

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 162**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2007 E 07757542 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 1996939**

54 Título: **Métodos para predecir la toxicidad cardíaca antes y después del tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa**

30 Prioridad:

27.02.2006 US 777096 P

02.08.2006 US 821230 P

28.09.2006 US 827372 P

05.10.2006 US 828345 P

29.11.2006 US 867736 P

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

10.07.2014

73 Titular/es:

**TARGETED MOLECULAR DIAGNOSTICS, LLC
(100.0%)
610 OAKMONT LANE
WESTMONT IL 60559, US**

72 Inventor/es:

BACUS, SARAH S.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 475 162 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

Métodos para predecir la toxicidad cardíaca antes y después del tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa

Antecedentes

5 El corazón tiene una enorme capacidad para la generación de ATP lo que le permite funcionar como una bomba eficiente durante toda la vida del organismo. El miocardio adulto utiliza ya sea ácido graso (FA) y/o la oxidación de la glucosa como sus principales fuentes de energía. En condiciones normales, el corazón adulto obtiene la mayor parte de su energía por oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias.

10 Las células del miocardio tienen capacidad para ir cambiando entre la glucólisis de hidratos de carbono y el ciclo de Krebs y a fuentes de combustible de grasa de manera que la producción de ATP se mantiene a un ritmo constante en diversas condiciones fisiológicas y alimentarias. Esta flexibilidad metabólica y de selección del combustible es importante para la función cardíaca normal. Aunque la capacidad de conversión de energía cardíaca y el flujo metabólico está modulado en muchos niveles, un importante mecanismo de regulación se produce a nivel de la expresión génica. La expresión de los genes que intervienen en múltiples vías de transducción de energía está regulada dinámicamente en respuesta a las señales de desarrollo, fisiológicas y fisiopatológicas.

15 Los genes que intervienen en estas vías metabólicas clave de energía están regulados en la transcripción por miembros de la superfamilia de receptores nucleares, específicamente los receptores activados por proliferador de peroxisoma activado por ácidos grasos (PPAR) y el coactivador del receptor nuclear, coactivador 1 α de PPAR γ (PGC-1 α), así como las proteínas ERR α , ERR β y ERR γ relacionadas con el receptor de estrógenos y sus activadores PGR-1 y PERC. La regulación dinámica del complejo PPAR/PGC-1 cardíaco de acuerdo con los estados fisiológicos y fisiopatológicos se describe con más detalle a continuación.

20 PGC-1 α es un coactivador de PPAR γ , relacionado con la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo pardo. Dos proteínas relacionadas estructuralmente, PGC-1 β y PARC, se han clonado y parece que intervienen en la regulación de las vías metabólicas de la energía. La naturaleza de la expresión de PGC-1 α específica del tejido e inducible sugiere su implicación en la regulación dinámica de la energía celular produciendo procesos metabólicos, como por ejemplo la biogénesis mitocondrial y la oxidación, la gluconeogénesis hepática y la absorción de la glucosa de los músculos esqueléticos. PGC-1 α se expresa selectivamente en los tejidos muy oxidativos tales como el corazón, los músculos esqueléticos, tejido adiposo marrón y el hígado. En el corazón la expresión de PGC-1 α aumenta bruscamente al nacer. Esto coincide con un cambio perinatal desde el metabolismo de la glucosa hasta la oxidación de las grasas. Los niveles de actividad y expresión de PGC-1 α también son conocidos por estar inducidos por la exposición al frío, el ayuno y el ejercicio; estímulos conocidos por activar el metabolismo oxidativo. La expresión forzada de PGC-1 en cardiomiocitos en cultivo induce la expresión de genes nucleares y mitocondriales que intervienen en múltiples vías de energía mitocondrial-transducción/energía-producción, aumenta el número mitocondrial celular y estimula la respiración acoplada. Las vías de señalización asociadas a estos estímulos, como por ejemplo la p38 MAP cinasa, β -adrenérgico/AMPC, óxido nítrico, AMP cinasa, y Ca²⁺-calmodulina cinasa, activan PGC-1 α y sus genes diana aguas abajo ya sea por aumento de la expresión de PGC-1 α o su función de transactivación.

25 Estos cambios metabólicos y estructurales puede dar lugar a miocardiopatía dilatada y disfunción diastólica en el corazón. Curiosamente, la proliferación mitocondrial es reversible y la miocardiopatía puede rescatarse tras la reducción en la expresión transgénica. Esto sugiere que, además de servir como activador del metabolismo celular de los ácidos grasos a través de las PPAR, PGC-1 α está relacionada con la biogénesis mitocondrial. Por lo tanto, PGC-1 α parece servir como un modulador principal de metabolismo de la energía oxidativa y responde a los cambios en el estado de la energía celular.

30 Están apareciendo pruebas de que la familia de receptores relacionados con estrógenos (ERR) de la función de receptores nucleares huérfanos como reguladores activados por PGC-1 del metabolismo energético del músculo cardíaco y esquelético. Hay tres miembros de la familia ERR: ERR α , ERR β y ERR γ . La expresión de ERR α y ERR γ es elevada en los tejidos adultos que se basan principalmente en el metabolismo oxidativo mitocondrial para la producción de ATP, como el corazón y el músculo esquelético de contracción lenta. La expresión de ERR α aumenta drásticamente en el corazón después del nacimiento, en paralelo con la regulación por incremento mundial de enzimas que intervienen en la absorción de ácidos grasos celulares y la oxidación mitocondrial. Recientemente, ERR α y ERR γ se identificaron como nuevos miembros para la familia PGC-1 de coactivadores. Esta relación funcional entre las isoformas ERR y PGC-1 α han estimulado interés en la función de ERR en el metabolismo energético.

35 La supresión del gen ERR α pone de manifiesto una función específico de tejido para ERR α en la regulación constitutiva del metabolismo de los lípidos. La masa adiposa blanca disminuye en ERR α —/— ratones coincidente con la disminución de tamaño de los adipocitos y las velocidades de síntesis de los lípidos. Por el contrario, ERR α desempeña probablemente una función en el catabolismo de los lípidos en el corazón, de acuerdo con su interacción funcional con PGC-1 α . Ratones ERR α —/—, que no presentan un fenotipo cardíaco abierto, presentan un aumento compensatorio en la expresión cardíaca de PGC-1 α y ERR γ . Estos resultados sugieren que las isoformas

de ERR contribuyen a la expresión constitutiva de los genes del metabolismo de los ácidos grasos en el corazón. Sin embargo, los efectos metabólicos de los cambios en la expresión génica sigue siendo desconocidos.

El registro de las características de la expresión génica en miocitos cardíacos que sobreexpresan ERR α se está utilizando para identificar genes diana ERR α cardíacos. ERR α activa los genes que intervienen en las vías de producción de energía, como por ejemplo la absorción celular de ácidos grasos (LPL, CD36/FAT, H-FABP, FACS-1), β -oxidación (MCAD, VLCAD, LCHAD) y transporte mitocondrial de electrones/fosforilación oxidativa (citocromo c, COXIV, COXVIII, NADH ubiquinona deshidrogenasa, flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa, ATP sintasa β). ERR α también aumenta las velocidades de oxidación de palmitato en los cardiomiocitos. La activación de los genes de las enzimas de β -oxidación por ERR α implica la vía de señalización de PPAR. ERR α activa directamente la expresión del gen PPAR α , y la regulación mediada por ERR α de MCAD y M-CPT I se suprime en células procedentes de ratones PPAR α —/—. ERR α también es ahora conocida por estar involucrada en la regulación por PGC-1 α de la biogénesis mitocondrial. Es conocida por mediar la activación de PGC-1 α de la vía de NRF a través de la regulación del gen *Gapba*, que codifica una subunidad del complejo NRF-2 y activa directamente los genes que intervienen en el metabolismo oxidativo mitocondrial en el nivel de la transcripción. ERR α con su coactivador PGC-1 α activa el MCAD, el citocromo c, y los activadores del gen de ATP sintasa β . En conjunto, estos resultados identifican ERR α como un regulador del metabolismo energético oxidativo cardíaco a través de su participación en el circuito regulador de PGC-1. Sin embargo, no se han identificado las funciones biológicas precisas de los ERR en el corazón.

El receptor nuclear ERR γ (receptor gamma relacionado con estrógenos) se expresa mucho en el corazón, músculos esqueléticos, riñones y cerebro, así como en el sistema nervioso en desarrollo. La expresión de los coactivadores PGC-1 α y PGC-1 β en células de mamífero aumentada potentemente la activación de la transcripción por ERR γ . La función de activación 2 constitutiva (AF-2) del receptor huérfano es importante para el aumento sinérgico. Análisis de truncamiento de receptores funcionales se ha utilizado para identificar una función adicional de activación amino-terminal, específico para la isoforma ERR γ 2 y PGC-1 α . Los experimentos *in vitro* mostraron una interacción directa de ERR γ con ambos coactivadores. Estos descubrimientos son coherentes con la hipótesis de que distintas funciones reguladoras para PGC-1 α y PGC-1 β como coactivadores específicas del tejido para ERR γ . No obstante, se necesitan más estudios para definir mejor estas funciones.

La sobreexpresión cardíaca específica de PGC-1 en ratones transgénicos produce proliferación mitocondrial incontrolada en los cardiomiocitos lo que conduce a la pérdida de la estructura sarcomérica y una miocardiopatía dilatada. Por lo tanto, PGC-1 es una molécula reguladora importante en el control del número y la función mitocondrial cardíaca en respuesta a las demandas de energía.

La mayoría, si no todas estas vías de regulación implican la fosforilación de intermedios en una vía de señalización. La inhibición de la fosforilación, tal como mediante la acción de diversos inhibidores de la cinasa, afecta a estas vías de señalización que causan alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos lo que puede causar toxicidad en los órganos, como por ejemplo cardiotoxicidad. Muchos de los nuevos fármacos contra el cáncer son inhibidores de la cinasa y van acompañados de toxicidad. Por lo tanto, se necesitan métodos para la identificación de si los fármacos pueden ir acompañados de efectos tóxicos y si los efectos tóxicos es probable que se produzcan en un paciente. También se necesitan métodos para evitar los efectos tóxicos de estos inhibidores, manteniendo su potencia frente a los objetivos de los receptores fosforilados.

