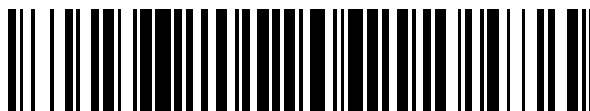


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 856**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2001 E 06114110 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 1731161**

54 Título: **Anticuerpos de esfingosina-1-fosfato para el tratamiento de enfermedades asociadas con elevadas concentraciones de esfingolípidos**

30 Prioridad:

**22.12.2000 US 257926 P**

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

**02.12.2014**

73 Titular/es:

**LPATH, INC. (100.0%)  
4025 Sorrento Valley Blvd.  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**SABBADINI, ROGER A.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 523 856 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

Anticuerpos de esfingosina-1-fosfato para el tratamiento de enfermedades asociadas con elevadas concentraciones de esfingolípidos.

### Solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad a la Serie de solicitud de patente de EE.UU. núm. 60/257.926 titulada "Compositions and Methods for the Treatment and Prevention of Cardiac and Myocardial Disorders" por Sabbadini, Roger A., presentada el 22 de diciembre de 2000.

### Campo de la invención

- 10 La invención se refiere generalmente al área de tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos y trauma físico cardiovascular y cerebrovascular. El efecto beneficioso de la invención se alcanza a través del uso de un anticuerpo que se une a esfingosina-1-fosfato (S-I-P). La invención se dirige también a métodos para aislar, formular y usar composiciones farmacéuticas, y equipos y dispositivos médicos que comprenden dicho anticuerpo.

### Antecedentes de la invención

- 15 La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para entender la presente invención. No constituye una admisión de que cualquiera de la información proporcionada en esta memoria, o cualquier publicación específica o implícitamente referida en esta memoria, sea una técnica previa, o incluso particularmente relevante, a la invención actualmente reivindicada.

### Enfermedades y trastornos cardiovasculares

- 20 La enfermedad cardíaca isquémica es la causa principal de muerte en los EE.UU. Cada año aproximadamente 1,5 millones de personas sufre ataques al corazón (infartos de miocardio), de los que 1/3 (es decir, aproximadamente 500.000) son fatales. Además, aproximadamente 6,75 millones de americanos sufren angina de pecho, la manifestación más común de isquemia cardíaca. La angina de pecho es una sensación dolorosa de presión en el pecho que resulta de la enfermedad cardíaca isquémica. En total, hay 13,5 millones de pacientes viviendo con enfermedad cardíaca isquémica en los EE.UU. Los americanos en categorías de alto riesgo para esta enfermedad incluyen personas que tienen uno o más indicadores/factores de riesgo debido a eso, que incluyen aunque no están limitados a hipertensión, altos niveles de colesterol en suero y un historial familiar de enfermedad cardíaca. Mucha gente tiene al menos uno de estos indicadores/factores de riesgo; por ejemplo, hay 50 millones de americanos diagnosticados solo con hipertensión.

- 30 "Isquemia" es un proceso asociado con un flujo inadecuado de sangre oxigenada a una parte del cuerpo, típicamente provocada por la constricción o bloqueo de los vasos sanguíneos que lo suministran. La isquemia se da en cualquier momento que el flujo sanguíneo a un tejido se reduce por debajo de un nivel crítico. Esta reducción en el flujo sanguíneo puede resultar de: (i) el bloqueo de un vaso mediante un émbolo (coágulo de sangre); (ii) el bloqueo de un vaso debido a aterosclerosis; (iii) la rotura de un vaso sanguíneo (un ictus hemorrágico); (iv) el bloqueo de un vaso sanguíneo debido a vasoconstricción aguda; (v) un infarto de miocardio (cuando el corazón se para, el flujo de sangre a órganos se reduce y resulta la isquemia); (vi) trauma; (vii) cirugía, durante la que el flujo sanguíneo a un tejido u órgano necesita reducirse o pararse para alcanzar los objetivos de la cirugía (por ejemplo, angioplastia, trasplantes de corazón y pulmón/corazón); (viii) exposición a ciertos agentes, por ejemplo, dobutamina o adenosina (Lagerqvist et al., Br. Heart J. 68:282-285, 1992) o (ix) agentes anti-neoplásicos y otros quimioterapéuticos, tales como doxirubicina, que son cardiotoxicos.

- 40 Incluso si el caudal (volumen/tiempo) de sangre es adecuado, la isquemia puede sin embargo ocurrir debido a hipoxia. "Hipoxia" se refiere a procesos en que el contenido de oxígeno en sangre es insuficiente para satisfacer las necesidades normales de oxígeno celular. La sangre hipóxica es, por definición, distinta de la sangre normóxica, es decir, sangre en que el contenido de oxígeno es suficiente para satisfacer las necesidades normales de oxígeno celular. Dichos procesos incluyen aunque no están limitados a formas de fallo cardíaco que afectan de forma adversa al bombeo cardíaco tales como hipertensión, arritmias, choque séptico, trauma, cardiomiopatías y enfermedad cardíaca congestiva.

- 50 Los trastornos isquémicos de miocardio se dan cuando el flujo sanguíneo cardíaco se restringe (isquemia) y/o cuando el suministro de oxígeno al músculo del corazón está comprometido (hipoxia) de manera que la demanda de oxígeno del corazón no se satisface por el suministro. La enfermedad de arteria coronaria (EAC) que deriva de arteriosclerosis, particularmente aterosclerosis, es la causa más común de isquemia, y tiene síntomas tales como angina de pecho estable o inestable. EAC puede llevar a infartos agudos de miocardio (IAM) y muerte cardíaca repentina. El espectro de procesos isquémicos que dan por resultado fallo cardíaco se denomina como Síndrome Coronario Agudo (SCA). La lesión por perfusión es a menudo una consecuencia de la isquemia, en particular cuando anticoagulantes, agentes trombolíticos o medicamentos anti-angina se usan o cuando la vasculatura cardíaca se abre quirúrgicamente por angioplastia o por injerto de arteria coronaria.

Los agentes cardiotóxicos son aquellos materiales que provocarían una pérdida de función cardiaca, que incluyen inotropia negativa, arritmias, fallo cardiaco y muerte celular (tanto apoptótica como necrótica).

Actualmente, los tratamientos para infarto agudo de miocardio y otras enfermedades cardiacas incluyen aunque no están limitados a dispositivos mecánicos y procedimientos asociados con eso (por ejemplo, angioplastia coronaria; Grines et al., N. Engl. J. Med. 3298:673-679, 1993); agentes trombolíticos tales como estreptoquinasa, tPA, y derivados de los mismos. Los adyuvantes de estas terapias incluyen beta-bloqueantes, aspirina y heparina e inhibidores de glucoproteína (GP) IIb/IIIa (Antman et al., Circ. 99:2720-2732, 1999). Los inhibidores de GP IIb/IIIa disminuyen la agregación plaquetaria y la formación de trombos (para una revisión, véase Topol, Lancet 353:227-231, 1999). Los ejemplos incluyen aunque no están limitados a anticuerpos monoclonales (por ejemplo, abciximab), péptidos cíclicos (por ejemplo, eptifibatide) y peptidomiméticos no peptídicos (por ejemplo, tirofibano, lamifibano, xemilofibano, sibrafibano y lefradafibano).

Los tratamientos preventivos incluyen aunque no están limitados a los que reducen los niveles de colesterol de un paciente mediante, por ejemplo, gestión de la dieta e intervención farmacológica. Las estatinas son un tipo de agente que se ha usado para reducir los niveles de colesterol. Las estatinas se cree que actúan inhibiendo la actividad de HMG-CoA reductasa, que a su vez aumenta la producción hepática de receptores de colesterol (Nickenig et al., Circ. 100:2131-2134, 1999). Los receptores de colesterol hepáticos se unen al colesterol y lo eliminan de la sangre. Dichos agentes incluyen aunque no están limitados a lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina (Lennernas, Clin. Pharmacokinet. 32:403-425, 1997). Estas y otras estatinas ralentizan la progresión de enfermedad de la arteria coronaria y pueden inducir la regresión de lesiones ateroscleróticas en los pacientes. No se sabe, sin embargo, si otras reductasas se inhiben por dichos agentes, y que efectos secundarios podrían darse como resultado.

#### Enfermedades y trastornos cerebrovasculares

Los pacientes que experimentan isquemia cerebral a menudo sufren de discapacidades que oscilan de déficit neurológico transitorio a daño irreversible (ictus) o muerte. La isquemia cerebral, es decir, la reducción o cese de flujo sanguíneo al sistema nervioso central, puede caracterizarse como global o focal.

La isquemia cerebral focal se refiere al cese o reducción de flujo sanguíneo en la vasculatura cerebral que resulta de una oclusión parcial o completa en las arterias cerebrales intracraneales o extracraneales. Dicha oclusión da por resultado típicamente ictus, un síndrome caracterizado por el comienzo agudo de un déficit neurológico que persiste durante al menos 24 horas, reflejando la implicación focal del sistema nervioso central y es el resultado de una perturbación de la circulación cerebral. Otras causas de isquemia cerebral focal incluyen vasoespasmo debido a hemorragia subaracnoide o intervención iatrogénica.

La isquemia cerebral global se refiere a la reducción de flujo sanguíneo en la vasculatura cerebral que resulta de fallo circulatorio sistémico. El fallo del sistema circulatorio para mantener la perfusión celular adecuada lleva a una reducción de oxígeno y nutrientes a los tejidos. Así, la isquemia cerebral global resulta de depresión grave del rendimiento cardiaco. La causa más frecuente es infarto agudo de miocardio con pérdida de masa muscular sustancial. El fallo de la bomba puede también resultar de miocarditis aguda o de depresión de contractibilidad de miocardio después de paro cardiaco o bypass cardiopulmonar prolongado. Las anomalías mecánicas, tales como estenosis valvular grave, regurgitación aórtica o mitral masiva, defectos del tabique ventricular adquirido de forma aguda, pueden reducir también el gasto cardiaco. Causas adicionales incluyen arritmia cardiaca, tal como fibrilación ventricular, y cualquier enfermedad cardiaca descrita en esta memoria. Causas adicionales incluyen procedimientos intervencionistas, tales como angioplastia carótida, implantación de stent o endarterectomía, que daría por resultado de otra forma isquemia cerebral focal, y también procedimientos cardiacos que pueden dar por resultado isquemia cerebral global, tal como cateterización cardiaca, estudios electrofisiológicos y angioplastia.

Los expertos en la técnica son capaces fácilmente de identificar pacientes que tienen un ictus o riesgo de tener un ictus, isquemia cerebral, trauma de cabeza o epilepsia. Por ejemplo, los pacientes que tienen riesgo de tener un ictus incluyen, aunque no están limitados a, pacientes que tienen hipertensión o sufren cirugía mayor.

Tradicionalmente, la gestión emergente de ictus isquémico agudo consiste en principalmente cuidado de apoyo general, por ejemplo, hidratación, monitorización del estado neurológico, control de presión sanguínea y/o terapia anti-plaquetaria o anti-coagulación. La heparina se ha administrado a pacientes de ictus con efectividad limitada e inconsistente. En algunas circunstancias, la isquemia se resuelve por sí misma durante un periodo de tiempo debido al hecho de que algunos trombos se absorben en la circulación, o se fragmentan y viajan distalmente durante un periodo de unos pocos días. En 1996, la Administración de Alimentos y Fármacos aprobó el uso de activador plasminógeno de tejido (t-PA) o Activase®, para tratar ictus agudo. Sin embargo, el tratamiento con t-PA sistémico se asocia con riesgo aumentado de hemorragia intracerebral y otras complicaciones hemorrágicas. A un lado de la administración de agentes trombolíticos y heparina, no hay opciones terapéuticas actualmente en el mercado para pacientes que sufren isquemia cerebral focal por oclusión. El vasoespasmo puede ser parcialmente sensible a agentes vasodilatadores. El campo recientemente en desarrollo de cirugía neurovascular, que implica colocar dispositivos mínimamente invasivos en las arterias carótidas para eliminar físicamente la lesión causante puede

proporcionar una opción terapéutica para estos pacientes en el futuro, aunque esta clase de manipulación puede llevar al vasoespasmo en sí mismo.

#### Documentos

5 La Patente de EE.UU. 6.210.976 B1 y la solicitud de patente PCT publicada WO98/57179 (PCT/US98/10486), ambas tituladas "Methods for Early Detection of Heart Disease", se refiere al uso de niveles en sangre de ciertos esfingolípidos para cribar sucesos isquémicos tempranos antes de que los síntomas se presenten en personas con alto riesgo de enfermedad cardíaca, o en una disposición de triaje para pacientes con síndrome coronario agudo.

10 La Solicitud PCT PCT/US01/12706, publicada como documento WO 01/80903, titulada "Detection and Treatment of Atherosclerosis Based on Plasma Sphingomyelin Concentration", se refiere a métodos enzimáticos para medir esfingomielina de plasma y tejido, concentraciones y esos niveles de esfingomielina en plasma humano se correlacionan positivamente con aterosclerosis y enfermedad cardíaca coronaria.

15 La Patente de EE.UU. 5.929.039, titulado "Method for Treating Cardiac Dysfunction and Pharmaceutical Compositions Useful Therefor", se refiere a describir métodos para la profilaxis o tratamiento de arritmia cardíaca usando un agente capaz de bloquear o inhibir el efecto o liberación de inositol(1,4,5)trisfosfato en el tejido cardíaco. El agente puede ser un aminoglucósido, que incluye gentamicina.

La Patente de EE.UU. 5.677.288, titulado "Use of Aminoglycosides to Protect Against Excitotoxic Neuron Damage", se refiere al uso de un aminoglucósido, que puede ser gentamicina, que suprime el flujo de iones de calcio en neuronas a través de canales de calcio de tipo N. El método se refiere a la reducción de daño excitotóxico a las neuronas, que puede darse como un resultado de ictus, isquemia/hipoxia cerebral u otros sucesos o procesos.

20 La Solicitud de Patente de EE.UU. publicada 20010041688, titulada "Methods and Compositions for the Regulation of Vasoconstriction", se refiere a la modulación de esfingosina quinasa y actividad esfingosina-1-fosfato fosfatasa y señalización de receptor EDG para el tratamiento de procesos relacionados con vasoconstricción y vasoconstricción, incluyendo migraña, ictus, hemorragia subaracnoide y vasoespasmo.

25 Ancellin et al., "Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme: Sphingosine 1 phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation", JBC Papers in Press. Publicado el 10 de diciembre de 2001 como el manuscrito M 102841200 se refiere a sucesos relacionados con angiogénesis que están mediados por una esfingosina quinasa.

#### Compendio de la invención

30 La invención se dirige a composiciones y métodos para tratar o prevenir enfermedad cardiovascular, cardíaca, de miocardio y otras enfermedades, trastornos o trauma físico, y/o enfermedades y trastornos cerebrovasculares, en que el anticuerpo terapéutico se administra a un paciente que altera la actividad o concentración de un S-I-P indeseable, tóxico y/o cardiopático o metabolitos de los mismos. Los métodos terapéuticos y composiciones de la invención se dice que están "basados en esfingolípidos" para indicar que actúan cambiando la concentración absoluta, relativa y/o disponible y/o actividades de ciertos esfingolípidos indeseables, tóxicos o cardiopáticos.

35 La composición que comprende el anticuerpo de la invención es para usar en métodos de terapia cardiovascular y cardíaca basada en esfingolípidos. "Terapia cardíaca" se refiere a la prevención y/o tratamiento de enfermedades, trastornos o trauma físico del miocardio. Los procesos de interés particular incluyen aunque no están limitados a isquemia de miocardio; infarto agudo de miocardio (IAM); enfermedad de arteria coronaria (EAC); síndrome coronario agudo (SCA); daño celular y tisular cardíaco que puede darse durante o como consecuencia de revascularización percutánea (angioplastia coronaria) con o sin implantación de stent; injerto de bypass coronario (IBC) u otros procedimientos o terapias quirúrgicas o médicas que pueden provocar daño isquémico o isquémico/reperusión en seres humanos; y trauma cardiovascular.

40 "Terapia cardiovascular" abarca terapia cardíaca además de la prevención y/o tratamiento de otras enfermedades asociadas con el sistema cardiovascular, tal como enfermedad cardíaca. El término "enfermedad cardíaca" abarca cualquier tipo de enfermedad, trastorno, trauma o tratamiento quirúrgico que implica al tejido cardíaco o del miocardio. De particular interés son enfermedades cardíacas que se refieren a hipoxia y/o isquemia del tejido de miocardio y/o fallo cardíaco. Un tipo de enfermedad cardíaca que puede resultar de isquemia es la lesión por reperusión, tal como puede darse cuando se usan anticoagulantes, agentes trombolíticos, o medicamentos anti-angina en terapia, o cuando la vasculatura cardíaca se abre quirúrgicamente por angioplastia o por injerto de arteria coronaria. Otro tipo de enfermedad cardíaca a la que la invención se dirige es enfermedad de arteria coronaria (EAC), que puede surgir de arteriosclerosis, particularmente aterosclerosis, una causa común de isquemia. EAC tiene síntomas tales como angina de pecho estable o inestable, y puede llevar a infartos agudos de miocardio (IAM) y muerte cardíaca repentina. El término "fallo cardíaco" abarca infarto agudo de miocardio, miocarditis, una cardiomiopatía, fallo cardíaco congestivo, choque séptico, trauma cardíaco y fallo cardíaco idiopático. El espectro de procesos isquémicos que dan por resultado fallo cardíaco se denomina como Síndrome Coronario Agudo (SCA).

"Terapia cerebrovascular" se refiere a terapia dirigida a la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con isquemia cerebral y/o hipoxia. De interés particular es la isquemia cerebral y/o hipoxia que resulta de isquemia global que resulta de una enfermedad cardíaca, que incluye sin limitación fallo cardíaco.

5 "Esfingolípidos tóxicos" son aquellos esfingolípidos que pueden provocar o aumentar la necrosis y/o apoptosis de células, incluyendo, en algunos ejemplos, tipos de células particulares que se encuentran en tejidos u órganos específicos. "Esfingolípidos cardiotoxicos" son esfingolípidos tóxicos que provocan o aumentan directa o indirectamente arritmias cardíacas, la inotropia negativa (pérdida de función contráctil) del corazón y la necrosis y/o apoptosis de células encontradas en o asociadas con el corazón, que incluyen aunque no están limitadas a cardiomiocitos, neuronas cardíacas y similares. "Esfingolípidos indeseables" incluyen esfingolípidos tóxicos y cardiotoxicos, además de metabolitos, particularmente precursores metabólicos, de esfingolípidos tóxicos y cardiotoxicos. Esfingolípidos indeseables, cardiotoxicos y/o tóxicos de interés particular incluyen aunque no están limitados a ceramida (CER), esfingosina-1-fosfato (S-1-P) y esfingosina (SPH; D(+)-eritro-2-amino-4-trans-octadeceno-1,3-diol o esfinganina).

15 El término "metabolitos" se refiere a compuestos a partir de los que se hacen los esfingolípidos, además de aquellos que resultan de la degradación de esfingolípidos; que es compuestos que están implicados en las rutas metabólicas de esfingolípidos (Figuras 1 y 2). Los metabolitos incluyen precursores metabólicos y productos metabólicos. El término "precursores metabólicos" se refiere a compuestos a partir de los que se hacen los esfingolípidos. Los precursores metabólicos de interés particular incluyen aunque no están limitados a SPC, esfingomielina, dihidroesfingosina, dihidroceramida y 3-cetoefinganina. El término "productos metabólicos" se refiere a compuestos que resultan de la degradación de esfingolípidos, tal como fosforilcolina (también conocida como fosfocolina, fosfato de colina), ácidos grasos, que incluyen ácidos grasos libres y hexadecanal (también conocido como palmitaldehído).

25 Como se usa en esta memoria, el término "terapéutico" abarca el espectro completo de tratamientos para una enfermedad o trastorno. Un agente "terapéutico" de la invención puede actuar de una manera que sea profiláctico o preventivo, incluyendo aquellos que incorporan procedimientos diseñados para fijar como objetivo individuos que pueden identificarse como que son de riesgo (farmacogenéticos); o de una manera que es mejorativo o curativo por naturaleza; o puede actuar para ralentizar la velocidad o extensión de la progresión de una enfermedad o trastorno; o puede actuar para minimizar el tiempo necesario, la ocurrencia o extensión de cualquier malestar o dolor, o limitaciones físicas asociadas con la recuperación de una enfermedad, trastorno o trauma físico; o puede usarse como un adyuvante a otras terapias y tratamientos. El término "agente cardioterapéutico" se refiere a un agente que es terapéutico para enfermedades y enfermedades provocadas por o asociadas con enfermedades y trastornos cardíacos y de miocardio.

35 Sin desear ceñirse a cualquier teoría particular, se cree que el nivel de esfingolípidos indeseables tales como SPH o S-1-P, y/o uno o más de sus metabolitos, provocan o contribuyen al desarrollo de enfermedades y trastornos cardíacos y de miocardio. Porque los esfingolípidos también están implicados en fibrogenesis y curación de heridas del tejido hepático (Davaille et al., J. Biol. Chem. 275:34268-34633, 2000; Ikeda et al., Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 279:G304-G310, 2000), curación de vasculaturas heridas (Lee et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278:C612-C618, 2000), y otros estados de enfermedad o trastornos, o sucesos asociados con dichas enfermedades o trastornos, tal como cáncer, angiogénesis e inflamación (Pyne et al., Biochem. J. 349:385-402, 2000), las composiciones y métodos de la presente descripción pueden aplicarse para tratar estas enfermedades y trastornos además de enfermedades y trastornos cardíacos y del miocardio.

45 Una forma de terapia basada en esfingolípidos implica manipular las rutas metabólicas de esfingolípidos para disminuir las concentraciones reales, relativas y/o disponibles in vivo de esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotoxicos. La invención proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo que se une a S-1-P y un anticuerpo que se une a S-1-P para usar en el tratamiento y prevención de enfermedades, trastornos o trauma físico cardíaco o de miocardio, en que los agentes terapéuticos se administran a un paciente que altera la actividad o concentración de un enzima, en donde la enzima cataliza una reacción que produce o degrada esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotoxicos, o metabolitos de los mismos. Una "enzima" es una proteína o polipéptido que cataliza (provoca, acelera o aumenta) una reacción química. El término "metabolismo" se usa para describir la construcción o destrucción biológica de un compuesto. El metabolismo comprende la síntesis (metabolismo constructivo, también conocido como anabolismo) de compuestos y la degradación (metabolismo destructivo, también conocido como catabolismo) de los mismos. Las enzimas de interés particular, y agentes moduladores preferidos de las mismas (inhibidores/activadores o estimulantes/agentes bloqueantes), se describen en la descripción detallada (véase también los Ejemplos 7 a 10).

55 En una versión de esta forma de terapia basada en esfingolípidos, las etapas metabólicas que implican la producción de esfingolípidos se inhiben o bloquean. Los agentes terapéuticos y métodos se usan para disminuir la cantidad o actividad de enzimas que catalizan reacciones químicas que degradan esfingolípidos indeseables y/o precursores metabólicos de los mismos. Así, se aumenta el catabolismo neto de esfingolípidos.

En otra versión de esta forma de terapia basada en esfingolípidos, las etapas metabólicas que implican la destrucción de esfingolípidos se activan o estimulan. Los agentes terapéuticos y los métodos se usan para aumentar

la cantidad o actividad de enzimas que catalizan reacciones químicas que degradan esfingolípidos indeseables y/o precursores metabólicos de los mismos. Así, se disminuye el anabolismo neto de esfingolípidos.

Una forma de terapia basada en esfingolípidos implica el uso de agentes que se unen a esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotoxicos, o metabolitos de los mismos. Dichos agentes de unión a esfingolípidos incluyen aunque no están limitados a proteínas y derivados polipeptídicos de las mismas que se unen a esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotoxicos o metabolitos de los mismos. Dicha proteína y polipéptido puede, por medio de ejemplo no limitante, ser un derivado no catalítico de una enzima implicada en las rutas metabólicas del esfingolípidos, un derivado de proteínas que participan en la ruta de señalización de esfingomielina, un derivado de un receptor que se une a un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico, un anticuerpo o derivado de anticuerpo que se dirige a (se une específicamente a) un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico. Dichos derivados son preferiblemente solubles en agua. Un anticuerpo que se une a S-1-P es según la invención. (Los agentes de unión a esfingolípidos se describen en la descripción detallada de la invención; véase también los Ejemplos 6 a 14).

Una forma de terapia basada en esfingolípidos implica el uso de agentes que se unen a receptores de esfingolípidos que inician y estimulan la ruta de señalización de esfingomielina. Esta ruta da por resultado finalmente la producción de ceramida aumentada. Un nivel aumentado de ceramida podría esperarse, a su vez, que diera por resultado concentraciones elevadas de esfingolípidos indeseables tales como, por ejemplo, S-1-P y SPH. Así, inhibir o bloquear dichos receptores disminuye, o al menos evita un aumento debido a la ruta de señalización de esfingomielina, la producción intracelular de ceramida y metabolitos de los mismos (véase la descripción detallada y el Ejemplo 9). Otra forma de terapia basada en esfingolípidos implica el uso de genética molecular para generar agentes terapéuticos (véase la descripción detallada y el Ejemplo 18).

En una versión de esta forma de terapia basada en esfingolípidos, el agente terapéutico es una proteína (que incluye, sin limitación, polipéptidos, oligopéptidos y peptidomiméticos). Una "proteína" es una molécula que tiene una secuencia de aminoácidos que están unidos unos a otros en una molécula lineal mediante enlaces peptídicos. El término proteína se refiere a un polipéptido que se aísla de una fuente natural, o se produce a partir de un ADNc aislado usando tecnología de ADN recombinante; y tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de al menos aproximadamente 200 aminoácidos. Como se usa en esta memoria, el término "polipéptido" incluye proteínas, proteínas de fusión, oligopéptidos y derivados polipeptídicos, con la excepción de que los peptidomiméticos se considera que son moléculas pequeñas en esta memoria. Un "oligopéptido" es un polipéptido que tiene una secuencia corta de aminoácidos (es decir, 2 a aproximadamente 200 aminoácidos). Un oligopéptido se prepara generalmente por síntesis química. Aunque los oligopéptidos y fragmentos de proteína pueden prepararse de otra forma, es posible usar tecnología de ADN recombinante y/o manipulaciones bioquímicas in vitro. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos puede prepararse y usarse como un molde para reacciones de transcripción/traducción in vitro.

Un "fragmento de proteína" es un fragmento proteolítico de un polipéptido mayor, que puede ser una proteína o una proteína de fusión. Un fragmento proteolítico puede prepararse por escisión proteolítica in vivo o in vitro de un polipéptido mayor, y es generalmente demasiado grande para prepararse por síntesis química. Preferiblemente, los fragmentos proteolíticos tienen secuencias de aminoácidos que tienen una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 5.000 aminoácidos; más preferiblemente aproximadamente 200 a 1000 aminoácidos; lo más preferiblemente 200 a aproximadamente 1.000 aminoácidos.

Una proteína terapéutica puede ser un mutante negativo dominante de una enzima que cataliza una reacción que da por resultado la producción de un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico o un metabolito del mismo, de un receptor para dicho esfingolípidos, o de una proteína que participa en la ruta de señalización de esfingomielina. Una "proteína mutante negativa dominante" es una que, cuando se expresa, (i) no proporciona por sí misma la actividad de la proteína natural y (ii) inhibe la acción de la forma natural de la proteína. La proteína terapéutica puede ser una enzima, producida por tecnología de ADN recombinante o cualquier otro método apropiado, que cataliza una reacción que da por resultado la degradación de un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico, o un metabolito del mismo; y dicha enzima puede ser una que se ha alterado por medio de genética molecular para tener propiedades deseables mejoradas tal como actividad catalítica aumentada, unión más fuerte al sustrato, etc.

En otra versión de esta forma de terapia basada en esfingolípidos, el agente terapéutico es un ácido nucleico (que incluye, sin limitación, ADN, ARN y oligonucleótidos). Un ácido nucleico terapéutico puede tener una secuencia que es antisentido a una secuencia de nucleótidos encontrada en un ARNm que codifica una enzima que cataliza una reacción que da por resultado la producción de un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico, o un metabolito del mismo, o un receptor del mismo. Dichas moléculas nucleicas incluyen oligonucleótidos antisentido. Dichos ácidos nucleicos antisentido se unen a un ARNm objetivo específico debido a sus secuencias complementarias, y evitan que el ARNm se procese o traduzca, o aumente o provoque la degradación del ARNm. Un ácido nucleico terapéutico puede ser una construcción de terapia génica que comprende y expresa, sobre-expresa o expresa constitutivamente (i) ácidos nucleicos que son antisentido a aquellos que codifican una enzima que cataliza una reacción que da por resultado la producción de un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico o un metabolito del mismo; (ii) proteínas terapéuticas, tal como enzima que degrada un esfingolípidos, o un mutante negativo dominante que inhibe dicha enzima, o una proteína de unión al esfingolípidos.

Cualquier composición y composición para el uso de la invención que puede usarse en terapia basada en esfingolípidos puede usarse en combinación con cualquier otra composición y método para terapia basada en esfingolípidos, además de en conjunto con agentes terapéuticos y composiciones que no están basados en esfingolípidos. Tratamientos adyuvantes útiles para los tratamientos basados en esfingolípidos de la invención modulan la ruta de señalización de esfingomielina y/o inhiben citoquinas (véase la descripción detallada y el Ejemplo 14). Un "adyuvante" es cualquier agente que se añade a una composición o régimen terapéutico para ayudar al efecto terapéutico del(de los) agente(s) activo(s) del(de los) mismo(s).

