactivadores específicos. Los aniones superóxido son secuestrados por la superóxido dismutasa (100 U / ml) o su generación se inhibe mediante la NADPH oxidasa con 50 μ g/ml de apocinina o AEBSF 100 μ M 4-(2-aminoetil)benzenosulfonilo). El peróxido de hidrógeno se destruye por acción de la catalasa (100 U / ml). El ácido hipocloroso es secuestrado por la taurina (50 mM). Los radicales hidroxilo son secuestrados por tereftalato sódico 400 μ M o manitol 1 mM. El peroxinitrito es

secuestrado por FeTPPS 40 μM . La síntesis de NO se bloquea mediante la adición de L-NAME (N^{G} -nitro-L-arginina-metiléster) 2,4 mM. La reacción de la peroxidasa, que conduce a la formación de ácido hipocloroso, se inhibe mediante by aminobenzoil hidrazida 150 μM , un inhibidor de la peroxidasa basada en un mecanismo. Si la inducción de la apoptosis se puede inhibir disminuyendo uno de los compuestos que participan en la vía de señalización de ROS, se proporcionan pruebas de que la inducción de la apoptosis se basa en la vía de señalización de ROS.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** divulga los mecanismos de la apoptosis en células tumorales. Abreviaturas: NOS = óxido nítrico sintasa; NOD = óxido nítrico dioxigenasa; NOD-INH = inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa; CAT = catalasa; POD = peroxidasa; NOX = NADPH oxidasa.

La **Figura 2** divulga datos experimentales obtenidos en condiciones de terapia fotodinámica. La figura divulga el porcentaje de células apoptóticas en muestras que comprende fotofrina y compuestos que influyen sobre la vía de señalización de ROS, mientras que las muestras se irradian opcionalmente con luz. Abreviaturas: PHO = fotofrina; HIS = histidina; APO = Apocinina; SOD = superóxido dismutasa; TAU = taurina; FeTPPS = cloruro de 5,10,15,20-TETRAKIS (4-sulfonatofenil)porfirinato de hierro (III).

La **Figura 3** divulga datos experimentales obtenidos con 25.000 células L929 en grupos de cultivos tisulares de 48 pocillos en presencia de 20 ng/ml de TGF-beta. Se añadió itraconazol a las concentraciones indicadas en presencia o ausencia de histidina 2 mM (secuestrante de oxígeno singlete). El porcentaje de células apoptóticas se determinó tras 37 horas. Obsérvese que la apoptosis se induce mediante itraconazol de un modo dependiente de la concentración. La apoptosis mediada por itraconazol se inhibe significativamente mediante la histidina secuestrante de oxígeno singlete.

Las líneas discontinuas indican el porcentaje de células apoptóticas obtenidas cuando se bloqueó la catalasa de células tumorales con 23-aminotriazol (3-AT) 25 mM. Al contrario que la inducción de apoptosis mediada por itraconazol, la inducción mediante inhibición directa de la catalasa a través de 3-AT no se bloqueó con histidina.

La **Figura 4** divulga datos experimentales obtenidos con 25.000 células L929 en grupos de cultivos tisulares de 48 pocillos en presencia de 20 ng/ml de TGF-beta. "Sin adición" representa el control sin adición de compuesto. Se añadió ketoconazol, miconazol y fluconazol a una concentración final de 12,5 $\mu\text{g/ml}$. El porcentaje de células apoptóticas se determinó tras 63 horas. El experimento demuestra el potencial inducción de apoptosis de los azoles.

La **Figura 5** divulga datos experimentales obtenidos con 25.000 células SKNMC (neuroblastoma humano) en grupos de cultivos tisulares de 48 pocillos (sin la adición de TGF-beta). Los ensayos control no recibieron compuestos inductores de apoptosis y mostraron un fondo constante de apoptosis inferior al 1 por ciento (datos no mostrados). Los ensayos recibieron 12,5 $\mu\text{g/ml}$ de miconazol (A), econazol (B), sulconazol (C), bifonazol (D), o 25 $\mu\text{g/ml}$ de ketoconazol (E), itraconazol (F), fluconazol (G) o 75 mM el inhibidor de catalasa 3-AT. Los ensayos control contenían el compuesto respectivo en ausencia de cualquier inhibidor. Ensayos paralelos contenían 200 μM del inhibidor de la NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasa AEBSF, 10 μM del inhibidor de la NO sintetasa específica de nNOS 3-Br-7-Ni (3-bromo-7-nitroindazol), 2 mM del secuestrante del oxígeno singlete histidina o 50 mM del secuestrante de HOCl taurina. El porcentaje de células apoptóticas se determinó en los puntos de tiempo indicados. El experimento demuestra que todos los azoles y el inhibidor de la catalasa 3-AT inducían apoptosis en las células tumorales en una extensión significativa. Para todos los inductores, la inducción de la apoptosis dependía de la generación de aniones superóxido y de la síntesis de NO, ya que se bloquearon con AEBSF y 3-Br-7-Ni, respectivamente. Al contrario que la vía de NO / peroxinitrito, la vía de HOCl no desempeñaba ningún papel en la inducción de la apoptosis en esta línea concreta. La inducción de la apoptosis por todos los azoles analizados dependía de la acción del oxígeno singlete y se bloqueó con histidina. Esto indica que la catalasa tenía que inactivarse con oxígeno singlete antes de que la vía de señalización de ROS intercelular pueda inducir apoptosis. Si el 3-AT inhibe directamente la catalasa, no se necesita oxígeno singlete y no contribuye a la inducción de la apoptosis. Otros análisis (datos no mostrados) revelaron que la acción del oxígeno singlete era necesaria durante las primeras horas de los experimentos, mientras que la señalización de ROS es necesaria a lo largo del experimento.

La **Figura 6** divulga datos experimentales obtenidos con 25.000 células SISO (carcinoma de cérvix humano) cultivadas en grupos de cultivos tisulares de 48 pocillos en presencia de las concentraciones indicadas del compuesto quimioterapéutico establecido taxol. Los ensayos contenían histidina 2 mM o no. El experimento demuestra el hallazgo inesperado de que el efecto inductor de la apoptosis de taxol depende de la acción del oxígeno singlete, ya que es inhibida por el secuestrante específico de oxígeno singlete histidina.