40 Compendio

Se describen métodos para diagnosticar si la toxicidad, especialmente la cardiotoxicidad, es probable que se produzca en un paciente seleccionado para el tratamiento con una variedad de fármacos, tales como inhibidores de tirosina cinasa o inhibidores de erbB. Se describen también métodos para evaluar si un fármaco experimental es probable que tenga un efecto tóxico o cardiotoxico. En un método los lípidos, tales como los triglicéridos y el colesterol, se pueden analizar para determinar si hay un trastorno de la oxidación de ácidos grasos. En otro método pueden determinarse las enzimas responsables de la oxidación de ácidos grasos observada, tales como MCAD. Con respecto a las concentraciones de lípidos se cree que en las células normales la activación de la proteína cinasa activada por AMP puede conducir a una reducción característica en la concentración de lípidos y a un aumento correspondiente en los intermedios glucolíticos y de cadena de carbono más corta, por ejemplo de intermedios con C₂ a C₆ carbonos. Cualquier desviación estadísticamente significativa de la reducción de lípidos característicos en las células normales se puede considerar, por lo que respecta a esta descripción, un trastorno de la oxidación de los ácidos grasos. Del mismo modo, con respecto a las enzimas que participan en estas vías metabólicas, ningún cambio estadísticamente significativo, con respecto a las células normales, en la cantidad de actividad o concentraciones de estas enzimas, medidas mediante técnicas Western, Northern, PCR u otras, se puede considerar, por lo que respecta a esta descripción, un trastorno de la oxidación de ácidos grasos. El diagnóstico de un trastorno de la oxidación de ácidos grasos puede utilizarse para predecir un aumento del riesgo de toxicidad y, posiblemente, como un contraindicador para la utilización del fármaco. Alternativamente, en el caso de que un fármaco se utiliza en un paciente con un trastorno de la oxidación de ácidos grasos pueden utilizarse métodos para indicar la necesidad de seguir de cerca la función cardíaca en el paciente. Alternativamente puede medirse la absorción de la glucosa por métodos conocidos, tal como la tomografía por emisión de positrones. En situaciones en las que la absorción de glucosa no disminuye o no disminuye en la misma medida que en células normales no

cancerosas tras la administración de un fármaco inhibidor de tirosina cinasa, entonces es probable que el tratamiento con el fármaco sea tóxico para las células no cancerosas. Alternativamente, si las concentraciones de ATP disminuyen más que en las células no cancerosas normales tras la exposición a un inhibidor de la tirosina cinasa, entonces el inhibidor de tirosina cinasa se prevé que sea tóxico.

- 5 Otro método para predecir si la cardiotoxicidad en un paciente seleccionado para el tratamiento con un fármaco, tal como el inhibidor de la tirosina cinasa, especialmente un inhibidor de erbB, es evaluar las concentraciones de FNT α en el paciente, ya sea en el tumor o en la sangre o ambos. La concentración de FNT α se puede utilizar para predecir si un paciente es probable que tenga un episodio adverso relacionado con la cardiotoxicidad procedente de fármacos, particularmente tratamiento con Herceptin.
- 10 En la presente memoria se describen características y ventajas adicionales, y serán evidentes en, la siguiente Descripción detallada y en las figuras.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una lista de los genes regulados por el tratamiento con Herceptin en células Au565.

La figura 2 son fotografías de células Au-565 tratadas por NDF o Herceptin y teñidas por lípidos.

- 15 La figura 3 son fotografías de células Au-565 tratadas por GW-2974 y teñidas por lípidos.

La figura 4 son fotografías de cardiomiocitos humanos primarios cultivados en diversas condiciones y teñidos por lípidos.

La figura 5 es un gráfico de barras que ilustra el porcentaje de ensayos con cardiomiocitos humanos positivos para lípidos en diversas condiciones.

- 20 La figura 6 son fotografías de células MDA-MB-468 células tratadas por GW-2974 y Ca intracelular detectado por fluor-4.

La figura 7A es una fotografía de una transferencia Western que muestra la influencia de determinados inhibidores de tirosina cinasa sobre la expresión de p-eEF2 y p-AMPKa.

- 25 La figura 7B es una fotografía de células teñidas que muestran la expresión de p-eEF2 en células Au565 en presencia de diversos compuestos.

La figura 8 es una fotografía de ERR α y MCAD en células de cardiomiocitos con y sin tratamiento por diversos inhibidores de la cinasa.

La figura 9 es un gráfico de barras que ilustra la inhibición del crecimiento de HMC tratados con combinaciones de diferentes tipos de inhibidores de erbB y FNT α .

- 30 La figura 10 es una transferencia Western de HMC sondados para la NF-kB después del tratamiento con FNT, GW2974 o Herceptin (o combinaciones).

Descripción detallada

- 35 En un aspecto, la presente descripción se basa en el descubrimiento de que los fármacos, tales como los inhibidores de tirosina cinasa, como Herceptin y lapatinib (Tykerb), influyen en la expresión de genes asociados a vías metabólicas de lípidos y afectan drásticamente la cantidad de lípidos dentro de las células. El tratamiento de las células normales por lo demás o de células que con regulación normal de la proteína tirosina cinasa con los inhibidores de la cinasa de la invención afecta al metabolismo de los ácidos grasos al aumentar o disminuir la capacidad de dichas células para oxidar los ácidos grasos. Cuando los adipocitos normales en el cultivo están expuestos a inhibidores de cinasa tales como GW2974, GW572016, los lípidos almacenados dentro de esas células desaparece rápidamente. Esta observación también se ha hecho en las células cardíacas. Dichos estudios pueden llevarse a cabo usando la tinción con aceite rojo O para lípidos. Por lo tanto, el tratamiento con lapatinib (Tykerb) y otros inhibidores de tirosina cinasa Her1/Her2 originan una pérdida de grasa en dichas células que es coherente con las velocidades reducidas de síntesis de lípidos y/o aumento de las velocidades de oxidación de los lípidos. Con otros fármacos, tal como Herceptin, contenido de lípidos NDF parece aumentar.

- 45 Muchos inhibidores de la cinasa también son conocidos por ser útiles como agentes quimioterapéuticos. En algunos pacientes estos medicamentos producen cardiotoxicidad. En el artículo titulado "Trastuzumab cardiotoxicity: Speculations regarding pathophysiology and targets for further study" (Seminars in Oncology, Vol. 29, páginas 22-28), los autores Jay W. Schneider *et al.* describen que los efectos secundarios cardiovasculares tóxicos se producen en el contexto del tratamiento con trastuzumab. Varios factores como la mutación de la estirpe germinativa, la regulación por aumento de la expresión de HER2 cardíaca y los cambios en la estequiometría de los receptores de erbB disponibles se exponen para dilucidar los posibles mecanismos moleculares que subyacen a la toxicidad observada. La cardiotoxicidad, como resultado del deterioro de un mecanismo celular general, tal como la oxidación
- 50

de ácidos grasos no está indicada en este artículo. La presente descripción se basa en el sorprendente descubrimiento de que la cardiotoxicidad puede asociarse con defectos en el metabolismo de los ácidos grasos. Por lo tanto, los pacientes con determinadas disfunciones en el metabolismo de los ácidos grasos o que tienen concentraciones elevadas de FNT α en sangre, y que están en tratamiento con inhibidores de la cinasa son más propensos a padecer una insuficiencia cardíaca tal como la miocardiopatía tras el tratamiento con inhibidores de la cinasa, tales como inhibidores de tirosina cinasa ErbB. Además, se ha descubierto que los pacientes que tienen altas concentraciones de FNT α , o su factor de supervivencia NF- κ B aguas abajo, en el tejido tumoral o el suero generalmente tienen una mejor respuesta a Herceptin. Este descubrimiento ha conducido al desarrollo de nuevos métodos para predecir si los pacientes padecerán cardiotoxicidad tras el tratamiento con fármacos, como por ejemplo inhibidores de la cinasa, ya sea solos o en combinación con otros agentes activos, que afectan a estados de fosforilación de determinadas proteínas celulares.

Se describe un método para el análisis de lípidos de un paciente, como por ejemplo triglicéridos y colesterol y/o enzimas metabólicas de lípidos tales como, MCAD, entre otras. Los resultados de dichos análisis se pueden utilizar para predecir cuándo la cardiotoxicidad podría proceder de un tratamiento inhibidor de cinasa y proporcionar una indicación temprana de que la función cardíaca debe controlarse estrechamente en pacientes sometidos a tratamiento con fármacos, tales como inhibidores de la cinasa, como por ejemplo Herceptin, GW572016 u otro inhibidores de erbB.

La actividad de proteína cinasa activada por 5'-AMP, que se ha demostrado que fosforila e inactiva la acetil-CoA carboxilasa en otros tejidos, se ha descubierto que aumenta significativamente al final de la isquemia, y permanece elevada a lo largo de la reperfusión. La acumulación de 5'-AMP durante la isquemia produce una activación de la proteína cinasa activada por AMP, que fosforila e inactiva la acetil-CoA carboxilasa durante la reperfusión. La posterior reducción de las concentraciones de malonil-CoA reductasa puede dar como resultado velocidades de oxidación aceleradas de los ácidos grasos durante la reperfusión de corazones isquémicos.

Con respecto a la toxicidad cardíaca, se conocen varios trastornos de la oxidación de los ácidos grasos y se enumeran a continuación en la Tabla I. Si se detecta dicho trastorno en un paciente esto puede proporcionar una indicación de que los inhibidores de la cinasa podrían ser tóxicos para el corazón.

TABLA I

Carencia de acil-CoA deshidrogenasa
Acil-CoA deshidrogenasa, de cadena corta (SCAD)
Acil-CoA deshidrogenasa, de cadena media (MCAD)
Acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCAD)
Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD)
Carencia de hidratasa 2-enoil-CoA
Carencia de L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCHAD)
Proteína trifuncional: FA de cadena larga (LCHAD)
Subunidad alfa (HADHA)
Subunidad beta (HADHB)
Carencia de 3-cetoacil-CoA reductasa tiolasa
3-cetoacil-CoA tiolasa de cadena media (MCKAT)
Proteína trifuncional
Carencia de α -metilacil-CoA racemasa (AMACR)
Carencia de carnitina-acilcarnitina translocasa: 3p21
2,4-dienoil-CoA reductasa: 8q21
Carencia de flavoproteína de transferencia de electrones (ETF): 15q23
Eritrodermia ictiosiforme(NCIE2): gen CGI58; 3p21
Carencia de proteínas trifuncionales: Subunidades A y B

Tirosinemia

Trastornos 1° del metabolismo de la carnitina

Vías de transporte de ácidos grasos y carnitina

Vías de oxidación de ácidos grasos

Trastornos lipídicos

Mitocondrias: Anomalías bioquímicas

Trastornos peroxisomáticos

Dichos trastornos pueden detectarse por cualquier método adecuado. Por ejemplo, en determinados trastornos, los ácidos grasos pueden alimentarse a un individuo y seguir su metabolismo. Alternativamente, pueden determinarse las concentraciones de enzimas como en las transferencias Western o pueden analizarse las concentraciones de ARNm para determinados productos génicos, por ejemplo. Cualquier disminución detectable proporciona una indicación de que existe un trastorno de oxidación de los ácidos grasos y que el tratamiento con un inhibidor de tirosina cinasa puede ser tóxico para las células y órganos normales.

En un método, los pacientes que son candidatos para el tratamiento con inhibidores de la cinasa pueden examinarse de estas enfermedades para determinar si son propensos a padecer toxicidad de miocardiocitos. Por ejemplo, las macromoléculas biológicas se pueden determinar en los miocardiocitos en cultivo para determinar cómo las concentraciones de estas macromoléculas se ven afectadas por la administración del fármaco experimental. En un método los miocardiocitos humanos pueden crecer en cultivo y la concentración de proteína cinasa activada por AMP fosforilada se puede controlar en presencia del fármaco experimental. Esto puede determinarse por una transferencia Western que detecta la cinasa activada por AMP fosforilada.