Un agente para terapia basada en esfingolípidos se formula en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para reparto cardiaco rápido. Por "reparto cardiaco rápido" se entiende que el agente terapéutico alcanza una concentración terapéuticamente efectiva en la sangre, suero o tejido especificado en aproximadamente 30 a 60 minutos, preferiblemente en aproximadamente 15 a 20 minutos, más preferiblemente 5 a 10 minutos, y lo más preferiblemente en aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 5 minutos, después de su administración. Las composiciones farmacéuticas se usan para tratar enfermedades, trastornos o trauma físico cardiaco, de miocardio y otros.

Los compuestos farmacéuticos y composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención se incorporan en equipos y dispositivos médicos para dichos tratamientos. Los dispositivos médicos se usan para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención a un paciente que los necesita, y equipos que incluyen dichos dispositivos. Dichos dispositivos y equipos pueden diseñarse para la administración rutinaria, que incluye la auto-administración, de las composiciones farmacéuticas de la invención. Dichos dispositivos y equipos pueden diseñarse también para uso de emergencia, es decir, en ambulancias o salas de urgencias, o durante la cirugía o en actividades donde la lesión es posible aunque donde toda la atención médica puede no estar inmediatamente próxima (es decir, senderismo y acampada, o situaciones de combate). La invención proporciona así terapias cardiacas y de miocardio basadas en el papel de los esfingolípidos en enfermedades, trastornos y trauma físico cardiaco y de miocardio.

Los ensayos de cribado, que incluyen ensayos de cribado de alto rendimiento (HTS), que son útiles para identificar compuestos terapéuticos basados en esfingolípidos nuevos se describen en esta memoria. Las bibliotecas químicas se criban usando estos ensayos, preferiblemente de una manera de alto rendimiento, para identificar compuestos de partida y agentes terapéuticos.

En un aspecto relacionado, se describe un método para identificar moléculas que se unen específicamente a, y/o interfieren de otra forma con la acción de un objetivo de esfingolípido. Un "objetivo de esfingolípido" es cualquier molécula o resto que se desea para obtener nuevos compuestos que se unen a él o inhibir de otra forma la actividad del mismo. Los objetivos de esfingolípido incluyen, aunque no están limitados a, esfingolípidos per se; receptores de esfingolípido; y moléculas implicadas en el metabolismo de esfingolípidos, que incluyen aunque no están limitados a enzimas que actúan en esfingolípidos y metabolitos de esfingolípido.

Los esfingolípidos que son cardiotoxicos a concentraciones relativamente altas se usan para precondicionar corazones. Precondicionar corazones con ciclos cortos de isquemia y reperfusión se conoce por tener un efecto cardioprotector en roedores (Yellon et al., Cardiovasc Res 26:983-987, 1992; Napoli et al., J Clin Bas Cardiol 1:37-42, 1998). En los métodos de precondicionado los esfingolípidos que son cardiotoxicos se administran en pequeñas dosis. En los métodos los esfingolípidos, que incluyen aunque no están limitados a ceramida, esfingosina y esfingosina-1-fosfato dados en dosis bajas, intermitentes, pueden proteger el tejido cardiaco de la isquemia.

La invención proporciona beneficios no obtenibles previamente en tratamientos cardiovasculares, cardiacos y de miocardio. Por medio de ejemplo no limitante, las consecuencias de sucesos agudos cardiacos o de miocardio pueden resultar del resultado final de una cascada de sucesos moleculares que evolucionan rápidamente después de que los síntomas se vuelvan evidentes. Los tratamientos que abordan los sucesos tempranos en la cascada pueden no ser capaces de "dar alcance" a dichos sucesos, es decir, pueden no alcanzar un nivel efectivo hasta después de que algunas moléculas indeseables que llevan al daño cardiaco o de miocardio se han producido. Las terapias basadas en esfingolípidos actúan en sucesos indeseables y en moléculas que se dan o están presentes en las etapas tardías de estas cascadas, pueden actuar antes de que se den dichos sucesos indeseables o se produzcan moléculas indeseables, y así pueden evitar la ocurrencia de dichos sucesos y/o la producción de dichos compuestos a un mayor grado del que puede realizarse por terapias que actúan más temprano en la cascada. Las terapias basadas en esfingolípidos abordan sucesos que llevan directamente (más que indirectamente) a isquemia de miocardio y otros trastornos cardiacos, y los efectos secundarios indeseables de tratamientos indirectos se reducen, minimizan o eliminan así. Las terapias basadas en esfingolípidos proporcionan tratamientos preventivos que alcanzan un estado efectivo relativamente rápido y no intrusivo en comparación con otras medidas preventivas, por ejemplo, cambios en la dieta o cirugía.

El compendio de la invención descrita anteriormente no es limitante y otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas, además de las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra un conjunto de reacciones bioquímicas que son una parte central de las rutas metabólicas de esfingolípidos.

5 La Figura 2 es una vista más amplia del metabolismo de esfingolípidos e incluye las reacciones bioquímicas y enzimas mostradas en la Figura 1. Abreviaturas: DAG, diacilglicerol); PtdCho, fosfatidilcolina.

10 La Figura 3 muestra el destino del SPH marcado con <sup>3</sup>H en la sangre completa. Después de añadirse la esfingosina marcada (SPH) a la sangre humana completa, la concentración de SPH cae mientras la concentración de esfingosina-1-fosfato (S1P) marcado aumenta, sugiriendo que SPH se convierte en S-1-P en la sangre; en contraste, poca de la marca se detecta como hexadecanal (HD) marcado. Símbolos: línea sólida, S1P; línea con guiones largos, HD; línea con guiones cortos, SPH.

La Figura 4 muestra los resultados de experimentos que demuestran que la L-carnitina bloquea la producción inducida por hipoxia de esfingosina en un modelo celular.

La Figura 5 muestra resultados de experimentos en que corazones de rata se someten a isquemia con (líneas grises) o sin (líneas negras) un inhibidor de esfingomielinasa.

15 La Figura 6 muestra la estructura química general de aminoglucósidos. "R1" a "R 13" son grupos sustituyentes.

**Abreviaturas**

A menos que se indique otra cosa, las siguientes abreviaturas se usan en esta memoria.

Esfingolípidos

DHSPH	Dihidroesfingosina
CER	ceramida (N-acesfingosina)
SPC	Esfingosilfosforilcolina
SPH	Esfingosina
S-1-P	Esfingosina-1-fosfato (también conocido como S1P o SPP)
SM	Esfingomielina

20 Enzimas

CER quinasa	ceramida quinasa
SMasa	Esfingomielinasa
SM-desacilasa	Esfingomielina desacetilasa
SPH quinasa	Esfingosina quinasa
S-1-P Liasa	Esfingosina-1-fosfato liasa
S-1-P Fosfatasa	Esfingosina-1-fosfato liasa fosfatasa

**Descripción detallada de la invención**

25 La presente invención proporciona composiciones para usar en el tratamiento de enfermedades y trastornos cardiovasculares y cerebrovasculares, además de otros estados de enfermedad que se refieren a esfingolípidos y metabolitos de esfingolípidos. Las composiciones y las composiciones para usar actúan interfiriendo con el metabolismo de varios esfingolípidos y/o sus metabolitos; uniendo S-1-P, reduciendo así su concentración efectiva; modulando la ruta de señalización de esfingomielina; por medio de modalidades basadas en genética molecular (que incluyen aunque no están limitadas al uso de proteínas negativas dominantes, antisentido, terapia génica y similares). Todas las modalidades anteriores de terapia cardiovascular pueden usarse solas, en combinación unas con otras y/o en combinación con otros métodos y composiciones útiles para terapia cardiovascular (que incluyen aunque no están limitadas a las que interfieren con la acción de ciertas citoquinas). Las composiciones terapéuticas de la invención se dice que están "basadas en esfingolípidos" para indicar que estas terapias actúan cambiando la(s)

30



concentración(ones) relativa, absoluta o disponible de ciertos esfingolípidos indeseables, tóxicos o cardiotóxicos. La administración terapéutica de esfingolípidos exógenos puede tener beneficio terapéutico si se da en un régimen de precondicionado (es decir, bajas dosis dadas de forma intermitente).

5 Se cree, sin desear ceñirse a cualquier teoría particular, que el nivel de esfingolípidos indeseables tales como CER, SPH o S-1-P, y/o uno o más de sus metabolitos, puede ser directamente responsable de la disfunción cardíaca, durante o inmediatamente después de la isquemia cardíaca, tal como durante la lesión por reperfusión. Por ejemplo, la esfingosina tiene efectos inotrópicos negativos en el corazón (Oral H, Dorn GW, Mann DL. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the adult mammalian cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:4836-4842; Krown K, Yasui K, Brooker M, et al. TNF $\alpha$  receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF $\alpha$  inhibition of L-type Ca $^{2+}$  current and Ca $^{2+}$  transients. *FEBS Letters* 1995; 376:24-30; Smith GW, Constable PD, Eppley RM, Tumbleson ME, Gumprecht LA, Haschek-Hock WM. Purified fumonisins B1 decreases cardiovascular function but does not alter pulmonary capillary permeability in swine. *Toxicological Sciences*-2000; 56:240-249, bloquea los intercambiadores de Na/Ca Condrescu M, Reeves JP. Inhibition of sodium-calcium exchange by ceramide and sphingosine. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:4046-4054, y el canal de calcio tipo L en células cardíacas Krown K, Yasui K, Brooker M, et al. TNF $\alpha$  receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF $\alpha$  inhibition of L-type Ca $^{2+}$  current and Ca $^{2+}$  transients. *FEBS Letters* 1995; 376:24-30, y modula el receptor de rianodina McDonough PM, Yasui K, Betto R, et al. Control of cardiac Ca $^{2+}$  levels: inhibitory actions of sphingosine on Ca $^{2+}$  transients and L-channel conductance. *Circ. Res.* 1994; 75:981-989, todos los cuales pueden provocar la desregulación de calcio que se observa cuando las células cardíacas se tratan con esfingosina (McDonough PM, Yasui K, Betto R, et al. Control of cardiac Ca $^{2+}$  levels: inhibitory actions of sphingosine on Ca $^{2+}$  transients and L-channel conductance. *Circ. Res.* 1994; 75:981-989; Krown K, Yasui K, Brooker M, et al. TNF $\alpha$  receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF $\alpha$  inhibition of L-type Ca $^{2+}$  current and Ca $^{2+}$  transients. *FEBS Letters* 1995; 376:24-30). Además, SPH inhibe el intercambiador de Na/H (Lowe JHN, Huang C-L, Ives HE. Sphingosine differentially inhibits activation of the Na $^{+}$ /H $^{+}$  exchange by phorbol esters and growth factors. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:7188-7194), que es responsable de la regulación de pH. También se ha mostrado que la esfingosina produce muerte celular en células cardíacas Krown KA, Page MT, Nguyen C, et al. TNF $\alpha$ -induced apoptosis in cardiac myocytes: Involvement of the sphingolipid signalling cascade in cardiac cell death. *J. Clin. Invest.* 1996; 98:2854-2865; Zechner D, Craig R, Hanford D, McDonough PM, Sabbadini RA, Glembotski CC. MKK6 inhibits myocardial cell apoptosis via a p38 MAP kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:8232-8239, y puede también producir daño por radicales libres durante la reperfusión Hernández O, Discher, D., Bishorpric, N., Webster, K. Rapid Activation of Neutral Sphingomyelinase by Hypoxia-Reoxygenation of Cardiac Myocytes. *Circ. Res* 2000:198-204. Se ha mostrado que la esfingosina-1-fosfato produce muerte celular Zechner D, Craig R, Hanford D, McDonough PM, Sabbadini RA, Glembotski CC. MKK6 inhibits myocardial cell apoptosis via a p38 MAP kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:8232-8239, y promueve arritmias y vasoconstricción coronaria Sugiyama A, Yatomi Y, Ozaki Y, Hashimoto K. Sphingosine 1-phosphate induces sinus tachycardia and coronary vasoconstriction in the canine heart. *Cardiovasc. Res.* 2000; 46:119-125; MacDonnell K, Severson D, Giles W. Depression of excitability by sphingosine 1-phosphate in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 1998; 44:H2291-H2299; y Liliom K, Sun G, Bunemanns M, et al. Sphingosylphosphocholine is a naturally occurring lipid mediator in blood plasma: a possible role in regulating cardiac function via sphingolipid receptors. *Biochem J.* 2001; 355:189-197).

40 Porque los esfingolípidos tales como S-1-P están implicados en la fibrogénesis y curación de heridas del tejido hepático (Davaile et al., *J. Biol. Chem.* 275:34268-34633, 2000; Ikeda et al., *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 279:G304-G310, 2000), la curación de vasculaturas heridas (Lee et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278:C612-C618, 2000), y otros estados de enfermedad o sucesos asociados con dichas enfermedades, tal como cáncer, angiogénesis e inflamación (Pyne et al., *Biochem. J.* 349:385-402, 2000), las composiciones y métodos de la descripción pueden aplicarse para tratar estas enfermedades además de enfermedades cardíacas. Por ejemplo, S-1-P puede usarse terapéuticamente como un promotor de angiogénesis cardíaca. Se ha presentado la capacidad de S-1-P para estimular la angiogénesis en cultivo celular y en tejido no cardíaco (Lee et al., Sphingosine 1-Phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264:743-325; Lee et al., *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C612-C618, 2000). Evidencia reciente sugiere que S-1-P administrado de forma exógena cruza la barrera de sangre-cerebro y promueve la vasoconstricción cerebral (Tosaka et al., *Stroke* 32:2913-2919. 2001). Esto sugiere que los esfingolípidos derivados de fuentes cardíacas u otras no cerebrales podrían contribuir al ictus. En consecuencia, interferir con la producción y/o acción de esfingolípidos puede ser beneficioso para mitigar el ictus, particularmente en ictus provocado por enfermedad vascular periférica, aterosclerosis y trastornos cardíacos. Por ejemplo, S1P puede usarse terapéuticamente como un promotor de angiogénesis cardíaca. Se ha presentado la capacidad de S1P para estimular la angiogénesis en cultivo celular y en tejido no cardíaco [Lee, 1999 núm. 1508]. Evidencia reciente sugiere que S1P administrado de forma exógena cruza la barrera de sangre-cerebro y promueve la vasoconstricción cerebral (Tosaka et al., *Stroke* 32:2913-2919. 2001). Esto sugiere que los esfingolípidos derivados de fuentes cardíacas u otras no cerebrales podrían contribuir al ictus. En consecuencia, interferir con la producción y/o acción de esfingolípidos puede ser beneficioso para mitigar el ictus, particularmente en ictus provocado por enfermedad vascular periférica, aterosclerosis y trastornos cardíacos.

Se ha sugerido que un suceso temprano en el curso de isquemia cardíaca (es decir, falta de suministro de sangre al corazón) es una producción en exceso por el músculo cardíaco del compuesto esfingosina que se da de forma

natural, y que otros metabolitos, particularmente esfingosina-1-fosfato (S-1-P) también se producen por el tejido cardiaco en sí mismo o por componentes de la sangre como consecuencia de producción de esfingolípido cardiaco y posterior conversión en la sangre. La presente invención proporciona composiciones y composiciones para usar para inhibir y/o activar la producción y/o metabolismo de esfingolípidos. Más específicamente, la presente invención proporciona métodos y las composiciones que pueden bloquear la producción de SPH, S-1-P y otros metabolitos inhibiendo y/o activando enzimas metabólicas y/o receptores de esfingolípido involucrados en las rutas metabólicas de esfingolípidos. Como o bien la hipoxia per se y/o el TNF $\alpha$  derivado cardiaco y/u otras citoquinas pueden desencadenar la cascada de transducción de señal de esfingomielina en el corazón para aumentar la producción de SPH, S-1-P y otros metabolitos, la presente invención también proporciona composiciones y composición para bloquear la liberación de citoquina y/o su acción.

La presente invención proporciona así composiciones y una composición para usar para reducir niveles en sangre y tejido de esfingolípidos clave, por ejemplo, SPH y S-1-P. Dichas composiciones son anticuerpos monoclonales y/o policlonales dirigidos a S-1-P, que puede usarse, por ejemplo, para unirse y así disminuir la concentración efectiva de S-1-P indeseable en la sangre completa. La presente invención también proporciona composiciones para reducir indirectamente los niveles en sangre y tejido, absolutos o efectivos (disponibles) de S-1-P, que incluyen aunque no están limitadas a composiciones para inhibir y/o activar enzimas implicada en las rutas metabólicas de esfingolípidos; para el uso de fragmentos solubles que contienen el dominio de unión a esfingolípidos de enzimas implicadas en el metabolismo de esfingolípidos, o el dominio de unión de proteínas de unión a esfingolípidos, para unir y reducir la concentración efectiva de esfingolípidos indeseables; para el uso de mutantes dominantes negativos (también conocido como "transdominante") de receptores de esfingolípidos y enzimas implicadas en el metabolismo de esfingolípidos; para una revisión del metabolismo de esfingolípidos, véase Liu et al., Crit Rev. Clin. Lab. Sci. 36:511-573, 1999.

La presente invención proporciona también composiciones para inhibir la acción o expresión de citoquinas, interferonas, quimioquinas y similares, que pueden modular sucesos que se dan durante la ruta de señalización de esfingomielina. Esta ruta, que se ha sugerido se activa durante la isquemia/hipoxia cardiaca (Bielawska et al., Am. J. Pathol. 151:1257-1263, 1997; Meldrum, Am. J. Physiol. 274:R577-R595, 1998; y Cain et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 31:931-947, 1999), y que se estimula mediante citoquinas, interferonas, quimioquinas y similares, dan por resultado finalmente la producción de ceramida aumentada. Un nivel aumentado de ceramida se esperaría, a su vez, que de por resultado concentraciones elevadas de esfingolípidos indeseables tales como, por ejemplo, S-1-P y SPH. Para revisiones de la ruta de señalización de esfingomielina, véase Hannun et al., Adv. Lipid Res. 25:27-41, 1993; Liu et al., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 36:511-573, 1999; Igarashi, J. Biochem. 122:1080-1087, 1997; Oral et al., J. Biol. Chem. 272:4836-4842, 1997; y Spiegel et al., Biochemistry (Moscow) 63:69-83, 1998.

#### Esfingolípidos

Las composiciones terapéuticas de la invención se dice que están "basadas en esfingolípidos" para indicar que estas terapias pueden cambiar la(s) concentración(ones) relativa, absoluta o disponible de ciertos esfingolípidos indeseables, tóxicos o cardiotoxicos. "Esfingolípidos tóxicos" son aquellos que pueden, bajo ciertas circunstancias, alterar la función normal de células tal como los que provocan o aumentan la necrosis y/o apoptosis de células, que incluyen, en algunos ejemplos, tipos de células particulares que se encuentran en tejidos u órganos específicos. "Esfingolípidos cardiotoxicos" son esfingolípidos tóxicos que provocan directa o indirectamente un estado inotrópico negativo o provocan o aumentan la necrosis y/o apoptosis de células encontradas en o asociadas con el corazón, que incluyen aunque no están limitadas a cardiomiocitos, neuronas cardiacas y similares, y/o pueden provocar pérdida de función cardiaca debido a los efectos inotrópicos negativos, vasoconstricción/espasmo coronario arritmico de los esfingolípidos y/o sus metabolitos. "Esfingolípidos indeseables" incluyen esfingolípidos tóxicos y cardiotoxicos, además de metabolitos, particularmente precursores metabólicos, de esfingolípidos tóxicos y cardiotoxicos. Esfingolípidos indeseables de interés particular incluyen aunque no están limitados a ceramida (CER), esfingosina-1-fosfato (S-1-P) y esfingosina (SPH).

Los esfingolípidos son una única clase de lípidos que llevan, debido a su naturaleza inicialmente misteriosa, el nombre del Sphinx. Los esfingolípidos se caracterizaron inicialmente como componentes estructurales primarios de membranas celulares, aunque estudios recientes indican que los esfingolípidos también sirven como moléculas reguladoras y de señalización celular (Hannun et al., Adv. Lipid Res. 25:27-41, 1993; Spiegel et al., FASEB J. 10:1388-1397, 1996; Igarashi, J. Biochem 122:1080-1087, 1997). Las rutas metabólicas para esfingolípidos se muestran en las Figuras 1 y 2.

Un grupo de esfingolípidos de interés particular es el conjunto de esfingolípidos implicados en la ruta de transducción de la señal de esfingomielina (Hannun et al., Adv. Lipid Res. 25:27-41, 1993; Liu et al., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 36:511-573, 1999). A este respecto, se han estudiado ceramida, esfingosina y esfingosina-1-fosfato lo más ampliamente (Hannun et al., Science 243:500-507, 1989). Las moléculas de señalización de esfingolípidos se derivan de esfingomielina e incluyen aunque no están limitadas a esfingosina [(SPH; D(+)-eritro-2-amino-4-*trans*-octadeceno-1,3-diol o esfingenina)], esfingosina-1-fosfato (S-1-P), ceramida (CER), además de esfingosilfosforilcolina (SPC) (véase Figura 1).

Ceramida y esfingomielina (SPH) son segundos mensajeros intracelulares activados por la cascada de transducción de señal de esfingomielina que se da en respuesta a citoquinas inflamatorias tal como TNF $\alpha$ ,  $\gamma$ IFN y IL-1 $\beta$ , y en respuesta a isquemia/reperfusión (Bielawska et al., *Am. J. Pathol.* 151:1257-1263, 1997; Zager et al., *Kidney Int.* 54:60-70, 1997).

5 Las acumulaciones de ceramida se ha supuesto que se dan en isquemia de cerebros humano y de rata, y en isquemia renal (Kubota et al., *Japan J Exp. Med.* 59:59-64, 1989; Kubota et al., *Neuro. Res.* 18:337-341, 1996; y Zager et al., *Kidney Int.* 54:60-70, 1997). Además, S1P provoca vasoconstricción cerebral (Tosaka et al., *Stroke* 32:2913-2919, 2001). Tomados juntos, se razona que o bien esfingolípidos derivados del cerebro o no derivados del cerebro pueden contribuir al ictus y que interfiriendo con la producción y/o acción de esfingolípidos pueden mitigar el ictus.

10 Hernández et al. (*Circ. Res.* 86:198-204, 2000) se afirma que muestra que una de las respuestas más tempranas de miocitos cardiacos a hipoxia y reoxigenación es la activación de esfingomielinasa neutra y la acumulación de ceramida. SPH se ha implicado supuestamente como que media un suceso de señalización temprana en la muerte celular apoptótica en una variedad de tipos de células (Ohta et al., *FEBS Letters* 355:267-270, 1994; Ohta et al., *Cancer Res.* 55:691-697, 1995; Cuvillier et al., *Nature* 381:800-803, 1996). Se postula que los efectos cardiotoxicos de hipoxia pueden dar por resultado parte de producción de esfingolípidos y/o de la producción inapropiada de otros metabolitos (por ejemplo, protones, calcio, ciertos radicales libres) o moléculas de señalización (por ejemplo, MAP quinasas, caspasas) que afectan de forma adversa a la función cardiaca.

15 S-1-P se almacena en las plaquetas y es un constituyente normal del plasma y suero humano (Yatomi et al., *J Biochem.* 121:969-973, 1997). Sugiyama et al. (*Cardiovascular Res.* 46:119-125, 2000) se afirma que demuestra que S-1-P es un vasoconstrictor coronario y tiene otros efectos biológicos en corazones caninos. Siess *et al.* ha propuesto un papel para S-1-P en la arterosclerosis (*IUBMB Life* 49:161-171, 2000). Esto se ha soportado por otros datos, que incluyen la evidencia de que el efecto protector de HDL es debido al bloqueo de la producción de S1P (Xia et al., *PNAS* 95:14196-14201, 1998; Xia et al., *J Biol Chem* 274:33143-33147, 1999).

20 El tratamiento de células cardiacas neonatales y adultas en cultivo con niveles fisiológicamente relevantes de SPH y su metabolito inmediato, S-1-P, se ha relacionado con la activación de muerte celular de cardiomiocito por apoptosis, una forma de muerte celular programada que puede contribuir al tamaño del infarto de miocardio (Krown et al., *J. Clin. Invest.* 98:2854-2865, 1996; Zechner et al., *J. Biol. Chem.* 273:8232-8239, 1998; Kajstura et al., *Lab. Invest.* 74:86-107, 1996).

25 Cordis et al. (*J. Pharm. and Biomed. Analysis* 16:1189-1193, 1998) afirma que los niveles de esfingosina se reducen en corazones de rata con isquemia/reperfundidos. En contraste, sin embargo, Bielawska et al., *Am. J. Pathol.* 151:1257-1263, 1997) se afirma que presenta evidencia de que los niveles del precursor metabólico inmediato de SPH, ceramida, se aumentan en cardiomiocitos neonatales de rata perfundidos bajo condiciones isquémicas.

30 La esfingomielina, el precursor metabólico de ceramida, se ha afirmado que se aumenta en animales experimentales sometidos a hipoxia (Sergeev et al., *Kosm. Biol. Aviakosm. Med. (Russian)* 15:71-74, 1981). Se ha afirmado que otros estudios muestran que las membranas internas de las células musculares contienen altas cantidades de SPH y esfingomielina (Sumnicht et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 215:628-637, 1982; Sabbadini et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193:752-758, 1993). El tratamiento de animales experimentales con toxinas fúngicas fumonisina B dan por resultado el aumento de niveles en suero de SPH y DHSPH (S1P no se midió) con efectos inotrópicos negativos coincidentes en el corazón (Smithe et al., *Toxicological Sciences* 56:240-249, 2000).

#### Modulación del metabolismo de esfingolípidos para beneficio terapéutico

Una forma de controlar la cantidad de esfingolípidos indeseables en un paciente es alterar la actividad de una enzima que cataliza una reacción que es parte del metabolismo de esfingolípidos (véanse Figuras 1 y 2). Específicamente, para disminuir la cantidad de esfingolípidos indeseables, se pueden inhibir o bloquear las enzimas implicadas en el anabolismo de esfingolípidos (metabolismo constructivo, es decir, reacciones que llevan a la producción de esfingolípidos indeseables). Adicional o alternativamente, se pueden estimular o activar las enzimas implicadas en el catabolismo de esfingolípidos (metabolismo destructivo, es decir, reacciones que llevan a la ruptura de esfingolípidos indeseables). Para detalles adicionales, véanse los Ejemplos 7-10.

45 Hay varias enzimas implicadas en la ruta metabólica de esfingolípidos que pueden inhibirse para reducir la cantidad de esfingolípidos indeseables. Como se explica en esta memoria, debido a sus efectos nocivos en las células y tejidos cardiacos, dos esfingolípidos particularmente indeseables son SPH y S-1-P. Las enzimas que se inhiben con el propósito de disminuir los niveles de SPH, S-1-P y/u otros esfingolípidos indeseables se asignan a diferentes clases en base al(a los) producto(s) de la reacción que catalizan.

50 De forma similar, hay varias enzimas implicadas en el metabolismo de esfingolípidos que pueden estimularse para reducir la cantidad de esfingolípidos indeseables que incluyen aunque no están limitados a SPH y S-1-P. La estimulación de estas enzimas lleva a una degradación más rápida de esfingolípidos indeseables. Las enzimas que se estimulan con el propósito de disminuir los niveles de SPH, S-1-P y otros esfingolípidos indeseables se asignan a diferentes clases en base a si promueven la producción o degradación de un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o

cardiotóxico seleccionado o un precursor del mismo. En general, las enzimas que catalizan la producción de un esfingolípido indeseable, tóxico y/o cardiotóxico o su precursor se inhiben, mientras que las enzimas que catalizan la degradación del esfingolípido indeseable, tóxico y/o cardiotóxico se estimulan.

#### **Esfingolípidos de unión, y receptores de los mismos, para beneficio terapéutico.**

- 5 Una forma de controlar la cantidad de esfingolípidos indeseables en un paciente es proporcionando una composición que se une a uno o más esfingolípidos, o receptores de los mismos.

Los anticuerpos y otros compuestos que se unen a esfingolípidos indeseables pueden usarse como "esponjas" terapéuticas que reducen el nivel de esfingolípidos indeseables libres. Cuando se afirma que un compuesto está "libre", el compuesto no está de ninguna forma restringido de alcanzar el sitio o sitios donde ejerce sus efectos indeseables. Típicamente, un compuesto libre está presente en el sistema cardiovascular, que o bien contiene el(los) sitio(s) de acción del compuesto libre, o del que un compuesto puede migrar libremente a su(s) sitio(s) de acción. Un compuesto libre puede además estar disponible para estar afectado por cualquier enzima que convierte el compuesto en un compuesto indeseable.

15 Los anticuerpos y otros compuestos que se unen a los receptores celulares de esfingolípidos indeseables pueden usarse para competir con y/o evitar que los esfingolípidos se unan a receptores y provocar o aumentar así sucesos celulares o bioquímicos indeseables. Dichos sucesos incluyen, aunque no están limitados a, la entrada de esfingolípidos indeseables en las células, iniciación de la ruta en cascada de señal que tiene un resultado indeseable, y una reacción, que puede catalizarse mediante una enzima, que produce un producto indeseable. Los receptores de interés incluyen aunque no están limitados a receptores Edg, SCaMPER y otros receptores que se unen a esfingolípidos, y receptores para citoquinas, que incluyen aunque no están limitados al receptor TNF $\alpha$ .