La **Figura 7** divulga datos experimentales obtenidos con 25.000 células SISO (carcinoma de cérvix humano) cultivadas en grupos de cultivo tisular de 48 pocillos en ausencia de cualquier inductor ("sin adición") o en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de taxol ("TAX") sin otras adiciones o con la adición de 100 μM del inhibidor de la NADPH oxidasa AEBSF, 100 U /ml del secuestrante de aniones superóxido SOD (SOD que contiene

manganeso de *E. coli*), 100 U / ml de catalasa, 150 μM del inhibidor de la peroxidasa ABH (aminobenzoilhidrazida, 50 mM del secuestrante de HOCl taurina, 1 mM del secuestrante de radicales hidroxilo manitol, 2,4 mM del inhibidor de la NO sintasa L-NAME, y 25 μM de los inhibidores de las caspasas 3, -9 y 8. El experimento demuestra que la inducción de la apoptosis por 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de taxol depende de la señalización -intercelular de ROS (vía de HOCl), ya que la eliminación o inhibición de los superóxidos, peróxido de hidrógeno, peroxidasa, HOCl, radicales hidroxilo bloquea la inducción de la apoptosis. La vía de NO no desempeña ningún papel en estas condiciones. La inducción de la apoptosis está mediada por las caspasas 9 y 3 (vía mitocondrial) y es independiente de la caspasa 8 específica del receptor de muerte. La química de la señalización durante la inducción de la apoptosis mediada por taxol en células SISO humanas depende de la concentración de taxol. Cuando se usan 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de taxol en lugar de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la señalización intercelular depende muy poco de la vía de HOCl, pero la vía de señalización de NO es dominante.

La **Figura 8** divulga datos experimentales obtenidos con 25.000 células SISO en grupos de cultivos tisulares de 48 pocillos en presencia de 20 ng/ml de TGF y las concentraciones indicadas de taxol. Cuando está indicado, los ensayos que contienen taxol recibieron arginina 10 mM (10 ARG), Nor-NOHA 200 μM o una combinación de ambos. El experimento demuestra el efecto sinérgico entre arginina y Nor-NOHA con taxol.

La **Figura 9** divulga datos experimentales obtenidos con 12500 células SISO en grupos de cultivos tisulares de 96 pocillos en presencia de 20 ng/ml de TGF y las concentraciones indicadas de taxol. Además, se añadió histidina a diferentes puntos de tiempo en el experimento. El experimento demuestra que la adición de histidina al comienzo del experimento inhibe la destrucción de la catalasa, mientras que una adición de histidina 5 horas después de comenzado el experimento conduce a una elevada apoptosis celular.

La **Figura 10** se refiere a un experimento que fue similar al descrito con respecto a la figura 9, mientras que la histidina se sustituyó por L-NAME (inhibidor de la NO sintasa 2,4 mM). Los datos experimentales muestran que la adición temprana de L-NAME inhibe la apoptosis tumoral inducida por taxol en el intervalo de concentraciones de cero a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que la adición tardía de L-NAME (5 horas después del comienzo del experimento) solo inhibe la apoptosis tumoral a concentraciones de taxol inferiores a 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (La falta de inhibición de la apoptosis inducida por taxol a concentraciones de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y mayores se debe al agotamiento del sistema inhibidor a estas concentraciones de taxol.)

La **Figura 11** se refiere a un experimento similar al descrito con respecto a las figuras 8 o 9, mientras que la histidina / L-NAME se sustituyó por taurina (secuestrante de HOCl 50 mM). Los datos experimentales muestran que la taurina solo inhibe la apoptosis tumoral a concentraciones altas de taxol, lo que indica que solo concentraciones altas de taxol induce apoptosis mediante la vía de HOCl. Además, la apoptosis tumoral no depende del punto de tiempo de la adición de taurina porque la taurina no influye sobre la destrucción de la catalasa.

Ejemplo 1

La prueba de concepto para la vía de señalización de ROS de la apoptosis de las células tumorales a través de la formación de oxígeno singlete seguida de señalización basada en la interacción de especies de oxígeno reactivas se proporciona a continuación.

Los experimentos se han llevado a cabo usando la terapia fotodinámica sobre células tumorales en combinación con compuestos relacionados con la señalización de ROS (comparar con la figura 2). Células L 929 (25.000 por grupo de cultivo tisular de 48 pocillos en 200 μl de medio que contiene 5 % de suero bovino fetal) obtuvieron 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fotofrina. El experimento se realizó cercano a la oscuridad. Los controles (más 20 ng/ml de TGF-beta) no se iluminaron y se envolvieron en papel de aluminio cuando se incubaron a 37°C durante 48 horas. Todos los demás ensayos recibieron iluminación con luz visible durante diez minutos. Los ensayos recibieron 20 ng/ml de TGF y permanecieron sin más adiciones ("Photo/Light") o recibieron 2 mM del secuestrante de oxígeno singlete histidina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina, 100 U / ml de SOD, 50 mM del secuestrante de HOCl taurina, 1 mM del secuestrante de radicales hidroxilo manitol, 2,4 mM del inhibidor de la NO sintasa L- NAME o 40 μM del catalizador de la descomposición de peroxinitrito FeTPPS.

El primer experimento (a empezar desde la izquierda) mostrado en la figura 2 representa un experimento control e indica una apoptosis muy pequeña en las células tumorales con fotofrina y sin luz. El segundo experimento muestra una apoptosis elevada en células tumorales con fotofrina y luz. El tercer experimento comprende una combinación de fotofrina, luz e histidina y prueba que el oxígeno singlete está implicado en la inducción de la apoptosis, dato que la histidina como inactivador del oxígeno singlete reduce la apoptosis de las células tumorales. El uso de fotofrina, luz y APO (inhibidor de la NADPH oxidasa), SOD (superóxido dismutasa, un secuestrante de aniones superóxido) indica que la prevención de la síntesis de aniones superóxido o su eliminación del sistema reduce la apoptosis inhibiendo la vía de señalización de ROS. El efecto inhibidor de la taurina apunta al papel de HOCl para la inducción de la apoptosis con fotofrina iluminada, mientras que el efecto inhibidor del secuestrante de radicales hidroxilo manitol ilustra el papel de los radicales hidroxilo (derivado de la reacción de aniones superóxido con HOCl). Usando L-NAME en combinación con fotofrina y luz reduce la apoptosis en células tumorales mediante inhibición de la óxido nítrico sintasa, apuntando al papel del NO. El último experimento indica que el uso de FeTPPS también es capaz de

reducir la apoptosis en células tumorales, mientras que FeTPPS actúa como inactivador de peroxinitrito, lo que demuestra que la apoptosis está mediada por peroxinitrito, un producto de reacción entre NO y aniones superóxido.

5 En conjunto, los experimentos demuestran que el oxígeno singlete (que se genera mediante iluminación de fotofrina) desencadena apoptosis en células tumorales. En contraste con el concepto aceptado actualmente de la terapia
 10 fotodinámica, el papel del oxígeno singlete no es inducir directamente la apoptosis sino destruir la catalasa protectora de las células tumorales y, por tanto, permitir establecer la señalización de ROS intercelular por las células tumorales, lo que conduce a la destrucción apoptótica de estas células. Dado que esta señalización se basa en la generación de aniones superóxido, que es una característica específica de las células tumorales, la inducción de la apoptosis está dirigida selectivamente contra las células malignas. Mientras que el oxígeno singlete se genera
 15 mediante la adición de fotosensibilizadores como fotofrina durante la terapia fotodinámica, la presente invención genera las especies de oxígeno reactivas incrementando el nivel de óxido nítrico, por lo que el óxido nítrico reacciona con peróxido de nitrógeno que reacciona con peróxido de hidrógeno para formar oxígeno singlete. La siguiente cadena de reacciones es similar a las definidas en la figura 2.