Sin limitar la invención, se cree que en condiciones de estrés tales como hipoxia, isquemia, privación de glucosa y inanición, un aumento en la relación AMP:ATP intracelular activa alostéricamente la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), una respuesta diseñada para mantener el balance energético celular. La proteína cinasa activada por AMP se descubrió inicialmente que inhibe preparados de acetil-CoA carboxilasa (ACC) y 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa, HMGR). La activación de AMPK se piensa que inicia una serie de episodios de fosforilación aguas abajo que cambian las células de consumo de ATP activo (p. ej., biosíntesis de ácidos grasos, colesterol y proteínas) a la producción de ATP (p. ej., oxidación de ácidos grasos y glucosa). La activación de AMPK inducida por estrés se cree que ocurre después de su fosforilación en treonina 172 en la subunidad α por una o más AMPK cinasas (AMPKK) corriente arriba, como por ejemplo cinasa β de cinasa dependiente de calmodulina (CAMKK β), una proteína cinasa activada por calcio, y LKB1, una serina / treonina cinasa codificada por el gen supresor de tumores del síndrome de Peutz-Jeghers. Se cree que la activación de AMPK en el músculo esquelético y el corazón conduce a la fosforilación e inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), que a su vez se cree que reduce la concentración de malonil-CoA, un inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT 1). La desrepresión de la CPT-1 se cree que produce el aumento simultáneo de la β -oxidación de ácidos grasos, que se cree que conducen a un aumento de la producción mitocondrial de ATP. La activación inducida por el estrés de la AMPK también se cree que inhibe la síntesis de proteínas al inhibir a mTOR y modular directamente eEF2, un factor de elongación de la traducción que se sabe que está asociado a la protección cardíaca. Sobre todo, se piensa que la alteración de la función mitocondrial conduce a la muerte de cardiomiocitos por imatinib. Por otra parte, se cree que la inhibición de la traducción dependiente de la cubierta a través de la fosforilación de TSC2 en la que actúa como mediador AMPK es sumamente importante para la supervivencia celular en respuesta a la supresión de ATP. El aumento de la biosíntesis de, en lugar de consumo de ATP después de la activación de AMPK también puede proteger los cardiomiocitos de la lesión isquémica.

Se ha descubierto que las moléculas tales como GW2974, una pequeña molécula potente HER2/EGFR inhibidor de tirosina cinasa con un perfil de actividad similar a lapatinib, que puede activar la AMPK y sus sustratos aguas abajo estimular la oxidación de ácidos grasos, que a su vez aumenta la producción de ATP en cardiomiocitos humanos que expresan HER2, protegiendo contra la apoptosis inducida por FNT α , una citoquina conocida detectada en la insuficiencia cardíaca. A la inversa, moléculas tales como trastuzumab que no activan la AMPK producen un aumento de la muerte celular de los cardiomiocitos en respuesta a FNT α . Los efectos de tratamientos específicos dirigidos a HER2 en AMPK y consecuentemente la producción de energía pueden predecir el riesgo asociado a la cardiomiopatía y proporcionar una nueva estrategia terapéutica dirigida a HER2 para proteger el miocardio de los efectos mortales del FNT α u otros estímulos proapoptóticos, después de una lesión isquémica aguda.

Además, se pueden utilizar inhibidores de tirosina cinasa para reducir la grasa en las células, particularmente las células que si no son normales o que no tienen la enfermedad mediada por la actividad de la proteína tirosina cinasa. La Tabla II a continuación muestra la reducción en el contenido de lípidos obtenido por el tratamiento con GW2974. Se cultivaron células Au565 en condiciones normales conocidos en la técnica y se trataron durante 2 días con GW2974 (25 μ M). Las células se recogieron, se lavaron y se sometieron a ultrasonidos en agua (2.000.000

células en 200 µl de agua). Las células se centrifugaron y se analizaron las acilcarnitinas (subproductos de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos) por MS/MS para los metabolitos intracelulares.

Tabla II

Acilcarnitinas (pmoles de proteína)	C18:1	C16	C2
Referencia (sedimento celular)	8,56	4,09	148,54
GW2974 (sedimento celular)	4,1	0,83	258,88

Ejemplo 1

- 5 El siguiente ejemplo demuestra la identificación de genes que se ven afectados por el tratamiento de Herceptin en un cultivo celular *in vitro* de células Au565. Se cultivaron células Au565 en condiciones normales y se trataron con Herceptin o se dejaron sin tratar. Las células se sedimentaron, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se analizaron en un chip utilizando condiciones normales. Se preparó ADNc marcado con Cy3 y Cy5 a partir de ARN aislado de los sedimentos celulares. Los genes que intervienen en el metabolismo lipídico se muestran en la
- 10 Tabla III. Los genes que intervienen en otras vías que estaban reguladas por aumento o por disminución se muestran también en la figura 1.

TABLA III

Cambios en los genes metabólicos por análisis de chip de células Au565 que se trataron o no con Herceptina		
Gen	Descripción	Cambio relativo en células tratadas con Herceptin en comparación con células sin tratar
NKKX2-5	Homeosecuencia cardíaca específica, un factor de transcripción que interviene en el desarrollo del corazón y posiblemente en la apoptosis; las mutaciones en el gen correspondiente están asociadas con la cardiopatía congénita, comunicaciones del tabique y de la conducción y tetralogía de Fallot	4,71 x
ESRR6	Receptor gamma relacionado con el estrógeno, se une a elementos de respuesta a estrógenos y activa la transcripción de una manera independiente de ligando, puede tener funciones en la diferenciación y mantenimiento de tejidos	4,18 x
FABP1	Proteína 1 del hígado que se une a ácidos grasos, regulador positivo de receptor alfa activado por proliferadores de peroxisoma (PPARA), desempeña una función en el transporte de ácidos grasos, la proliferación celular y la apoptosis, el aumento de expresión está asociado al cáncer de próstata	-6,29 x
NRG1	Neuregulina 1, una proteína segregada, activa ERBB2 y otros miembros de la familia del receptor de EGF de receptores de tirosina cinasa, produce migración celular, proliferación celular y neurogénesis; la amplificación génica está asociada con algunos tumores de mama	-5,07 x
PERC	Coactivador alfa del receptor de estrógenos relacionado con PGC-1 (coactivador 1 beta de PPAR gamma), un coactivador de transcripción que se une y activa los receptores nucleares de hormonas, puede desempeñar una función en la gluconeogénesis o la oxidación de ácidos grasos	-5,20 x
ERBB4	Oncogén B4 de eritroblastosis aviar, un receptor de tirosina cinasa de la familia del receptor de EGF, activado por ligandos de neuregulina, desempeña una función en la migración, proliferación y diferenciación celular, interviene en la patogénesis de múltiples neoplasias malignas	4,48 x

ES 2 475 162 T3

Gen	Descripción	Log Relación
BBOX1	Butirobetaína (gamma) 2-oxoglutarato dioxigenasa (gamma-butirobetaína hidroxilasa) 1, cataliza la conversión de butirobetaína gamma en L-carnitina en la biosíntesis de carnitina	5,13E-01
GLS	Glutaminasa de tipo renal, cataliza la hidrólisis de la glutamina en glutamato y amoníaco, proporciona intermediarios cíclicos de TCA, ayuda a mantener el equilibrio ácido-base, produce neurotransmisores e inicia el catabolismo de glutamina	5,12E-01
IQGAP2	Motivo IQ que contiene proteína 2 activadora de GTPasa, inhibe la actividad GTPasa de CDC42 y RAC1, se puede unir la actina y desempeña una función en la regulación por GTPasa de la familia Rho de la forma celular	4,85E-01
TRPM4	Miembro 4 de la subfamilia M del canal de cationes potencial receptor transitorio, un canal permeable a cationes monovalentes activado por Ca^{2+} , sensible a la elevación de Ca^{2+} mediada por el receptor acoplado a la proteína G, inhibe la entrada de Ca^{2+} por despolarización del potencial de la membrana	4,43E-01
SAT	Espermidina/espermina N1-acetiltransferasa, cataliza la etapa limitativa de velocidad de catabolismo de las poliaminas, favorece la homeostasis de las poliaminas, participa en el estrés oxidativo y las respuestas al choque térmico, modula la tumorigenicidad y la sensibilidad a algunos fármacos contra el cáncer	4,04E-01
I_1152020	Proteína que contiene tres repeticiones de la triple hélice del colágeno, que se encuentran en algunas proteínas extracelulares, y un dominio C1q en el terminal C, tiene similitud moderada con Acrp30 de ratón, que controla el balance de energía, sensibilidad a la insulina y adipocitos	4,00E-01
CLSP	Proteína de la piel similar a la calmodulina, miembro de la familia de calmodulina de proteínas que se unen al calcio, puede desempeñar una función en la diferenciación de queratinocitos, presenta expresión alterada en la piel dañada por el sol	4,03E-01
ME1	Enzima málica 1, cataliza la descarboxilación oxidativa del malato para formar piruvato y puede desempeñar una función en la lipogénesis; variantes pueden estar asociadas al cáncer de mama	4,04E-01
ACAT2	Acetil-coenzima A acetiltransferasa 2 de <i>Homo sapiens</i> (acetoacetil Coenzima A tiolasa) (ACAT2), ARNm	4,33E-01
ACAT2	Acetil-coenzima A acetiltransferasa 2 (acetoacetil coenzima A tiolasa citosólica), una enzima hepática que funciona en el metabolismo de acil-CoA	-5,30E-01
ACAT2	Acetil-coenzima A acetiltransferasa 2 de <i>Homo sapiens</i> (acetoacetil coenzima A tiolasa) (ACAT2), ARNm	-4,33E-01
ACAT2	Acetil-coenzima A acetiltransferasa 2 (acetoacetil coenzima A tiolasa citosólica), una enzima hepática que funciona en el metabolismo de acil-CoA	-5,30E-01
ALDOA	Aldolasa A (fructosa-aldolasa bifosfato), cataliza la escisión o la condensación de fructosa-1,6-bisfosfato en fosfato de dihidroxiacetona y gliceraldehído-3-fosfato en la glucólisis, la insuficiencia se manifiesta como anemia hemolítica y miopatía metabólica	-4,54E-01