20 Un anticuerpo que se une a S-I-P para el uso según las reivindicaciones 7-12 es un anticuerpo de la invención.

#### **Anticuerpos**

Varios anticuerpos se han aprobado recientemente para uso terapéutico en seres humanos por la Administración Federal de Fármacos (Kling, Mod. Drug Disc. 2:33-45, 1999). En un aspecto de la terapia cardiovascular basada en esfingolípidos, los anticuerpos que se unen a esfingolípidos pueden repartirse a un paciente, por ejemplo, incorporación en composiciones farmacéuticas, dispositivos médicos y similares, para el uso en terapia cardiovascular basada en esfingolípidos. Dichos métodos pueden, por medio de ejemplo no limitante, (1) modular la concentración efectiva de un esfingolípido indeseable, tóxico y/o cardiotóxico o un precursor metabólico del mismo; (2) inhibir estéricamente la unión de un esfingolípido a un receptor celular debido a ello, o disminuir la concentración de un esfingolípido que está disponible para la unión a dicho receptor; (3) inhibir estéricamente la conversión enzimática de un precursor metabólico de un esfingolípido indeseable, tóxico y/o cardiotóxico, o disminuir la concentración de dicho precursor que está disponible por conversión enzimática en un esfingolípido indeseable, tóxico y/o cardiotóxico; y (4) eliminar esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotóxicos y sus precursores metabólicos a partir de sangre in vivo o ex vivo.

35 El término "anticuerpo" se pretende que abarque una molécula de inmunoglobulina obtenida por generación in vitro o in vivo de una respuesta inmunogénica, e incluye anticuerpos policlonales, monoespecífico y monoclonales, además de receptores de células T, y fragmentos y derivados de los mismos. Una "respuesta inmunogénica" es una que da por resultado la producción de anticuerpos dirigidos a una o más proteínas después de que las células apropiadas se han puesto en contacto con dichas proteínas, o derivados polipeptídicos de los mismos, de una manera tal que una o más partes de la proteína funcionan como epítopos. Un epítipo es un determinante antigénico sencillo en una molécula. En las proteínas, particularmente proteínas desnaturalizadas, un epítipo se define y representa típicamente por una secuencia de aminoácidos contiguos. Sin embargo, en el caso de proteínas no desnaturalizadas, los epítopos incluyen además estructuras, tales como sitios activos, que están formados por el plegamiento tridimensional de una proteína en una manera tal que los aminoácidos de partes separadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína se ponen en íntimo contacto físico los unos con los otros.

Los anticuerpos policlonales se generan en una respuesta inmunogénica a una proteína que tiene muchos epítopos, y así incluyen una variedad de diferentes anticuerpos dirigidos a diferentes epítopos en la proteína. Los métodos para producir anticuerpos policlonales se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Cooper et al., Sección III del Capítulo 11 en: Short Protocols in Molecular Biology, 2ª Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, Nueva York, 1992, páginas 11-37 a 11-41).

Los anticuerpos monoespecíficos (también conocidos como anticuerpos antipeptido) se generan en una respuesta humoral a un polipéptido inmunogénico corto (típicamente, 5 a 20 aminoácidos) que corresponde a unos pocos (preferiblemente uno) epítopos aislados de la proteína a partir de la cual se deriva. Una pluralidad de anticuerpos monoespecíficos incluyen una variedad de anticuerpos diferentes dirigidos a una parte específica de la proteína, es decir, a una secuencia de aminoácidos que contiene al menos un, preferiblemente solo un, epítipo. Los métodos para producir anticuerpos monoespecíficos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Id., páginas 11-42 a 11-46).

Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo específico que reconoce un único epítipo específico de una proteína inmunogénica. En una pluralidad de un anticuerpo monoclonal, cada molécula de anticuerpo es idéntica a las otras en la pluralidad. Para aislar un anticuerpo monoclonal, la línea celular clonal que expresa, presenta y/o secreta un anticuerpo monoclonal particular se identifica primero; esta línea celular clonal puede usarse en un método para producir los anticuerpos de la invención. Los métodos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales expresados así se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Fuller et al., Sección II del Capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, 2ª Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, Nueva York, 1992, páginas 11-22 a 11-11-36).

Los receptores de células T (TCR) son una clase distinta de proteínas que están relacionadas genética y estructuralmente a anticuerpos. Las proteínas TCR pertenecen a la superfamilia de proteínas de inmunoglobulinas y tienen estructuras moleculares similares a las de los anticuerpos y, como los anticuerpos, reconocen específicamente (es decir, específicamente y se unen) a ligandos específicos. Los complejos de TCR se presentan en células T y se unen a antígenos específicos con el propósito de desencadenar sucesos moleculares asociados con la diferenciación y activación de células T. Como los anticuerpos, las proteínas TCR reconocen antígenos particulares. Sin embargo, por las diferencias en las estructuras precisas de las partes de proteínas TCR que se unen a ligandos y las secuencias de aminoácidos asociadas con esas estructuras, además de los diferentes mecanismos por los que los genes que codifican una proteína se diversifican por redistribución y mutación. Así, las "reglas moleculares" para la unión específica de moléculas TCR a sus ligandos son diferentes de las de los anticuerpos, y el uso de proteínas TCR expande la población de proteínas de unión a esfingolípidos potenciales.

Los fragmentos de anticuerpo y derivados son proteínas que se derivan de anticuerpos y receptores de células T y que retienen la capacidad de reconocer de forma específica el ligando reconocido por el anticuerpo "parental" o TRC (véase Gaviñondo et al., *BioTechniques* 29:128-145, 2000 y Morrow, *Amer. Lab.* 32:15-19, 2000). Fragmentos preferidos incluyen fragmentos Fab (es decir, un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio de unión a antígeno y comprende una cadena ligera y parte de una cadena pesada unida mediante puente por un enlace disulfuro); Fab' (un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio anti-unión sencillo que comprende un Fab y una parte adicional de la cadena pesada a través de la región en bisagra); F(ab')<sub>2</sub> (dos moléculas Fab' unidas por enlaces disulfuro intercadenas en las regiones en bisagra de las cadenas pesadas; las moléculas Fab' pueden dirigirse hacia los mismos o diferentes epítopos); un Fab biospecífico (una molécula Fab que tiene dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los que pueden dirigirse a un epítipo diferente); y dominios VH camelizados (la región determinante de unión a antígeno, variable, de una única cadena pesada de un anticuerpo en que algunos aminoácidos en la interfase VH son los encontrados en la cadena pesada de anticuerpos camélidos que se dan de forma natural).

Los anticuerpos de cadena sencilla (scFv) comprenden una región variable, también conocida como, una scFv (la región determinante de unión a antígeno, variable, de una única cadena ligera y pesada de un anticuerpo unida por una cadena de 10-25 aminoácidos). Para revisiones, véase Raag et al., *Single-chain Fvs*. *FASEB J.* 9:73-80, 1995, y Hudson, *Recombinant antibody fragments*. *Curr. Op. Biotechnol.* 9, 395-402, 1999. Véase también Bird et al., *Single-chain antigen-binding proteins*. *Science* 242, 423-426, 1988 y las Patentes de EE.UU. 5.260.203; 5.869.620; 5.455.030; 5.518.889; 5.534.621; 4.946.778; 6.025.165; y 6.027.725.

La técnica bien conocida de presentación de fago se usa para preparar moléculas scFv. Para revisiones, véase Winter et al., *Making antibodies by phage display technology*. *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994; Little et al., *Surface display of antibodies*. *Biotechn. Adv.* 12:539-555, 1994; y Burton et al., *Human antibodies from combinatorial libraries*. *Adv. Immunol.* 57:191-280, 1994. Véase también las Patentes de EE.UU. 5.821.047; 5.702.892; 6.031.071; y 6.310.191.

Los complejos de anticuerpos de cadena sencilla también están en el alcance de la invención e incluyen, aunque no están limitados a, un Fv unido por disulfuro, o dsFv (la región determinante de unión al antígeno, variable, de una única cadena ligera y pesada de un anticuerpo unidas por un enlace disulfuro); un sFv biospecífico (una molécula scFv o una dsFv que tiene dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los que pueden dirigirse a un epítipo diferente); un diacuerpo (un scFv dimerizado formado cuando el dominio VH de un primer scFv se junta con el dominio VL de un segundo scFv y el dominio VL del primer scFv se junta con el dominio VH del segundo scFv; las dos regiones de unión al antígeno del diacuerpo pueden dirigirse hacia los mismos o diferentes epítopos); y un triacuerpo (un sFv trimerizado, formado de una manera similar a un diacuerpo, aunque en el que se crean tres dominios de unión a antígeno en un complejo sencillo; los tres dominios de unión a antígeno pueden dirigirse hacia los mismos o diferentes epítopos).

El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos diseñados genéticamente y/o anticuerpos producidos por técnicas de ADN recombinante y anticuerpos "humanizados". Los anticuerpos humanizados se han modificado, por manipulación genética y/o tratamiento *in vitro* para ser más humanos, en términos de secuencia de aminoácidos, patrón de glucosilación, etc., para reducir la antigenicidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en un animal al que se pretende administrar el anticuerpo (Gussow et al., *Methods Enz.* 203:99-121, 1991). Un anticuerpo que se une a S-I-P para el uso como se describe en las reivindicaciones 7 a 12 es un anticuerpo de la invención.

## Métodos de preparación de anticuerpos y variantes de anticuerpo.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención pueden producirse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, in vivo (en el caso de anticuerpos policlonales y monoespecíficos), en cultivos celulares (como es típicamente el caso de anticuerpos monoclonales, en donde las células de hibridoma que expresan el anticuerpo deseado se cultivan bajo condiciones apropiadas), en reacción de traducción in vitro, y en sistemas de expresión de ADN recombinante (Johnson et al., *Methods Enz.* 203:88-98, 1991). Los anticuerpos y variantes de anticuerpos pueden producirse a partir de una variedad de células animales, preferiblemente de células de mamífero, siendo las preferidas particularmente células murinas y humanas. Los anticuerpos que incluyen anticuerpos que no se dan de forma natural y variantes del receptor de células T que retienen solo la capacidad de señalización del antígeno deseado conferida por un(os) sitio(s) de unión al antígeno de un anticuerpo pueden producirse por técnicas de cultivo celular conocidas y sistemas de expresión de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Johnson et al., *Methods in Enzymol.* 203:88-98, 1991; Molloy et al., *Mol. Immunol.* 32:73-81, 1998; Schodin et al., *J. Immunol. Methods* 200:69-77, 1997). Los sistemas de expresión de ADN recombinante se usan típicamente en la producción de variantes de anticuerpos tales como, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y moléculas sFv.

Los sistemas de expresión de ADN recombinante preferidos incluyen aquellos que utilizan células huésped y construcciones de expresión que se han diseñado para producir altos niveles de una proteína particular. Células huésped y construcciones de expresión preferidas incluyen *Escherichia coli*; construcciones de expresión de acumulación derivados de plásmidos o virus (bacteriófago); levadura tal como construcciones de expresión integradas cromosómicamente o acumulaciones episomáticas de *Sacharomyces cerevisiae* o *Fichia pastoras*; células de insecto y virus tales como células Sf 9 y baculovirus; y construcciones de expresión de acumulación episomal o cromosómicamente integrados (por ejemplo, retroviral) en células de mamífero (para una revisión, véase Verma et al., *J. Immunol. Methods* 216:165-181, 1998). Los anticuerpos pueden producirse además en plantas (Patente de EE.UU. 6.046.037; Ma et al., *Science* 268:716-719, 1995) o mediante tecnología de presentación de fagos (Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994).

Cepas de Xenorotón son ratones diseñados genéticamente en que los loci IgH e Igk de murina se han sustituido de forma funcional por sus contrapartes Ig en transgenes YAC artificiales de levadura. Estos transgenes Ig humanos pueden portar la mayoría del repertorio variable humano y puede sufrir cambio de clase de isotipos IgM a IgG. El sistema inmune del xenorotón reconoce antígenos humanos administrados como extraños y produce una fuerte respuesta humoral. El uso de Xenorotón en conjunto con técnicas hibridomas bien establecidas, da por resultado mAbs IgG totalmente humanos con afinidades sub-nanomolares para antígenos humanos (véanse las Patentes de EE.UU. núms. 5.770.429, titulada "Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies"; 6.162.963, titulada "Generation of Xenogenetic antibodies"; 6.150.584, titulada "Human antibodies derived from immunized xenomice"; 6.114.598, titulada "Generation of xenogenetic antibodies"; y 6.075.181, titulada "Human antibodies derived from immunized xenomice"; para revisiones, véase Green, *Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies*, *J. Immunol. Methods* 231:11-23, 1999; Wells, Eek, a *XenoMouse: Abgenix, Inc.*, *Chem Biol* Agosto de 2000; 7(8):R185-6; y Davis et al., *Transgenic mice as a source of fully human antibodies for the treatment of cancer* *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18(4):421-5).

## Fragmentos de receptor solubles

Los polipéptidos solubles derivados de receptores de esfingolípido, típicamente hidrofóbicos, unidos a la membrana, que retienen la capacidad del receptor para unirse a esfingolípidos pueden usarse también para unirse a esfingolípidos y metabolitos de esfingolípido. En el caso de receptores Edg, en algunos ejemplos, residuos particulares de aminoácido pueden estar implicados en la especificidad de la unión al esfingolípido, es decir, los aminoácidos que determinan que esfingolípido se une por un receptor específico (Parrill et al., "Identification of Edg1 Receptor Residues That Recognize Sphingosine 1-Phosphate", *J. Biol. Chem.* 275:39379-39384, 2000; y Wang et al., "A Single Amino Acid Determines Lysophospholipid Specificity of the S1P1(EDG1) and LPA1 (EDG2) Phospholipid Growth Factor Receptors", *JBC Papers in Press* Publicado el 16 de octubre de 2001 como Manuscrito M107301200). Dicha información puede usarse para proporcionar fragmentos de receptor soluble que comprenden residuos de receptor de interés, es decir, los tramos de aminoácidos que se unen al esfingolípido. Los fragmentos de receptor soluble derivados del receptor TNF $\alpha$  soluble de forma natural se han preparado y al menos uno de estos, ENBREL® (Etanercept) está en desarrollo como un agente terapéutico para la artritis. Además, la modificación de dichos residuos puede permitir al experto adaptar las especificidades de unión y/o afinidad de los fragmentos del receptor soluble.

Los fragmentos de receptor soluble de interés particular incluyen Edg-1, Edg-3, Edg-5, Edg-6 y Edg-8, todos los cuales se unen al esfingolípido indeseable esfingosina-1-fosfato (S-1-P). Los receptores Edg-1, Edg-3, Edg-5 son de interés particular porque la unión de S-1-P a ellos parece estimular la producción de S-1-P intracelular (Heringdorf et al., *Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors*, *Eur J Pharmacol.* 414:145-54, 2001). El receptor P2Y(2) es de interés ya que también aumenta la producción intracelular de S-1-P (Alemany et al., *Stimulation of sphingosine-1-phosphate formation by the P2Y(2) receptor in HL-60 cells: Ca(2+) requirement and implication in receptor-mediated Ca(2+) mobilization, but not MAP kinase activation*, *Mol Pharmacol.* 58:491-7, 2000).

Los fragmentos de receptor solubles pueden prepararse de varias formas que incluyen aunque no están limitadas a digestión proteolítica de células o preparados de membrana celular que comprenden el receptor (Bartfeld et al., Active acetylcholine receptor fragment obtained by tryptic digestion of acetylcholine receptor from Torpedo californica, *Biochem Biophys Res Commun.* 89:512-9, 1979; Borhani et al., Crystallization and X-ray diffraction studies of a soluble form of the human transferrin receptor, *J Mol Biol.* 218:685-9, 1991), tecnologías de ADN recombinante (Marlovits et al., Recombinant soluble low-density lipoprotein receptor fragment inhibits common cold infection, *J Mol Recognit.* 11:49-51, 1998; Huang et al., Expression of a human thyrotrophin receptor fragment in *Escherichia coli* and its interaction with the hormone and autoantibodies from patients with Graves' disease, *J Mol Endocrinol.* 8:137-44, 1992), o por síntesis in vitro de oligopéptidos.

## 10 Ácidos nucleicos

Tradicionalmente, las técnicas para detectar y purificar moléculas diana han usado polipéptidos, tales como anticuerpos, que se unen de forma específica a dichas dianas. Mientras los ácidos nucleico se han conocido desde hace tiempo por unirse específicamente a otros ácidos nucleicos (por ejemplo, los que tienen secuencias complementarias), los aptámeros (es decir, ácidos nucleicos que se unen a moléculas diana no nucleicas) se han descrito. Véase, por ejemplo, Blackwell et al., *Science* (1990) 250:1104-1110; Blackwell et al., *Science* (1990) 250:1149-1152; Tuerk et al., *Science* (1990) 249:505-510; Joyce, *Gene* (1989) 82:83-87; y Patente de EE.UU. 5.840.867 titulada "Aptamer analogs specific for biomolecules".

Como se aplica a los aptámeros, el término "unión" excluye específicamente las interacciones de unión tipo "Watson-Crick" (es decir, emparejamiento de bases A:T y G:C) asociadas tradicionalmente con la doble hélice de ADN. El término "aptámero" se refiere así a un ácido nucleico o un derivado de ácido nucleico que se une específicamente a una molécula diana, en donde la molécula diana es o bien (i) una que no es ácido nucleico, o (ii) un ácido nucleico o un elemento estructural del mismo que se une a través de mecanismos diferentes del emparejamiento de base tipo duplex o triplex. Dicha molécula se denomina una "molécula no nucleica" en esta memoria.

## 25 Estructuras de ácidos nucleicos.

"Ácidos nucleicos," como se usa en esta memoria, se refiere a ácidos nucleicos que se aíslan de una fuente natural; preparados in vitro, usando técnicas tales como amplificación PCR o síntesis química; preparados in vivo, por ejemplo, por medio de tecnología de ADN recombinante; o mediante cualquier método apropiado. Los ácidos nucleicos pueden ser de cualquier forma (lineal, circular, etc.) o topología (de hebra sencilla, de hebra doble, superenrollada, etc.). El término "ácidos nucleicos" también incluye sin limitación derivados de ácido nucleico tal como ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y conjugados de ácido nucleico-polipeptídico; ácidos nucleicos que tienen al menos un residuo de azúcar, esqueleto, unión de internucleótido, base, nucleósido o análogo de nucleótido, modificado químicamente; además de ácidos nucleicos que tienen extremos 5' o 3' modificados químicamente; y ácidos nucleicos que tienen dos o más de dichas modificaciones. No todas las uniones en un ácido nucleico necesitan ser idénticas.

Los ácidos nucleicos que son aptámeros a menudo están, aunque no necesitan estar, preparados como oligonucleótidos. Los oligonucleótidos incluyen sin limitación moléculas de ARN, ADN y ARN-ADN mixto que tienen secuencias de longitudes que tienen longitudes mínimas de 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos, y longitudes máximas de aproximadamente 100, 75, 50, 40, 25, 20 o 15 o más nucleótidos, independientemente. En general, un mínimo de 6 nucleótidos, preferiblemente 10 nucleótidos, más preferiblemente 14 a 20 nucleótidos, es necesario para efectuar uniones específicas.

En general, los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN de hebra sencilla (hs) o de hebra doble (hd), o conjugados (por ejemplo, moléculas de ARN que tienen "abrazaderas" de ADN 5' y 3') o híbridos (por ejemplo, moléculas emparejadas de ARN:ADN) o derivados (formas modificadas químicamente de los mismos). Sin embargo, se prefiere ADN de hebra sencilla, ya que el ADN es a menudo menos lábil que el ARN. De forma similar, se prefieren modificaciones químicas que aumentan una especificidad o estabilidad del aptámero.

## Modificaciones químicas de ácidos nucleicos

Las modificaciones químicas que pueden incorporarse en aptámeros y otros ácidos nucleicos incluyen, sin ninguna limitación ni exclusividad, modificaciones de bases, modificaciones de azúcar y modificaciones de esqueleto.

50 Modificaciones de base: Los residuos de base en aptámeros pueden ser distintos de las bases que se dan de forma natural (por ejemplo, A, G, C, T, U, 5MC y similares). Los derivados de purinas y pirimidinas se conocen en la técnica; una lista ejemplar aunque no exhaustiva incluye aziridinilcitosina, 4-acetilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina (5MC), N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-6-isopenteniladenina, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-oxiacético y 2,6-diaminopurina. Además de ácidos nucleicos que incorporan uno o más de

dichos derivados de base, los ácidos nucleicos que tienen residuos de nucleótido que están desprovistos de una base de purina o una pirimidina pueden estar incluidos también en aptámeros.

- 5 Modificaciones de azúcar: Los residuos de azúcar en aptámeros pueden ser distintos de residuos de ribosa y desoxirribosa convencional. Por medio de ejemplo no limitante, la sustitución en la posición 2' del residuo de furanosa aumenta la estabilidad de nucleasa. Una lista ejemplar, aunque no exhaustiva, de residuos de azúcar modificados incluye azúcares sustituidos en 2' tal como 2'-O-metil-, 2'-O-alquil-, 2'-O-alil-, 2'-S-alquil-, 2'-S-alil-, 2'-fluoro-, 2'-halo-, o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricas tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido abásico tal como ribósido de metilo, ribósido de etilo o ribósido de propilo.
- 10 Modificaciones de esqueleto: Los esqueletos modificados químicamente incluyen, por medio de ejemplo no limitante, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otro alquilo que incluyen fosfonatos de 3'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos unidos 2'-5' de estos, y los que han invertido la polaridad en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósido están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. Los esqueletos modificados químicamente que no contienen un átomo de fósforo tienen esqueletos que se forman por uniones de internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, uniones mixtas de heteroátomo e internucleósido de alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones de internucleósido heteroatómico o heterocíclico de cadena corta, que incluyen sin limitación de uniones de morfolino; esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo de metileno; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenoimidazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; y esqueletos de amida.
- 15
- 20

#### Preparación e identificación de aptámeros

- 25 En general, las técnicas para identificar aptámeros implican incubar una molécula diana no nucleica preseleccionada con mezclas (2 a 50 miembros), acumulaciones (50 a 5.000 miembros) o bibliotecas (50 o más miembros) de diferentes ácidos nucleicos que son aptámeros potenciales bajo condiciones que permiten formar complejos de moléculas diana y aptámeros. Por "diferentes ácidos nucleicos" se quiere decir que la secuencia de nucleótidos de cada aptámero potencial puede ser diferente de la de cualquier otro miembro, esto es, las secuencias de los aptámeros potenciales son aleatorias con respecto los unos de los otros. La aleatoriedad puede introducirse en una variedad de maneras tales como, por ejemplo, mutagénesis, que puede llevarse a cabo in vivo exponiendo células que albergan un ácido nucleico con agentes mutagénicos, in vitro mediante tratamiento químico de un ácido nucleico, o in vitro por replicación bioquímica (por ejemplo, PCR) que se deja de forma deliberada que prosiga bajo condiciones que reducen la fidelidad del proceso de replicación; síntesis química aleatorizada, es decir, sintetizando una pluralidad de ácidos nucleicos que tienen una secuencia preseleccionada que, con respecto a al menos una posición en la secuencia, es aleatoria. Por "aleatoria a una posición en una secuencia preseleccionada" se entiende que una posición en una secuencia que se sintetiza normalmente como, por ejemplo, tan cerca a 100% de A como sea posible (por ejemplo, 5'-C-T-T-A-G-T-3') se deja sintetizarse de forma aleatoria a esa posición (C-T-T-N-G-T, en donde N indica una posición aleatorizada donde, por ejemplo, la reacción de sintetizado contiene 25% de cada uno de A, T, C y G; o x% de A, w% de T, y% de C y z% de G, en donde  $x + w + y + z = 100$ ). En etapas tardías del proceso, las secuencias están cada vez menos aleatorizadas y pueden aparecer secuencias de consenso; en cualquier caso, se prefiere obtener en último lugar un aptámero que tenga una única secuencia de nucleótidos.
- 30
- 35
- 40

- Los aptámeros y acumulaciones de aptámeros se preparan, identifican, caracterizan y/o purifican por cualquier técnica apropiada, que incluyen las que utilizan síntesis in vitro, técnicas de ADN recombinante, amplificación por PCR, y similares. Después de su formación, los complejos diana:aptámero se separan entonces de los miembros no complejados de la mezcla de ácido nucleico, y los ácidos nucleicos que pueden prepararse de los complejos son aptámeros candidatos (a etapas tempranas de la técnica, siendo los aptámeros generalmente una población de una multiplicidad de secuencias de nucleótidos que tienen grados variables de especificidad para la diana). El aptámero resultante (mezcla o acumulación) se sustituye entonces por el aptámero de partida (biblioteca o acumulación) en iteraciones repetidas de esta serie de etapas. Cuando se obtiene un número limitado (por ejemplo, una acumulación o mezcla, preferiblemente una mezcla con menos de 10 miembros, lo más preferiblemente 1) de ácidos nucleicos que tienen especificidad satisfactoria, el aptámero se secuencia y se caracteriza. Se generan preparados puros de un aptámero dado mediante una técnica apropiada (por ejemplo, amplificación de PCR, síntesis química in vitro y similares).
- 45
- 50

- Por ejemplo, Tuerk y Gold (Science (1990) 249:505-510) describe el uso de un procedimiento denominado "evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial" (SELEX). En este método, las acumulaciones de moléculas de ácido nucleico que se aleatorizan a posiciones específicas se someten a selección por unión a una proteína de unión a ácido nucleico (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT núm. WO 91/19813 y Patente de EE.UU. núm. 5.270.163). Los oligonucleótidos así obtenidos se secuencian y caracterización diferente. Kinzler, K. W., et al. (Nucleic Acids Res. (1989) 17:3645-3653) usó una técnica similar para identificar moléculas de ADN de hebra doble sintéticas que se unen de forma específica mediante polipéptidos de unión a ADN. Ellington, A. D., et al. (Nature (1990) 346: 818-822) describen la producción de un gran número de moléculas de ARN de
- 55
- 60



secuencia aleatoria y la selección e identificación de aquellas que se unen de forma específica a tintes específicos tales como azul Cibacron.

Otra técnica para identificar ácidos nucleicos que se unen a moléculas diana no nucleicas es la técnica combinatoria de oligonucleótidos descrita por Ecker, D. J. et al. (Nuc. Acids Res. 21, 1853 (1993)) conocida como "desaleatorización sintética de fragmentos aleatorizados" (SURF), que se basa en síntesis repetitiva y cribado de conjuntos cada vez más simplificados de bibliotecas, acumulaciones y mezclas análogas de oligonucleótidos (Tuerk, C. y Gold, L. (Science 249, 505 (1990)). La biblioteca de partida consiste en análogos de oligonucleótido de longitud definida con una posición en cada acumulación que contiene un análogo conocido y las posiciones restantes que contienen mezclas equimolares de todos los demás análogos. Con cada vuelta de síntesis y selección, la identidad de al menos una posición del oligómero se determina hasta que se descubren las secuencias de aptámeros de ligando de ácido nucleico optimizados.

Una vez que un aptámero candidato particular se ha identificado a través de SURF, SELEX o cualquier otra técnica, su secuencia de nucleótidos puede determinarse (como se conoce en la técnica), y su estructura molecular tridimensional puede examinarse por resonancia magnética nuclear (RMN). Estas técnicas se explican en relación a la determinación de la estructura tridimensional de un ligando de ácido nucleico que se une a trombina en Padmanabhan, K. et al., J. Biol. Chem. 24, 17651 (1993); Wang, K. Y. et al., Biochemistry 32, 1899 (1993); y Macaya, R. F. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90, 3745 (1993). Los aptámeros seleccionados pueden sintetizarse de nuevo usando una o más uniones de bases, azúcares o esqueleto modificadas. Los aptámeros consisten esencialmente de la secuencia mínima de ácido nucleico necesaria para conferir especificidad de unión, aunque pueden extenderse en el extremo 5', el extremo 3', o ambos, o pueden derivarse o conjugarse de otra forma.

#### Moléculas pequeñas

El término "molécula pequeña" incluye cualquier compuesto químico u otro resto, distinto de polipéptidos y ácidos nucleicos, que puede actuar para afectar los procesos biológicos. Las moléculas pequeñas pueden incluir cualquier número de agentes terapéuticos conocidos actualmente y usados, o pueden sintetizarse moléculas pequeñas en una biblioteca de dichas moléculas con el propósito de cribado por función(ones) biológica(s). Las moléculas pequeñas se distinguen de las macromoléculas por tamaño. Las moléculas pequeñas normalmente tienen peso molecular menor que aproximadamente 5.000 daltons (Da), preferiblemente menos que aproximadamente 2.500 Da, más preferiblemente menos que 1.000 Da, lo más preferiblemente menos que aproximadamente 500 Da.

Las moléculas pequeñas incluyen sin limitación compuestos orgánicos, peptidomiméticos y conjugados de los mismos. Como se usa en esta memoria, el término "compuesto orgánico" se refiere a cualquier compuesto basado en carbono distinto de macromoléculas tales como ácidos nucleicos y polipéptidos. Además de carbono, los compuestos orgánicos pueden contener calcio, cloro, flúor, cobre, hidrógeno, hierro, potasio, nitrógeno, oxígeno, azufre y otros elementos. Un compuesto orgánico puede estar en una forma aromática o alifática. Ejemplos no limitantes de compuestos orgánicos incluyen acetonas, alcoholes, anilinas, carbohidratos, monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, lípidos, retinoides, esteroides, proteoglicanos, cetonas, aldehídos, grasas saturadas, insaturadas y poliinsaturadas, aceites y ceras, alquenos, ésteres, éteres, tioles, sulfuros, compuestos cíclicos, compuestos heterocíclicos, imidazoles y fenoles. Un compuesto orgánico como se usa en esta memoria incluye también compuestos orgánicos nitrados y compuestos orgánicos halogenados (por ejemplo, clorados). Los métodos para preparar peptidomiméticos se describen a continuación. Las colecciones de moléculas pequeñas y las moléculas pequeñas se caracterizan por técnicas tales como espectrometría de masa en acelerador (AMS; véase Turteltaub et al., Curr Pharm Des 2000 6:991-1007, Bioanalytical applications of accelerator mass spectrometry for pharmaceutical research; y Enjalbal et al., Mass Spectrom Rev 2000 19:139-61, Mass spectrometry in combinatorial chemistry.)