Ejemplo 2

15 Las figuras 3 - 5 demuestran que la interacción de azoles con células tumorales produce apoptosis dirigida por ROS basada en la inactivación inicial de la catalasa protectora por el oxígeno singlete, seguido del establecimiento de la señalización mediada por ROS intercelular. La Figura 3 demuestra el potencial dependiente de la concentración de itraconazol para inducir apoptosis en las células tumorales L929 Dado que la inducción de la apoptosis está
 20 bloqueada por el secuestrante de oxígeno singlete histidina, el oxígeno singlete desempeña un papel central para el efecto observado. Si la catalasa es bloqueada directamente por inhibidores como 3-AT, el oxígeno singlete no parece desempeñar papel alguno, ya que no hay inhibición con histidina en este caso.

Una modificación de este experimento (datos no mostrados) en el que se añadió histidina a diferentes puntos de tiempo permitió la conclusión de que la acción del oxígeno singlete tiene lugar durante las primeras horas tras el
 25 contacto entre las células e itraconazol y, después, es seguida por la señalización mediada por ROS en la que el oxígeno singlete no desempeña ningún papel adicional. La generación de oxígeno singlete por itraconazol está bien explicada con el efecto inhibitor de este compuesto sobre la óxido nítrico dioxigenasa. La inhibición de esta enzima consumidora de NO produce un rápido incremento de los niveles de NO, seguido de formación de peroxinitrato cuando el NO interacciona con aniones superóxido. La interacción de peroxinitrito con peróxido de hidrógeno causa la generación de oxígeno singlete que tiene el potencial de inactivar la catalasa protectora de las células tumorales.

30 La Figura 4 demuestra que diferentes azoles muestran el potencial de inducción de apoptosis en células tumorales. En el intervalo de concentraciones usado en estos experimentos, los azoles no tienen efectos sobre las células no transformadas (datos no mostrados). Las Figuras 5A - G demuestran que varios azoles inducen apoptosis en la línea celular de neuroblastoma humano SKNMC. De nuevo, el oxígeno singlete es de gran importancia, ya que la reacción es bloqueada por la histidina. De acuerdo con los experimentos de los inventores, se ha demostrado que las células
 35 de neuroblastoma establecen principalmente la vía de señalización de NO / peroxinitrito y no la vía de HOCl cuando su catalasa es inhibida o inactivada. Esta preferencia se explica por la liberación mucho mejor de peroxidasa por las líneas de neuroblastoma en comparación con las líneas celulares como L929 o SISO. Compatible con este hallazgo, un inhibidor de la generación de aniones superóxido (AEBSF) y altamente específico del inhibidor específico de NOS 3-Br- 7-NI inhibe la acción de los azoles, como se muestra en las Figuras 5 A-G.

40 Estos datos muestran la reacción uniforme de varios azoles: generación de oxígeno singlete, inhibición de catalasa, establecimiento de señalización de ROS intercelular dirigida por las células tumorales, en el presente documento en base a NO y aniones superóxido (que conducen a la generación del último inductor de la apoptosis peroxinitrito). La Figura 5H demuestra que la inhibición directa de la catalasa de células tumorales mediante 3-AT conduce al mismo patrón de señalización de ROS intercelular, como se ve para la acción de los azoles, aunque sin la implicación de
 45 oxígeno singlete. En conjunto, estos datos confirman que el oxígeno singlete no es parte de la señalización y de la inducción última de la apoptosis pero representa el desencadenante inicial para inactivar la catalasa de células tumorales.

Ejemplo 3

50 La Figura 6 muestra que la inducción de la apoptosis por el bien conocido fármaco antitumoral taxol depende de la acción del oxígeno singlete, ya que es bloqueada por la histidina. Por tanto, se asemeja a los azoles a este respecto. Este hallazgo es nuevo, inesperado y, por primera vez, permite entender la selectividad del taxol por las células tumorales. Tras la acción del oxígeno singlete (generado por taxol a través de los mismos mecanismos como se indica para los azoles en el ejemplo 2), las células tumorales tratadas con taxol mueren mediante la señalización intercelular, que implica aniones superóxido (porque la reacción es bloqueada por AEBSF and SOD), peróxido de
 55 hidrógeno (ya que es bloqueada por la catalasa), peroxidasa (ya que es bloqueada por ABH), HOCl (ya que es bloqueada por la taurina), radicales hidroxilo (ya que sb bloqueados por manitol). Estos componentes representan los jugadores principales de la vía de señalización de HOCl (como se indica en la figura 1). El NO no parece desempeñar un papel importante en estas condiciones, ya que L-NAME no bloquea la reacción. Si la concentración de taxol se disminuye, la vía de NO se hace más prominente (datos no mostrados).

Finalmente, el uso de inhibidores específicos de la caspasa demuestra el papel de la regulación de la apoptosis mitocondrial y no proporciona indicaciones para la implicación de los receptores de muestra, ya que el inhibidor de la caspasa 8 no tiene efecto.

5 Por último, la figura 8 demuestra un efecto sinérgico entre las concentraciones subóptimas de taxol con arginina y el inhibidor de la arginasa nor-NOHA

Estos experimentos iluminan la actividad del taxol y demuestran que actúa a través de la cadena de acontecimientos que son el centro de esta solicitud de patente. Esto puede indicar que las vías que funcionan in vivo pueden funcionar bien in vivo.

Ejemplo 4

10 A continuación se sometió al taxol al ensayo de acuerdo con la presente invención con el fin de determinar sus propiedades inductoras de tumor debido a una inactivación de una catalasa sobre la superficie de células tumorales.

Etapa 1

15 Las células SISO humanas se usan en una placa de 48 pocillos (Costar) en 200 μ l de medio con una concentración celular de 25.000. El medio comprende 20 ng/ml de TGF-beta y después se somete al taxol a pruebas en una concentración que varía de from1,25 a 20 ng/ml. Para comparar, los experimentos control se realizan sin taxol, del que se analiza la inducción de la apoptosis. Como se muestra en la Figura 6, la apoptosis inducida por taxol ya se produce tras 12,5 horas a todas las concentraciones, mientras que el ensayo sin la adición de taxol mostró apoptosis de fondo.

Etapa 2

20 La etapa 2 se lleva a cabo con las mismas condiciones que se especifican para la etapa 1, pero todas las células se ponen en contacto con taxol. Además, se añade histidina (2 mM) a las células, mientras que también se realizan experimentos sin histidina como experimentos control. Como se muestra en la Figura 6, la histidina inhibió la apoptosis inducida por taxol a todas las concentraciones de taxol aplicadas, lo que demuestra que la inducción de la apoptosis inducida por taxol requiere la acción de oxígeno singlete.