ES 2 475 162 T3

Gen	Descripción	Log Relación
NFkBIL2	Inhibidor NF-κB de tipo 2, miembro de la familia IκappaB, inhibe la unión al ADN de los heterodímeros NFκB1-RELA NF-κappaB y homodímeros NFκB 1, la transcripción mediada por NF-κB del potenciador Iκgappa y puede regular la función de NF-κappaB en células epiteliales	-4,90E-01
ENO1	Enolasa 1 (enolasa alfa), convierte 2-fosfo-D-glicerato en fosfoenolpiruvato en la glucólisis, un autoantígeno en varias enfermedades autoinmunitarias, la forma alternativa más corta proteína de unión al activador c-myc (MPB1) es un represor de transcripción	-5,01E-01
GSTT2	Glutación S-transferasa theta 2, glutación transferasa tipo theta y peroxidasa, que participan en el metabolismo de xenobióticos, puede estar implicado en la desintoxicación de hidroperóxidos de ácidos grasos y desempeñar una función en la prevención del cáncer al inactivar agentes carcinógenos	-5,33E-01
APOL1	Apolipoproteína L, un componente de gran tamaño, que contiene apoA-I (APOA1), lipoproteínas de alta densidad, puede estar involucrado en el transporte y el metabolismo de lípidos; elevada expresión en la corteza prefrontal está asociada con la esquizofrenia	-6,43E-01
AKR1C2	Miembro C2 de la familia 1 de aldo-ceto-reductasa (dihidrodiol deshidrogenasa), funciona en el transporte de bilis, metabolismo de los esteroides y el metabolismo de xenobióticos, puede desempeñar una función en la modificación de la conducta mediada por inhibidores selectivos de la reabsorción de serotonina	-7,44E-01
AKR1C2	Miembro C2 de la familia 1 de aldo-ceto-reductasa (dihidrodiol deshidrogenasa), funciona en el transporte de bilis, metabolismo de los esteroides y el metabolismo de xenobióticos, puede desempeñar una función en la modificación de la conducta mediada por inhibidores selectivos de la reabsorción de serotonina	-8,23E-01
CAMK4	Proteína cinasa IV dependiente de calcio/calmodulina, una proteína cinasa involucrada en la expresión génica regulada por Ca(2+), como por ejemplo la expresión génica dependiente de CREBBP	4,46E-01
FKSG 14	Proteína con alta similitud con la proteína de unión de la cremallera de leucina SoxLZ-Sox6 en los testículos (ratón Solt), que se une a SoxLZ/Sox6 y mejora la activación de la transcripción mediada por SoxLZ/Sox6 junto con la proteína cinasa IV dependiente de calcio/calmodulina (CAMK4 de ratón)	-4,57E-01
SOAT1	Acil-coenzima A: colesterol aciltransferasa, sintetiza ésteres de colesterol a partir del colesterol y ácido graso de cadena larga acil-coenzima A, actúa en el metabolismo de las lipoproteínas, la homeostasis del colesterol, y la diferenciación de monocitos; asociada con la aterosclerosis	-4,05E-01
I-962304. FL1	Canal de potasio dependiente del voltaje (subfamilia relacionada con Shal, miembro 1), previsto para generar corrientes de K ⁺ hacia afuera transitorias de tipo A que son importantes para el control de la excitabilidad de las neuronas y las células cardíacas [formulación de 647 aa]	-4,16E-01
SCN2A2	Canal de sodio dependiente del voltaje tipo II alfa 2, presenta la corriente dependiente del voltaje y selectiva para el sodio, puede desempeñar una función en la fase ascendente del potencial de acción en células excitables, sensible a la tetrodotoxina	4,54E-01

ES 2 475 162 T3

Gen	Descripción	Log Relación
SCN1A	Canal de sodio dependiente de voltaje de tipo I (subunidad alfa), un canal de sodio sensible al voltaje; las mutaciones están asociadas a la epilepsia mioclónica grave de la infancia y la epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus	4,14E-01
SCN11A	Polipéptido alfa del canal de sodio dependiente de voltaje de tipo XI, un supuesto canal de sodio sensible al voltaje que puede producir corrientes de sodio resistentes a tetrodotoxina en las neuronas sensoriales periféricas, puede desempeñar una función en la transmisión del dolor y el dolor neuropático en ...	4,02E-01
FASN	Ácido graso sintasa, enzima multifuncional que sintetiza ácidos grasos a partir de proteínas y carbohidratos de la dieta, el aumento de expresión se asocia con varios tipos de cáncer y la inhibición puede ser terapéutica para el cáncer de mama y de próstata	-4,29E-01
ELOVL2	Prolongación en el <i>Homo sapiens</i> de los ácidos grasos de cadena muy larga (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, levadura) de tipo 2 (ELOVL2), ARNm	-4,36E-01
HPCAL1	Hippocalcina de tipo 1, una supuesta proteína detectora del calcio, miembro de la familia similar a visinin neural (NVP) de proteínas que se unen al calcio, localizada en los axones y dendritas, puede desempeñar una función en la señalización neuronal en el sistema nervioso central	-4,53E-01
KCNG2	Subfamilia gamma 2 del canal de voltaje de potasio, un miembro de la familia Kv6 de canales iónicos, funciona como un canal de potasio dependiente del voltaje tras la interacción con la subunidad alfa Kv2.1, puede contribuir a la repolarización con potenciación de la acción cardíaca	-5,53E-01
CCL14	Miembro 14 de la subfamilia A de la pequeña citocina inducible, un factor quimiotáctico que aumenta la proliferación de células madre mieloides y puede afectar a la multiplicación del virus VIH 1, puede desempeñar una función en la patogenia del SIDA y enfermedades asociadas al receptor de quimiocinas CCR1	-4,49E-01
CLCA1	Canal 1 de cloruro activado por calcio, un canal de cloruro que desempeña una función en la producción de mucosa en las células mucoepidérmicas y puede funcionar como supresor tumoral; la desregulación puede contribuir al asma y a la evolución del cáncer colorrectal	-6,70E-01
FABP1	Proteína 1 del hígado de unión a ácidos grasos, regulador positivo del receptor alfa activado por el proliferador de peroxisoma (PPARA), desempeña una función en el transporte de ácidos grasos, la proliferación celular y la apoptosis, el aumento de la expresión está asociado al cáncer de próstata	-7,22E-01
BBOX1	Butirotetaina (gamma) 2-oxoglutarato dioxigenasa (butirotetaina gamma hidroxilasa) 1, cataliza la conversión de butirotetaina gamma en L-carnitina en la biosíntesis de carnitina	5,13E-01
GLS	Glutaminasa renal, cataliza la hidrólisis de la glutamina a glutamato y amoníaco, proporciona intermediarios del ciclo TCA, ayuda a mantener el equilibrio ácido-base, produce neurotransmisores e inicia el catabolismo de la glutamina	5,12E-01
IQGAP2	Proteína 2 activadora de GTPasa que contiene el motivo IQ, inhibe la actividad GTPasa de CDC42 y RAC1, puede unirse a la actina y desempeñar una función en la regulación de la forma celular de GTPasa de la familia Rho	4,85E-01

Gen	Descripción	Log Relación
TRPM4	Miembro 4 de la subfamilia M del canal de cationes de potencial del receptor transitorio, un canal activado por Ca^{2+} permeable a cationes monovalentes, sensible a la elevación de Ca^{2+} mediada por el receptor acoplado a la proteína G, inhibe la entrada de Ca^{2+} mediante la despolarización del potencial de la membrana	4,43E-01
SAT	Espermidina/espermina N1-acetiltransferasa, cataliza la etapa limitativa de velocidad de catabolismo de poliaminas, estimula la homeostasis de poliamina, participa en las respuestas al estrés oxidativo y al choque térmico, modula la tumorigenicidad y la sensibilidad a algunos fármacos contra el cáncer	4,04E-01
I_1152020	Proteína que contiene tres repeticiones de la triple hélice del colágeno, que se encuentran en algunas proteínas extracelulares, y un dominio C1q en el terminal C, tiene similitud moderada con Acrp30 de ratón, que controla el balance de energía, sensibilidad a la insulina, y los adipocitos	4,00E-01

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que los adipocitos pierden lípidos cuando se tratan con una pequeña molécula de inhibidor de tirosina cinasa, GW2974. La figura 2 demuestra que las células Au565 tratados tanto con un ligando estimulante de ErbB, NDF, como con el anticuerpo monoclonal Herceptin, dan como resultado la producción de lípidos. Esto se demuestra por la tinción de lípidos con aceite rojo (lípidos están representados por puntos rojos) contra la tinción por contraste del fondo de las celdas (hematoxilina). La figura 3 demuestra que los lípidos están presentes en las células Au565 no tratadas, pero se reducen en las células tratadas con inhibidor doble EGFR y ErbB2, GW2974. La figura 4 presenta cardiomiocitos tratados con GW2974, Herceptin o NDF. Los lípidos aumentan en las células tratadas con Herceptin y FDN (en comparación con las células no tratadas), pero no disminuyen en las células tratadas con GW2974. La figura 5 presenta una medida cuantitativa de los lípidos en las células tratadas con la referencia, Herceptin y GW2974.

El tratamiento de células con GW2974 provoca una redistribución de calcio intracelular (Figura 6). Esto se puede apreciar en las de cáncer de mama MDA-MB-468 células donde el calcio se detecta por fluorescencia con flúor-4. Esta redistribución de calcio produce la activación y la fosforilación de AMPK. La AMPK activada reprime la traducción por la fosforilación del factor de traducción eEF-2 (Figura 7), que inactiva eEF-2 y reprime la síntesis de proteínas, un efecto conocido de las TKI. La figura 7A presenta una transferencia Western de células Au565 tratadas con un ligando estimulante (EGF) o GW2974 y sondadas para p-eEF-2. p-eEF-2 aumentó drásticamente después del tratamiento con GW2974. La figura 7B presenta la expresión de p-eEF-2 por IHC. C225 y Herceptin no aumentan p-eEF-2, sin embargo las TKI como Iressa, GW2974 y rapamicina sí.

ERR α desempeña una función en el metabolismo de los lípidos en las células cardíacas, y MCAD es una enzima que descompone lípidos y ácidos grasos. Las mutaciones en MCAD es un trastorno genético frecuente, especialmente en los del linaje del norte de Europa. La figura 8 demuestra que en las células tratadas con Herceptin, la concentración de ERR α disminuyó ligeramente. MCAD se expresa en las células tratadas con Herceptin pero está completamente ausente en las células tratadas con GW2974.

Ejemplo 3

El siguiente ejemplo demuestra el cambio en el perfil de expresión de ARNm de las células tratadas con GW2974.

Se cultivaron células Au565 en condiciones normales y se trataron o no con GW2974 (25 μ M). Se sedimentaron las células, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se sometieron a análisis por chip. Se aisló ARN utilizando el kit de aislamiento de ARN total de Agilent. Se preparó ARNc marcado con Cy3 y Cy5 usando el kit Low ARN Input Fluorescent Linear de Agilent. Los ARNc marcados se hibridaron con un chip 1A(V2) humano G4110A que consiste en oligonucleótidos de 60 eslabones que representan genes humanos, completos, de más de 18K bien caracterizados. Tabla IV presenta los resultados en forma de tabla.