Las moléculas pequeñas preferidas se fabrican, se formulan o se preparan de otra forma relativamente de forma más fácil y menos cara. Las moléculas pequeñas preferidas son estables bajo una variedad de condiciones de almacenaje. Las moléculas pequeñas preferidas pueden situarse en fuerte asociación con macromoléculas para formar moléculas que son biológicamente activas y que han mejorado las propiedades farmacéuticas. Las propiedades farmacéuticas mejoradas incluyen cambios en el tiempo de circulación, distribución, metabolismo, modificación, excreción, secreción, eliminación y estabilidad que son favorables a la actividad biológica deseada. Las propiedades farmacéuticas mejoradas incluyen cambios en las características toxicológicas y de eficacia de la entidad química.

#### Peptidomiméticos

En general, un polipéptido mimético ("peptidomimético") es una molécula que mimetiza la actividad biológica de un polipéptido, pero que no es peptídico en naturaleza química. Mientras, en ciertas realizaciones, un peptidomimético es una molécula que no contiene enlaces peptídicos (esto es, enlaces amida entre aminoácidos), el término peptidomimético puede incluir moléculas que no son completamente peptídicas en carácter, tales como pseudo-peptidos, semi-peptidos y peptoides. Ejemplos de algunos peptidomiméticos mediante la definición más amplia (por ejemplo, donde parte de un polipéptido se sustituye por una estructura que carece de enlaces peptídicos) se describen a continuación. Si son completamente o parcialmente no peptídicos en carácter, los peptidomiméticos

pueden proporcionar una disposición espacial de restos químicos reactivos que se parecen mucho a la disposición tridimensional de grupos activos en un polipéptido. Como resultado de esta geometría de sitio activo similar, el peptidomimético puede mostrar efectos biológicos que son similares a la actividad biológica de un polipéptido.

5 Hay varias ventajas potenciales para el uso de un compuesto mimético de un polipéptido dado mejor que el polipéptido en sí mismo. Por ejemplo, los polipéptidos pueden mostrar dos atributos indeseables, es decir, pobre biodisponibilidad y corta duración de acción. Los peptidomiméticos son a menudo lo suficientemente pequeños para ser tanto activos oralmente como para tener una larga duración de acción. Hay también problemas asociados con la estabilidad, almacenaje e inmunoreactividad para los polipéptidos que pueden obviarse con los peptidomiméticos.

10 Los polipéptidos candidatos, de partida y otros que tienen una actividad biológica deseada pueden usarse en el desarrollo de peptidomiméticos con actividades biológicas similares. Se conocen técnicas de desarrollo de peptidomiméticos a partir de polipéptidos. Los enlaces peptídicos pueden sustituirse por enlaces no peptídicos que permiten al peptidomimético adoptar una estructura similar, y por lo tanto actividad biológica, al polipéptido original. También pueden hacerse modificaciones adicionales sustituyendo grupos químicos de los aminoácidos con otros grupos químicos de estructura, forma o reactividad similar. El desarrollo de peptidomiméticos puede acelerarse determinando la estructura terciaria del polipéptido original, o bien libre o unido a un ligando, por espectroscopia RMN, cristalografía y/o modelado molecular asistido por ordenador. Estas técnicas ayudan en el desarrollo de nuevas composiciones de mayor potencia y/o mayor biodisponibilidad y/o mayor estabilidad que el polipéptido original (Dean (1994), *BioEssays*, 16:683-687; Cohen y Shatzmiller (1993), *J. Mol. Graph.*, 11: 166-173; Wiley y Rich (1993), *Med. Res. Rev.*, 13:327-384; Moore (1994), *Trends Pharmacol. Sci.*, 15:124-129; Hruby (1993), *Biopolymers*, 33: 1073-1082; Bugg et al. (1993), *Sci. Am.*, 269:92-98].

Ejemplos específicos de peptidomiméticos se describen a continuación. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes en términos de las modificaciones distintas o adicionales.

#### Peptidos con un enlace pseudopeptido isómero reducido

25 Las proteasas actúan en los enlaces peptídicos. La sustitución de enlaces peptídicos por enlaces pseudopeptídicos pueden conferir resistencia a la proteólisis o de otro modo hacer un compuesto menos lábil. Se ha descrito un número de enlaces pseudopeptídicos que en general no afectan a la estructura polipeptídica y actividad biológica. El enlace pseudopeptídico isómero reducido es un enlace pseudopeptídico adecuado que se conoce por aumentar la estabilidad a la escisión enzimática con ninguna o poca pérdida de actividad biológica (Couder, et al. (1993), *Int. J. Polypeptide Protein Res.* 41:181-184). Así, las secuencias de aminoácidos de estos compuestos pueden ser idénticas a las secuencias de sus polipéptidos de L-aminoácido parentales, excepto que uno o más de los enlaces peptídicos se sustituyen por un enlace pseudopeptídico isómero. Preferiblemente se sustituye el enlace peptídico más N-terminal, ya que dicha sustitución daría resistencia a la proteólisis mediante exopeptidasas que actúan en el extremo N.

#### Peptidos con un enlace pseudopeptido retro-inverso

35 Para dar resistencia a la proteólisis, los enlaces peptídicos pueden estar sustituidos también por enlaces pseudopeptídicos retro-inversos (Dal Pozzo, et al. (1993), *Int. J. Polypeptide Protein Res.* 41:561-566). Según esta modificación, las secuencias de aminoácidos de los compuestos pueden ser idénticas a las secuencias de sus polipéptidos parentales de L-aminoácido, excepto que uno o más de los enlaces peptídicos se sustituyen por un enlace pseudopeptídico retro-inverso. Preferiblemente se sustituye el enlace peptídico más N-terminal, ya que dicha sustitución dará resistencia a la proteólisis mediante exopeptidasas que actúan en el extremo N.

#### Derivados peptoides

45 Los derivados peptoides de polipéptidos representan otra forma de polipéptidos modificados que retienen los determinantes estructurales importantes para la actividad biológica, eliminan aún los enlaces peptídicos, dando así resistencia a la proteólisis (Simon, et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9367-9371). Los peptoides son oligómeros de glicinas N-sustituidas. Se ha descrito un número de grupos N-alquilo, que corresponde cada uno a una cadena lateral de un aminoácido natural.

#### Polipéptidos

50 Los polipéptidos que incluyen los análogos y otras variantes modificadas, pueden prepararse generalmente siguiendo técnicas conocidas. Preferiblemente, la producción sintética del polipéptido puede ser según el método sintético de fase sólida. Por ejemplo, la síntesis en fase sólida se entiende bien y es un método común para la preparación de polipéptidos, como son una variedad de modificaciones de esa técnica [Merrifield (1964), *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149; Stewart y Young (1984), *Solid Phase polypeptide Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Bodansky y Bodanszky (1984), *The Practice of polypeptide Synthesis*, Springer-Verlag, Nueva York; Atherton y Sheppard (1989), *Solid Phase polypeptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Nueva York].

De forma alternativa, los polipéptidos pueden prepararse en sistemas recombinantes usando secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Por ejemplo, las proteínas de fusión se preparan típicamente usando tecnología de ADN recombinante.

Derivados de polipéptido

- 5 Un "derivado" de un polipéptido es un compuesto que no es, por definición, un polipéptido, es decir, contiene al menos una unión química que no es un enlace peptídico. Así, los derivados polipeptídicos incluyen sin limitación proteínas que sufren de forma natural modificaciones post-traduccionales, tales como, por ejemplo, glucosilación. Se entiende que un polipéptido puede contener más de una de las siguientes modificaciones en el mismo polipéptido. Los derivados de polipéptido preferidos conservan un atributo deseable, que puede ser actividad biológica; más preferiblemente, un derivado de polipéptido está mejorado con respecto a uno o más atributos deseables, o tiene uno o más atributos deseables no encontrados en el polipéptido parental.

Polipéptidos mutantes: Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la encontrada en una proteína preparada a partir de una fuente natural es un polipéptido "natural". Los oligopéptidos mutantes pueden prepararse por síntesis química, que incluye sin limitación síntesis combinatoria.

- 15 Los polipéptidos mutantes más grandes que los oligopéptidos pueden prepararse usando tecnología de ADN recombinante alterando la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido. Aunque algunas alteraciones en la secuencia de nucleótidos no alterarán la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado así (mutaciones "silenciosas"), muchas darán por resultado un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos alterada que está alterada respecto a la secuencia parental. Dichas secuencias de aminoácidos alteradas pueden comprender sustituciones, supresiones y adiciones de aminoácidos, con la condición de que dichos aminoácidos sean aminoácidos que se dan de forma natural.

- 25 Así, someter un ácido nucleico que codifica un polipéptido a mutagénesis es una técnica que puede usarse para preparar polipéptidos mutantes, particularmente unos que tienen sustituciones de aminoácidos aunque no supresiones o inserciones de los mismos. Se conoce una variedad de técnicas mutagénicas que pueden usarse in vitro o in vivo que incluyen sin limitación mutagénesis química y mutagénesis mediada por PCR. Dicha mutagénesis puede estar dirigida de forma aleatoria (es decir, pueden darse mutaciones en cualquier sitio en el ácido nucleico) o estar dirigida a una sección del ácido nucleico que codifica un tramo de aminoácidos de interés particular. Usando dichas técnicas, es posible preparar bibliotecas, acumulaciones y mezclas de compuesto aleatorias, combinatorias o enfocadas.

- 30 Los polipéptidos que tienen supresiones o inserciones de aminoácidos que se dan de forma natural pueden ser oligopéptidos sintéticos que resultan de la síntesis química de secuencias de aminoácidos que se basan en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido parental pero que tiene uno o más aminoácidos insertados o suprimidos respecto a la secuencia del polipéptido parental. Las inserciones y supresiones de residuos de aminoácido en polipéptidos que tienen secuencias más largas de aminoácidos pueden prepararse por mutagénesis dirigida.

- 35 Polipéptidos modificados químicamente: Como se contempla por esta invención, el término "polipéptido" incluye aquellos que tienen una o más modificaciones químicas respecto a otro polipéptido, es decir, polipéptidos modificados químicamente. El polipéptido a partir del que se deriva un polipéptido modificado químicamente puede ser una proteína natural, una proteína mutante o un polipéptido mutante, o fragmentos polipeptídicos de los mismos; un anticuerpo u otro ligando polipeptídico que incluye sin limitación anticuerpos de cadena sencilla, proteína bacterianas y derivados polipeptídicos de los mismos; o ligandos polipeptídicos preparados según la descripción. Preferiblemente, la(s) modificación(ones) química(s) confiere(n) o mejora(n) los atributos deseables del polipéptido pero no altera(n) o compromete(n) sustancialmente la actividad biológica del mismo. Los atributos deseables incluyen aunque no están limitados a vida en almacenamiento aumentada; estabilidad aumentada en suero u otro in vivo; resistencia a proteasas; y similares. Dichas modificaciones incluyen por medio de ejemplo no limitante acetilación, glucosilación y biotilación N-terminal. Un anticuerpo que se une a S-I-P para el uso según las reivindicaciones 7-12 es un anticuerpo de la invención.

- 50 Polipéptidos con grupos químicos N-terminales o C-terminales: Una aproximación efectiva para dar resistencia a peptidasas que actúan en los residuos N-terminal o C-terminal de un polipéptido es añadir grupos químicos en los extremos del polipéptido, de manera que el polipéptido modificado no es más un sustrato para la peptidasa. Una modificación química tal es la glucosilación de los polipéptidos o bien en un extremo o en ambos. Ciertas modificaciones químicas, en particular glucosilación N-terminal, se ha mostrado que aumentan la estabilidad de los polipéptidos en el suero humano (Powell et al. (1993), *Pharma. Res.* 10: 1268-1273). Otras modificaciones químicas que aumentan la estabilidad en suero incluyen, aunque no están limitadas a, la adición de un grupo alquilo N-terminal, que consiste en un alquilo inferior de 1 a 20 carbonos, tal como un grupo acetilo, y/o la adición de una amida C-terminal o grupo amida sustituida.

- 55 Polipéptidos con un D-aminoácido terminal: La presencia de un D-aminoácido N-terminal aumenta la estabilidad en suero de un polipéptido que de otra forma contiene L-aminoácidos, porque las exopeptidasas que actúan en el residuo N-terminal no pueden utilizar un D-aminoácido como un sustrato. De forma similar, la presencia de un D-

aminoácido C-terminal estabiliza también un polipéptido, porque las exopeptidasas del suero que actúan en el residuo C-terminal no pueden utilizar un D-aminoácido como un sustrato. Con la excepción de estas modificaciones terminales, las secuencias de aminoácido de polipéptidos con D-aminoácidos N-terminales y/o C-terminales son normalmente idénticas a las secuencias del polipéptido de L-aminoácido parental.

5 Polipéptidos con sustitución de aminoácidos naturales por aminoácidos no naturales: La sustitución de aminoácidos no naturales por aminoácidos naturales en una subsecuencia de un polipéptido puede dar o aumentar los atributos deseables que incluyen actividad biológica. Dicha sustitución puede, por ejemplo, dar resistencia a la proteólisis por exopeptidasas que actúan en el extremo N. La síntesis de polipéptidos con aminoácidos no naturales es rutinaria y conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Collier, et al. (1993), citado anteriormente).

10 Modificaciones químicas post-traduccionales: Diferentes células huésped contendrán diferentes mecanismos de modificación post-traduccionales que pueden proporcionar tipos particulares de modificación post-traduccionales de una proteína de fusión si las secuencias de aminoácidos necesarias para dichas modificaciones está presente en la proteína de fusión. Se ha descrito un gran número (~100) de modificaciones post-traduccionales, unas pocas de las cuales se tratan en esta memoria. Un experto en la técnica será capaz de elegir las células huésped apropiadas, y  
15 diseñar genes quiméricos que codifiquen los miembros de proteína que comprenden la secuencia de aminoácidos necesaria para un tipo particular de modificación.

La glucosilación es un tipo de modificación química post-traduccionales que se da en muchos sistemas eucarióticos, y puede influir en la actividad, estabilidad, farmacogenética, inmunogenicidad y/o antigenicidad de proteínas. Sin embargo, deben estar presentes aminoácidos específicos en dichos sitios para reclutar la maquinaria de  
20 glucosilación apropiada, y no todas las células huésped tienen la maquinaria molecular apropiada. *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* mantienen la producción de proteínas glucosiladas, como hacen los sistemas de expresión que utilizan células de insecto, aunque el patrón de glucosilación puede variar dependiendo de qué células huésped se usan para producir la proteína de fusión.

Otro tipo de modificación post-traduccionales es la fosforilación de un grupo hidroxilo libre de la cadena lateral de uno o más residuos de Ser, Thr o Tyr. Las proteínas quinasas catalizan dichas reacciones. La fosforilación es a menudo reversible debido a la acción de una proteína fosfatasa, una enzima que cataliza la desfosforilación de residuos de aminoácidos.

Diferencias en la estructura química de residuos amino terminales resultan de diferentes células huésped, cada una de las cuales puede tener una versión química diferente del residuo de metionina codificado por un codón de partida, y estos darán por resultado extremos amino con diferentes modificaciones químicas.  
30

Por ejemplo, muchas o la mayoría de proteínas bacterianas se sintetizan con un aminoácido amino terminal que es una forma modificada de metionina, es decir, N-formil-metionina (fMet). Aunque se hace a menudo el resumen de que todas las proteínas bacterianas se sintetizan con un aminoácido iniciador fMet; aunque esto puede ser cierto para *E. coli*, recientes estudios han mostrado que no es cierto en el caso de otras bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa* (Newton et al., *J. Biol. Chem.* 274:22143-22146, 1999). En cualquier caso, en *E. coli*, el grupo formilo de fMet normalmente se elimina enzimáticamente después de la traducción para dar un residuo de metionina amino terminal, aunque el residuo fMet entero se elimina a veces (véase Hershey, Capítulo 40, "Protein Synthesis" en: *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Neidhardt, Frederick C., Editor en Jefe, Sociedad Americana de Microbiología, Washington, D.C., 1987, Volumen 1, páginas 613-647, y referencias citadas en el mismo). Mutantes de *E. coli* que carecen de las enzimas (tal como, por ejemplo, formilasa) que catalizan dichas modificaciones post-traduccionales producirán proteínas que tienen un residuo fMet amino terminal (Guillon et al., *J. Bacteriol.* 174:4294-4301, 1992).  
35  
40

En eucariotas, la acetilación del residuo de metionina iniciador, o el residuo penúltimo si la metionina iniciadora se ha eliminado, se da típicamente co- o post-traduccionales. Las reacciones de acetilación se catalizan por acetiltransferasas N terminales (NAT, también conocidas como N-alfa-acetiltransferasas), mientras la eliminación del residuo de metionina iniciador se cataliza por metionina aminopeptidasas (para revisiones, véase Bradshaw et al., *Trends Biochem. Sci.* 23:263-267, 1998; y Driessen et al., *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18:281-325, 1985). Las proteínas acetiladas de forma amino terminal se dice que están "N-acetiladas", "N alfa-acetiladas" o simplemente "acetiladas".  
45

Otro procedimiento post-traduccionales que se da en eucariotas es la alfa-amidación del extremo carboxi. Para revisiones, véase Eipper et al. *Annu. Rev. Physiol.* 50:333-344, 1988, y Bradbury et al. *Lung Cancer* 14:239-251, 1996. Aproximadamente el 50% de las hormonas peptídicas endocrinas y neuroendocrinas conocidas están alfa-amidadas (Treston et al., *Cell Growth Differ.* 4:911-920, 1993). En la mayoría de los casos, la carboxi alfa-amidación se necesita para activar estas hormonas peptídicas.  
50

55 Aminoglucósidos

Una clase de moléculas pequeñas de interés particular se conocen como aminoglucósidos, particularmente aquellos que inhiben una esfingomielinasa (SMasa), particularmente una SMasa neutra. El Ejemplo de referencia 13 describe

el uso de los métodos de cribado para preparar nuevos agentes terapéuticos usando bibliotecas químicas basadas en la estructura de aminoglucósido.

5 Los aminoglucósidos se identificaron primero como antibióticos producidos por microorganismos del género *Micromonospora*. Los antibióticos, recuperados del medio de cultivo de *Micromonospora*, incluyeron Gentamicina (Weinstein et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1963, página 1; Cooper et al., *J. Infect. Dis.* 119:342, 1969; Waitz: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2:464, 1972), Antibiótico núm. 460 (Patente Japonesa núm. 16153/71), Sisomicina (Weinstein et al., *J. Antibiotics* 23:551, 555, 559, 1970), Canamicina, Neomicina y muchos otros como se describe a continuación. Para una revisión, véase Edson et al., *The Aminoglycosides*, *Mayo Clin Proc* 74:519-528, 1999.

10 Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos que ejercen su actividad bactericida principalmente por inhibición de síntesis de proteína. Las moléculas de aminoglucósido se unen a la subunidad ribosómica 30S bacteriana volviendo a los ribosomas no disponibles para la traducción, lo que da por resultado la muerte celular.

15 El primer aminoglucósido, estreptomina, se aisló de *Streptomyces griseus* en 1943. La neomicina, aislada de *Streptomyces fradiae*, tenía mejor actividad que la estreptomina frente a bacilos gram-negativos aeróbicos pero, por su formidable toxicidad, no podría usarse de forma segura sistemáticamente. La gentamicina, aislada de *Micromonospora* en 1963, fue un avance en el tratamiento de infecciones por bacilos gram-negativos, que incluyen los provocados por *Pseudomonas aeruginosa*. Otros aminoglucósidos se desarrollaron posteriormente, incluyendo ampicilina (Amikin), netilmicina (Netromycin) y tobramicina (Nebcin), que están todas actualmente disponibles para uso sistémico en los Estados Unidos.

20 En la familia de aminoglucósidos, el sufijo "-micina" se usa en el nombre cuando el antibiótico se produce por especie *Streptomyces* y "micina," cuando se produce por especies *Micromonospora*.

#### Estructura de aminoglucósidos

25 Los aminoglucósidos son bases débiles solubles en agua que son policationes a pH corporal. Son químicamente similares en que tienen una de dos bases a la que se une dos o tres aminoazúcares. Los aminoazúcares se unen por enlaces glucosídicos, de ahí el nombre del grupo. La base en estreptomina es estreptidina, pero todas las demás tienen 2-desoxiestreptamina por lo que la mayoría de los miembros difieren en el número y naturaleza de los aminoazúcares unidos a la 2-desoxiestreptamina.

30 El término "aminoglucósido" se usa en esta memoria según sus significados químicos convencionales, como se describe en varios textos estándar en química orgánica. Lo siguiente es un compendio condensado de estos términos.

35 Como se implica por el término, un aminosacárido es una molécula de sacárido (el término sacárido se usa de forma intercambiable con azúcar) que tiene al menos un grupo amina acoplado a él, o bien directa o indirectamente. Las moléculas de sacárido (es decir, aldehídos o cetonas polihidroxiladas) existen tanto como cadenas lineales como estructuras anulares, que se convierten espontáneamente de un lado para otro entre formas lineales y anulares en un modo "tautomérico" tipo equilibrio. Como el equilibrio entre las estructuras lineal y anular tiende a generar más estructuras anulares que cadenas rectas a cualquier momento dado cuando se disuelve en un disolvente acuoso, la mayoría de los sacáridos se dibujan normalmente y se tratan como estructuras anulares.

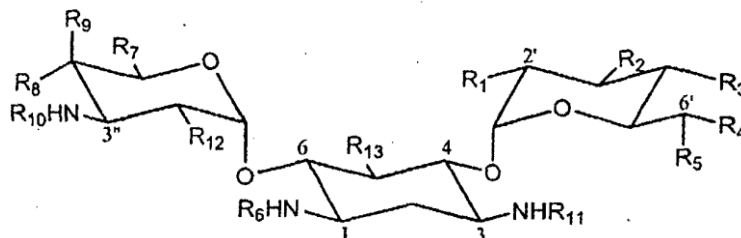
40 Los anillos de sacárido se denominan anillos de furanosa si la estructura anular en sí misma (excluyendo cualquier grupo colgante) contiene cinco átomos, y anillos de piranosa si el anillo contiene seis átomos. La mayoría de moléculas de furanosa se derivan de azúcares de pentosa (es decir, azúcares que contienen cinco átomos de carbono, tal como ribosa, arabinosa o xilosa). En una molécula de pentosa, uno de los átomos en la forma anular de la molécula es un átomo de oxígeno; el quinto átomo de carbono se une al anillo en una estructura colgante, normalmente como un grupo metilo hidroxilado. De la misma manera, la mayoría de moléculas de piranosa (con anillos de seis miembros) son azúcares de hexosa tales como glucosa, galactosa y manosa, o derivados de los mismos. Los azúcares de hexosa contienen seis átomos de carbono; en los anillos de piranosa más comunes, cinco carbonos están en el anillo junto con un átomo de oxígeno; el sexto átomo de carbono se une al anillo en un grupo colgante.

50 Una molécula de glucósido contiene al menos un componente sacárido (normalmente dibujado como un anillo) unido a través de un átomo de oxígeno (que puede considerarse como una unión éter) a un segundo grupo molecular que tiene al menos un átomo de carbono. Si una molécula de glucósido se hidroliza químicamente para romper la(s) unión(ones) éter, liberará al menos una molécula de sacárido. Normalmente, la unión glucósido es entre anillos sacáridos adyacentes, para formar disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, etc.

55 Como se implica por el nombre, un aminoglucósido es un glucósido con uno o más grupos amino. Por sus propiedades biológicas, los aminoglucósidos son una clase importante de aminosacáridos. Neomicina A (neamina), Neomicina B y C, gentamicina, sisomicina, estreptomina y tobramicina son todos aminoglucósidos, ya que tienen los grupos amino, anillos de sacárido y uniones de oxígeno requeridos. La mayoría de aminoglucósidos se identificaron inicialmente debido a las actividades anti-bacterianas de varios microbios que sintetizan dichos

compuestos en la naturaleza. Muchos de estos antibióticos de aminoglucósidos pueden alterarse o derivarse de varias formas que no destruyen su actividad antibiótica; por ejemplo, si la Neomicina B o Neomicina C se escinde entre la estructura de disacárido y el anillo de pentosa, los dos productos de escisión son Neomicina A (un disacárido, también conocido como neamina) y o bien Neobiosamina B o Neobiosamina C.

5 Los aminoglucósidos y derivados de los mismos descritos en esta memoria tienen la estructura:



10 En donde cada uno de R1-R13 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo, arilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo opcionalmente sustituido, alcoxi, alcoxi opcionalmente sustituido, heterociclilo, heterociclilo opcionalmente sustituido, heteroarilo, heteroarilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, halógeno, nitro, carboxilo, tioalquilo, amino, alquilamino, arilamino, amido, amonio, alquilamonio, sulfonilo, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, alcoxicarbonilo, acetilo o acilo.

15 En la estructura anterior, cada uno de R1-R13 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi, alcoxi opcionalmente sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo opcionalmente sustituido, ciclooxialquilo, ciclooxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, alquilamino, amido, amonio, alcoxicarbonilo, acetilo o acilo.

en la estructura anterior cada uno de R1-R13 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi, alcoxi opcionalmente sustituido, halógeno, amino, acetilo o acilo. En la estructura anterior al menos uno de R1-R13 es independientemente acetilo.

20 En la estructura anterior al menos uno de R2, R3, R6, R12 o R13 es halógeno. En la estructura anterior, el halógeno es flúor.

En la estructura anterior, al menos uno de R4, R5 o R6 es acilo.

En la estructura anterior, R7 es alquilo o alquilo opcionalmente sustituido. En una realización relacionada, el alquilo opcionalmente sustituido es un alquilo C6 a C12.

25 En la estructura anterior, cada uno de R1-R13 es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi, alcoxi opcionalmente sustituido, arilo, arilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo, heterociclilo opcionalmente sustituido, heteroarilo, heteroarilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, halógeno, nitro, carboxilo, tioalquilo, amino, alquilamino, arilamino, amido, amonio, alquilamonio, sulfonilo, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, alcoxicarbonilo, acetilo o acilo, con la condición de que cuando R6 = H, R7 = H, R8 = CH3, R9 = OH, R10 = CH3, R11 = H, R12 = OH y R13 = OH; si R1 = NH2, R2 = H, R3 = H y R4 = CH3; entonces R5 no es NH2 o NHCH3; y si R1 = OH, R2 = OH, R3 = OH y R4 es H, entonces R5 no es NH2.

En la estructura anterior, R1 = NH2, R2 = H, R3 = H, R4 = CH3, R5 = NH2 o NHCH3, R6 = H, R7 = H, R8 = CH3, R9 = OH, R10 = CH3, R11 = H, R12 = OH y R13 = OH.

35 En la estructura anterior, R1 = OH, R2 = OH, R3 = OH, R4 = H, R5 = NH2, R6 = H, R7 = H, R8 = CH3, R9 = OH, R10 = CH3, R11 = H, R12 = OH y R13 = OH.

40 Además de lo anterior, algunos compuestos se denominan también aminoglucósidos incluso aunque no tengan una unión de oxígeno glucosídico, ya que son componentes de moléculas mayores que son aminoglucósidos reales, y se sintetizan normalmente usando aminoglucósidos bacterianos como reactivos de partida. Los ejemplos incluyen 2,6-diamino-2,6-didesoxi-D-glucosa (que puede obtenerse hidrolizando Neomicina) y estreptidina (que puede obtenerse hidrolizando estreptomina). Como se usa en esta memoria, el término "aminoglucósido" abarca estos compuestos también.

45 La gentamicina y derivados de la misma son un tipo de aminoglucósidos de interés, ya que la gentamicina se conoce por inhibir SMasa (Ghosh et al., J. Biol. Chem. 262:12550-12556, 1987). Se conocen varias isoformas de gentamicina, incluyendo gentamicina C, gentamicina Cla, gentamicina C2, gentamicina C26 y gentamicina B (véase el Ejemplo 13 para las estructuras de estas isoformas). Los métodos de preparación de isoformas y derivados de gentamicina se describen en las Patentes de EE.UU. núms. 3.984.395 (Métodos de aislamiento de gentamicina

C2a); 4.288.547 (Procedimiento fermentativo para preparar antibióticos de la clase de gentamicina); y 5.814.488 (1-N-etilgentamicina Cla semisintética y método para su preparación). Los derivados de gentamicina se describen en las Patentes de EE.UU. núm. 4.387.219 (compuestos de 2-Hidroxi-gentamicina); 4.283.528 (1-N-aminohidroxiacil-derivados de gentamicina B); y 4.223.024 (4"-O-Alquilgentamicinas y sagamicinas). La Patente de EE.UU. núm. 4.150.949, (Inmunoensayo para gentamicina) describe gentamicinas marcadas con fluoresceína, que incluye fluoresceintiocarbamil-gentamicina.

La canamicina y derivados de la misma son de interés. Se conocen muchos derivados químicamente modificados de canamicina; para una revisión, véase Mingeot-Leclercq et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:727-737, 1999. Los derivados de canamicina se describen en las Patentes de EE.UU. 4.873.225 (1-n-(4-amino-3-fluoro-2-hidroxi-butiril)-canamicinas); 4.455.419 (canamicinas modificadas en 2' y producción de las mismas); 4.424.343 (Preparación de polisililatos de 1-N->.omega.-amino-.alfa.-hidroxialcanoilcanamicina y productos); 4.337.336 (Derivado de canamicina A y un procedimiento para la preparación de la misma); 4.195.170 (compuestos de 3',4'-Episulfuro-canamicina B); 4.178.437 (derivados de 1-N-canamicina); 4.170.642 (Derivados de canamicina A); 4.140.849 (derivados de canamicina C); 4.120.955 (Método para la producción de canamicina C y sus derivados); 3.974.137 (Procedimiento para la preparación de 1-[L-(-).gamma.-amino-.alfa.-hidroxibutiril]-canamicina A (RD-1341A)); 3.940.382 (compuestos de canamicina B 1,2'-Di-N-sustituidos); 4.178.437 (derivados de 1-N-canamicina); 4.140.849 (derivados de canamicina C); 4.181.797 (1-N-(.omega.-amino-.alfa.-hidroxialcanoil)-derivados de 4'-desoxi-6'-N-metilcanamicina A); y 4.051.315 (6"-Desoxicicanamicina B y 6"-desoxitobramicina).