25 Etapa 3 adicional

30 Las condiciones experimentales son las mismas que para la etapa 1, aunque las células usadas para la etapa 3 son fibroblastos diploides normales. Los experimentos control se llevan a cabo con el compuesto de ensayo y las células se incuban durante dos días. El taxol no indujo una apoptosis significativa en los fibroblastos diploides, lo que indica que no muestra efectos tóxicos inespecíficos en estas condiciones (datos no mostrados). Asimismo, el uso de células SISO que inhibían la generación de aniones superóxido a través de la inactivación genérica basada en SIAT no condujo a la inducción de la apoptosis mediada por taxol, lo que indica que la apoptosis mediada por taxol depende de la síntesis de aniones superóxido, que es un rasgo característico del estado transformado.

35 En un experimento adicional usando las condiciones de la etapa 1, las células tumorales humanas (SISO) se ponen en contacto con taxol (10 μ g / ml) y 100 μ M del inhibidor de la NADPH oxidasa AEBSF, 100 U / ml del secuestrante de aniones superóxido SOD (SOD que contiene manganeso de E. coli), 100 U / ml de catalasa, 150 μ M del inhibidor de la peroxidasa ABH (aminobenzoilhidrazida), 50 mM del secuestrante de HOCl taurina, 1 mM del secuestrante de radicales hidroxilo manitol o 2,4 mM del inhibidor de la NO sintasa L-NAME La apoptosis mediada por taxol se inhibió con los inhibidores de la generación de aniones superóxido (AEBSF, SOD) y los inhibidores de la vía de HOCl (catalasa, ABH, taurina, manitol), pero no mediante el inhibidor de la vía de NO (L-NAME) (Figura 7).

40 Cuando se aplicaron 2 μ g / ml de taxol en su lugar, la vía de NO se hizo más prominente, mientras que la vía de HOCl era menos eficaz, en base a los datos del inhibidor (datos no mostrados). A todas las concentraciones de taxol los aniones superóxido y una de las dos vías fueron eficaces.

Ejemplo 5a-c

45 El efecto de un secuestrante de oxígeno singlete, un inhibidor de la NO sintasa y un secuestrante de HOCl sobre la destrucción de la catalasa o la vía de HOCl se determinó mediante el experimento siguiente. 12500 células SISO en 100 μ l de medio en 96 pocillos tisulares se trataron con taxol (20 μ g / ml) en presencia de TGF- β (20 ng / ml). Además, se añadieron el secuestrante de oxígeno singlete, el inhibidor de la NO sintasa o el secuestrante de HOCl a diferentes puntos de tiempo en los experimentos.

50 En el experimento 5a, se añadió histidina (secuestrante del oxígeno singlete) al comienzo del experimento o tras 5 horas. Se realizó un experimento control en el que no se añadió histidina. La figura 9 muestra que la adición de histidina al comienzo del experimento inhibe la apoptosis tumoral en gran medida. No obstante, la adición tardía (5 horas después del comienzo del experimento) solo muestra un pequeño efecto de inhibición de la apoptosis. Esto se puede explicar con las propiedades de la histidina para inhibir la destrucción de la catalasa. La adición temprana de histidina inhibe la destrucción de la catalasa, mientras que una adición tardía de histidina (la catalasa ya se ha

destruido en gran medida) ya no puede inhibir más la apoptosis.

El **Ejemplo 5b** se llevó a cabo como el experimento 5a, aunque se usó L-NAME en lugar de histidina (2.4 mM, inhibidor de la NO sintasa). La Figure 10 muestra que la adición temprana de L-NAME inhibe la apoptosis tumoral, mientras que la adición tardía de L-NAME solo muestra algo de inhibición a concentraciones bajas de taxol. El experimento demuestra que la inhibición de la producción de NO inhibe la formación de especies de oxígeno reactivas y, por tanto, inhibe la destrucción de la catalasa cuando se aplicó taxol a concentraciones inferiores a 5 $\mu\text{g/ml}$. Cuando taxol se aplicó a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ o mayor, el sistema inhibitor se agitó y el análisis del papel de NO no fue posible a este intervalo de concentraciones.

El experimento 5c se llevó a cabo como los experimentos 5a y 5b, aunque se usó taurina en lugar de histidina o de L-NAME. La taurina (50 mM, secuestrante de HOCl) se añadió histidina al comienzo del experimento y tras 5 horas en un segundo experimento. Se realizó un experimento control en el que no se añadió taurina. Los resultados experimentales (véase la figura 11) demuestran que la apoptosis tumoral es independiente del punto de tiempo de la adición de taurina. Esto se puede explicar, ya que la taurina es un secuestrante de HOCl que no influye en la destrucción de la catalasa sino en la vía de HOCl. El experimento 5c muestra además que solo concentraciones altas de taxol inducen la vía de HCOI, que inhibe la taurina.

Ejemplo 6

Se han llevado a cabo otros experimentos usando diferentes tipos de células y diferentes inhibidores de la apoptosis. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 1 que se expone a continuación. El escenario experimental fue análogo al de los ejemplos 5a-5c y la adición tardía del inhibidor (histidina, L-NAME, 3-Br-7-nitroindazol o taurina) se realizó 1 hora después de comenzar el experimento. Las concentraciones de taxol, histidina, L-NAME y taurina fueron las mismas que en los experimentos 5a-5c. El 3-Br-7-nitroindazol se añadió a una concentración de 10 μM . Los compuestos inductores de la apoptosis se añadieron a concentraciones crecientes (arginina 0-5 mM, 0-20 $\mu\text{g/ml}$ de taxol, 0-20 $\mu\text{g/ml}$ de artemisina, 0-20 $\mu\text{g/ml}$ de xantohumol, 0-20 $\mu\text{g/ml}$ de itraconazol, 0-10 $\mu\text{g/ml}$ de miconazol, 0-20 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo contra el receptor de Apo/FAS). En cada uno de los experimentos se pudo observar el efecto de los inhibidores sobre la destrucción de catalasa mediada por oxígeno singlete y/o la posterior señalización de ROS. El efecto inhibitor de la apoptosis celular de los compuestos está indicada por "+" en la tabla 1. La adición de histidina al comienzo del experimento produjo inhibición en todos los experimentos y para todas las líneas celulares mostradas. La adición de histidina una hora después de la adición de los inductores indicados no causó inhibición de la apoptosis, ya que la destrucción de la catalasa por oxígeno singlete ya se había producido en este punto de tiempo (por favor, véase la Fig. 9). Los experimentos usando células de neuroblastoma solo muestran apoptosis mediada por la vía de NO, ya que estas células solo liberan cantidades pequeñas de peroxidasa. Por tanto, la adición del inhibidor específico de nNOS 3-Br-7NI produjo inhibición de la apoptosis con independencia del momento de la adición. Las otras líneas celulares mostraron apoptosis mediada por la vía de señalización de NO a concentraciones menores del compuesto inductor de la apoptosis y apoptosis mediada por HOCl a concentraciones más altas. Por tanto, la adición de L-NAME al comienzo del experimento inhibió la apoptosis a todas las concentraciones de inductores (lo que refleja el papel de la generación de oxígeno singlete a partir de peroxinitrito derivado de NO), mientras que la adición de L-NAME una hora después de la adición del inductor solo inhibió la apoptosis inducida por concentraciones menores de inductores, lo que indica que en estas condiciones la vía de señalización de NO prevalecía en cuanto se destruyó la catalasa. La adición de taurina en presencia de concentraciones mayores de inductores inhibió la apoptosis con independencia del momento de la adición (cero frente a una hora), ya que solo está implicado HOCl en la señalización intercelular, pero no en la destrucción de la catalasa.