TABLA IV

TABLA IV A – Canal iónico

Denominación del gen	Descripción	Cambio de GW2974 en comparación con la referencia
FLJ12476	Proteína que contiene un dominio de unión a IQ calmodulina	5,0 x
CAMK4	Proteína cinasa IV dependiente de calcio/calmodulina, una proteína cinasa que interviene en la expresión génica regulada por Ca (2+), incluyendo la expresión de genes dependiente de CREBBP	4,5 x
AVIL	Proteína con alta similitud con villin 1 (VIL1 humana), que es una proteína de unión a la actina regulada por calcio que limita, corta y envuelve filamentos de actina, miembro de la familia gelsolina y contiene un dominio protector de villin	4,2 x
SCN1A	Canal de sodio de tipo I dependiente de voltaje (subunidad alfa), un canal de sodio sensible al voltaje; las mutaciones están asociadas a la epilepsia mioclónica grave de la infancia y a la epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus	4,1 x
CLSP	Proteína de la piel similar a la calmodulina, miembro de la familia de calmodulina de proteínas que se unen al calcio, puede desempeñar una función en la diferenciación de queratinocitos, presenta expresión alterada en la piel dañada por el sol	-4,0 x
GNB5	Proteína beta 5 de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), un componente de los complejos heterotriméricos de la proteína G que transducen señales de los receptores acoplados a la proteína G a proteínas efectoras aguas abajo, puede regular la actividad de los canales de calcio	- 4,1 x
KCNK6	Miembro 6 de la subfamilia K del canal de potasio (TWIK-2), un miembro de la familia del canal de K ⁺ con dominio de poros en tándem que rectifica hacia afuera sensible al pH y ligero hacia dentro, puede desempeñar una función en el establecimiento del potencial de membrana celular en reposo y en la excitabilidad celular cardíaca	- 4,1 x
CASK	Serina proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina, miembro de la familia MAGUK, involucrado en la recuperación de complejos multiproteicos en la membrana plasmática, puede enlazar la matriz extracelular al citoesqueleto de actina, puede regular la exocitosis de vesículas sinápticas	- 4,2 x
I-962304.FL1	Canal de potasio dependiente del voltaje (subfamilia relacionada con Shal, miembro 1), previsto para generar corrientes de K ⁺ hacia afuera transitorias de tipo A que son importantes para el control de la excitabilidad de las neuronas y las células cardíacas [formulación de 647 aa]	- 4,2 x
CD38	Antígeno CD38, tiene actividades tanto como de hidrólisis de ADP-ribosa cíclica, regula la movilización de calcio intracelular, puede desempeñar una función en la proliferación de linfocitos T inducidos por el superantígeno, los autoanticuerpos pueden contribuir a la diabetes no dependiente de insulina	- 4,4 x
HPCAL1	Hipocalcin de tipo 1, una supuesta proteína detectora de calcio, miembro de la familia similar a visinin neural (NVP) de proteínas que se unen al calcio, localizada en axones y dendritas, puede desempeñar una función en la señalización neuronal en el sistema nervioso central	- 4,5 x

ES 2 475 162 T3

Denominación del gen	Descripción	Cambio de GW2974 en comparación con la referencia
FKSG 14	Proteína con alta similitud con la proteína de unión de la cremallera de leucina SoxLZ-Sox6 en los testículos (ratón Solt), que se une a SoxLZ/Sox6 y mejora la activación de la transcripción mediada por SoxLZ/Sox6 junto con la proteína cinasa IV dependiente de calcio/ calmodulina (CAMK4 de ratón)	- 4,6 x
CCR2	Receptor 2 de quimiocinas CC, un receptor acoplado a la proteína G que se une a quimiocinas de la subfamilia CC y media en la quimiotaxia y la circulación de calcio intracelular; variantes de CCR2 pueden conferir una mayor supervivencia tras la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana	- 5,0 x
FREQ	Homólogo de Frecuenin (Drosophila), una proteína de unión al calcio y un supuesto inhibidor de cinasa, se une y modula la actividad de canales de K ⁺ KV4 en función del Ca ²⁺ , puede tener una función reguladora en la secreción	- 5,3 x
STK33	Serina-treonina proteína cinasa 33, una supuesta serina-treonina cinasa que puede ser un miembro de la de calcio / de la familia de la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina	- 5,3 x
S100A9	Proteína A9 de unión al calcio S100 (calgranulina B), parte de un complejo (antígeno 27e10) con S100A8 que activa la unión del ligando integrina beta2 (ITGB2), actuando como mediador de ese modo en la adhesión de neutrófilos durante la inflamación, se une y transporta ácidos grasos	5,5 x
KCNG2	Subfamilia gamma 2 del canal de voltaje de potasio, un miembro de la familia Kv6 de canales iónicos, funciona como un canal de potasio dependiente del voltaje tras la interacción con la subunidad Kv2.1 alfa, puede contribuir a la repolarización con potenciación de la acción cardíaca	- 5,5 x
CLCA1	Canal 1 de cloruro activado por calcio, un canal de cloruro que desempeña una función en la producción de mucosa en las células mucoepidérmicas y puede funcionar como un supresor tumoral; la desregulación puede contribuir al asma y a la evolución del cáncer colorrectal	- 6,7 x
AKAP5	Una proteína 5 de anclaje en cinasa, ancla la proteína cinasa dependiente de AMPc a densidades postsinápticas al unir las subunidades reguladoras de tipo 2, PRKAR2A y PRKAR2B, y por esto puede regular episodios postsinápticos; también une la calmodulina y la proteína cinasa C	- 7,3 x

Tabla IV C - Metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos

Denominación del gen	Descripción	Cambio de GW2974 en comparación con la referencia
PRKG1	Proteína cinasa de tipo 1 dependiente de GMPc, relaja el músculo liso vascular e inhibe la agregación de plaquetas, puede estar implicada en la contracción cardíaca, puede estar asociada a la hipertensión y la aterosclerosis; Prkg1 de ratón está asociada a la disfunción eréctil	6,5 x
BBOX1	Butirobetaína (gamma) 2-oxoglutarato dioxigenasa (butirobetaína gamma hidroxilasa) 1, cataliza la conversión de butirobetaína gamma en L-carnitina en la biosíntesis de carnitina	5,1

ES 2 475 162 T3

Denominación del gen	Descripción	Cambio de GW2974 en comparación con la referencia
GLS	Glutaminasa renal, cataliza la hidrólisis de la glutamina a glutamato y amoníaco, proporciona intermediarios del ciclo TCA, ayuda a mantener el equilibrio ácido-base, produce neurotransmisores e inicia el catabolismo de la glutamina	5,1
NRXN3	Neurexina 3, miembro de la familia de neurexinas de proteínas de la superficie de las células sinápticas y una supuesta proteína integral de la membrana que puede tener una función en la orientación de axones, la isoforma cardíaca puede formar un complejo con distroglucano y actuar como mediadora en las conexiones intercelulares	4,6 x
CYP2C8	Polipéptido 8 de la subfamilia IIC del citocromo P450 (mefenitoína 4-hidroxilasa), un miembro de la superfamilia de la monooxigenasa de unión al grupo hemo que metaboliza esteroides, ácidos grasos, y xenobióticos; la expresión hepática está aumentada por tratamiento con rifampicina	4,5 x
SAT	Espermidina/espermina N1-acetiltransferasa, cataliza la etapa limitativa de velocidad de catabolismo de poliaminas, estimula la homeostasis de poliamina, participa en las respuestas al estrés oxidativo y al choque térmico, modula la tumorigenicidad y la sensibilidad a algunos fármacos contra el cáncer	4,4
SOAT1	Acil-coenzima A: colesterol aciltransferasa, sintetiza ésteres de colesterol a partir del colesterol y ácido graso de cadena larga acil-coenzima A, actúa en el metabolismo de las lipoproteínas, la homeostasis del colesterol, y la diferenciación de monocitos; asociada a la aterosclerosis	-4,0 x
KCNK6	Miembro 6 de la subfamilia del canal de potasio K (TWIK-2), un miembro de la familia del canal de K ⁺ con dominio de poros en tándem que rectifica hacia afuera sensible al pH y ligero hacia dentro, puede desempeñar una función en el establecimiento del potencial de membrana celular en reposo y en la excitabilidad celular cardíaca	-4,1 x
I_962304.FL1	Canal de potasio dependiente del voltaje (subfamilia relacionada con Shal, miembro 1), previsto para generar corrientes de K ⁺ hacia afuera transitorias de tipo A que son importantes para el control de la excitabilidad de las neuronas y las células cardíacas [formulación de 647 aa]	- 4,2 x
HSPA8	Proteína 8 del choque térmico de 70 kDa, un miembro constitutivamente expresado de la familia HSP70 del choque térmico de las chaperonas moleculares; la expresión es elevada en los corazones de los pacientes con miocardiopatía hipertrófica	- 4,2 x
FASN	La ácido graso sintasa, enzima multifuncional que sintetiza ácidos grasos a partir de proteínas y carbohidratos de la dieta, el aumento de expresión se asocia con varios tipos de cáncer y la inhibición puede ser terapéutica para el cáncer de mama y de próstata	- 4,3 x
ELOVL2	Prolongación en el <i>Homo sapiens</i> de los ácidos grasos de cadena muy larga (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, levadura) de tipo 2 (ELOVL2), ARNm	-4,4 x
PFKL	Fosfofructocinasa hepática, cataliza la fosforilación de la fructosa-6-fosfato en fructosa-1,6-bifosfato en glucólisis, la deficiencia está ligada a la glucogenosis de tipo VII mientras que la sobreexpresión puede conducir a las discapacidades cognitivas del síndrome de Down	-4,7

ES 2 475 162 T3

Denominación del gen	Descripción	Cambio de GW2974 en comparación con la referencia
LDLR	Receptor de lipoproteína de baja densidad, media la absorción de lipoproteínas de baja densidad, participa en el metabolismo de los lípidos; las variaciones de genes están asociadas a la hipercolesterolemia familiar, la hipertensión, la aterosclerosis y la arteriopatía coronaria	-5,2 x
GSTT2	Glutación S-transferasa theta 2, glutación transferasa clase theta y peroxidasa, participa en el metabolismo de xenobióticos, puede estar implicada en la desintoxicación de hidroperóxidos de ácidos grasos y desempeñar una función en la prevención del cáncer al inactivar agentes carcinógenos	-5,3
ACAT2	Acetil-coenzima A acetiltransferasa 2 (acetoacetil coenzima A tiolasa citosólica), una enzima del hígado que funciona en el metabolismo de acil-CoA	-5,3
S100A9	Proteína A9 de unión al calcio S100 (calgranulina B), parte de un complejo (antígeno 27e10) con S100A8 que activa la unión del ligando integrina beta2 (ITGB2), actuando como mediador de ese modo en la adhesión de neutrófilos durante la inflamación, se une y transporta ácidos grasos	-5,4
KCNG2	Subfamilia gamma 2 del canal de voltaje de potasio, un miembro de la familia Kv6 de canales iónicos, funciona como un canal de potasio dependiente del voltaje tras la interacción con la subunidad Kv2.1 alfa, puede contribuir a la repolarización con potenciación de la acción cardíaca	-5,5 x
FABP1	Proteína 1 del hígado de unión a ácidos grasos, regulador positivo del receptor alfa activado por el proliferador de peroxisoma (PPARA), desempeña una función en el transporte de ácidos grasos, la proliferación celular y la apoptosis, el aumento de la expresión está asociado al cáncer de próstata	-7,2