Fortimicina y derivados de la misma son de interés. La fortimicina es un antibiótico aminoglucósido que se da de forma natural, producido primero por fermentación de un microorganismo que pertenece al género *Micromonospora*. Los estudios de fortimicina mostraron que el bloqueo del grupo 2-hidroxi inactiva el antibiótico. Como resultado, se enfocó mucha atención en desarrollar modificaciones químicas al aminoglucósido en esa posición para desarrollar derivados de fortimicina más estables. La fortimicina y derivados químicos de fortimicina se describen en las Patentes de EE.UU. 4.214.079 (derivados 4-N, 2'-N y 4,2'-Di-N-fortimicina AL); 4.214.078 (Fortimicina AL); 4.214.076 (fortimicina B 2'-N-sustituida y derivados); 4.220.756 (Métodos de producción de 3-O-demetilfortimicina B, derivados de 4-N-alquilfortimicina B y antibióticos de aminoglucósido relacionados); 4.219.644 (Fortimicinas AH y AI); 4.219.643 (Fortimicina AN); 4.219.642 (Fortimicina AO); 4.214.080 (Fortimicinas AM y AP); 4.214.075 (derivados de 6'-epi-fortimicina A y B); 4.213.974 (derivados de 4-N, 2'-N y 4,2'-Di-N-fortimicina AO); 4.213.972 (4-N, 2'-N y 4,2'-Di-N-fortimicinas AH y AI); 4.213.971 (derivados de 4-N, 2'-N y 4,2'-Di-N-fortimicina AD); 4.207.415 (Método de producción de 2-desoxifortimicina A); 4.205.070 (6'-N-Alquil- y 6',6'-di-N-alquil-derivados de fortimicinas A y B); 4.176.178 (2-Desoxi-2'-N-acil y alquil fortimicinas A y B); 4.169.198 (2-Desoxifortimicina B); 4.183.920 (derivados de 4-N-Acil, 2'-N-acil y 4,2'-N,N'-diacilfortimicina E); 4.192.867 (2-desoxifortimicina A, derivados de 4-N-alquil y 4-N-acil-2-desoxifortimicina B); 4.220.756 (Método de producción de 3-O-demetilfortimicina B, derivados de 4-N-alquilfortimicina B y antibióticos de aminoglucósido relacionados); 4.196.197 (derivados de 2'-N-Acil y alquil-6'-N-alquil- y 6',6'-di-N-alquilo de fortimicinas A y B); 4.187.299 (Fortimicina E); 4.187.298 (2'-N-acil y alquil fortimicina B y derivados, derivados 4,2'-N,N'diacil y dialquil fortimicina B, derivados de 4-N-acil-2'-N-alquil y 4-N-alquil-2'-N-acil fortimicina B); 4.187.297 (3-De-O-metil-2-N-acil y alquil fortimicinas A y B); 4.187.296 (2-N-acil y alquil 6-epi-fortimicina B y derivados); 4.208.407 (5-Desoxifortimicina A, 2,5-didesoxifortimicina A y los correspondientes derivados de 4-N-acil y alquil fortimicina B de los mismos e intermedios de los mismos); 4.216.210 (derivados de Fortimicinas AM y AP); 4.319.022 (derivados de sulfonilo 2-O-Sustituidos de fortimicina B); 4.251.516 (2-Desoxi-3-O-Demetilfortimicinas); 4.251.511 (Antibiótico y procedimiento de preparación de fermentación); 4.250.304 (Fortimicina A y B 2-Desoxi-2-sustituidos y derivados); 4.317.904 (1,2-Epiminofortimicina B); 4.255.421 (aminoglucósidos de fortimicina, procedimiento para la producción del mismo, y uso del mismo); 4.252.972 (Fortimicina B-1,2,4,5-bis-carbamatos); 4.418.193 (Método de producción de 2-epi-fortimicina A); y 4.207.415 (Método de producción de 2-desoxifortimicina A).

La sisomicina y derivados de los mismos se describen en las Patentes de EE.UU. 4.438.260 (compuestos de sisomicina); 4.369.251 (Método para la producción de sisomicina); 4.365.020 (Método para la preparación de antibiótico sisomicina); 4.336.369 (derivados de 1-N-(.omega.-aminoalcoxicarbonil)-sisomicina protegidos selectivamente); 4.312.859 (derivados de sisomicina, procedimientos para su producción y su uso medicinal); 3.997.524 (Procedimiento para la fabricación de 6'-N-alquil derivados de sisomicina y verdamicina; nuevos intermedios útiles en ello y nuevas 6'-N-alquilverdamicinas preparadas así); y 3.988.316 (Antibióticos sisomicina y verdamicina I y complejo que contiene lo mismo).

Amicacina y derivados de la misma se describen en las Patentes de EE.UU. 5.763.587 (Procedimiento para la síntesis de amicacina); 5.656.735 (Procedimiento para la preparación de precursores de amicacina); 5.621.085 (Procedimiento para la preparación de precursores de amicacina); 4.985.549 (Procedimiento para preparar amicacina); y 4.902.790 (Nuevo procedimiento para la síntesis de amicacina).

La dibecacina y derivados de la misma se describen en las Patentes de EE.UU. 5.618.795 (derivados de dibecacina y derivados de arbecacina activos contra bacterias resistentes, y la producción de los mismos; y 5.488.038 (derivados de dibecacina y derivados de arbecacina activos contra bacterias resistentes).

Se describen otros aminoglucósidos en las Patentes de EE.UU. 4.855.287 (compuestos de aminoglucósido, procedimientos para la producción de los mismos, y composición farmacéutica que contiene lo mismo); 5.442.047

(Procedimiento para preparar isepamicina); 4.208.531 (aminoglucósidos sintéticos); 4.656.160 (derivados de aminoglucósido); 4.647.656 (compuestos de aminoglucósidos); 4.645.760 (aminoglucósidos activados y composiciones farmacéuticas de aminoglucósido-aminociclitoles y método de uso); 4.617.293 (sales de fosfato de flavonoides de antibióticos de aminoglucósido); 4.554.269 (derivados de casugamicina, composiciones farmacéuticas y método de uso); 4.503.046 (derivados de 1-Nitro-aminoglucósido, composiciones farmacéuticas que las contienen y dichos derivados para el uso de compuestos farmacéuticos); 4.493.831 (derivados de aminoglucósido); 4.486.418 (2'-Desamino aminoglucósidos y composición de los mismos); 4.468.513 (derivados 2'-N-Acilados y 2'-N-alquilados de 4-O-sustituido-2-desoxiestreptamina aminoglucósidos); 4.468.512 (derivados 1-N-Acilados y 1-N-alquilados de 4-O-sustituido-2-desoxiestreptamina aminoglucósidos); 4.438.107 (Aminoglucósidos y el uso de los mismos); 4.424.345 (derivados 1-N-Acilados y 1-N-alquilados de 4-O-sustituido-2-desoxiestreptamina aminoglucósidos y procedimiento); 4.424.344 (derivados 2-N-Acilados y 2-N-alquilados de 4-O-sustituido-2-desoxiestreptamina aminoglucósidos y el procedimiento); 4.380.625 (Procedimiento para la preparación de antibióticos de aminoglucósido purificado); 4.349.667 (antibiótico G-367-2 de aminoglucósido); 4.347.354 (Preparación de antibióticos polisililados de 1-N-[.omega.-amino-.alfa.-hidroxialcanoil]aminoglucósido y productos obtenidos del mismo); 4.330.673 (Procedimiento para producir 3-O-demetilaminoglucósido y nuevos derivados de 3-O-demetilfortimicina); 4.297.486 (antibiótico G-367-1 de aminoglucósido y método para la producción del mismo); 4.297.485 (Producción de un derivado N-acilado protegido selectivamente de un antibiótico aminoglucosídico); 4.279.997 (procedimiento para la producción de antibióticos de aminoglucósido); 4.273.923 (Procedimiento para preparar derivados de aminoglucósido); 4.255.421 (aminoglucósidos de fortimicina, procedimiento para la producción del mismo y el uso del mismo); 4.252.972 (Fortimicina B-1, 2:4,5-bis-carbamatos); 4.250.170 (agentes antibacterianos Bu-2349A y B y método de uso de los mismos); 4.248.865 (nuevos derivados de aminoglucósido); 4.242.331 (Aminoglucósidos y método de uso); 4.230.847 (compuestos antibióticos de aminoglucósido); 4.226.978 (antibióticos de aminoglucósido marcados con beta.-Galactosil-umbeliferona e intermedios en su preparación); 4.223.022 (formulaciones de antibiótico de aminoglucósido estabilizado); 4.217.446 (.omega.Amino-2-hidroxialquil derivados de antibióticos de aminoglucósidos); 4.214.074 (derivados de hidroxialquilo de antibióticos de aminoglucósido); 4.212.859 (2'-Hidroxi-2'-desamino-4,6-di-O-(aminoglucosil)-1,3-diaminociclitoles, métodos para su fabricación, método para su uso como agentes antibacterianos y composiciones útiles debido a eso); 4.209.511 (antibióticos de aminoglucósido y procedimiento para la producción del mismo); 4.207.314 (Isofortimicina); 4.201.774 (nuevos derivados de aminoglucósido); 4.200.628 (nuevos derivados de aminoglucósido); 4.199.570 (derivados de aminoglucósido que contienen 1-N-Hetero); 4.189.569 (derivados de factor 5 de seldomicina); 4.187.372 (derivado de factor 5 de seldomicina); 4.187.299 (Fortimicina E); 4.170.643 (derivados de aminoglucósido-aminociclitol y método de uso); 4.166.114 (derivados de antibiótico de aminoglucósido y método de uso); 4.146.617 (derivados de desoxiestreptamina, sales, composiciones farmacéuticas y método de uso); 4.136.254 (Procedimiento para bloquear de forma selectiva funciones amino en aminoglucósidos usando sales de metal de transición e intermedios usados así); 4.125.707 (intermedio pseudotrisacárido protegido para derivados de paromomicina y neomicina); 4.117.221 (derivados de aminoacilo de antibióticos de aminoglucósido); 4.107.435 (procedimiento para .omega.-amino-2-hidroxialquil derivados de antibióticos de aminoglucósido); 4.101.556 (síntesis total de 2,5-didesoxiestreptaminas); 4.085.208 (Procedimiento para preparar 4,6-di-O-(aminoglucosil)-1,3-diaminociclitoles y nuevos 1-epímeros y 1-N-alquil derivados producidos así, métodos para el uso de los 1-epímero derivados como agentes antibacterianos y composiciones útiles para lo mismo); 4.066.752 1-Desamino-1-hidroxi y 1-desamino-1-epi-hidroxi-4,6-di-o-(aminoglucosil)-1,3-diaminociclitoles; 1-desamino-1-oxo-4,6-di-o-(aminoglucosil)-1,3-diaminociclitoles, intermedios y uso como agentes antibacterianos); 4.065.615 (derivados de antibiótico de desoxiaminoglucósido); 4.064.339 (aminoglucósidos antibióticos, procedimientos de preparación y composiciones farmacéuticas); 4.049.498 (Métodos para la preparación de antibióticos semi-sintéticos de aminociclitol aminoglucósido); 4.044.123 (6'-N-alquil-4,6-di-O-(aminoglucosil)-1,3-diaminociclitoles, métodos para su uso como agentes antibacterianos y composiciones útiles del mismo); 4.038.478 (O-Glucósido orto ésteres de compuestos que contienen neamina); 4.032.404 (procedimiento de fermentación para producir apramicina y nebramicina factor V); 4.031.210 (aminoglucósidos antibióticos, procedimientos de preparación y composiciones farmacéuticas); 4.024.332 (antibióticos de aminoglucósido e intermedios del mismo); 4.020.269 (antibióticos de epiminodesaminodesoxiaminoglucósido e intermedios); 4.012.576 (complejo antibiótico Bu 2183); 4.011.390 (antibióticos semi-sintéticos de aminociclitol aminoglucósido y métodos para la preparación de los mismos); 4.009.328 (Aminoglucósido 66-40C, método para su fabricación, método para su uso como un intermedio en la preparación de antibióticos conocidos y nuevos compuestos antibacterianos); 4.003.922 (Síntesis de dióxido de cis-1,4-ciclohexadieno); 4.002.608 (derivados de 1-N-alquil-aminoglucósido-XK-88 y métodos para su fabricación); 3.996.205 (antibióticos de aminoglucósido e intermedios); 3.984.393 (antibióticos de aminoglucósido); 3.981.861 (aminoglucósidos antibióticos, procedimientos de preparación y composiciones farmacéuticas); 3.978.214 (nueva 4,6-di-O-(aminoglucosil)-2-desoxiestreptamina, método para su fabricación, método para su uso como un agente de antiprotozoos y composiciones útiles de los mismos); 3.962.429 (Método para reducir efectos secundarios de antibióticos de aminoglucósido y composiciones de los mismos); 3.959.255 (aminoglucósidos antibióticos y procedimiento de preparación); 3.953.422 (Derivados de desoxiglucosa); y 3.953.293 (Procedimiento para la preparación de xilostatina).

Se describen aminoglucósidos adicionales por Matsumoto et al., "Synthesis of novel 13-methyl-13-dihydroanthracyclines", Chem Pharm Bull (Tokio), 34:4613-9, 1986; Israel et al., "Adriamycin analogues. Preparation and biological evaluation of some N-(trifluoroacetyl)-14-O-[(N-acetyl amino)acyl]adriamycin derivatives", J Med Chem., 2:1273-6, 1986; Takahashi et al., "Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of Nocardioopsis mutabilis with multiple antibiotic resistance", J Antibiot (Tokio), 39:175-83, 1986; Yasuda et al., "Total



synthesis of 3-O-demethylsporadicin A", *J Antibiot (Tokio)*, 38:1512-25, 1985; Tsunakawa et al., "Inosamycin, a complex of new aminoglycoside antibiotics. I. Production, isolation and properties", *J Antibiot (Tokio)*, 38:1302-12, 1985; Matsuhashi et al., "In vitro and in vivo antibacterial activities of dactimicin, a novel pseudodisaccharide aminoglycoside, compared with those of other aminoglycoside antibiotics", *Antimicrob Agents Chemother*, 27:589-94, 1985; Matsunaga et al., "Bacterial uptake of habekacin, a novel aminoglycoside antibiotic", *J Antibiot (Tokio)*, 37:596-601, 1984; Tanaka et al., "Mechanism of action of habekacin, a novel amino acid-containing aminoglycoside antibiotic", *Antimicrob Agents Chemother*, 24:797-802, 1983; Dawson, "Activity of SC33428, a novel bishydrazone-bridged derivative of 4-demethoxydaunorubicin, against experimental tumors in mice", *Cancer Res.*, 43:2880-3, 1983; Digranes et al., "N-formimidoyl thienamycin: in vitro comparison with cefoxitin and tobramycin against clinical, bacterial isolates", *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]*, 91:141-4, 1983; FitzGerald et al., "3,4-Dihydroxybenzylamine: an improved dopamine analog cytotoxic for melanoma cells in part through oxidation products inhibitory to dna polymerase", *J Invest Dermatol.*, 80:119-23, 1983; Israel et al., "Adriamycin analogues. Novel anomeric ribofuranoside analogues of daunorubicin", *J Med Chem.*, 25:28-31, 1982; Tanaka, "Effects of habekacin, a novel aminoglycoside antibiotic, on experimental corneal ulceration due to *Pseudomonas aeruginosa*", *J Antibiot (Tokio)*, 34:892-7, 1981; Fujiwara et al., "Production of a new aminoglycoside antibiotic by a mutant of *Bacillus circulans*", *J Antibiot (Tokio)*, 33:836-41, 1980; Ohashi et al., "In vitro and in vivo antibacterial activity of KW1070, a new aminoglycoside antibiotic", *Antimicrob Agents Chemother.*, 17:138-43, 1980; Inouye et al., "A novel aminoglycoside antibiotic, substance SF-2052", *J Antibiot (Tokio)*, 32:1355-6, 1979; Perzynski et al., "Effects of apramycin, a novel aminoglycoside antibiotic on bacterial protein synthesis", *Eur J Biochem.*, 99:623-8, 1979; Suzuki et al., "Preparation and some microbiological properties of novel kanamycin-glucoside derivatives", *J Antibiot (Tokio)*, 32:753-5, 1979; Smith et al., "Synthesis of daunorubicin analogues with novel 9-acyl substituents", *J Med Chem.*, 22:40-4, 1979; Davies et al., "Semisynthetic aminoglycoside antibacterials. 6. Synthesis of sisomicin, Antibiotic G-52, and novel 6'-substituted analogues of sisomicin from aminoglycoside 66-40C", *J Med Chem.*, 21:189-93, 1978; Egan et al., "Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. III. Structural identification", *J Antibiot (Tokio)*, 30:552-63, 1977; Okachi et al., "Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. II. Isolation, physico-chemical and chromatographic properties", *J Antibiot (Tokio)*, 30:541-51, 1977; Kinumaki et al., "Macrolide antibiotics M-4365 produced by *Micromonospora*. II. Chemical structures", *J Antibiot (Tokio)*, 30:450-4, 1977; Okutani et al., "Conversion of aminoglycosidic antibiotics: Novel and efficient approaches to 3'-deoxyaminoglycosides via 3'-phosphoryl esters", *J Am Chem Soc.*, 99:1278-9, 1977; Hanessian et al., "Aminoglycoside antibiotics: oxidative degradations leading to novel biochemical probes and synthetic intermediates", *J Antibiot (Tokio)*, 28:835-7, 1975; Reimann et al., "The structure of sisomicin, a novel unsaturated aminocyclitol antibiotic from *Micromonospora inyoensis*", *J Org Chem.*, 39:1451-7, 1974; Kugelman et al., "Letter: The preparation of garamine, a novel pseudodisaccharide from sisomicin", *J Antibiot (Tokio)*, 26:394-5, 1973; Arcamone et al., "Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic", *Tetrahedron Lett.*, 13:1007-10, 1969; Matsumoto et al., "Synthesis of novel 13-methyl-13-dihydroanthracyclines", *Chem Pharm Bull (Tokio)*, 34:4613-9, 1986; Israel et al., "Adriamycin analogues. Preparation and biological evaluation of some N-(trifluoroacetyl)-14-O-[(N-acetylaminio)acyl]adriamycin derivatives", *J Med Chem.*, 29:1273-6, 1986; Takahashi et al., "Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardia mutabilis* with multiple antibiotic resistance", *J Antibiot (Tokio)*, 39:175-83, 1986; Yasuda et al., "Total synthesis of 3-O-demethylsporadicin A", *J Antibiot (Tokio)*, 38:1512-25, 1985; Tsunakawa et al., "Inosamycin, a complex of new aminoglycoside antibiotics. I. Production, isolation and properties", *J Antibiot (Tokio)*, 38:1302-12, 1985; Matsuhashi et al., "In vitro and in vivo antibacterial activities of dactimicin, a novel pseudodisaccharide aminoglycoside, compared with those of other aminoglycoside antibiotics", *Antimicrob Agents Chemother.*, 27:589-94, 1985; Matsunaga et al., "Bacterial uptake of habekacin, a novel aminoglycoside antibiotic", *J Antibiot (Tokio)*, 37:596-601, 1984; Tanaka et al., "Mechanism of action of habekacin, a novel amino acid-containing aminoglycoside antibiotic", *Antimicrob Agents Chemother.*, 24:797-802, 1983; Dawson, "Activity of SC33428, a novel bishydrazone-bridged derivative of 4-demethoxydaunorubicin, against experimental tumors in mice", *Cancer Res.*, 43:2880-3, 1983; Digranes et al., "N-formimidoyl thienamycin: in vitro comparison with cefoxitin and tobramycin against clinical, bacterial isolates", *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]*, 91:141-4, 1983; FitzGerald et al., "3,4-Dihydroxybenzylamine: an improved dopamine analog cytotoxic for melanoma cells in part through oxidation products inhibitory to dna polymerase", *J Invest Dermatol.*, 80:119-23, 1983; Israel et al., "Adriamycin analogues. Novel anomeric ribofuranoside analogues of daunorubicin", *J Med Chem.*, 25:28-31, 1982; Tanaka, "Effects of habekacin, a novel aminoglycoside antibiotic, on experimental corneal ulceration due to *Pseudomonas aeruginosa*", *J Antibiot (Tokio)*, 34:892-7, 1981; Fujiwara et al., "Production of a new aminoglycoside antibiotic by a mutant of *Bacillus circulans*", *J Antibiot (Tokio)*, 33:836-41, 1980; Ohashi et al., "In vitro and in vivo antibacterial activity of KW1070, a new aminoglycoside antibiotic", *Antimicrob Agents Chemother.*, 17:138-43, 1980; Inouye et al., "A novel aminoglycoside antibiotic, substance SF-2052", *J Antibiot (Tokio)*, 32:1355-6, 1979; Perzynski et al., "Effects of apramycin, a novel aminoglycoside antibiotic on bacterial protein synthesis", *Eur J Biochem.*, 99:623-8, 1979; Suzuki et al., "Preparation and some microbiological properties of novel kanamycin-glucoside derivatives", *J Antibiot (Tokio)*, 32:753-5, 1979; Smith et al., "Synthesis of daunorubicin analogues with novel 9-acyl substituents", *J Med Chem.*, 22:40-4, 1979; Davies et al., "Semisynthetic aminoglycoside antibacterials. 6. Synthesis of sisomicin, Antibiotic G-52, and novel 6'-substituted analogues of sisomicin from aminoglycoside 66-40C", *J Med Chem.*, 21:189-93, 1978; Egan et al., "Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. III. Structural identification", *J Antibiot (Tokio)*, 30:552-63, 1977; Okachi et al., "Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. II. Isolation, physico-chemical and chromatographic properties", *J Antibiot (Tokio)*, 30:541-51, 1977; Kinumaki et al., "Macrolide antibiotics M-4365 produced by *Micromonospora*. II. Chemical structures", *J Antibiot (Tokio)*, 30:450-4, 1977; Okutani et al., "Conversion of aminoglycosidic antibiotics: Novel and efficient approaches to 3'-deoxyaminoglycosides via 3'-phosphoryl esters", *J*

Am Chem Soc., 99:1278-9, 1977; Hanessian et al., "Aminoglycoside antibiotics: oxidative degradations leading to novel biochemical probes and synthetic intermediates", J Antibiot (Tokio), 28:835-7, 1975; Reimann et al., "The structure of sisomicin, a novel unsaturated aminocyclitol antibiotic from *Micromonospora inyoensis*", J Org Chem., 39:1451-7, 1974; Kugelman et al., "Letter: The preparation of garamine, a novel pseudodisaccharide from sisomycin", J Antibiot (Tokio), 26:394-5, 1973; Arcamone et al., "Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic", Tetrahedron Lett., 13:1007-10, 1969; Yew et al., "New antimycobacterial agents", Monaldi Arch Chest Dis., 51:394-404, 1996; Urban et al., "Comparative in-vitro activity of SCH 27899, a novel everninomicin, and vancomycin", J Antimicrob Chemother., 37:361-4, 1996; Lam et al., "Production and isolation of two novel esperamicins in a chemically defined medium", J Antibiot (Tokio), 48:1497-501, 1995; Pelyvas et al., "Novel aminocyclitol antibiotics derived from natural carbohydrates", Carbohydr Res., 272:C5-9, 1995; Pelyvas et al., "Synthesis of new pseudodisaccharide aminoglycoside antibiotics from carbohydrates", J Antibiot (Tokio), 48:683-95, 1995; Jones, "Isepamicin (SCH 21420, 1-N-HAPA gentamicin B): microbiological characteristics including antimicrobial potency of spectrum of activity", J Chemother., 2:7-16, 1995 Supl; Abe et al., "Novel antitumor antibiotics, saptomycins. II. Isolation, physico-chemical properties and structure elucidation", J Antibiot (Tokio), 46:1536-49, 1993; Abe et al., "Novel antitumor antibiotics, saptomycins. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation, HPLC analysis and biological activities", J Antibiot (Tokio), 46:1530-5, 1993; Phillipson et al., "Lanomycin and glucolanomycin, antifungal agents produced by *Pycnidophora dispersa*. II. Structure elucidation", J Antibiot (Tokio), 45:313-9, 1992; Mariani et al., "In vitro activity of novel sulphonic derivatives of distamycin A", EXS., 61:455-8, 1992; Abe et al., "Novel antitumor antibiotics, saptomycins D and E", J Antibiot (Tokio), 44:908-11, 1991; Priebe et al., "3'-Hydroxyesorubicin. Synthesis and antitumor activity", J Antibiot (Tokio), 43:838-46, 1990; Brill et al., "Altromycins, novel pluramycin-like antibiotics. II. Isolation and elucidation of structure", J Antibiot (Tokio), 43:229-37, 1990; Jackson et al., "Altromycins, novel pluramycin-like antibiotics. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and antibacterial activity", J Antibiot (Tokio), 43(3):223-8, 1990; Flynn et al., "The chiral synthesis and biochemical properties of electron rich phenolic sulfoxide analogs of sparsomycin", Biochem Biophys Res Commun., 166:673-80, 1990; Kitamura et al., "Pirarubicin, a novel derivative of doxorubicin. THP-COP therapy for non-Hodgkin's lymphoma in the elderly", Am J Clin Oncol., 13 Supl 1:S15-9, 1990; Gu et al., "In vitro activity of dactimicin, a novel pseudodisaccharide aminoglycoside, compared with activities of other aminoglycosides", Antimicrob Agents Chemother., 33:1998-2003, 1989; Lam, "Biosynthesis of elsamicin A, a novel antitumor antibiotic", J Nat Prod., 52:1015-21, 1989; Rolston et al., "In vitro activity of trospectomycin (U-63366F), a novel spectinomycin analog, against gram-positive isolates from cancer patients", Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 8:254-60, 1989; Gupta et al., "Synthesis, cytotoxicity, and antiviral activity of some acyclic analogues of the pyrrolo[2,3-d]pyrimidine nucleoside antibiotics tubercidin, toyocamycin, and sangivamycin", J Med Chem., 32:402-8, 1989; Hochlowski et al., "Phenelfamycins, a novel complex of elfamycin-type antibiotics. II. Isolation and structure determination" J Antibiot (Tokio), 41:1300-15, 1988; Jackson et al., "Phenelfamycins, a novel complex of elfamycin-type antibiotics. I. Discovery, taxonomy and fermentation", J Antibiot (Tokio), 41:1293-9, 1988; Saitoh et al., "Boholmocin, a new aminoglycoside antibiotic. I. Production, isolation and properties", J Antibiot (Tokio), 41:855-61, 1988; Matsumoto et al., "Synthesis of novel 13-methyl-13-dihydroanthracyclines", Chem Pharm Bull (Tokio), 34:4613-9, 1986; Israel et al., "Adriamycin analogues. Preparation and biological evaluation of some N-(trifluoroacetyl)-14-O-[(N-acetylamino)acyl]adriamycin derivatives", J Med Chem., 29:1273-6, 1986; Takahashi et al., "Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardiosis mutabilis* with multiple antibiotic resistance", J Antibiot (Tokio), 39:175-83, 1986; Yasuda et al., "Total synthesis of 3-O-demethylsporadicin A", J Antibiot (Tokio), 38:1512-25, 1985; Tsunakawa et al., "Inosamycin, a complex of new aminoglycoside antibiotics. I. Production, isolation and properties", J Antibiot (Tokio), 38:1302-12, 1985; Matsuhashi et al., "In vitro and in vivo antibacterial activities of dactimicin, a novel pseudodisaccharide aminoglycoside, compared with those of other aminoglycoside antibiotics", Antimicrob Agents Chemother., 27:589-94, 1985; Matsunaga et al., "Bacterial uptake of habekacin, a novel aminoglycoside antibiotic", J Antibiot (Tokio), 37:596-601, 1984; Tanaka et al., "Mechanism of action of habekacin, a novel amino acid-containing aminoglycoside antibiotic", Antimicrob Agents Chemother., 24:797-802, 1983; Dawson, "Activity of SC33428, a novel bishydrazone-bridged derivative of 4-demethoxydaunorubicin, against experimental tumors in mice", Cancer Res., 43:2880-3, 1983; Digranes et al., "N-formimidoyl thienamycin: in vitro comparison with cefoxitin and tobramycin against clinical, bacterial isolates", Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B], 91:141-4, 1983; FitzGerald et al., "3,4-Dihydroxybenzylamine: an improved dopamine analog cytotoxic for melanoma cells in part through oxidation products inhibitory to dna polymerase", J Invest Dermatol., 80:119-23, 1983; Israel et al., "Adriamycin analogues. Novel anomeric ribofuranoside analogues of daunorubicin", J Med Chem., 25:28-31, 1982; Tanaka, "Effects of habekacin, a novel aminoglycoside antibiotic, on experimental corneal ulceration due to *Pseudomonas aeruginosa*", J Antibiot (Tokio), 34:892-7, 1981; Fujiwara et al., "Production of a new aminoglycoside antibiotic by a mutant of *Bacillus circulans*", J Antibiot (Tokio), 33:836-41, 1980; Ohashi et al., "In vitro and in vivo antibacterial activity of KW1070, a new aminoglycoside antibiotic", Antimicrob Agents Chemother., 17:138-43, 1980; Inouye et al., "A novel aminoglycoside antibiotic, substance SF-2052", J Antibiot (Tokio), 32:1355-6, 1979; Perzynski et al., "Effects of apramycin, a novel aminoglycoside antibiotic on bacterial protein synthesis", Eur J Biochem., 99:623-8, 1979; Suzuki et al., "Preparation and some microbiological properties of novel kanamycin-glucoside derivatives", J. Antibiot (Tokio), 32:753-5, 1979; Smith et al., "Synthesis of daunorubicin analogues with novel 9-acyl substituents", J Med Chem., 22:40-4, 1979; Davies et al., "Semisynthetic aminoglycoside antibacterials. 6. Synthesis of sisomicin, Antibiotic G-52, and novel 6'-substituted analogues of sisomicin from aminoglycoside 66-40C", J Med Chem., 21:189-93, 1978; Egan et al., "Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. III. Structural identification", J Antibiot (Tokio), 30:552-63, 1977; Okachi et al., "Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. II. Isolation, physico-chemical and chromatographic properties", J Antibiot (Tokio), 30:541-51, 1977;