Tabla 1

Inhibidores

Línea celular	Inductor	Histidina	L-NAME	3-Br-7-NI	Taurina
SISO	Taxol	+	+		+
SHEP	Taxol	+		+	
SKNMC	Arginina	+		+	
MKN-45	Anticuerpo Fas	+	+		+

(continuación)

Inhibidores

Línea celular	Inductor	Histidina	L-NAME	3-Br-7-NI	Taurina
MKN-45	Artemisinina	+	+		+
Gumbus	Taxol	+	+	+	
Gumbus	Arginina	+	+	+	
Gumbus	Itraconazol	+	+		+
Gumbus	Miconazol	+	+		+
Gumbus	Xantohumol		+	+	+

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de compuestos que inducen apoptosis tumoral mediante inactivación de una catalasa sobre la superficie de las células tumorales, que comprende una primera etapa de:

5 poner en contacto los compuestos de ensayo con células tumorales o células transformadas y seleccionar los compuestos de ensayo que inducen apoptosis, y

una segunda etapa de:

poner en contacto los compuestos de ensayo inductores de la apoptosis identificados en la primera etapa con células en un medio que comprende histidina y seleccionar los compuestos de ensayo que no inducen apoptosis en estas condiciones.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la primera etapa comprende suministrar TGF- β a las células.
3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el procedimiento se puede realizar sin células no tumorales o células no transformadas.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende la etapa de determinar si los compuestos son tóxicos para las células no tumorales.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende la etapa de determinar si la inhibición de la apoptosis tumoral por la histidina está basado en la señalización de ROS (especie de oxígeno reactiva).
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de analizar el efecto sobre la señalización de ROS se realiza poniendo en contacto los compuestos de ensayo con las células tumorales y suministrando un compuesto, que es capaz de disminuir el nivel de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, peroxidasa, HOCl, radical hidroxilo, óxido nítrico, radical hidroxilo, peroxinitrito, y en el que la disminución del nivel de este compuesto reduce el efecto de la apoptosis tumoral inducida por el compuesto de ensayo.
- 25 7. Kit para identificar compuestos de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, que induce apoptosis tumoral inactivando una catalasa sobre la superficie de las células tumorales, que comprende células tumorales, TGF-beta, histidina y un compuesto que es capaz de disminuir los niveles de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: aniones superóxido, taurina, óxido nítrico, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, peroxinitrito.
- 30 8. Composición de un inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa y un inhibidor de la arginasa para su uso en el tratamiento del cáncer, en la que el inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa reduce la actividad enzimática para catalizar la formación de nitrato a partir de óxido nítrico, y en la que el inhibidor de la arginasa reduce la actividad enzimática para catalizar la formación de citrulina a partir de arginina,
- 35 9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el inhibidor de óxido nítrico dioxigenasa es seleccionado del grupo que consiste en: itraconazol, fluconazol, econazol, bifonazol, ketoconazol, sulconazol y miconazol.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en la que el inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa es itraconazol.
- 40 11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que el inhibidor de la arginasa se selecciona del grupo que consiste en (S)-(2-boronoetil)-L-cisteína (BEC), ácido 2(S)-amino-6-boronoheptanoico (ABHA), NOHA/ L-HO-Arg (N^G-hidroxi-L-arginina), nor-NOHA/ ácido L-2-amino-(4-(2'-hidroxiguanidino)butírico (N^{omega}-hidroxi-nor-L-arginina) y DL-alfa-difluorometilornitina (DFMO).
- 45 12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que el medicamento comprende además taxol.
13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que la proporción molar entre inhibidor de la óxido nítrico dioxigenasa / arginasa está entre 10:1 y 1:10.