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para predecir la toxicidad cardíaca en un paciente seleccionado para el tratamiento con un inhibidor de la tirosina cinasa, comprendiendo dicho método:
- 5 – tratar una población de células diana seleccionada de entre adipocitos, células cardíacas o miocardiocitos normales con el inhibidor de tirosina cinasa, y
- determinar si existe un trastorno de la oxidación de ácidos grasos en la población de células diana tratadas, por lo que la presencia de un trastorno de la oxidación de ácidos grasos en la población de células diana tratadas predice que el tratamiento de la población de células diana con el inhibidor de tirosina cinasa es probable que sea tóxico.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de la tirosina cinasa es un inhibidor de erbB.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de la tirosina cinasa es Herceptin.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el trastorno de la oxidación de ácidos grasos se determina midiendo una reducción en el contenido de lípidos de las células tras el tratamiento con un inhibidor de tirosina cinasa en comparación con la reducción en el contenido de lípidos en las células que carecen de un trastorno de la oxidación de ácidos grasos en el tratamiento con un inhibidor de tirosina cinasa.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, en donde el trastorno de la oxidación de ácidos grasos se determina midiendo una cantidad reducida de actividad de al menos una enzima en un ácido graso vía metabólica de oxidación en las células en comparación con células que carecen de un trastorno de la oxidación de ácidos grasos.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, en donde el trastorno de la oxidación de ácidos grasos se determina midiendo una cantidad reducida de ARNm que codifica al menos una enzima en una vía metabólica de oxidación de ácidos grasos en las células en comparación con células que carecen de un trastorno de oxidación de ácidos grasos.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el trastorno de la oxidación de ácidos grasos se determina midiendo una cantidad de al menos una enzima en una vía metabólica de oxidación de ácidos grasos en las células tras el tratamiento de células normales con un inhibidor de tirosina cinasa.
- 25 8. El método de la reivindicación 1, en donde el trastorno de la oxidación de ácidos grasos se determina midiendo una reducción en la cantidad de ATP tras el tratamiento de células normales con un inhibidor de tirosina cinasa.
9. El método de la reivindicación 1, en donde la población de células diana son miocardiocitos cultivados y macromoléculas biológicas que se seleccionan de entre cinasa activada por AMP fosforilado, una citocina, FNT α , o pNFkB, se determinan en dichos miocardiocitos.
- 30 10. El método de la reivindicación 9, en donde el método de determinación de macromoléculas biológicas en el paciente comprende el análisis de un extracto obtenido a partir del tejido del paciente en un analizador de chips.

Figura 1. Genes regulados por tratamiento con Herceptin en células Au565

Reparación del ADN (regulada por disminución)

- Proteína que interactúa con RAD51 (PIR51)
- Proteína diana con dedo de cinc p53 (WIG1)
- Exonucleasa I (EXO1)
- BRCA2
- RAD51
- RAD54

Ciclo celular y síntesis de ADN (regulada por disminución)

- Ciclina A2
- Ciclina D1
- Ciclina E2
- CHK1
- Timidina cinasa 1 (TK1)
- Respuesta al crecimiento precoz 1 (EGR1)
- CTP sintetasa (CTPS)
- Timidilato sintasa (TS)

Canales iónicos (regulados por incremento)

- Proteína que contiene un dominio de unión a IQ calmodulina
- Canal de sodio dependiente del voltaje tipo I (subunidad alfa) (SCN1A)

Canales iónicos (regulados por disminución)

- Serina proteina cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CASK)
- Serina-treonina proteina cinasa 33 (STK33)
- Canal 1 de cloruro activado por calcio
- Una proteína 5 de anclaje en cinasa (AKAP5)

Traducción (regulada por incremento)

- Similar a levadura BMs1p (biogénesis de 40S)

Traducción (regulada por disminución)

- Factor 5A de iniciación eucariótico (EIF5A)

Metabolismo/Regulación de ácidos grasos (por incremento)

- NKX2-5
- ACOX2
- AFP
- S100A9

Metabolismo/Regulación de ácidos grasos (por disminución)

- EMD
- TEAD1
- KCNH2
- SOAT1
- PERC
- FABP1
- CRBP1V

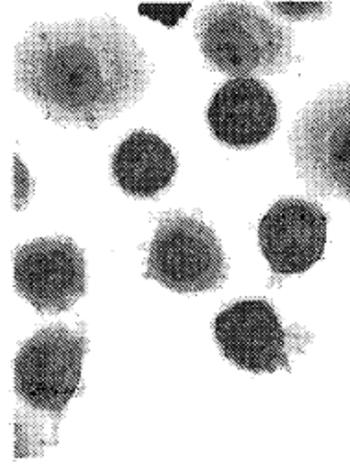
Apoptosis (regulada por incremento)

- TNFR1
- TRAIL
- Factor Forkhead O3A (FOXO3A)

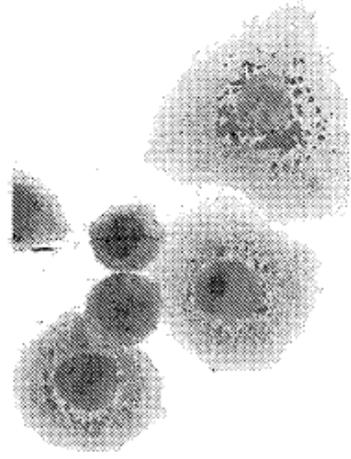
Apoptosis (regulada por disminución)

- FLIP
- Inhibidor NF- κ B tipo 2 (NFKBIL2)
- Factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF)
- Gen 6 inducible por mitógenos (MIG-6)

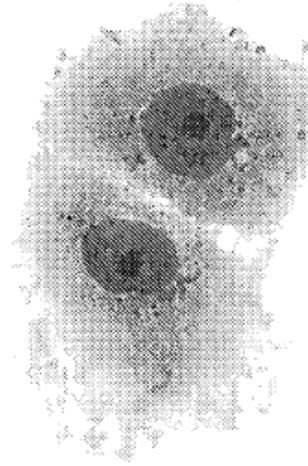
Figura 2. Células Au-565 tratadas por NDF o Herceptin y teñidas por lípidos