Kinumaki et al., "Macrolide antibiotics M-4365 produced by *Micromonospora*. II. Chemical structures", *J Antibiot (Tokio)*, 30:450-4, 1977; Okutani et al., "Conversion of aminoglycosidic antibiotics: Novel and efficient approaches to 3'-deoxyaminoglycosides via 3'-phosphoryl esters", *J Am Chem Soc.*, 99:1278-9, 1977; Hanessian et al., "Aminoglycoside antibiotics: oxidative degradations leading to novel biochemical probes and synthetic intermediates", *J Antibiot (Tokio)*, 28:835-7, 1975; Reimann et al., "The structure of sisomicin, a novel unsaturated aminocyclitol antibiotic from *Micromonospora inyoensis*", *J Org Chem.*, 39:1451-7, 1974; Kugelman et al., "Letter: The preparation of garamine, a novel pseudodisaccharide from sisomicin", *J Antibiot (Tokio)*, 26:394-5, 1973; Arcamone et al., "Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic", *Tetrahedron Lett.*, 13:1007-10, 1969; Yew et al., "New antimycobacterial agents", *Monaldi Arch Chest Dis.*, 51:394-404, 1996; Urban et al., "Comparative in-vitro activity of SCH 27899, a novel everninomicin, and vancomycin", *J Antimicrob Chemother.*, 37:361-4, 1996; Lam et al., "Production and isolation of two novel esperamicins in a chemically defined medium", *J Antibiot (Tokio)*, 48:1497-501, 1995; Pelyvas et al., "Novel aminocyclitol antibiotics derived from natural carbohydrates", *Carbohydr Res.*, 272:C5-9, 1995; Pelyvas et al., "Synthesis of new pseudodisaccharide aminoglycoside antibiotics from carbohydrates", *J Antibiot (Tokio)*, 48:683-95, 1995; Jones, "Isepamicin (SCH 21420, 1-N-HAPA gentamicin B): microbiological characteristics including antimicrobial potency of spectrum of activity", *J Chemother.*, 7 Supl 2:7-16, 1995; Abe et al., "Novel antitumor antibiotics, saptomycins. II. Isolation, physico-chemical properties and structure elucidation", *J Antibiot (Tokio)*, 46:1536-49, 1993; Abe et al., "Novel antitumor antibiotics, saptomycins. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation, HPLC analysis and biological activities", *J Antibiot (Tokio)*, 46:1530-5, 1993; Phillipson et al., "Lanomycin and glucolanomycin, antifungal agents produced by *Pycnidophora dispersa*. II. Structure elucidation", *J Antibiot (Tokio)*, 45:313-9, 1992; Mariani et al., "In vitro activity of novel sulphonic derivatives of distamycin A", *EXS.*, 61:455-8, 1992; Abe et al., "Novel antitumor antibiotics, saptomycins D and E", *J Antibiot (Tokio)*, 44:908-11, 1989; Priebe et al., "3'-Hydroxyesorubicin. Synthesis and antitumor activity", *J Antibiot (Tokio)*, 43:838-46, 1990; Brill et al., "Altromycins, novel pluramycin-like antibiotics. II. Isolation and elucidation of structure", *J Antibiot (Tokio)*, 43:229-37, 1990; Jackson et al., "Altromycins, novel pluramycin-like antibiotics. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and antibacterial activity", *J Antibiot (Tokio)*, 43:223-8, 1990; Flynn et al., "The chiral synthesis and biochemical properties of electron rich phenolic sulfoxide analogs of sparsomycin", *Biochem Biophys Res Commun.*, 166:673-80, 1990; Kitamura et al., "Pirarubicin, a novel derivative of doxorubicin. THP-COP therapy for non-Hodgkin's lymphoma in the elderly", *Am J Clin Oncol.*, 13 Supl 1:S15-9, 1990; Gu et al., "In vitro activity of dactimicin, a novel pseudodisaccharide aminoglycoside, compared with activities of other aminoglycosides", *Antimicrob Agents Chemother.*, 33:1998-2003, 1989; Lam et al., "Biosynthesis of elsamicin A, a novel antitumor antibiotic", *J Nat Prod.* 52:1015-21, 1989; Rolston et al., "In vitro activity of trospectomycin (U-63366F), a novel spectinomycin analog, against gram-positive isolates from cancer patients", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 8:254-60, 1989; Gupta et al., "Synthesis, cytotoxicity, and antiviral activity of some acyclic analogues of the pyrrolo[2,3-d]pyrimidine nucleoside antibiotics tubercidin, toyocamycin, and sangivamycin", *J Med Chem.*, 32:402-8, 1989; Hochlowski et al., "Phenelfamycins, a novel complex of elfamycin-type antibiotics. II. Isolation and structure determination", *J Antibiot (Tokio)*, 41:1300-15, 1988; Jackson et al., "Phenelfamycins, a novel complex of elfamycin-type antibiotics. I. Discovery, taxonomy and fermentation", *J Antibiot (Tokio)*, 41(10):1293-9, 1988; Saitoh et al., "Boholmycin, a new aminoglycoside antibiotic. I. Production, isolation and properties", *J Antibiot (Tokio)*, 41:855-61, 1988; Yew et al., "New antimycobacterial agents", *Monaldi Arch Chest Dis.*, 51(5):394-404, 1996; Urban et al., "Comparative in-vitro activity of SCH 27899, a novel everninomicin, and vancomycin", *J Antimicrob Chemother.*, 37:361-4, 1996; Lam et al., "Production and isolation of two novel esperamicins in a chemically defined medium", *J Antibiot (Tokio)*, 48:1497-501, 1995; Pelyvas et al., "Novel aminocyclitol antibiotics derived from natural carbohydrates", *Carbohydr Res.*, 272:C5-9, 1995; Pelyvas et al., "Synthesis of new pseudodisaccharide aminoglycoside antibiotics from carbohydrates", *J Antibiot (Tokio)*, 48:683-95, 1995; Jones, "Isepamicin (SCH 21420, 1-N-HAPA gentamicin B): microbiological characteristics including antimicrobial potency of spectrum of activity", *J Chemother.*, 7 Supl 2:7-16, 1995; Abe et al., "Novel antitumor antibiotics, saptomycins. II. Isolation, physico-chemical properties and structure elucidation", *J Antibiot (Tokio)*, 46:1536-49, 1993; Abe et al., "Novel antitumor antibiotics, saptomycins. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation, HPLC analysis and biological activities", *J Antibiot (Tokio)*, 46:1530-5, 1993; Phillipson et al., "Lanomycin and glucolanomycin, antifungal agents produced by *Pycnidophora dispersa*. II. Structure elucidation", *J Antibiot (Tokio)*, 45:313-9, 1992; Mariani et al., "In vitro activity of novel sulphonic derivatives of distamycin A", *EXS.*, 61:455-8, 1992; Abe et al., "Novel antitumor antibiotics, saptomycins D and E", *J Antibiot (Tokio)*, 44:908-11, 1991; Priebe et al., "3'-Hydroxyesorubicin. Synthesis and antitumor activity", *J Antibiot (Tokio)*, 43:838-46, 1990; Brill et al., "Altromycins, novel pluramycin-like antibiotics. II. Isolation and elucidation of structure", *J Antibiot (Tokio)*, 43:229-37, 1990; Jackson et al., "Altromycins, novel pluramycin-like antibiotics. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and antibacterial activity", *J Antibiot (Tokio)*, 43:223-8, 1990; Flynn et al., "The chiral synthesis and biochemical properties of electron rich phenolic sulfoxide analogs of sparsomycin", *Biochem Biophys Res Commun.*, 166:673-80, 1990; Kitamura et al., "Pirarubicin, a novel derivative of doxorubicin. THP-COP therapy for non-Hodgkin's lymphoma in the elderly", *Am J Clin Oncol.*, 13 Supl 1:S15-9, 1990; Gu et al., "In vitro activity of dactimicin, a novel pseudodisaccharide aminoglycoside, compared with activities of other aminoglycosides", *Antimicrob Agents Chemother.*, 33:1998-2003, 1989; Lam et al., "Biosynthesis of elsamicin A, a novel antitumor antibiotic", *J Nat Prod.*, 52:1015-21, 1989; Rolston et al., "In vitro activity of trospectomycin (U-63366F), a novel spectinomycin analog, against gram-positive isolates from cancer patients", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 8:254-60, 1989; Gupta et al., "Synthesis, cytotoxicity, and antiviral activity of some acyclic analogues of the pyrrolo[2,3-d]pyrimidine nucleoside antibiotics tubercidin, toyocamycin, and sangivamycin", *J Med Chem.*, 32:402-8, 1989; Hochlowski et al., "Phenelfamycins, a novel complex of elfamycin-type antibiotics. II. Isolation and structure determination", *J Antibiot (Tokio)*, 41:1300-15, 1988; Jackson et al.,

"Phenelfamycins, a novel complex of elfamycin-type antibiotics. I. Discovery, taxonomy and fermentation", *J Antibiot (Tokio)*, 41:1293-9, 1988; Saitoh et al., "Boholmycin, a new aminoglycoside antibiotic. I. Production, isolation and properties", *J Antibiot (Tokio)*, 41:855-61, 1988; Miller et al., "Clinical pharmacology and toxicity of 4'-O-tetrahydropyranyladriamycin", *Cancer Res.*, 47:1461-5, 1987; Stefani et al., "First microbiological approach to dactimicin, a novel aminoglycoside antibiotic", *Drugs Exp Clin Res.*, 13:727-9, 1987; Matsumoto et al., "Synthesis of novel 13-methyl-13-dihydroanthracyclines", *Chem Pharm Bull (Tokio)*, 34:4613-9, 1986; Israel et al., "Adriamycin analogues. Preparation and biological evaluation of some N-(trifluoroacetyl)-14-O-[(N-acetylamino)acyl]adriamycin derivatives", *J Med Chem.*, 29:1273-6, 1986; Takahashi et al., "Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardiosis mutabilis* with multiple antibiotic resistance", *J Antibiot (Tokio)*, 39:175-83, 1986; Yasuda et al., "Total synthesis of 3-O-demethylsporadicin A", *J Antibiot (Tokio)*, 38:1512-25, 1985; Tsunakawa et al., "Inosamycin, a complex of new aminoglycoside antibiotics. I. Production, isolation and properties", *J Antibiot (Tokio)*, 38:1302-12, 1985; Matsushashi et al., "In vitro and in vivo antibacterial activities of dactimicin, a novel pseudodisaccharide aminoglycoside, compared with those of other aminoglycoside antibiotics", *Antimicrob Agents Chemother.*, 27:589-94, 1985; Matsunaga et al., "Bacterial uptake of habekacin, a novel aminoglycoside antibiotic", *J Antibiot (Tokio)*, 37:596-601, 1984; Tanaka et al., "Mechanism of action of habekacin, a novel amino acid-containing aminoglycoside antibiotic", *Antimicrob Agents Chemother.*, 24:797-802, 1983; Dawson, "Activity of SC33428, a novel bishydrazone-bridged derivative of 4-demethoxydaunorubicin, against experimental tumors in mice", *Cancer Res.*, 43:2880-3, 1983; Digranes et al., "N-formimidoyl thienamycin: in vitro comparison with cefoxitin and tobramycin against clinical, bacterial isolates", *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]*, 91:141-4, 1983; FitzGerald et al., "3,4-Dihydroxybenzylamine: an improved dopamine analog cytotoxic for melanoma cells in part through oxidation products inhibitory to dna polymerase", *J Invest Dermatol.*, 80:119-23, 1983; Israel et al., "Adriamycin analogues. Novel anomeric ribofuranoside analogues of daunorubicin", *J Med Chem.* 25:28-31, 1982; Tanaka. "Effects of habekacin, a novel aminoglycoside antibiotic, on experimental corneal ulceration due to *Pseudomonas aeruginosa*", *J Antibiot (Tokio)*, 34:892-7, 1981; Fujiwara et al., "Production of a new aminoglycoside antibiotic by a mutant of *Bacillus circulans*", *J Antibiot (Tokio)*, 33:836-41, 1980; Ohashi et al., "In vitro and in vivo antibacterial activity of KW1070, a new aminoglycoside antibiotic", *Antimicrob Agents Chemother.*, 17:138-43, 1980; Inouye et al., "A novel aminoglycoside antibiotic, substance SF-2052", *J Antibiot (Tokio)*, 32:1355-6, 1979; Perzynski et al., "Effects of apramycin, a novel aminoglycoside antibiotic on bacterial protein synthesis", *Eur J Biochem.*, 99:623-8, 1979; Suzuki et al., "Preparation and some microbiological properties of novel kanamycin-glucoside derivatives", *J Antibiot (Tokio)*, 32:753-5, 1979; Smith et al., "Synthesis of daunorubicin analogues with novel 9-acyl substituents", *J Med Chem.*, 22:40-4, 1979; Davies et al., "Semisynthetic aminoglycoside antibacterials. 6. Synthesis of sisomicin, Antibiotic G-52, and novel 6'-substituted analogues of sisomicin from aminoglycoside 66-40C", *J Med Chem.*, 21:189-93, 1978; Egan et al., "Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. III. Structural identification", *J Antibiot (Tokio)*, 30:552-63, 1977; Okachi et al., "Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. II. Isolation, physico-chemical and chromatographic properties", *J Antibiot (Tokio)*, 30:541-51, 1977; Kinumaki et al., "Macrolide antibiotics M-4365 produced by *Micromonospora*. II. Chemical structures", *J Antibiot (Tokio)*, 30:450-4, 1977; Okutani et al., "Conversion of aminoglycosidic antibiotics: Novel and efficient approaches to 3'-deoxyaminoglycosides via 3'-phosphoryl esters", *J Am Chem Soc.*, 99(4):1278-9, 1977; Hanessian et al., "Aminoglycoside antibiotics: oxidative degradations leading to novel biochemical probes and synthetic intermediates", *J Antibiot (Tokio)*, 28:835-7, 1975; Reimann et al., "The structure of sisomicin, a novel unsaturated aminocyclitol antibiotic from *Micromonospora inyoensis*", *J Org Chem.*, 39:1451-7, 1974; Kugelman et al., "Letter: The preparation of garamine, a novel pseudodisaccharide from sisomicin", *J Antibiot (Tokio)*, 26:394-5, 1973; Arcamone et al., "Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic", *Tetrahedron Lett.*, 13:1007-10, 1969; Marchini et al., "4-Demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunorubicin (PNU-159548), a novel anticancer agent active against tumor cell lines with different resistance mechanisms", *Cancer Res.*, 61:1991-5, 2001; Sunada et al., "Acetylation of aminoglycoside antibiotics with 6'-methylamino group, istamycin B and micronomicin, by a novel aminoglycoside 6'-acetyltransferase of actinomycete origin", *J Antibiot (Tokio)*, 53:1416-9, 2000; Ganguly, "Ziracin, a novel oligosaccharide antibiotic", *J Antibiot (Tokio)*, 53:1038-44, 2000; Nicolaou et al., "Total synthesis of everninomicin 13,384-1--Part 2: synthesis of the FGHA2 fragment", *Chemistry*, 6:3116-48, 2000; Nicolaou et al., "Total synthesis of eveminomicin 13,384-1--Part 1: retrosynthetic analysis and synthesis of the A1B(A)C fragment", *Chemistry*, 6:3095-115, 2000; Wang et al., "In vivo activity and pharmacokinetics of ziracin (SCH27899), a new long-acting everninomicin antibiotic, in a murine model of penicillin-susceptible or penicillin-resistant pneumococcal pneumonia", *Antimicrob Agents Chemother.*, 44:1010-8, 2000; Ganguly et al., "Chemical modifications and structure activity studies of ziracin and related eveminomicin antibiotics", *Bioorg Med Chem Lett.*, 9:1209-14, 1999; y Hotta et al., "The novel enzymatic 3'-N-acetylation of arbekacin by an aminoglycoside 3'-N-acetyltransferase of *Streptomyces* origin and the resulting activity", *J Antibiot (Tokio)*, 51:735-42, 1998.

#### Farmacología de aminoglucósidos

Después de la inyección, los aminoglucósidos se distribuyen principalmente en el ECF. La unión a proteína es baja. Incluso con inflamación, las concentraciones en tejidos y secreciones son mucho menores que aquellas en niveles en plasma.

Los aminoglucósidos se excretan sin cambios en la orina por filtración glomerular. Generalmente tienen la misma vida media en plasma de 2 a 3 h; con insuficiencia renal y en la vejez, la vida media se eleva marcadamente. Para

evitar la toxicidad, las dosis de mantenimiento de aminoglucósidos en pacientes con insuficiencia renal deben modificarse o bien disminuyendo la dosis o aumentando el intervalo entre dosis o ambas.

Por las propiedades de distribución de aminoglucósidos, la dosificación en pacientes obesos debe basarse en un peso igual al peso corporal magro más el 50% de la masa adiposa. En pacientes con ECF excesivo, como en edema, la dosis debería calcularse en base al peso corporal total. Los pacientes con quemaduras y fibrosis quística han disminuido los niveles en plasma y necesitarían dosis mayores. La anemia tiende a aumentar los niveles en plasma.

Una dosis grande de aminoglucósido dada una vez al día más que varias dosis divididas dadas en múltiples ocasiones a lo largo del día se cree que da por resultado menos transferencia neta de aminoglucósido de la sangre al tejido. Esto se cree que se consigue saturando la velocidad por la que el aminoglucósido se mueve en el tejido.

El tratamiento de pacientes con ciertos aminoglucósidos da por resultado los efectos secundarios indeseables de nefrotoxicidad y ototoxicidad. (Para una revisión, véase Mingeot-Leclercq et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1003-1012, 1999). Los compuestos usados son preferiblemente no tóxicos, en particular porque no se darían típicamente durante periodos prolongados de tiempo. Los compuestos identificados por los ensayos de cribado se prueban por su toxicidad en modelos animales para identificar compuestos no tóxicos. Los aminoglucósidos que tienen efectos secundarios indeseables pueden administrarse a un paciente con uno o más agentes que mejoren o prevengan los efectos secundarios indeseables. Adicional o alternativamente, los compuestos se administran usando un régimen de dosificación que se diseña para minimizar o evitar la toxicidad o cualquier otro efecto secundario indeseable.

#### Modulación de la ruta de señalización de esfingomielina para beneficio terapéutico

La ruta de señalización de esfingomielina (también conocida como la ruta de SM o la ruta de señalización de ceramida) es una "cascada" de sucesos bioquímicos en que las proteínas en la ruta se activan (por modificación química enzimática o de otra forma) con el resultado final que se afecta el metabolismo de esfingosina. En la mayoría de ejemplos, la activación de la ruta de SM lleva a producción aumentada de ceramida. Para revisiones de la biología molecular de la ruta de señalización de esfingomielina, véase Hannun et al., *Adv. Lipid Res.* 25:27-41, 1993; Liu et al., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 36:511-573, 1999; Igarashi, J. *Biochem.* 122:1080-1087, 1997; y Oral et al., *J. Biol. Chem.* 272:4836-4842, 1997.

Se ha sugerido que la ruta de transducción de la señal de esfingomielina se activa durante la isquemia/hipoxia cardiaca (Bielawska et al., *Am. J. Pathol.* 151:1257-1263, 1997; Meldrum, *Am. J. Physiol.* 274:R577-R595, 1998; y Cain et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31:931-947, 1999). Si es así, uno o más factores o procedimientos pueden mediar la producción de SPH inducida por isquemia. Un candidato probable para dicho mediador es la citoquina pro-inflamatoria, factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ). En varios modelos animales de isquemia, el miocardio produce TNF $\alpha$  (Squadrito et al., *Eur. J. Pharmacol.* 237:223-230, 1993; Herrmann et al., *European Journal of Clinical Investigation* 28:59-66, 1998; Meldrum et al., *Ann. Thorac. Surg.* 65:439-443, 1998). Evidencia reciente demuestra que los cardiomiocitos en sí mismos producen TNF $\alpha$  y secretan la citoquina en el fluido extracelular (Comstock et al., *J. Mol. Cell Cardiol.* 30:2761-2775, 1998). Como los receptores de TNF $\alpha$  se expresan mediante cardiomiocitos (Krown et al., *FEBS Letters* 376:24-30, 1995; Torre-Amione et al., *Circulation* 92:1487-1493, 1995), se ha sugerido un papel autocrino/paracrino para TNF $\alpha$  (Meldrum et al., *Ann. Thorac. Surg.* 65:439-443, 1998). De forma significativa, TNF $\alpha$  induce la producción de SPH y la apoptosis en miocitos cardiacos (Krown et al., *J. Clin. Invest.* 98:2854-2865, 1996), presumiblemente actuando por unión al complemento de cardiomiocito de los receptores de TNF $\alpha$ . La activación de la cascada de transducción de señal de esfingomielina puede ser un suceso temprano clave en los efectos citotóxicos (apoptóticos) de la TNF $\alpha$  de citoquina (Zhang et al., *Endo.* 136:4157-4160, 1995). TNF $\alpha$  puede provocar apoptosis significativa en cardiomiocitos de rata cultivados y se ha sugerido que la producción de SPH inducida por TNF $\alpha$  es responsable de la muerte celular desencadenada por TNF $\alpha$  (Krown et al., *J. Clin. Invest.* 98:2854-2865, 1996).

La ruta de SM, muchas etapas de las cuales se dan de forma intracelular, se induce por una variedad de estímulos extracelulares. En terapia cardiovascular basada en esfingolípidos, dichos estímulos pueden inhibirse o bloquearse completamente. Los agentes que inducen la ruta de SM, cuya función puede modularse, incluyen aunque no están limitados a citoquinas. Las citoquinas de interés particular incluyen aunque no están limitadas a citoquinas pro-inflamatorias, interferonas y quimioquinas.

#### Métodos de cribado para nuevos agentes terapéuticos basados en esfingolípidos

Las dianas de esfingolípidos de la invención son fácilmente adaptables para usar en ensayos de cribado de alto rendimiento para el cribado de compuestos candidatos para identificar aquellos que tienen una actividad deseada, por ejemplo, inhibir una enzima que cataliza una reacción que produce un esfingolípidos indeseable, o bloquear la unión de un esfingolípidos a un receptor del mismo. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos de partida" convencionales o pueden usarse a sí mismos como agentes terapéuticos.

Los métodos de cribado comprenden usar ensayos de cribado para identificar, a partir de una biblioteca de diversas moléculas, uno o más compuestos que tienen una actividad deseada. Un "ensayo de cribado" es un ensayo

5 selectivo diseñado para identificar, aislar y/o determinar la estructura de, compuestos en una colección que tienen una actividad preseleccionada. Por "que identifica" se entiende que un compuesto que tiene una actividad deseable se aísla, su estructura química se determina (incluyendo sin limitación determinar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de ácidos nucleicos y polipéptidos, respectivamente) la estructura de y, adicional o alternativamente, purificar compuestos que tienen la actividad cribada). Los ensayos bioquímicos y biológicos se diseñan para probar la actividad en un amplio intervalo de sistemas que oscilan de interacciones proteína-proteína, catálisis de enzima, unión de molécula pequeña-proteína, a funciones celulares. Dichos ensayos incluyen ensayos automatizados, semi-automatizados y ensayos HTS (cribado de alto rendimiento).

10 En métodos HTS, muchos compuestos discretos se ensayan preferiblemente en paralelo por métodos robóticos, automáticos o semi-automáticos de manera que se criban grandes números de compuestos de ensayo para una actividad deseada simultáneamente o casi simultáneamente. Es posible ensayar y cribar hasta aproximadamente 6.000 a 20.000, e incluso hasta aproximadamente 100.000 a 1.000.000 de compuestos diferentes al día usando los sistemas integrados.

15 Típicamente en HTS, las moléculas diana están contenidas en cada pocillo de un microplato de multi-pocillos; en el caso de enzimas, los reactivos también están presentes en los pocillos. Normalmente, las técnicas más ampliamente establecidas utilizan platos de microtítulo de 96 pocillos. En este formato, 96 ensayos independientes se realizan simultáneamente en un único plato de plástico de 8 cm x 12 cm que contiene 96 pocillos de reacción. Uno o más pocillos de blanco contienen todos los reactivos excepto el compuesto candidato. Cada uno de los pocillos que no son de patrón contiene al menos un compuesto candidato.

20 Estos pocillos necesitan típicamente volúmenes de ensayo que oscilan de 50 a 500  $\mu$ l. Además de los platos, muchos instrumentos, materiales, pipetas, robots, lavadores de platos y lectores de platos están disponibles comercialmente para ajustar el formato de 96 pocillos a un amplio intervalo de ensayos homogéneos y heterogéneos. Los platos de microtítulo con más pocillos, tal como platos de microtítulo de 384 pocillos, también se usan, como son métodos emergentes tal como el método de nanopocillo descrito por Schullek et al. (Anal Biochem., 30 246, 20-29, 1997).

30 En una modalidad, el cribado comprende poner en contacto una diana de esfingolípido con una biblioteca diversa de compuestos miembros, algunos de los cuales son ligandos de la diana, bajo condiciones donde los complejos entre la diana y los ligandos pueden formar, e identificar que miembros de las bibliotecas están presentes en dichos complejos. En otra modalidad no limitante, el cribado comprende poner en contacto una enzima diana con una biblioteca diversa de compuestos miembros, algunos de los cuales son inhibidores (o activadores) de la diana, bajo condiciones donde un producto o un reactivo de la reacción catalizada por la enzima producen una señal detectable. En la última modalidad, los inhibidores de la enzima diana disminuyen la señal de un producto detectable o aumentan una señal a partir de un reactivo detectable (o viceversa para los activadores).

#### Bibliotecas químicas

35 Las novedades en química combinatoria permiten la síntesis rápida y económica de cientos a miles de compuestos discretos. Estos compuestos se presentan típicamente en bibliotecas de tamaño moderado de pequeñas moléculas orgánicas diseñadas por cribado eficiente. Los métodos combinatorios, pueden usarse para generar bibliotecas imparciales adecuadas para la identificación de nuevos inhibidores. Además, pueden generarse bibliotecas más pequeñas, menos diversas, que descienden de un único compuesto parental con una actividad biológica previamente determinada. En cada caso, la falta de sistemas de cribado eficientes para dirigir específicamente moléculas biológicas terapéuticamente relevantes producidas por química combinatoria tal como inhibidores de importantes enzimas dificulta el óptimo uso de estos recursos.

45 Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados o bien por síntesis química o síntesis biológica, combinando un número de "bloques de construcción" química, tal como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal, tal como una biblioteca de polipéptidos, se forma combinando un conjunto de bloques de construcción química (aminoácidos) en un gran número de combinaciones, y potencialmente en cada forma posible, para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipéptido). Millones de compuestos químicos pueden sintetizarse a través de dicha mezcla combinatoria de bloques de construcción química.

50 Una "biblioteca" puede comprender de 2 a 50.000.000 de compuestos miembros diversos. Preferiblemente, una biblioteca comprende al menos 48 compuestos diversos, preferiblemente 96 o más compuestos diversos, más preferiblemente 384 o más compuestos diversos, más preferiblemente, 10.000 o más compuestos diversos, preferiblemente más de 100.000 miembros diversos y lo más preferiblemente más de 1.000.000 de compuestos miembros diversos. Por "diverso" se entiende que más del 50% de los compuestos en una biblioteca tienen estructuras químicas que no son idénticas a ningún otro miembro de la biblioteca. Preferiblemente, más del 75% de los compuestos en una biblioteca tienen estructuras químicas que no son idénticas a ningún otro miembro de la colección, más preferiblemente más del 90% y lo más preferiblemente más que aproximadamente 99%.

La preparación de bibliotecas químicas combinatorias se conoce bien por los expertos en la técnica. Para revisiones, véase Thompson et al., *Synthesis and application of small molecule libraries*, *Chem Rev* 96:555-600, 1996; Kenan et al., *Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries*, *Trends Biochem Sci* 19:57-64, 1994; Janda, *Tagged versus untagged libraries: methods for the generation and screening of combinatorial chemical libraries*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:10779-85, 1994; Lebl et al., *One-bead-one-structure combinatorial libraries*, *Biopolymers* 37:177-98, 1995; Eichler et al., *Peptide, peptidomimetic, and organic synthetic combinatorial libraries*, *Med Res Rev.* 15:481-96, 1995; Chabala, *Solid-phase combinatorial chemistry and novel tagging methods for identifying leads*, *Curr Opin Biotechnol.* 6:632-9, 1995; Dolle, *Discovery of enzyme inhibitors through combinatorial chemistry*, *Mol Divers.* 2:223-36, 1997; Fauchere et al., *Peptide and nonpeptide lead discovery using robotically synthesized soluble libraries*, *Can J Physiol Pharmacol.* 75:683-9, 1997; Eichler et al., *Generation and utilization of synthetic combinatorial libraries*, *Mol Med Today* 1:174-80, 1995; y Kay et al., *Identification of enzyme inhibitors from phage-displayed combinatorial peptide libraries*, *Comb Chem High Throughput Screen* 4:535-43, 2001.

Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, aunque no están limitadas a, bibliotecas de péptidos (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. núm. 5.010.175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37:487-493 (1991) y Houghton, et al., *Nature*, 354:84-88 (1991)). Otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química pueden usarse también. Dichas químicas incluyen, aunque no están limitadas a, peptoides (Publicación PCT núm. WO 91/19735); péptidos codificados (Publicación PCT WO 93/20242); bio-oligómeros aleatorios (Publicación PCT núm. WO 92/00091); benzodiazepinas (Patente de EE.UU. núm. 5.288.514); diversómeros, tales como hidantoinas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90:6909-6913 (1993)); polipéptidos vinílogos (Hagihara, et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992)); peptidomiméticos no peptídicos con andamiaje de .beta.-D-glucosa (Hirschmann, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-9218 (1992)); síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994)); oligocarbamatos (Cho, et al., *Science*, 261:1303 (1993)); y/o peptidil fosfonatos (Campbell, et al., *J. Org. Chem.* 59:658 (1994)); bibliotecas de ácidos nucleicos (véase, Ausubel, Berger y Sambrook, *all supra*); bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. núm. 5.539.083); bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn, et al., *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 (1996) y documento PCT/US96/10287); bibliotecas de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang, et al., *Science*, 274:1520-1522 (1996) y Patente de EE.UU. núm. 5.593.853); bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepines, Baum *C&E News*, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides (Patente de EE.UU. núm. 5.569.588); tiazolidinonas y metatiazanonas (Patente de EE.UU. núm. 5.549.974); pirrolidinas (Patentes de EE.UU. núms. 5.525.735 y 5.519.134); morfolino compuestos (Patente de EE.UU. núm. 5.506.337); benzodiazepinas (Patente de EE.UU. núm. 5.288.514).

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, *Advanced Chem. Tech*, Louisville Ky., *Symphony*, Rainin, Woburn, Mass., 433A *Applied Biosystems*, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.). Además, numerosas bibliotecas combinatorias están en sí mismas disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscú, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Mo., ChemStar, Ltd., Moscú, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Bio sciences, Columbia, Md., etc.).

#### Bibliotecas de lípido bioactivo

Los lípidos que se dan de forma natural o sintéticos, particularmente esfingolípidos, se sabe que modulan procedimientos en biosíntesis de esfingolípidos y señalización intracelular por ceramida, S-1-P y otros esfingolípidos (para revisiones de procedimientos de señalización celular mediada por esfingolípidos y consecuencias que surgen de ellas, véase Linn et al., "Regulation of de novo sphingolipid biosynthesis and the toxic consequences of its disruption", *Biochemical Society*, 831-835, 2001; Luberto et al., "Sphingolipid Metabolism in the Regulation of Bioactive Molecules", *Lipids*, 34:S5-S11, 1999; Kester, "Sphingolipid Metabolites and the Cellular Phenotype", *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 9:447-460, 1997; Ariga et al., "Role of Sphingolipid-mediated cell death in neurodegenerative diseases", *Journal of Lipid Research*, 39:1-16, 1998; Chan et al., "Ceramide Path in Human Lung Cell Death", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 22:460-468, 2000; y Hannun et al., "Ceramide in the eukaryotic stress response", *Cell Biology*, 10:73-80, 2000; véase también Brownlee, *Current Biology* 11:R535-R538,2001).

Véase, por ejemplo, Usta et al., "Structural Requirements of Ceramide and Sphingosine Based Inhibitors of Mitochondrial Ceramidase", *Biochemistry*, 40:9657-9668, 2000; Hannun et al., "Method of Inducing Cellular Differentiations and Altering Cell Phenotype Using Ceramide Analogs", Patente de EE.UU. núm. 5.369.030, expedida el 29 de noviembre de 1994; Wei et al., "Pharmaceutically Active Ceramide-Related Compounds", Patente de EE.UU. núm. 5.631.394, expedida el 20 de mayo de 1997; Wei et al., "Methods of Treatment Using Pharmaceutically Active Ceramide-Related Compositions", Patente de EE.UU. núm. 5.677.337, expedida el 14 de octubre de 1997; Carson et al., "Compounds for Inhibition of Ceramide-Mediated Signal Transduction", Patente de EE.UU. núm. 6.323.201 B1, expedida el 27 de noviembre de 2001; Bell et al., "Inhibition of Protein Kinase C By Long-Chain Bases", Patente de EE.UU. núm. 4.937.232, expedida el 26 de junio de 1990; Bell et al., "Inhibition of Protein Kinase C By Long-Chain Bases", Patente de EE.UU. núm. 4.816.450, expedida el 28 de marzo de 1989; Hannun et al., "Ceramidase Compositions and Methods Based Thereon", documento PCT/US01/02866 publicado como documento WO01/55410 el 2 de agosto de 2001; Kimura et al., "Effect of N,N,N-trimethylsphingosine on Protein Kinase-C Activity; Melanoma Cell Growth In Vitro; Metastatic Potential In Vivo and Human Platelet Aggregation", Patente núm.

5.331.014, fechada el 19 de julio de 1994; Igarashi et al., "Effect of N,N,N,-trimethylsphingosine on Protein Kinase C Activity Melanoma Cell Growth In Vitro; Metastatic Potential In Vivo and Human Platelet Aggregation", Patente núm. 5.137.919, fechada el 11 de agosto de 1992; Handa et al., "Effect of N,N,N,-trimethylsphingosine on Protein Kinase C Activity, Melanoma Cell Growth In Vitro, Metastatic Potential In Vivo and Human Platelet Aggregation", Patente núm. 5.151.360 fechada el 29 de septiembre de 1992; Takesako et al., "Sphingosine Analogues", documento PCT/JP98/01038, publicado como documento WO98/40349 el 16 de septiembre de 1998; Kobori et al., "Sphingosine Derivatives", documento PCT/JP00/08229, publicado como documento WO01/38295 el 31 de mayo de 2001; Takesako et al., "Sphingosine Derivatives and Medicinal Composition", documento PCT/JP98/04093, publicado como documento WO99/12890 el 18 de marzo de 1999; Liotta et al., "Sphingolipid Derivatives and Their Methods of Use", documento PCT/US99/03093, publicado como documento WO99/41266 el 19 de agosto de 1999; Macchia et al., "Ceramide Analogs, Process for their Preparation and their Use as Antitumor Agents", documento PCT/EP00/07023, publicado como documento WO01/07418 el 1 de febrero de 2001; Shayman et al., "Amino Ceramide-Like Compounds and Therapeutic Methods of Use", documento PCT/US00/18935, publicado como documento WO01/04108 el 18 de enero de 2001; Bielawska et al., "(1S,2R)-D-erhthro-2-(N-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an Inhibitor of Ceramidase", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271, 24 de mayo de 1996, págs. 12646-12654; Wanebo et al., "Ceramide and Chemotherapeutic Agents for Inducing Cell Death", documento PCT/US00/09440, publicado como documento WO00/59517 el 12 de octubre de 2000; Ali et al., "Ceramide Derivatives and Method of Use", documento PCT/US01/09894, publicado como documento WO01/72701 el 4 de octubre de 2001; Eibl et al., "Pseudoceramides", documento PCT/EP99/07698, publicado como documento WO00/21919 el 20 de abril de 2000; Jonghe et al., "Structure-Activity Relationship of Short-Chain Sphingoid Bases As Inhibitors of Sphingosine Kinase", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9:3175-3180, 1999; Arenz et al., "Synthese des ersten selektiven irreveriblen Inhibitors der neutralen Sphingomyelinase", *Angew Chem.*, 112:1498-1500, 2000; y Abe et al., "Use of Sulfolbutyl Ether -Cyclodextrin as a Vehicle for D-threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropanol-Related Glucosylceramide Synthase Inhibitors", *Analytical Biochemistry*, 287:344-347, 2000.

25 Los esfingolípidos que son útiles en la terapia basada en esfingolípidos pueden identificarse. Esto puede hacerse ensayando esfingolípidos disponibles comercialmente u obtenibles de otra forma en ensayos que miden la actividad de enzimas implicadas en el metabolismo de esfingolípidos y/o señalización intracelular.

Los esfingolípidos disponibles comercialmente (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) incluyen sin limitación D-eritro (C-18) derivados sintéticos de esfingosina, por ejemplo, D-eritro esfingosina (sintético), esfingosina-1-fosfato, D-eritro ceramida-1-fosfato, N,N-dimetilesfingosina, N,N,N-trimetilesfingosina, esfingosilfosforilcolina, esfingomielina y ceramidas; D-eritro (C-18) derivados de esfinganina (dihidroesfingosina), por ejemplo, esfinganina-1-fosfato, D-eritro esfinganina, N-acil-esfinganina C2, N-acil-esfinganina C8, N-acil-esfinganina C16, N-acil-esfinganina C18, N-Acil-esfinganina C24 y N-Acil-esfinganina C24:1; derivados de esfingosina (C18) glucosilada y fosfolípido, por ejemplo, esfingosina glucosilada, ceramida y fosfatidiletanolamina, beta D-glucosil-esfingosina y beta D-galactosil-esfingosina; D-eritro (C17) derivados, por ejemplo, D-eritro esfingosina y D-eritro esfingosina-1-fosfato; D-eritro (C20) derivados, tal como D-eritro esfingosina; y L-treoro (C18) derivados tal como L-treo esfingosina y L-treo Dihidroesfingosina (Safingol). Derivados de fitoesfingosina a partir de levadura, por ejemplo, fitoesfingosina, D-ribofitoesfingosina-1-fosfato, N-acil-fitoesfingosina C2, N-acil-fitoesfingosina C8 y N-acil-fitoesfingosina C18 también puede usarse.

40 Se conoce una variedad de métodos para sintetizar esfingolípidos y moléculas relacionadas con esfingolípidos. Además de las referencias citadas anteriormente, véase Szulc et al., "A facile regioselective synthesis of sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate, *Tetrahedron Letter* 41:7821-7824, 2000; Igarashi et al., "Sphingosine-1-Phosphate Essentially Free of L-Threo Isomer, Patente de EE.UU. núm. 5.663.404, expedida el 2 de septiembre de 1997; Boumendjel et al., "Method For Preparation of Sphingoid Bases", Patente de EE.UU. núm. 5.430.160, expedida el 4 de julio de 1995; Ito et al., "Process for the Preparation of Sphingolipids and Sphingolipid Derivatives", documento PCT/JP97/02483, publicado como documento WO98/03529 el 29 de enero de 1998; e Igarashi et al., "Method of Preparing N,N,N,-trimethylsphingosine", Patente núm. 5.248.824 fechada el 28 de septiembre de 1993.

50 Los esfingolípidos que tienen una actividad deseada se identifican por cribado de alto rendimiento (HTS) de bibliotecas combinatorias de compuestos relacionados con esfingolípidos. Las bibliotecas de esfingolípidos combinatorios se preparan según los métodos conocidos en la técnica, o pueden comprarse comercialmente. Un tipo de biblioteca de esfingolípidos combinatorios que pueden usarse es la Biblioteca de Lípidos Bioactivos BIOMOL (Affiniti Research Products Ltd., Mamhead, R.U.).

#### Ensayos de cribado de alto rendimiento (HTS)

55 El HTS típicamente usa ensayos automatizados para buscar a través de grandes números de compuestos para una actividad deseada. Típicamente los ensayos HTS se usan para encontrar nuevos fármacos cribando compuestos químicos que actúan en una enzima o molécula particular. Por ejemplo, si un compuesto químico inactiva una enzima probaría ser efectiva en la prevención de un procedimiento en una célula que provoca una enfermedad. Los métodos de alto rendimiento permiten a los investigadores probar miles de compuestos químicos diferentes contra cada diana muy rápidamente usando sistemas de manejo robótico y análisis automatizados de resultados.



Como se usa en esta memoria, "cribado de alto rendimiento" o "HTS" se refiere al rápido cribado in vitro de grandes números de compuestos (bibliotecas); generalmente decenas a cientos de miles de compuestos, usando ensayos de cribado robótico. El cribado de ultra alto rendimiento (uHTS) generalmente se refiere al cribado de alto rendimiento acelerado a más de 100.000 ensayos por día.

- 5 Para alcanzar el cribado de alto rendimiento, es mejor alojar las muestras en un vehículo o plataforma multicontenedor. Un vehículo multicontenedor facilita medir las reacciones de una pluralidad de compuestos candidatos de forma simultánea. Los microplatos de multi-pocillo pueden usarse como el vehículo. Dichos microplatos multi-pocillo, y métodos para su uso en numerosos ensayos, se conocen ambos en la técnica y están comercialmente disponibles.
- 10 Los ensayos de cribado pueden incluir controles con propósitos de calibrado y confirmación de manipulación apropiada de los componentes del ensayo. Los pocillos de blancos que contienen todos los reactivos aunque no miembros de la biblioteca química se incluyen normalmente. Como otro ejemplo, un inhibidor (o activador) conocido de una enzima para la que se buscan moduladores, pueden incubarse con una muestra del ensayo, y la disminución (o aumento) resultante en la actividad enzimática se determina según los métodos en esta memoria. Se apreciará
- 15 que los moduladores pueden combinarse también con los activadores o inhibidores enzimáticos para encontrar moduladores que inhiben la activación o represión enzimática que se provoca de otra forma mediante la presencia del modulador enzimático conocido. De forma similar, cuando se buscan ligandos a diana de esfingolípido, pueden estar presentes ligandos conocidos de la diana en los pocillos de ensayo de control/calibrado.

Reacciones enzimáticas de medida y de unión durante ensayos de cribado

- 20 Técnicas para medir la progresión de reacciones enzimáticas y de unión en vehículos multicontenedor se conocen en la técnica e incluyen, aunque no están limitadas a, lo siguiente.

Los ensayos espectrofotométricos y espectrofluorométricos se conocen bien en la técnica. Ejemplos de dichos ensayos incluyen el uso de ensayos colorimétricos para la detección de peróxidos, como se describe en el Ejemplo 1(b) y Gordon, A. J. y Ford, R. A., *The Chemist's Companion: A Handbook Of Practical Data, Techniques, And References*, John Wiley and Sons, N.Y., 1972, Página 437.

- 25 La espectrometría de fluorescencia puede usarse para monitorizar la generación de productos de reacción. La metodología de fluorescencia es generalmente más sensible que la metodología de absorción. El uso de sondas fluorescentes se conoce bien por los expertos en la técnica. Para revisiones, véase Bashford et al., *Spectrophotometry and Spectrofluorometry: A Practical Approach*, págs. 91-114, IRL Press Ltd. (1987); y Bell, *Spectroscopy In Biochemistry*, Vol. I, págs. 155-194, CRC Press (1981).

- 35 En los métodos espectrofluorométricos, las enzimas se exponen a sustratos que cambian su fluorescencia intrínseca cuando se procesan por la enzima diana. Típicamente, el sustrato no es fluorescente y se convierte a un fluoróforo a través de una o más reacciones. Como un ejemplo no limitante, la actividad SMasa puede detectarse usando el reactivo Amplex® Red (Molecular Probes, Eugene, OR). Para medir la actividad de esfingomielinasa usando Amplex Red, se dan las siguientes reacciones. Primero, la SMasa hidroliza la esfingomielina para dar ceramida y fosforicolina. Segundo, la fosfatasa alcalina hidroliza la fosforicolina para dar colina. Tercero, la colina se oxida mediante colina oxidasa a betaína. Finalmente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en presencia de peroxidasa de rábano picante, reacciona con Amplex Red para producir el producto fluorescente, Resorufina, y la señal del mismo se detecta usando espectrofluorometría.

- 40 La polarización de fluorescencia (FP) se basa en una disminución en la velocidad de rotación molecular de un fluoróforo que se da en la unión a una molécula mayor, tal como una proteína receptora, permitiendo la emisión fluorescente polarizada mediante el ligando unido. FP se determina empíricamente midiendo los componentes verticales y horizontales de emisión de fluoróforo seguido de excitación con luz polarizada plana. La emisión polarizada se aumenta cuando la rotación molecular de un fluoróforo se reduce. Un fluoróforo produce una mayor
- 45 señal polarizada cuando se une a una molécula mayor (es decir, un receptor), ralentizando la rotación molecular del fluoróforo. La magnitud de la señal polarizada se refiere cuantitativamente a la extensión de unión de ligando fluorescente. Por consiguiente, la polarización de la señal "unida" depende del mantenimiento de la unión de alta afinidad.

- 50 FP es una tecnología homogénea y las reacciones son muy rápidas, tomando de segundos a minutos para alcanzar el equilibrio. Los reactivos son estables, y pueden prepararse cargas grandes, dando por resultado alta capacidad de reproducción. Por estas propiedades, FP ha probado ser altamente automatizable, a menudo llevado a cabo con una única incubación con un único reactivo marcador-receptor, premezclado. Para una revisión, véase Owickiet al., *Application of Fluorescence Polarization Assays in High-Throughput Screening*, *Genetic Engineering News*, 17:27, 1997.

- 55 FP es particularmente deseable ya que su lectura es independiente de la intensidad de emisión (Checovich, W. J., et al., *Nature* 375:254-256, 1995; Dandliker, W. B., et al., *Methods in Enzymology* 74:3-28, 1981) y es así insensible a la presencia de compuestos coloreados que apagan la emisión de fluorescencia. FP y FRET (véase a continuación) son muy adecuados para identificar compuestos que bloquean las interacciones entre receptores de esfingolípidos y

sus ligandos. Véase, por ejemplo, Parker et al., Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays, *J Biomol Screen* 5:77-88, 2000.

5 Los fluoróforos derivados de esfingolípidos que pueden usarse en ensayos FP están disponibles comercialmente. Por ejemplo, Molecular Probes (Eugene, OR) vende normalmente fluoróforos de esfingomielina y una ceramida. Estos son, respectivamente, N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-pentanoil)esfingosil fosfocolina (BODIPY® FL C5-esfingomielina); N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-dodecanoil)esfingosil fosfocolina (BODIPY® FL C12-esfingomielina); y N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-pentanoil)esfingosina (BODIPY® FL C5-ceramida). La Patente de EE.UU. núm. 4.150.949, (Inmunoensayo para gentamicina) describe gentamicinas marcadas con fluoresceína, que incluye fluoresceintiocarbamil gentamicina. Fluoróforos adicionales pueden prepararse usando métodos bien conocidos por el artesano experto.

10 Lectores ejemplares de fluorescencia normal y polarizada incluyen el sistema de polarización de fluorescencia POLARION (Tecan AG, Hombrechtikon, Suiza). Lectores generales de plato multipocillo para otros ensayos están disponibles, tal como el lector VERSAMAX y el espectrofotómetro de plato multipocillo SPECTRAMAX (ambos de Molecular Devices).

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) es otro ensayo útil para detectar la interacción y se ha descrito anteriormente. Véase, por ejemplo, Heim et al., *Curr. Biol.* 6:178-182, 1996; Mitra et al., *Gene* 173:13-17 1996; y Selvin et al., *Meth. Enzymol.* 246:300-345, 1995. FRET detecta la transferencia de energía entre dos sustancias fluorescentes en estrecha proximidad, que tienen longitudes de onda de excitación y emisión conocidas. Como un ejemplo, una proteína puede expresarse como una proteína de fusión con proteína fluorescente verde (GFP). Cuando dos proteínas fluorescentes están en proximidad, tal como cuando una proteína interactúa específicamente con una molécula diana, la energía de resonancia puede transferirse de una molécula excitada a la otra. Como resultado, el espectro de emisión de la muestra se desplaza, lo que puede medirse por un fluorómetro, tal como un fluorómetro multipocillo fMAX (Molecular Devices, Sunnyvale Calif.).

20 El ensayo de centelleo por proximidad (SPA) es un ensayo particularmente útil para detectar una interacción con la molécula diana. SPA se usa ampliamente en la industria farmacéutica y se ha descrito (Hanselman et al., *J. Lipid Res.* 38:2365-2373 (1997); Kahl et al., *Anal. Biochem.* 243:282-283 (1996); Undenfriend et al., *Anal. Biochem.* 161:494-500 (1987)). Véase también las Patentes de EE.UU. núms. 4.626.513 y 4.568.649, y la Patente Europea núm. 0.154.734. Un sistema disponible comercialmente usa platos recubiertos de centelleador FLASHPLATE (NEN Life Science Products, Boston, MA).

La molécula diana puede unirse a los platos de centelleador mediante una variedad de medios bien conocidos. Están disponibles platos de centelleador que se derivan para unirse a proteínas de fusión tales como proteínas de fusión GST, His6 o Flag. Donde la molécula diana es un complejo de proteína o un multímero, una proteína o subunidad puede unirse al plato primero, después los demás componentes del complejo se añaden más tarde bajo condiciones de unión, dando por resultado un complejo unido.

35 En un ensayo SPA típico, los productos génicos en la acumulación de expresión se habrán radiomarcado y añadido a los pocillos, y dejado interactuar con la fase sólida, que es la molécula diana inmovilizada y el recubrimiento de centelleo en los pocillos. El ensayo puede medirse inmediatamente o dejarse alcanzar el equilibrio. En cualquier caso, cuando un radiomarcaje se pone suficientemente cerca del recubrimiento de centelleo, produce una señal detectable por un dispositivo tal como un contador de centelleo de microplato TOPCOUNT NXT (Packard BioScience Co., Meriden Conn.). Si un producto de expresión radiomarcado se une a la molécula diana, el radiomarcaje permanece en la proximidad del centelleador lo suficiente para producir una señal detectable.

40 En contraste, las proteínas marcadas que no se unen a la molécula diana, o se unen solo brevemente, no permanecerán cerca del centelleador lo suficiente para producir una señal por encima del fondo. Cualquier tiempo pasado cerca del centelleador provocado por movimiento Browniano aleatorio no dará por resultado tampoco una cantidad significativa de señal. Igualmente, el radiomarcaje residual no incorporado usado durante la etapa de expresión puede estar presente, aunque no generará señal significativa por estar en disolución más que interactuando con la molécula diana. Estas interacciones no enlazantes provocarán por lo tanto un cierto nivel de señal de fondo que puede eliminarse matemáticamente. Si se obtienen demasiadas señales, pueden añadirse sal u otros modificadores directamente a los platos de ensayo hasta que se obtenga la especificidad deseada (Nichols et al., *Anal. Biochem.* 257:112-119, 1998).

Ensayos para enzimas implicadas en el metabolismo de esfingolípidos

55 SMasa: Una variedad de métodos están disponibles para medir la actividad de SMasa. Es posible probar la actividad de SMasa in vivo a través del marcaje de las células con un sustrato radioactivo para la SMasa y después determinar el nivel de radiomarcaje en los productos enzimáticos. Liu, B., y Y. A. Hannun. "Sphingomyelinase Assay Using Radiolabeled Substrate." *Sphingolipid Metabolism and Cell Signaling*, Pt a., 164-67. *Methods in Enzymology*, vol. 311, 2000. Los ensayos HTS de actividad de SMasa se describen por Lin et al., "Sphingomyelinase Assay Using

- Radiolabeled Substrate", pág. 164, Liu et al., Barbone et al., "Robotic Assay of Sphingomyelinase for High-Throughput Screening", pág. 168, y Hessler et al., "A High Throughput Sphingomyelinase Assay", pág. 176 en: Sphingolipid Metabolism and Cell Signaling, Hannun, Yusuf A. (editor); Merrill, Alfred H. (editor), Academic Press (1999). La actividad de SMasa puede determinarse también in vitro o bien usando SM radiomarcado, o un análogo cromogénico de SM o derivados coloreados y fluorescentes de SM natural. Torley et al. (A turbidometric assay for phospholipase C and sphingomyelinase, Anal Biochem 222:461-464, 1994) describe el ensayo turbidométrico para SMasa adecuado para cribado de alto volumen usando sustratos no modificados.
- SPH quinasa: Ensayos para SPH quinasa se describen por Olivera et al., "Assaying Sphingosine Kinase Activity", Methods in Enzymology, 311:215-223, 1999; y Caligan et al., "A High-Performance Liquid Chromatographic Method to Measure Sphingosine 1-Phosphate and Related Compounds from Sphingosine Kinase Assays and Other Biological Samples", Analytical Biochemistry, 281:36-44, 2000.
- CER quinasa: Los ensayos para CER quinasa se describen por Bajjalieh et al., "Ceramide Kinase", Methods in Enzymology, 311:207-215, 1999.
- Ceramidasa: Los ensayos para ceramidasa se describen por Zhang et al., "Human Acid Ceramidase Gene: Novel Mutations in Farber Disease", Molecular Genetics and Metabolism, 70:301-309, 2000.
- CER Sintasa: Los ensayos para CER sintasa se describen por Bose et al., "Measurement of Ceramide Synthase Activity", Methods in Enzymology, 322:378-382, 2000.
- Glucosilceramida Sintasa: Los ensayos para glucosilceramida sintasa se describen por Shayman et al., "Glucosylceramide Synthase: Assay and Properties", Methods in Enzymology, 311:42-49, 1999.
- Ensayos para esfingolípidos:
- Los ensayos S-1-P se describen por Ruwisch et al., "An improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of sphingosine-1-phosphate in complex biological materials", Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 363:358-363, 2001; Edsall et al., "Enzymatic Measurement of Sphingosine 1-Phosphate", Analytical Biochemistry, 272:80-86, 1999; y Edsall et al., "Enzymatic Method for Measurement of Sphingosine 1-Phosphate", Methods in Enzymology, 312:9-16, 2000.
- Los ensayos SPH se describen por Chmura et al. (Down-Regulation of Ceramide Production Abrogates Ionizing Radiation-Induced Cytochrome c Release and Apoptosis, Molecular Pharmacology, 57:792-796, 2001); Patente de EE.UU. núm. 5.677.189, y Shephard et al. (Liquid chromatographic determination of the sphinganine/sphingosine ratio in serum, Journal of Chromatography B, 710:291-222, 1998).
- Composiciones farmacéuticas
- Otro aspecto de la invención se deriva a composiciones, que incluyen aunque no están limitadas a composiciones farmacéuticas y/o biológicas. Según la invención, una "composición" se refiere a una mezcla que comprende al menos un vehículo, preferiblemente un vehículo fisiológicamente aceptable, y uno o más anticuerpos terapéuticos según la invención. El término "vehículo" define un compuesto químico que no inhibe o evita la incorporación de agentes terapéuticos en células o tejidos. Un vehículo es típicamente una sustancia inerte que permite a un ingrediente activo formularse o componerse en una forma de dosificación adecuada (por ejemplo, una píldora, una cápsula, un gel, una película, un comprimido, una micropartícula (por ejemplo, una microesfera), una disolución, etc.). Un "vehículo fisiológicamente aceptable" es un vehículo adecuado para usar bajo condiciones fisiológicas que no anulan (reducen, inhiben o evitan) la actividad biológica y las propiedades del compuesto. Por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO) es un vehículo ya que facilita la absorción de muchos compuestos orgánicos en las células o tejidos de un organismo. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo fisiológicamente aceptable, preferiblemente un vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable, en que se dispone el agente terapéutico. Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición en donde el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable, mientras una "composición veterinaria" es una en donde el vehículo es un vehículo veterinariamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo veterinariamente aceptable" incluye cualquier medio o material que no es indeseable biológicamente o de otra forma, es decir, el vehículo puede administrarse a un organismo junto con un agente terapéutico, composición o compuesto sin provocar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera nociva con el complejo o cualquiera de sus componentes o el organismo. Ejemplos de reactivos farmacéuticamente aceptables se proporcionan en la Farmacopea de los Estados Unidos, el Formulario de los Estados Unidos, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md. 1990. Los términos "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectiva" significan una cantidad suficiente para inducir o efectuar una respuesta medible en la célula, tejido u organismo diana. Lo que constituye una cantidad terapéuticamente efectiva dependerá de una variedad de factores que el médico conecedor tendrá en cuenta al llegar al régimen de dosificación deseado.
- Las composiciones de la invención pueden comprender adicionalmente otros componentes químicos, tales como diluyentes y excipientes. Un "diluyente" es un compuesto químico diluido en un disolvente, preferiblemente un disolvente acuoso, que facilita la disolución del agente terapéutico en el disolvente, y puede servir también para

estabilizar la forma biológicamente activa del agente terapéutico o uno o más de sus componentes. Las sales disueltas en disoluciones tamponadas se utilizan como diluyentes en la técnica. Por ejemplo, los diluyentes preferidos son disoluciones tamponadas que contienen una o más sales diferentes. Una disolución tamponada preferida es solución salina tamponada de fosfato (particularmente en conjunto con composiciones previstas para administración farmacéutica), ya que imita las condiciones salinas de la sangre humana. Como las sales de tampón pueden controlar el pH de una disolución a bajas concentraciones, un diluyente tamponado raramente modifica la actividad biológica de un agente terapéutico.