Figura 1

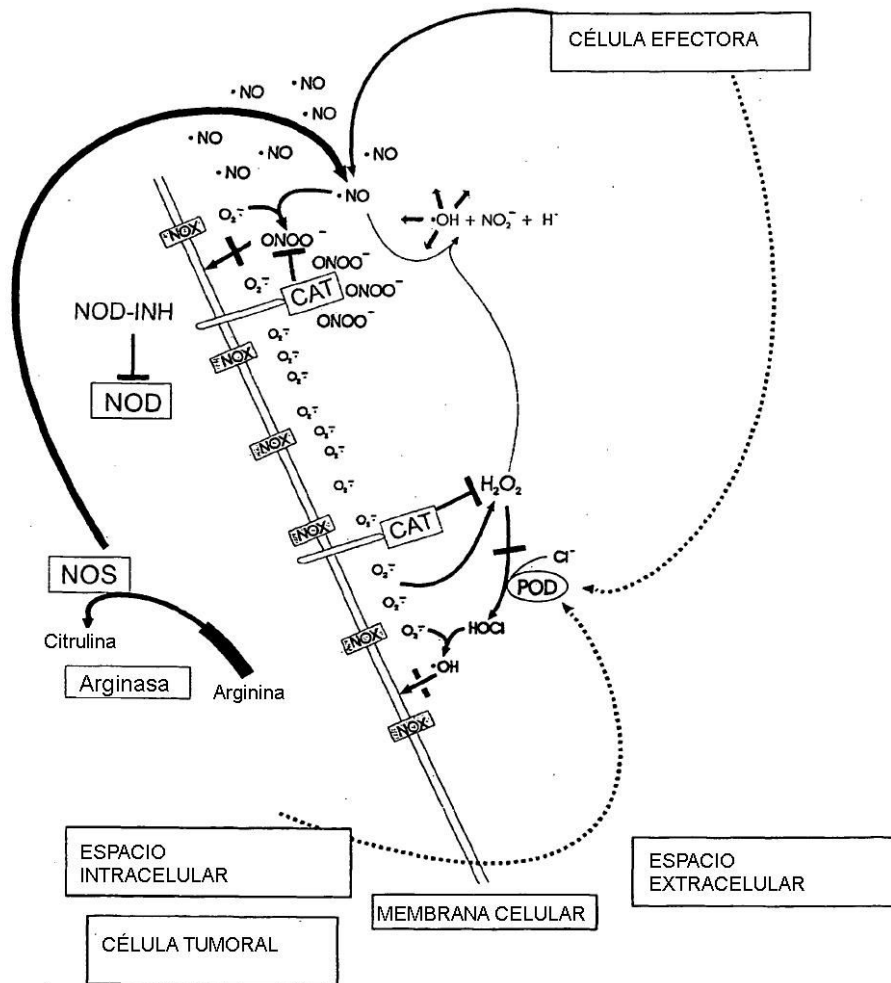


Figura 2

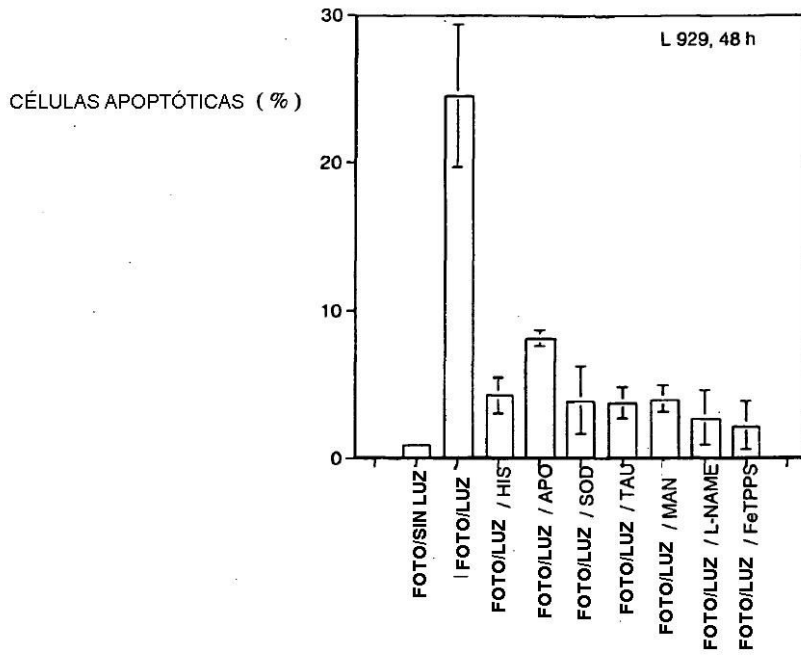


Figura 3

CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)

—○— L929, TGF, 37 hr
 —●— L929, TGF, + HIS, 37 hr

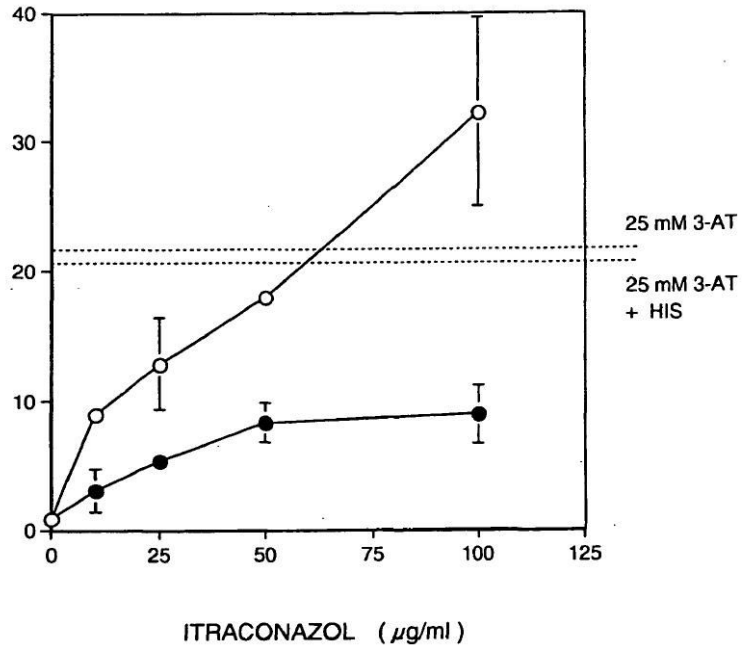


Figura 4

CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)