Sin tratar

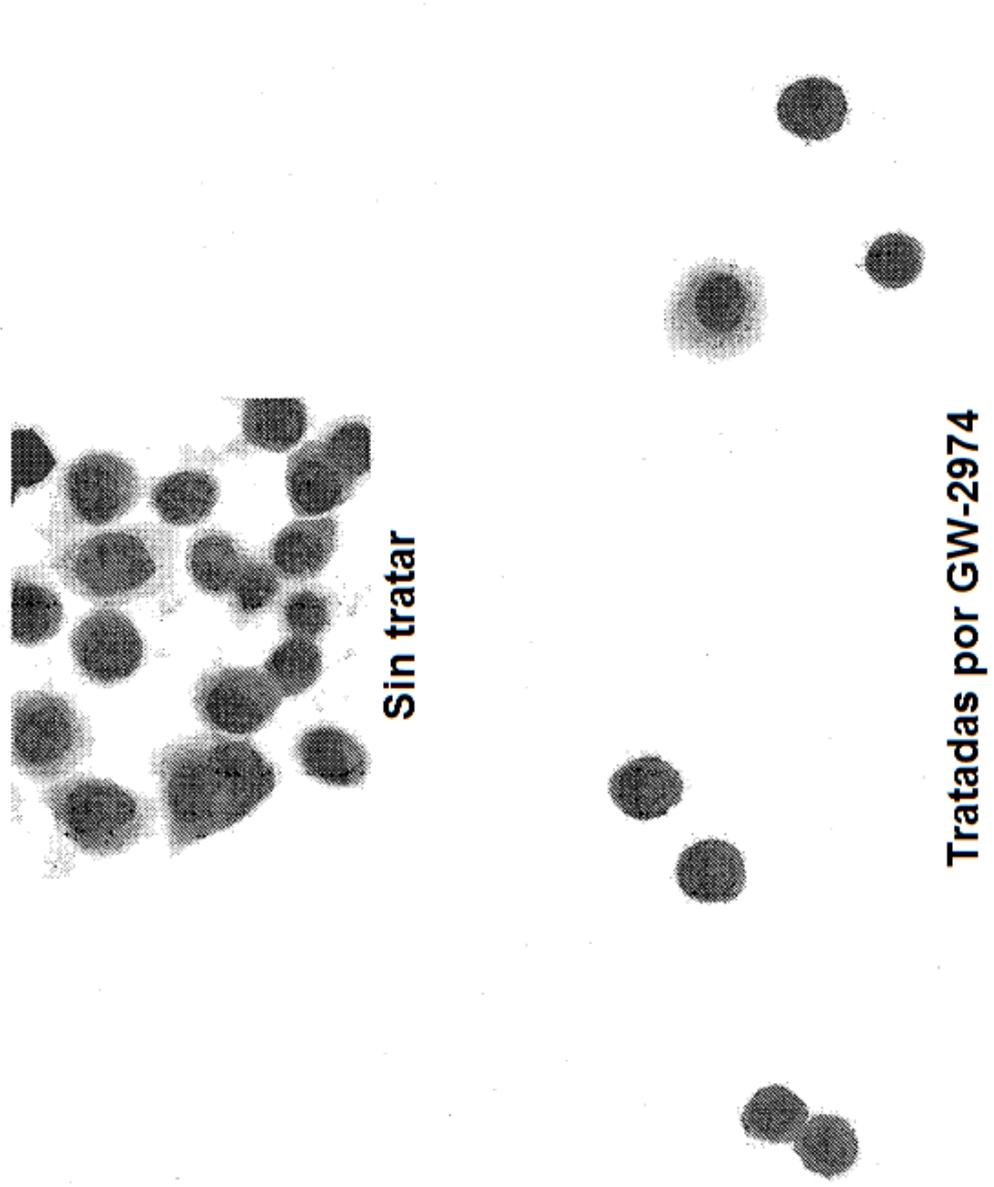


Tratadas por Herceptin



Tratadas por NDF

Figura 3. Células Au-565 tratadas por GW-2974 y teñidas por lípidos



**Figura 4. Miocitos cardíacos humanos primarios y
teñidos por lípidos**

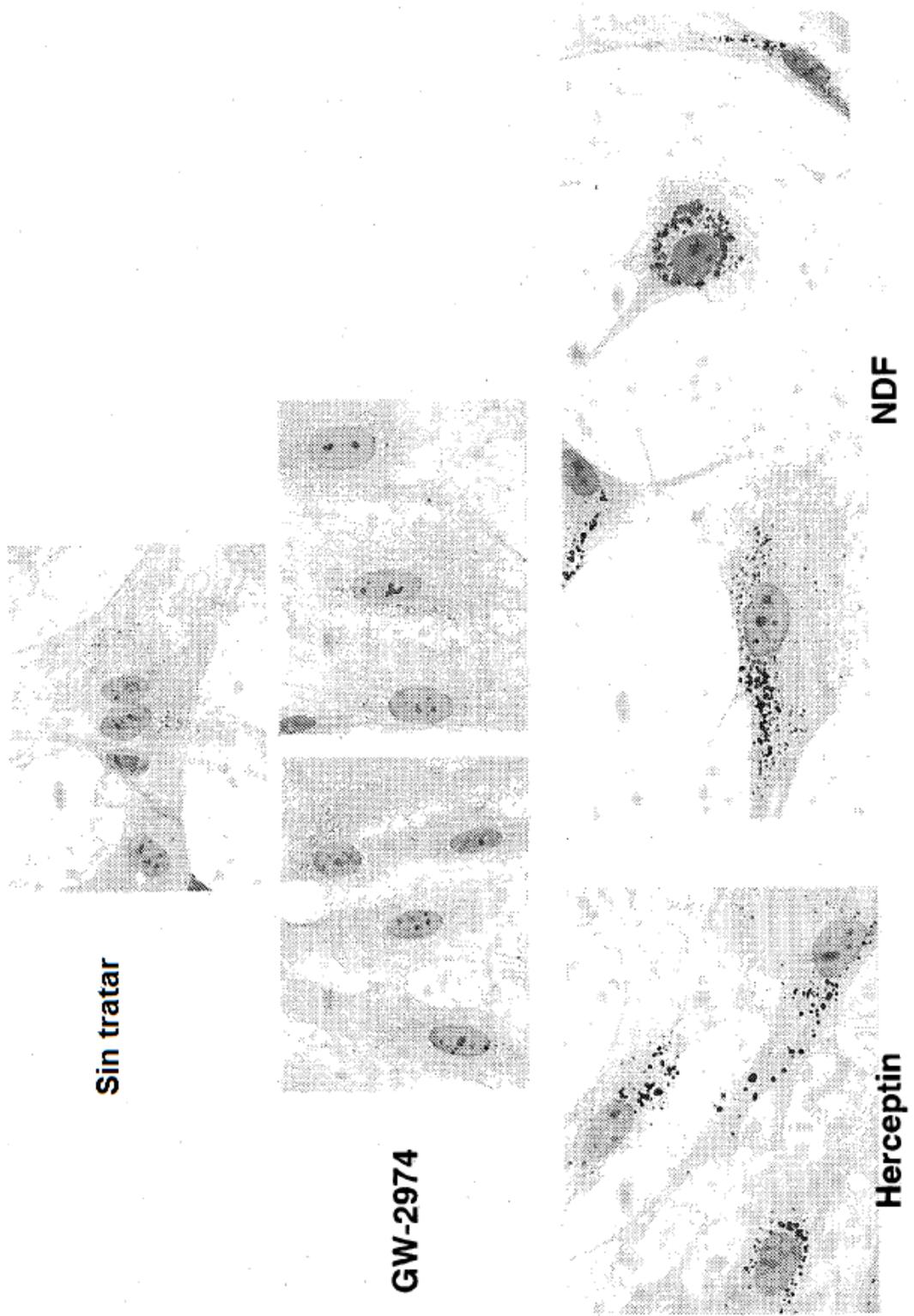


Figura 5. Cardiomiocitos humanos:
% de células positivas para lípidos

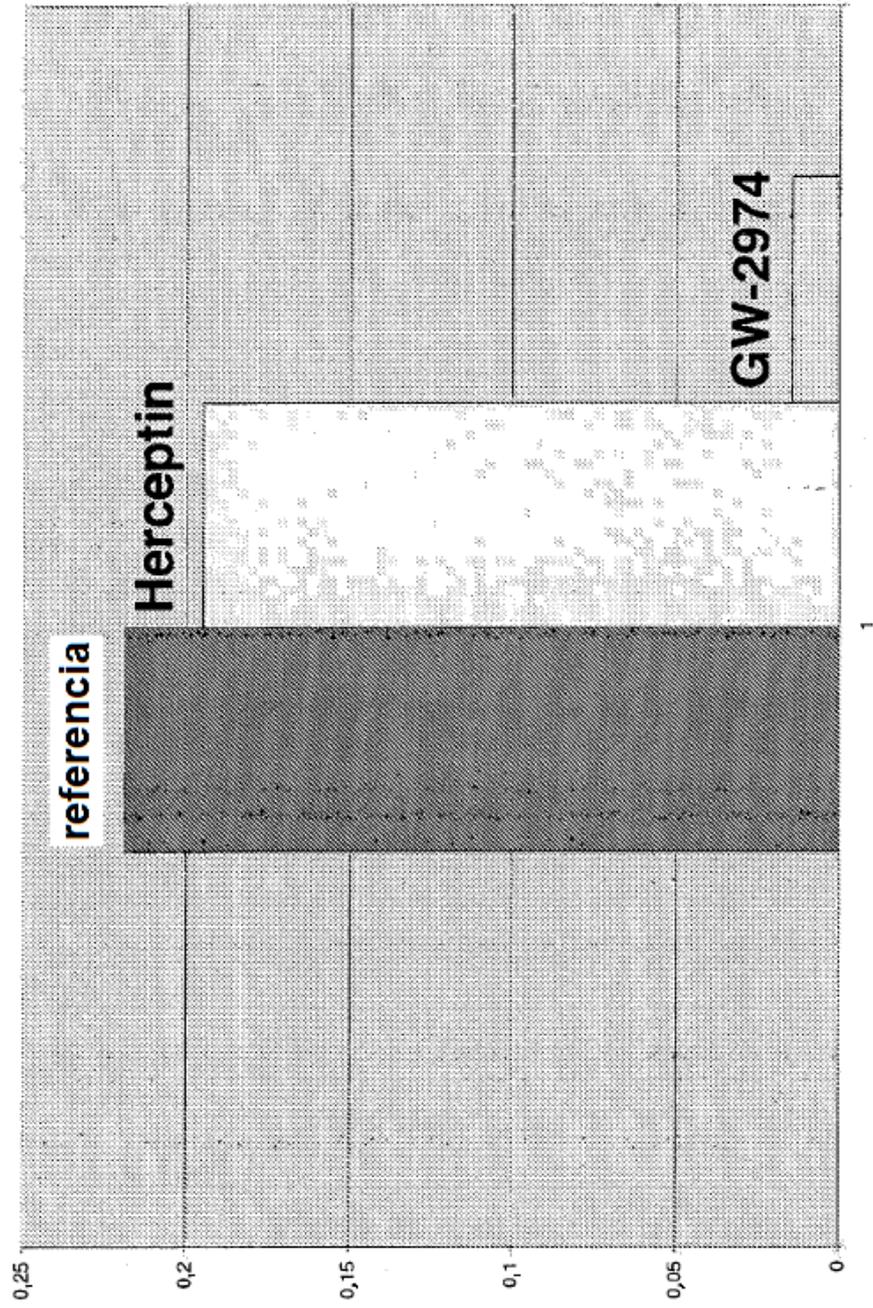


Figura 6. Células MDA-MB-468 tratadas por GW-2974 y Ca intracelular detectadas por Flúor-4.