□ 25000 L929, TGF, 63 H

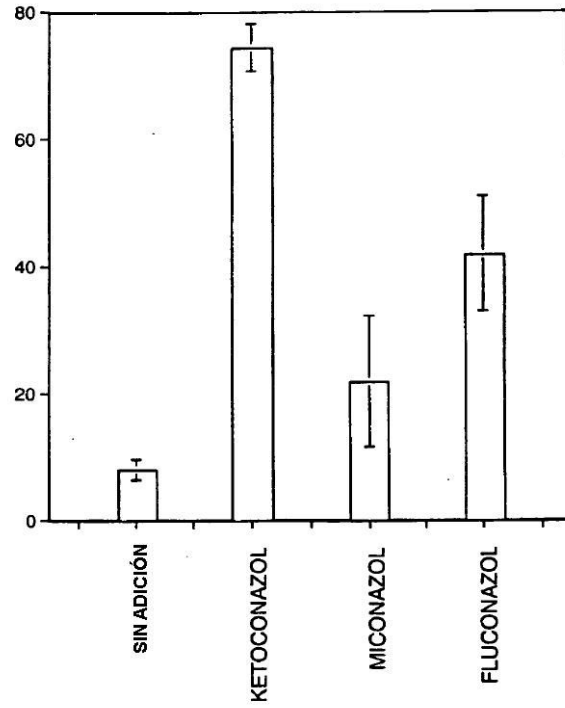


Figura 5 A-D

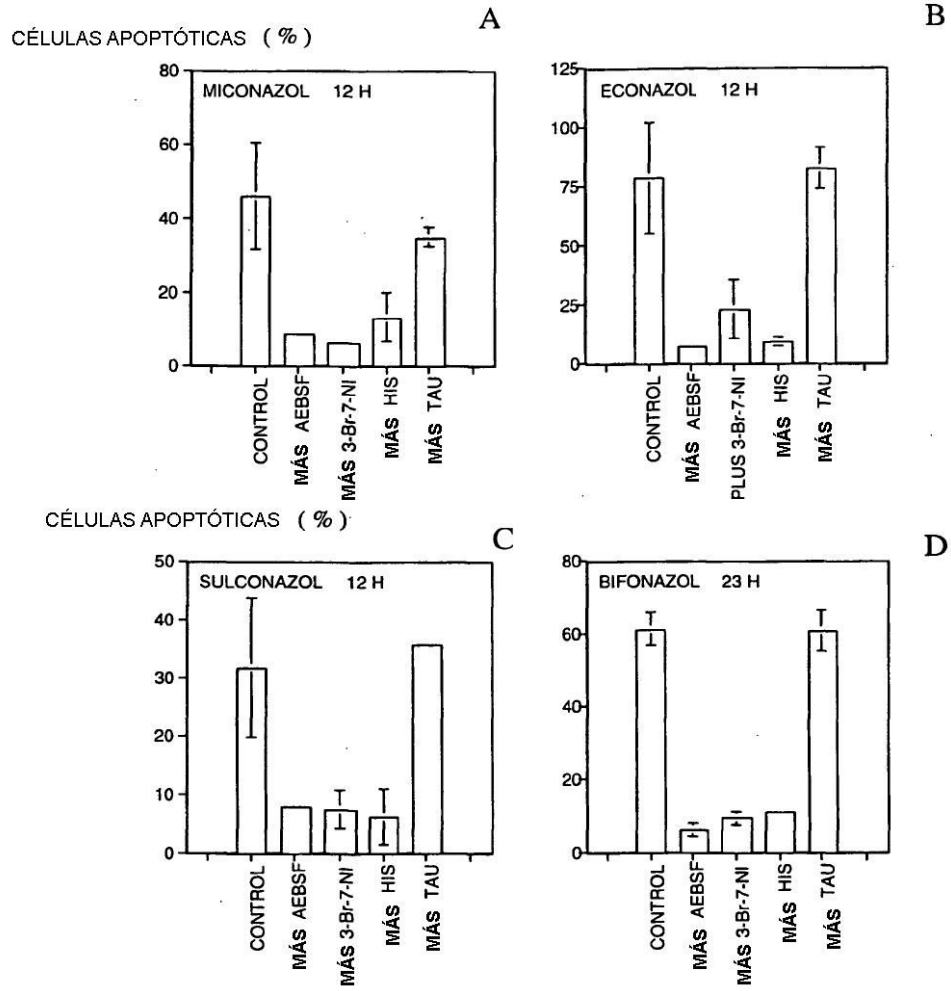


Figura 5 E-H

CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)

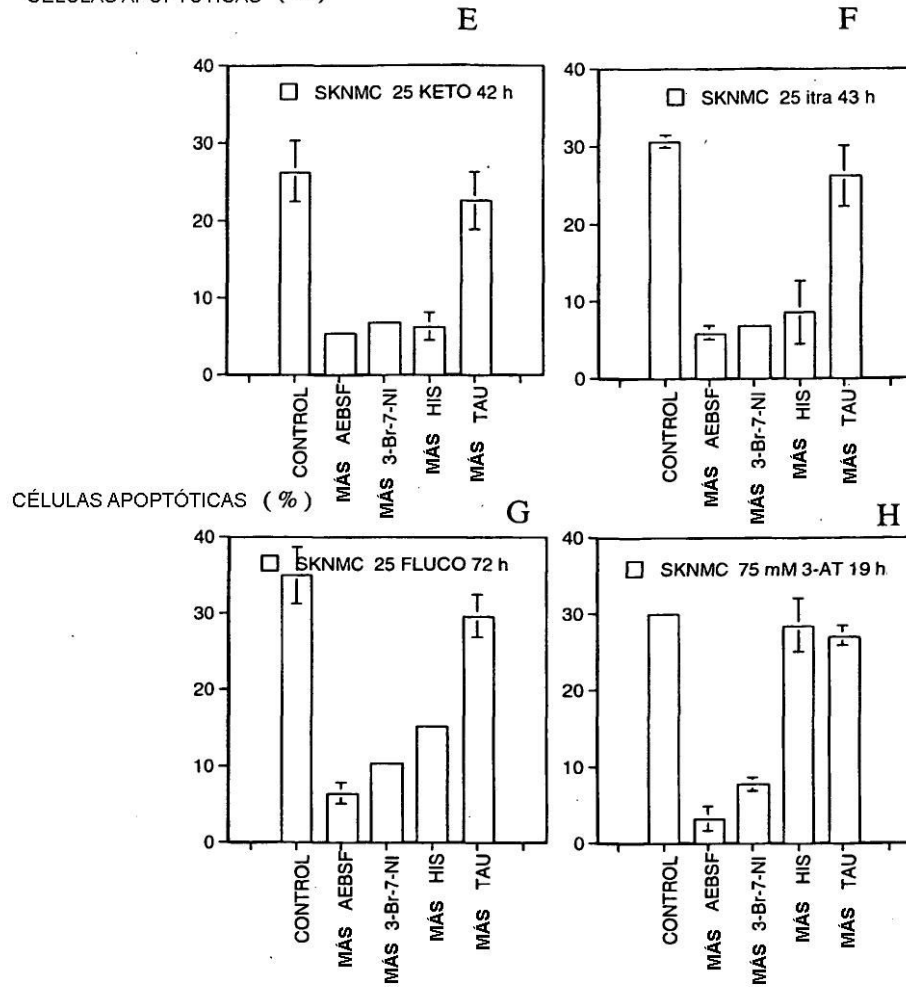


Figura 6

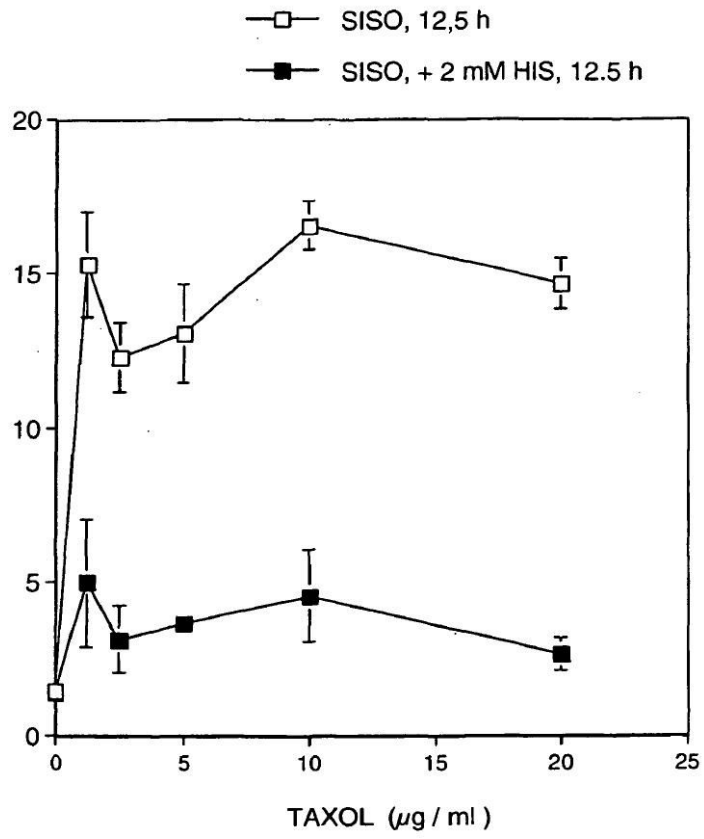


Figura 7

CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)

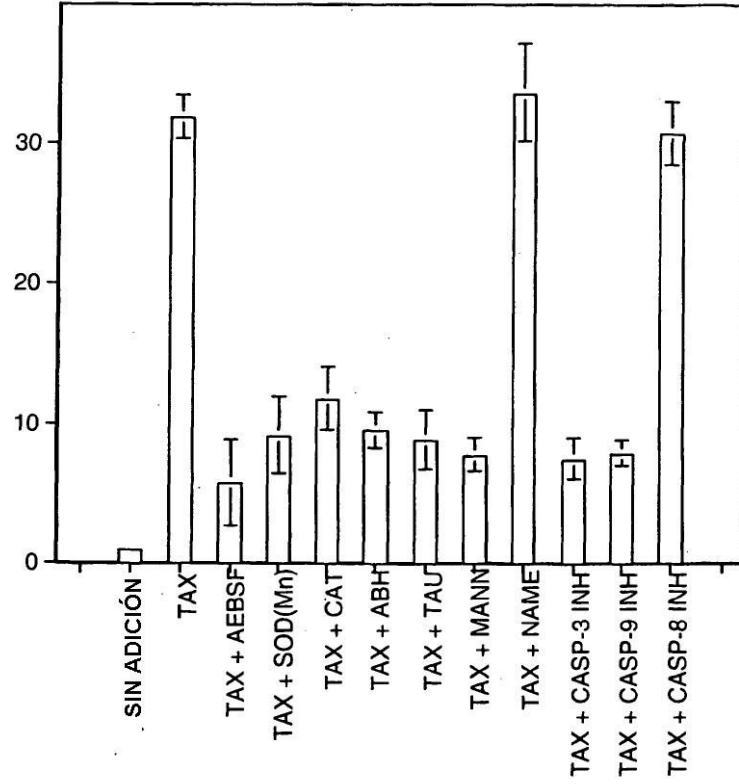


Figura 8

CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)

- SISO, TGF, 20 h
- ▲ SISO, TGF, 10 ARG, 20 h
- ◆ SISO, TGF, 200 NORNOHA, 20 h
- SISO, TGF, ARG + NORNOHA, 20 h

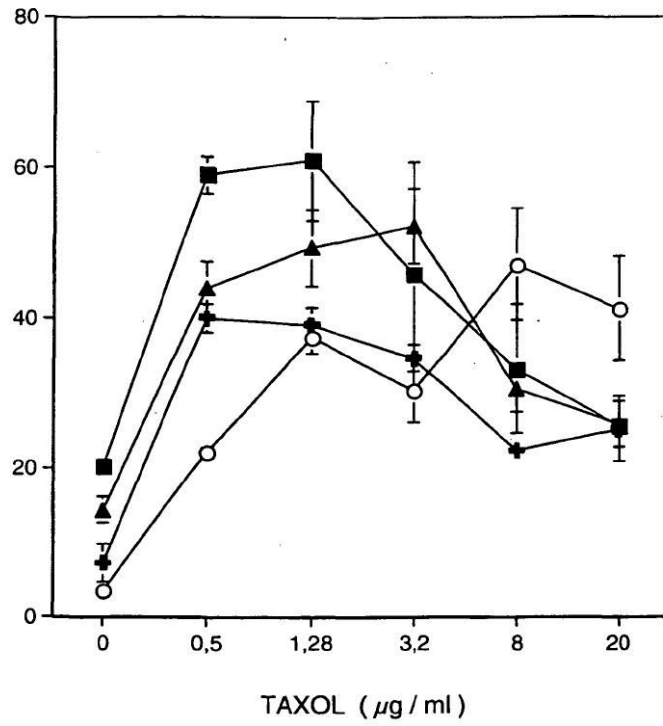


Figura 9

CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)

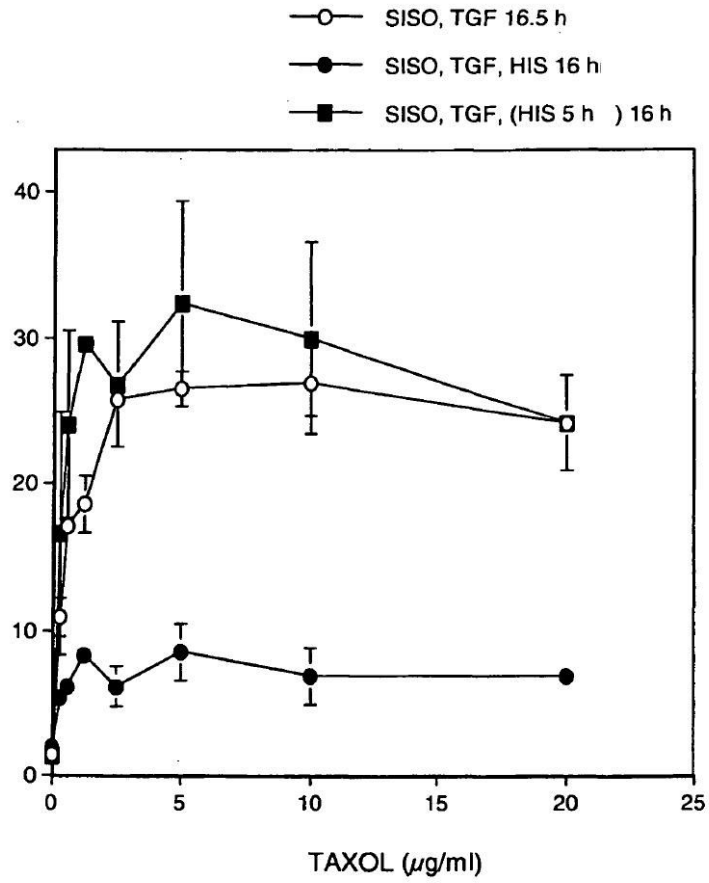


Figura 10

CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)

- SISO, TGF 16,5 h
- SISO, TGF, NAME 16 h
- SISO, TGF, (NAME 5 h) 16 h

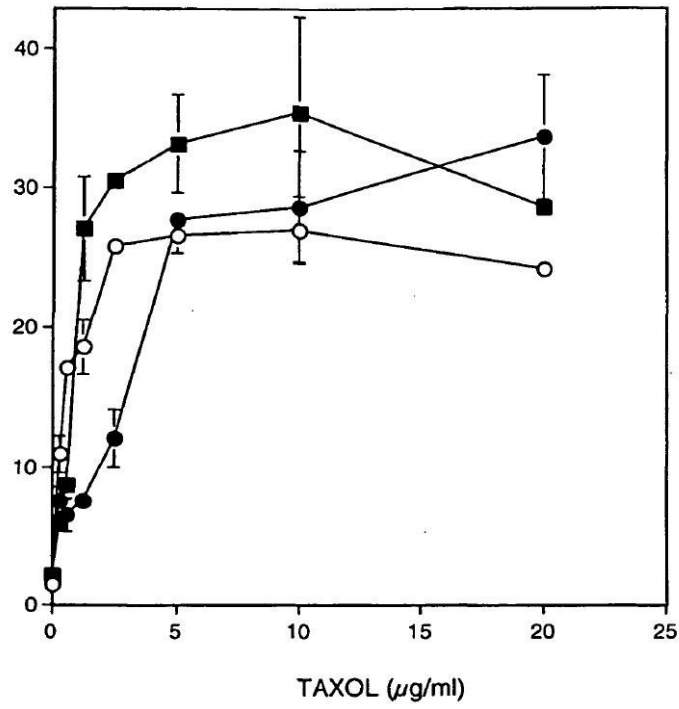


Figura 11

CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)