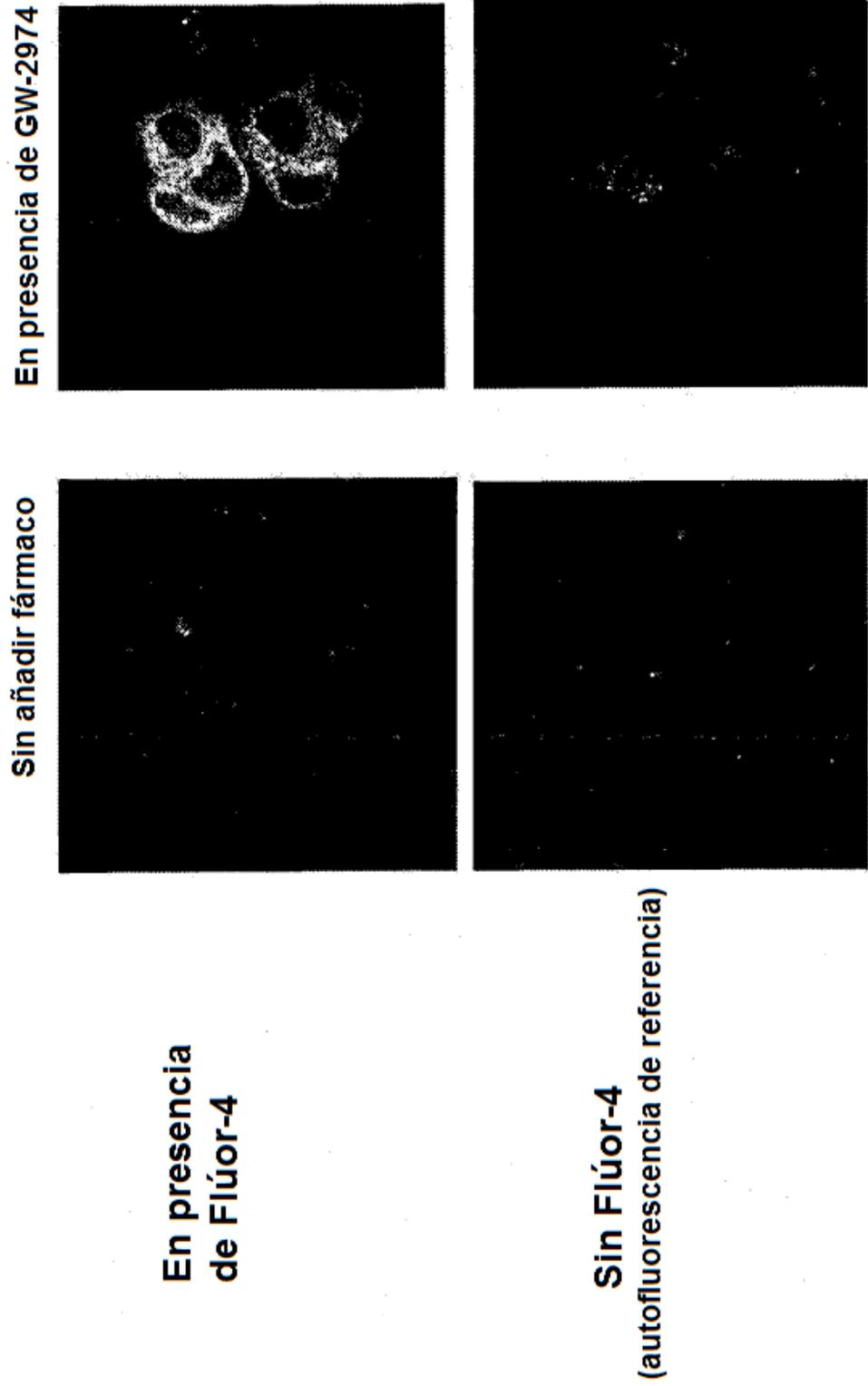


Figura 7. Los TKI intervienen en la regulación de la traducción

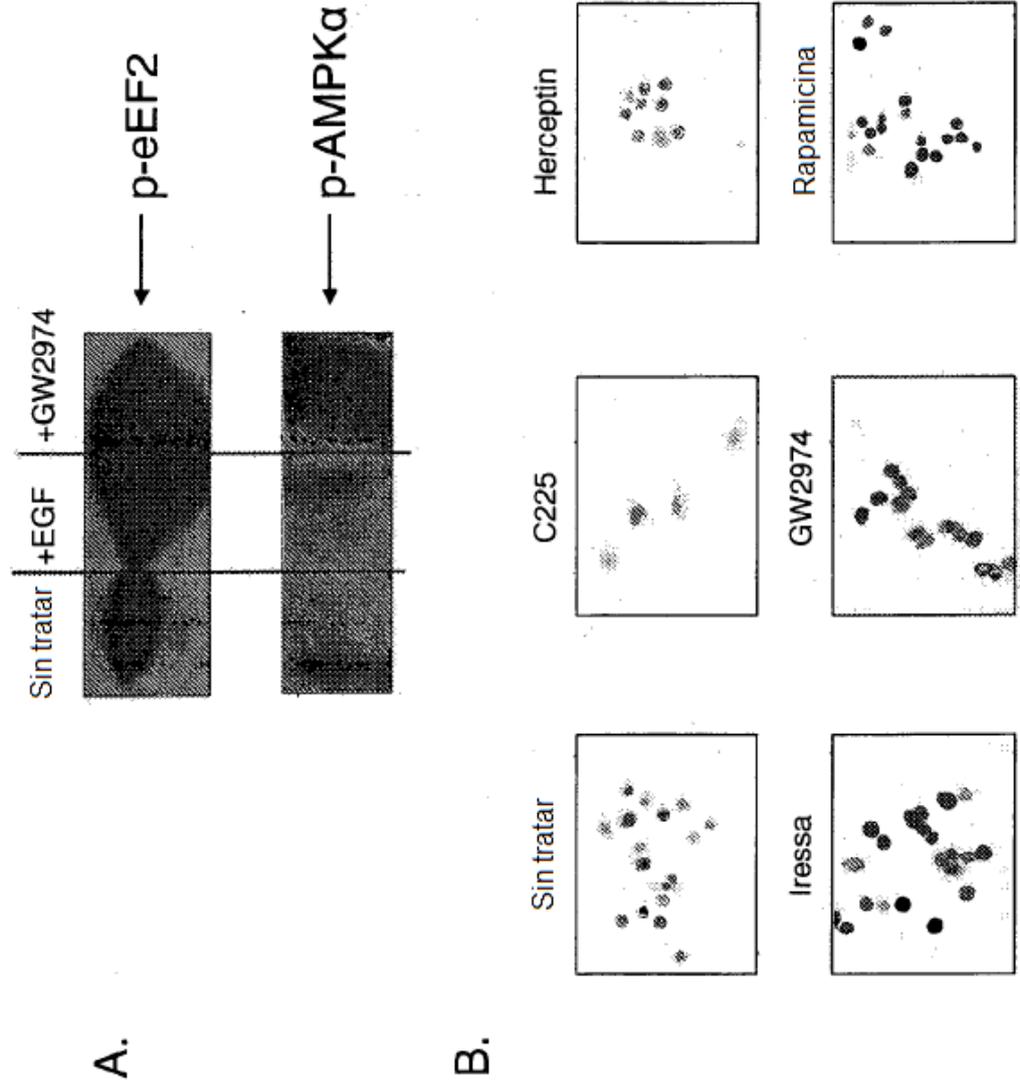


Figura 8. Expresión de ERR α y MCAD en células cardiomiocitos con y sin tratamiento

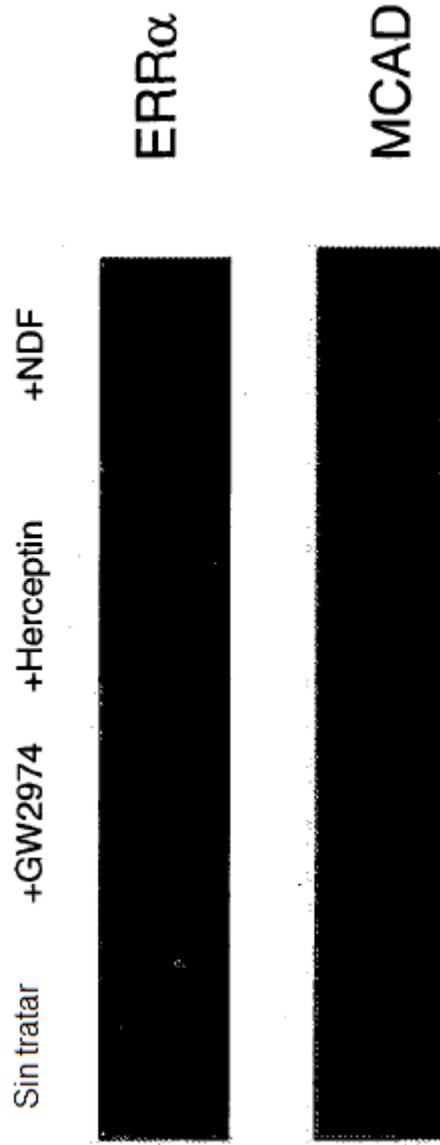
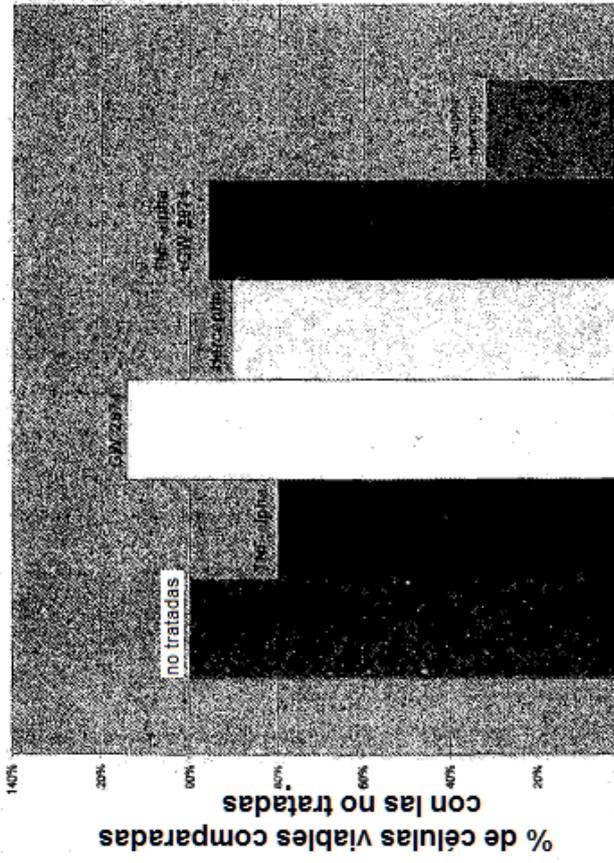
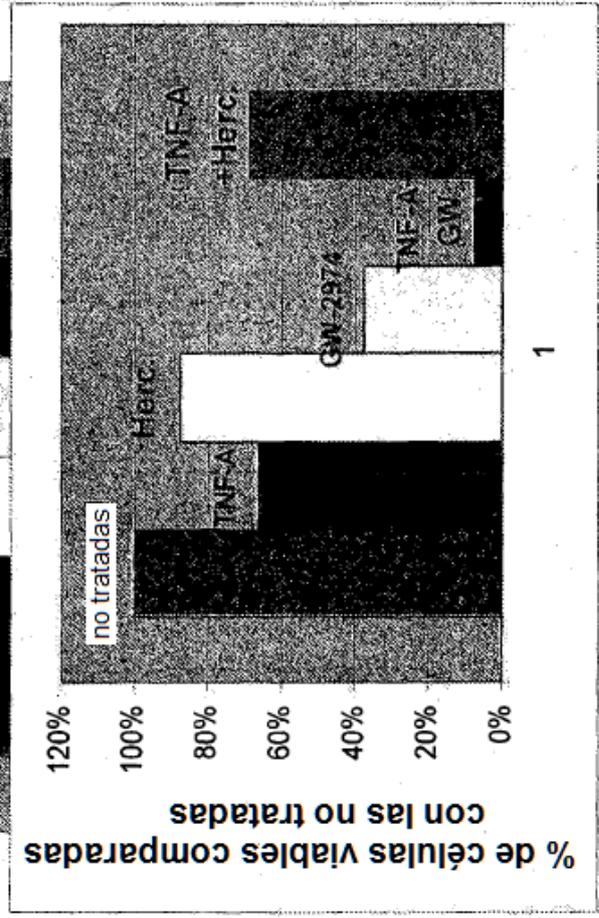


Figura 9



HMC



Au-565

Miocardiocitos humanos tratados

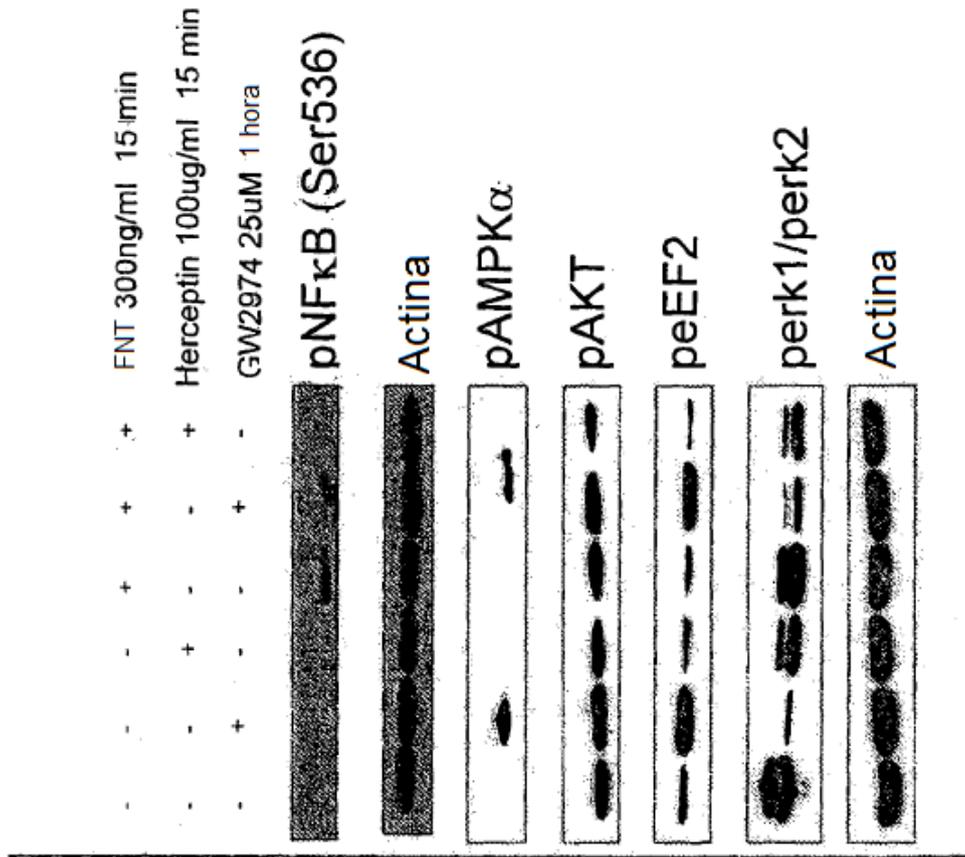


Figura 10