Un "excipiente" es cualquier sustancia más o menos inerte que puede añadirse a una composición para conferir una propiedad adecuada, por ejemplo, una consistencia adecuada o para formar un fármaco. Excipientes y vehículos adecuados incluyen, en particular, rellenos tal como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, preparados de celulosa tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, agar, pectina, goma de xantano, goma guar, goma garrofin, ácido hialurónico, almidón de patata caseína, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, poliácido, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, también pueden incluirse agentes disgregantes, tal como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico. Otros excipientes y vehículos adecuados incluyen hidrogeles, hidrocoloideos gelificables y quitosano. Las microesferas y microcápsulas de quitosano pueden usarse como vehículos. Véase el documento WO 98/52547 (que describe formulaciones de microesferas para dirigir compuestos al estómago, comprendiendo las formulaciones un núcleo interno (que incluye opcionalmente un hidrocoloide gelificado) que contiene uno o más ingredientes activos, una membrana comprendida por un polímero insoluble en agua (por ejemplo, etilcelulosa) para controlar la velocidad de liberación del(de los) ingrediente(s) activo(s), y una capa externa comprendida por un polímero catiónico bioadhesivo, por ejemplo, un polisacárido catiónico, una proteína catiónica y/o un polímero catiónico sintético; patente de EE.UU. núm. 4.895.724. Típicamente, el quitosano se reticula usando un agente adecuado, por ejemplo, glutaraldehído, glioxal, epiclorhidrina y succinaldehído. Las composiciones que emplean quitosano como un vehículo pueden formularse en una variedad de formas de dosificación, que incluyen píldoras, comprimidos, micropartículas y microesferas, que incluyen las proporcionadas para la liberación controlada del(de los) ingrediente(s) activo(s). Otros polímeros catiónicos bioadhesivos adecuados incluyen gelatina ácida, poligalactosamina, poliaminoácidos tales como polilisina, polihistidina, poliornitina, compuestos policuaternarios, prolamina, poliimina, dietilaminoetildextrano (DEAE), DEAE-imina, DEAE-metacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-dextrano, DEAE-celulosa, poli-p-aminoestireno, polioxetano, copolimetacrilatos, poliamidoaminas, almidones catiónicos, polivinilpiridina y politiodietilaminometileno.

Las composiciones de la invención pueden formularse de cualquier manera adecuada. Los agentes terapéuticos pueden dispersarse uniformemente (homogéneamente) o no uniformemente (heterogéneamente) en el vehículo. Las formulaciones adecuadas incluyen formulaciones secas y líquidas. Las formulaciones secas incluyen polvos secos por congelación y liofilizados, que son particularmente muy adecuados para reparto en aerosol a los senos o pulmón, o para un almacenaje a largo plazo seguido por reconstitución en un diluyente adecuado antes de la administración. Otras formulaciones secas preferidas incluyen aquellas en donde una composición según la invención se comprime en forma de comprimido o píldora adecuada para la administración oral o compuesta en una formulación de liberación sostenida. Cuando la composición se pretende para administración oral pero el agente terapéutico se va a repartir al epitelio en los intestinos, se prefiere que la formulación se encapsule con un recubrimiento entérico para proteger la formulación y prevenir la liberación prematura de los agentes terapéuticos incluidos en ella. Como los expertos en la técnica apreciarán, las composiciones de la invención pueden ponerse en cualquier forma de dosificación adecuada. Las píldoras y comprimidos representan algunas de dichas formas de dosificación. Las composiciones pueden encapsularse también en cualquier cápsula adecuada u otro material de recubrimiento, por ejemplo, por compresión, inmersión, recubrimiento en bombo, secado por pulverización, etc. Cápsulas adecuadas incluyen aquellas hechas a partir de gelatina y almidón. A su vez, dichas cápsulas pueden recubrirse con uno o más materiales adicionales, por ejemplo, un recubrimiento entérico, si se desea. Las formulaciones líquidas incluyen formulaciones acuosas, geles y emulsiones.

En una realización, la composición farmacéutica se formula para reparto cardiaco rápido. Un tipo de composición farmacéutica que se formula para reparto cardiaco rápido es una composición farmacéutica inyectable. Las composiciones farmacéuticas líquidas que son disoluciones o suspensiones estériles pueden utilizarse por ejemplo, mediante inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal o subcutánea. Las disoluciones estériles pueden administrarse también de forma intravenosa. El ingrediente activo puede prepararse como una composición sólida estéril que puede disolverse o suspenderse en el momento de la administración usando agua estéril, solución salina, u otro medio inyectable estéril apropiado. Se pretende que los vehículos incluyan aglutinantes necesarios e inertes, agentes de suspensión, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes, conservantes, tintes y recubrimientos.

Algunas realizaciones preferidas afectan a composiciones que comprenden un recubrimiento bioadhesivo, preferiblemente un mucoadhesivo. Un "recubrimiento bioadhesivo" es un recubrimiento que permite a una sustancia (por ejemplo, una composición o agente terapéutico según la invención) adherirse a una superficie biológica o sustancia mejor que como se da en ausencia del recubrimiento. Un "recubrimiento mucoadhesivo" es un recubrimiento bioadhesivo preferido que permite a una sustancia, por ejemplo, una composición según la invención, adherirse mejor a la mucosa que como se da en ausencia del recubrimiento. Por ejemplo, partículas micronizadas (por ejemplo, partículas que tienen un diámetro medio de aproximadamente 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 o 100  $\mu\text{m}$ ) pueden recubrirse con un mucoadhesivo. En ejemplos en donde el agente terapéutico es una molécula

soluble, tal como anticuerpos y derivados de anticuerpo según la invención, los diámetros preferidos incluyen aunque no están limitados a aproximadamente 0,1, 0,3, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y 1,0  $\mu\text{m}$ . En ejemplos donde el agente terapéutico es una molécula soluble, tal como anticuerpos y derivados de anticuerpo según la invención, los diámetros preferidos son aproximadamente 0,1, 0,3, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y 1,0  $\mu\text{m}$ . Las partículas recubiertas pueden entonces montarse en una forma de dosificación adecuada para el reparto a un organismo. Preferiblemente, y dependiendo de la posición donde se expresa el resto de transporte a la superficie celular que es objetivo, la forma de dosificación se recubre entonces con otro recubrimiento para proteger la formulación hasta que alcance la posición deseada, donde el mucoadhesivo permite que la formulación se conserve mientras los agentes terapéuticos interactúan con el resto de transporte a la superficie celular diana.

Los expertos en la técnica apreciarán que cuando las composiciones de la presente invención se administran como agentes para alcanzar un resultado biológico deseado particular, que puede incluir un(os) efecto(s) terapéutico(s) o protector(es), puede ser necesario combinar los agentes terapéuticos de la invención con un vehículo farmacéutico adecuado. La elección de vehículo farmacéutico y la preparación del agente terapéutico como un agente terapéutico o protector dependerá del uso pretendido y modo de administración. Las formulaciones adecuadas y métodos de administración de agentes terapéuticos incluyen aquellos de reparto oral, pulmonar, nasal, bucal, ocular, dérmico, rectal o vaginal.

Dependiendo del modo de reparto empleado, la entidad funcional dependiente del contexto puede repartirse en una variedad de formas farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, la entidad funcional dependiente del contexto puede repartirse en forma de un sólido, disolución, emulsión, dispersión, micela, liposoma y similares, incorporada en una píldora, cápsula, comprimido, supositorio, aerosol, gota o pulverizado. Las píldoras, comprimidos, supositorios, aerosoles, polvos, gotas y pulverizadores pueden tener estructuras multicapa complejas y tener un gran intervalo de tamaños. Los aerosoles, polvos, gotas y pulverizados pueden oscilar de pequeños (1 micra) a grandes (200 micras) en tamaño.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse en forma de un sólido, una disolución, una emulsión, una dispersión, una micela, un liposoma y similares, en donde la composición resultante contiene uno o más de los compuestos de la presente invención, como un ingrediente activo, en mezcla con un vehículo o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones enterales o parenterales. El ingrediente activo puede componerse, por ejemplo, con los habituales vehículos farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, para comprimidos, gránulos, cápsulas, supositorios, disoluciones, emulsiones, suspensiones y cualquier otra forma adecuada para el uso. Los vehículos que pueden usarse incluyen glucosa, lactosa, manosa, goma arábica, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, triglicéridos de longitud de cadena media, dextranos y otros vehículos adecuados para el uso en la fabricación de preparados, en forma sólida, semisólida o líquida. Además pueden usarse agentes auxiliares, de estabilización, de espesamiento y colorantes y perfumes. Ejemplos de un agente seco de estabilización incluye triulosa, preferiblemente a concentraciones de 0,1% o mayores (Véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. núm. 5.314.695).

Se prefieren generalmente composiciones farmacéuticas que se dirigen preferentemente a tejidos cardiacos. Como un ejemplo no limitante, la Patente de EE.UU. 5.876.747 a Stracher et al. reivindica liposomas que viajan preferentemente al músculo cardiaco y esquelético.

#### 40 Dispositivos y equipos médicos

Los dispositivos médicos que incorporan los agentes terapéuticos de la invención pueden prepararse y usarse. Dichos dispositivos y equipos pueden diseñarse para usar por personal médico entrenado en, por ejemplo, hospitales, ambulancias y similares. Adicional o alternativamente, dichos dispositivos y equipos pueden diseñarse para usarse por individuos no entrenados, que incluye un paciente que necesita el tratamiento, en situaciones donde no está disponible personal médico entrenado. Ejemplos no limitantes de dichos dispositivos y equipos se describen en la Patente de EE.UU. 4.658.830 a Sarnoff. Dichos dispositivos y equipos pueden incluir adicionalmente otros dispositivos (suplementarios) y formulaciones útiles para tratar trastornos cardiacos. Un ejemplo no limitante de un dispositivo suplementario tal es un desfibrilador portátil y dispositivos similares, tal como se describe en la Patente de EE.UU. RE 30.750 a Diack et al. Un ejemplo limitante de una formulación suplementaria es una que incluye compuestos útiles para tratar procesos asociados con trastornos cardiacos, tal como los que se describen en la Patente de EE.UU. 6.130.235 a Mavunkel et al.

Los dispositivos médicos que incorporan ligandos de unión a esfingolípidos, tal como los anticuerpos según la invención incluyen los que se denominan normalmente como "máquinas de diálisis" (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 6.080.321). En este tipo de dispositivo médico cardiaco con base de esfingolípidos, los ligandos de esfingolípidos se inmovilizan en una superficie en el dispositivo. La sangre de un paciente se bombea en el dispositivo de una manera tal como para poner la sangre en contacto con los ligandos de esfingolípidos. Los esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotóxicos y/o sus precursores metabólicos en la sangre se unen a los ligandos de esfingolípidos inmovilizados, eliminando así esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotóxicos y/o sus precursores metabólicos menos tóxicos de la sangre. La sangre, que se devuelve al paciente después de pasar a través del dispositivo, abandona el dispositivo mientras el esfingolípidos que era objetivo permanece unido a, y así retenido por,

los ligandos de esfingolípido inmovilizados. La sangre del paciente entra de nuevo al cuerpo del paciente relativa o completamente reducida en esfingolípidos que eran objetivos. El paso de la sangre de un paciente a través del dispositivo se repite tantas veces como se necesite para alcanzar el efecto deseado de disminuir la concentración de esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotóxicos y sus precursores metabólicos.

- 5 Un catéter permanente se insertaría en el área en riesgo en el corazón. El catéter tendría un catéter interno más pequeño que se insertaría posteriormente. El catéter más pequeño se recubriría con un anticuerpo u otros ligandos de unión a esfingolípido que actuarían como una pila para eliminar los esfingolípidos en el área enfocada. Esto lleva a una reducción localizada o eliminación completa de esfingolípidos indeseables.

10 Se describen en esta memoria equipos diagnósticos y terapéuticos relacionados con terapia con base de esfingolípidos. También se describen equipos para determinar el diagnóstico o pronóstico de un paciente. Estos equipos comprenden preferiblemente dispositivos y reactivos para medir los niveles de uno o más marcadores en una muestra de ensayo de un paciente, e instrucciones para realizar el ensayo. Opcionalmente, los equipos pueden contener uno o más medios para convertir el(los) nivel(es) de marcador(es) a un pronóstico. Dichos equipos contienen preferiblemente reactivos suficientes para realizar una o más de dichas determinaciones.

15 Más específicamente, un equipo diagnóstico comprende cualquiera de los siguientes reactivos y/o componentes en cualquiera combinación.

1. Un primer reactivo detectable o marcado de forma detectable que se une a un esfingolípido o metabolito de esfingolípido de interés. El reactivo de unión al esfingolípido puede, aunque no necesita, ser un anticuerpo o un derivado de anticuerpo que comprende un resto detectable. El reactivo de unión a esfingolípido se almacena en un contenedor que se puede abrir en el equipo, o se une a una superficie de un sustrato de manera que es accesible a otros reactivos. Ejemplos de lo último incluyen tiras de ensayo.

20

2. Si el primer reactivo ni es detectable ni está marcado de forma detectable, el equipo puede comprender un segundo reactivo detectable o marcado de forma detectable que se une al primer reactivo (por ejemplo, un anticuerpo secundario) o que produce una señal detectable cuando está en estrecha proximidad al primer reactivo (por ejemplo, como resulta de transferencia de energía por resonancia fluorescente FRET). En cualquier caso, la señal producida a partir del segundo reactivo correlaciona con la cantidad de esfingolípido en la muestra.

25

3. Uno o más reactivos de control positivo. Típicamente, estos reactivos comprenden un compuesto que se conoce por producir una señal en el ensayo. En una realización, los reactivos de control positivo son estándares, es decir, comprenden una cantidad conocida de un compuesto detectable o marcado de forma detectable, a partir de cuya señal puede compararse con la señal a partir de una muestra de ensayo. Además de servir como reactivos de control positivo, pueden usarse para desarrollar curvas de calibrado que relacionan la cantidad de señal a la concentración conocida de un compuesto detectable o marcado de forma detectable. La señal de una muestra de ensayo se compara con la curva de calibrado para determinar que concentración del compuesto detectable o marcado de forma detectable corresponde a la señal de la muestra de ensayo. En esta realización, el equipo proporciona medidas cuantitativas de la cantidad de un esfingolípido en una muestra de ensayo.

30

35

4. Uno o más reactivos de control negativo. Típicamente, estos reactivos de control pueden comprender tampón u otra disolución que no contiene ninguno de los reactivos primero o segundo detectables o marcados de forma detectable y no producirían así ninguna señal detectable. Cualquier señal que se detecta refleja el nivel de fondo de "ruido" en el ensayo. Otro tipo de reactivo de control negativo contiene la mayoría de los componentes necesarios para que se produzca la señal del ensayo, aunque carece de al menos uno de dichos componentes y por lo tanto no produciría una señal. Aún otro tipo de reactivo de control negativo contiene todos los componentes necesarios para que se produzca la señal del ensayo, aunque también contiene un inhibidor del proceso que produce la señal.

40

5. Uno o más reactivos auxiliares para usar en los ensayos diagnósticos del equipo, por ejemplo, tampones, alcoholes, disoluciones ácidas, etc. Estos reactivos están generalmente disponibles en instalaciones médicas y así son componentes opcionales del equipo. Sin embargo, estos reactivos se incluyen preferiblemente en el equipo para asegurar que se usan reactivos de suficiente pureza y esterilidad, ya que los conjugados de proteína resultantes se van a administrar a mamíferos, que incluyen seres humanos, con propósitos médicos, y para proporcionar equipos que pueden usarse en situaciones donde las instalaciones médicas no están fácilmente disponibles, por ejemplo, cuando se camina en sitios situados lejos de instalaciones médicas, o en situaciones donde la presencia de estos reactivos auxiliares permiten el tratamiento inmediato de un paciente fuera de una instalación médica en oposición al tratamiento que llega a algún tiempo más tarde (por ejemplo,

45

50

6. Instrucciones a una persona que usa un equipo para su uso. Las instrucciones pueden estar presentes en uno o más de los componentes del equipo, el envase del equipo y/o un prospecto del equipo.

Un equipo terapéutico comprende cualquiera de los siguientes reactivos y/o componentes en cualquiera combinación.

55

1. Uno o más agentes terapéuticos.

2. Si el(los) agente(s) terapéutico(s) no se formula(n) para repartir por medio del canal alimentario, que incluye aunque no está limitado a reparto sublingual, un dispositivo capaz de repartir el agente terapéutico a través de alguna otra ruta. Un tipo de dispositivo para reparto parenteral es una jeringa que se usa para inyectar el agente terapéutico en el cuerpo de un animal que necesita el agente terapéutico. Los dispositivos de inhalación también pueden usarse. Un dispositivo para repartir gentamicina a un paciente por medio de inhalación se describe en la patente de EE.UU.
3. Contenedores separados, cada uno de los que comprende uno o más reactivos del equipo. En una realización preferida, los contenedores son viales que contienen formulaciones liofilizadas estériles, de una composición terapéutica que son adecuadas para la reconstitución.
4. Instrucciones a una persona que usa un equipo para su uso. Las instrucciones pueden estar presentes en uno o más de los componentes del equipo, el envase del equipo y/o un prospecto del equipo.

Para un mejor entendimiento de la presente invención, se hace referencia a los dibujos de acompañamiento y descripción detallada y su alcance se mostrará en las reivindicaciones añadidas.

### Ejemplos

- Los siguientes ejemplos no son limitantes y son meramente representativos de varios aspectos y características de la presente invención.

Ejemplo 1: La producción de esfingosina en conejos aumenta en la isquemia cardiaca

- Los niveles tisulares de esfingosina (SPH) en corazones de conejo adulto bajo varias condiciones se determinaron como sigue. Los conejos se sometieron a perfusión coronaria retrógrada con condiciones hipóxicas (oxígeno bajo) (es decir, 95% de CO<sub>2</sub>; 5% de O<sub>2</sub>) o tampones de Krebs normales (equilibrados con 95% de O<sub>2</sub>; 5% de CO<sub>2</sub>). Los conejos se sacrificaron, y los corazones se quitaron y se homogeneizaron rápidamente. Los esfingolípidos se extrajeron a partir de homogeneizados usando protocolos esencialmente como se describe por Sabbadini et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 193:752-758, 1993. El análisis de HPLC de los lípidos extraídos reveló aumentos significativos en los niveles de SPH del tejido para corazones perfundidos con CO<sub>2</sub> cuando se compara con corazones expuestos a condiciones de control (20 veces, p<0,001). Estos aumentos se dan después de solo 5 minutos de hipoxia.

Ejemplo 2: Producción de esfingosina en seres humanos

- Los niveles en suero de niveles de SPH en pacientes humanos que experimentan isquemia cardiaca se examinaron como sigue. Las muestras de suero se tomaron de pacientes que se presentaron a sí mismas al departamento de emergencias del Centro Médico Naval de San Diego usando estrictos protocolos de sujetos humanos. Los esfingolípidos en las muestras de sangre se extrajeron y analizaron como se describe anteriormente. Los pacientes con isquemia de miocardio confirmada tenía niveles de SPH significativamente mayores que cualquiera de los grupos de control.

- Los niveles de SPH en suero en seis "atletas en buenas condiciones" se combinaron como un grupo de control. Estos sujetos eran de las fuerzas especiales de la Armada (Navy Seals) y atletas olímpicos del Centro de Entrenamiento Olímpico que se ejercitaron hasta agotamiento en cintas a 49°C. En el caso de los atletas olímpicos, los individuos en descanso se evaluaron también. El grupo de control atlético en buenas condiciones tuvo niveles de SPH en suero de  $4,18 \pm 1,8$  pmol/mL, oscilando desde el límite inferior de detección (5 pmol/mL) a 16,4 pmol/mL.

- Un grupo de control de edad equivalente (47-79 años) consistió en quince sujetos inscritos en el Programa de Capacitación de Adultos de la Universidad Estatal de San Diego (SDSU) que dieron negativo para la tensión por ejercicio (cinta) y sin síntomas de síndrome coronario agudo (por ejemplo, dolor en el pecho). El grupo de control de edad equivalente tuvo un nivel medio de SPH en suero de  $99,3 \pm 32,4$  pmol/mL, oscilando del límite inferior de detección a 369 pmol/mL.

- Un grupo de pacientes isquémicos (n=19) eran individuos que tenían isquemia de miocardio, dieron positivo para tensión por ejercicio para ensayo de ejercicio en cinta y/o estaban derivados al laboratorio de cateterización para revascularización coronaria percutánea (angioplastia). Los pacientes isquémicos tenían un nivel medio de SPH en suero de  $697 \pm 80,7$  pmol/mL.

- El subgrupo de pacientes isquémicos con síntomas de angina que se sometieron a angioplastia tenía niveles de SPH en suero promedio anterior al procedimiento de  $885 \pm 123$  pmol/mL (oscilando de 447 a 1122 pmol/mL). Los niveles de SPH en suero de los pacientes era significativamente (p<0,001) mayor que los niveles de SPH del grupo de control de edad equivalente. Cuando el grupo de control de pacientes isquémicos se examinó, un nivel de SPH en suero promedio de  $697 \pm 80,7$  pmol/mL se obtuvo. Este valor es ~7 veces mayor que el del grupo de control de edad equivalente (p<0,001) y ~160 veces mayor que el de los atletas en buenas condiciones.

## Ejemplo 3: Efectos hipóxicos en la cascada de transducción de la señal de esfingomielina

TNF $\alpha$ , que actúa por medio de receptores de TNF $\alpha$ , se ha mostrado que utiliza la cascada de transducción de la señal de esfingomielina en cardiomiocitos (Oral et al., J. Biol. Chem. 272:4836-4842, 1997; Krown et al., J. Clin. Invest. 98:2854-2865, 1996). Los siguientes experimentos se llevaron a cabo para determinar si este sistema de señalización podría activarse también por hipoxia, y si los esfingolípidos se produjeron antes de la muerte celular como en el caso para TNF $\alpha$ , como se describe en la descripción detallada de la invención.

Se sometieron a cardiomiocitos de rata adulta a condiciones hipóxicas como se describe anteriormente y se ensayaron por su capacidad para producir bases de esfingolípido implicadas en la cascada de transducción de la señal de esfingomielina.

Los cardiomiocitos se cultivaron en platos de plástico que se colocaron en una cámara incubadora modular humidificada (ICN Biomedicals, Aurora, OH) presurizada a 275,79-344,73 Pa (0,04-0,05 psi) mediante la mezcla de gas particular usada en el tratamiento. La disolución de Tyrode caliente (37°C) que contenía BSA 0,2 mM, ampicilina (50 mg/mL), canamicina (100 mg/mL) y fungizona (20  $\mu$ g/mL) se gasificó en un tubo cónico estéril de 50 mL durante 15 minutos con 95% de N<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub> antes de añadir la disolución a las células cultivadas. La pO<sub>2</sub> se monitorizó mediante un electrodo de oxígeno Micro pO<sub>2</sub> System (Lasar Research Labs, Los Ángeles, CA) y se encontró que era de 4,0 PPM para la duración del proceso de hipoxia. La cámara se mantuvo a 37°C durante los tiempos designados. Las células de control (normoxia) se trataron igual excepto por el uso de 95% de O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub> y se incubaron en una incubadora estándar. La pO<sub>2</sub> del tratamiento de normoxia fue de 7,3 PPM. El pH de los cultivos celulares de control y experimental se monitorizó con un micro electrodo de pH (Beetode pH Electrodes, Sarasota, FL) y permaneció constante a pH=7,26 +/- 0,02 para las células normóxicas y 7,15 +/-0,03 para células hipóxicas a lo largo del experimento. Porque las células se incubaron en disolución de Tyrode carente de glucosa, estos experimentos representan un modelo de hipoxia con inhibición metabólica. En experimentos seleccionados con cardiomiocitos de rata neonata, un tercer tratamiento después de la hipoxia se empleó para simular la reperfusión. Este tratamiento consistió en 5 horas de reoxigenación con 95% de O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub> en la cámara de incubación. Al final de cada periodo de incubación, el medio acondicionado para células se aspiró y se guardó para el análisis. En experimentos seleccionados, las células se rasparon en presencia de 800  $\mu$ l de 1-butanol para la determinación del contenido de esfingolípidos tanto celular como extracelular (medio acondicionado para células).

Para la extracción de esfingolípidos, 100-300  $\mu$ l de muestras de tejido, suero o extractos celulares se desproteinizaron añadiendo butanol caliente (70°C, 800  $\mu$ l), haciendo girar e incubando a 70°C mientras se balancea. La mezcla se colocó entonces en un baño de agua sonicante durante 10 minutos. La proteína desnaturizada y la fase acuosa se separaron de la fase de butanol por centrifugado a 15.300 x g. La fase de butanol superior se transfirió a un nuevo tubo de extracción y se saponificó mediante la adición de KOH 0,5 M (200  $\mu$ l). Después de hacerse girar, las muestras se incubaron a 70°C mientras se balanceaba durante 1 hora con girado intermitente y sonicación. Se añadió agua nanopura (400  $\mu$ l) a cada muestra y se devolvió a la incubadora durante 10 minutos. Después de sonicar durante 1 minuto, las fases se separaron por centrifugado a 15.300 x g durante 3 minutos. Las fases de butanol se transfirieron a un nuevo tubo y se secaron usando un Savant (Holbrook, NY) SpeedVac Plus. Las muestras secas se suspendieron de nuevo completamente en metanol (375  $\mu$ l) y se agitaron en un baño sonicador durante 2 minutos. Los extractos se derivaron entonces con O-ftalaldehído (OPA) (Molecular Probes, Eugene, OR). En breve, 50 mg de OPA se disolvieron en etanol (1,0 mL). En ácido bórico 0,5 M (24,75 mL), se añadieron 0,25 mL del OPA en etanol y se mezclaron. Finalmente, se añadió 2-mercaptoetanol (13  $\mu$ l) y se mezcló para hacer la disolución de derivación de OPA. A cada muestra se añadió EDTA disódico 10 mM (50  $\mu$ l) seguido por ácido bórico 0,5 M (50  $\mu$ l) y disolución de OPA (25  $\mu$ l). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente protegidas de la luz durante 20 minutos.

El análisis de HPLC se realizó usando un Módulo Disolvente 118 y una Automuestreadora 507e Beckman System Gold (Fullerton, CA). Un Detector de Fluorescencia Inteligente FP-920 Jasco (Easton, MD) se usó con una longitud de onda de excitación de 330 nm y longitud de onda de emisión de 455 nm. Las muestras derivadas (inyección de 50  $\mu$ l) se separaron en una columna Ultrasphere ODS de 4,6 mm x 25 cm de Beckman (Fullerton, CA) con una precolumna NewGuard RP-18 de 1,5 cm de Perkin Elmer (Norwalk, CT). El sistema disolvente fue metanol ácido acético glacial, fosfato de dihidrógeno y tetrabutilamonio 1M, agua nanopura (82,9:1,5:0,9:14,7, v/v) marchando a 1,5 mL/minuto. Los cromatogramas se analizaron usando el software Beckman System Gold Nouveau. Los resultados se muestran en la tabla 1.

La única base de esfingolípido que se acumuló en los cardiomiocitos en respuesta a la hipoxia fue esfingosina (SPH). Los niveles de S-1-P y SPC no se aumentaron por hipoxia. Los datos acumulativos de varios experimentos demostraron que la hipoxia produce un aumento de 6,4 veces en la producción de SPH. El aumento en el SPH celular total no se refleja en un contenido intracelular aumentado. En vez de esto, la mayoría del SPH producido en respuesta a la hipoxia se libera de las células en el medio acondicionado para las células. Estos datos demuestran un aumento de 18 veces en el contenido de SPH extracelular de los cardiomiocitos hipóxicos.

El corto tiempo (5 hrs) de hipoxia empleado no dio por resultado una muerte celular necrótica o apoptótica apreciable aunque se asoció con significativa liberación de TNF $\alpha$ . El pretratamiento con el fragmento de receptor TNFRII:Fc (Mohler et al., J Immunol. 151:1548-1561, 1993), dio por resultado la reducción significativa (p<0,001) (~3



veces) de la liberación de SPH. El pretratamiento del fragmento de receptor de TNF $\alpha$  no mitigó la apoptosis desencadenada por SPH (SPH sólo, sin TNF), indicando que la producción de SPH es una etapa en la cascada de señalización que está "corriente abajo" de la unión de TNF $\alpha$  a sus receptores.

Ejemplo 4: SPH en sangre se convierte a S-1-P

5 Estudios con sangre humana obtenida de sujetos normales sugieren que las plaquetas de la sangre son capaces de convertir SPH a S-1-P por su fuente rica en esfingosina quinasa (Yatomi et al., J. Biochem. 121:969-973, 1997; Yatomi et al., J. Biol. Chem. 272:5291-5297, 1997; Yatomi et al., Blood 86:193-202, 1995). En dichos experimentos, SPH suministrado comercialmente se añadió a suero sanguíneo que, en ausencia de componentes celulares, se encontró que era incapaz de convertir SPH a S-1-P. Sin desear limitarse a cualquier teoría particular, se cree que el corazón isquémico es la principal fuente de SPH en suero y que el SPH derivado del corazón podría convertirse a S-1-P por las plaquetas de la sangre (Patente de EE.UU. 6.210.976 B1, y solicitud de patente PCT publicada WO 98/57179).

15 Los experimentos se llevaron a cabo para determinar el destino de cualquier SPH que pudiera liberarse de las células o plaquetas en el compartimiento extracelular. Muestras de sangre completa se incubaron *in vitro* durante hasta 15 horas con <sup>3</sup>H-SPH, seguido de cromatografía en capa fina (TLC) para examinar cual, si era alguno, de los productos metabólicos conocidos de la ruta de la esfingomielina se radiomarcaban como resultado del metabolismo del SPH radiomarcado.

20 Los resultados (Figura 3) indican que, en la sangre completa, el SPH radiomarcado no se convirtió a ceramida o esfingomielina, ni se metabolizó a dimetilesfingosina o dihidroesfingosina (véase Figura 2). El principal metabolito de la ruta que se marcó de forma apreciable fue esfingosina-1-fosfato (S-1-P), presumiblemente debido a la acción de la esfingosina quinasa muy activa presente en las plaquetas de la sangre (Yatomi et al., J. Biochem. 121:969-973, 1997; Yatomi et al., J. Biol. Chem. 272:5291-5297, 1997; Yatomi et al., Blood 86:193-202, 1995).

Una cantidad sustancial de la conversión dependiente del tiempo de <sup>3</sup>H-SPH a <sup>3</sup>H-S-1-P se dio dentro de los 20 minutos y representó una conversión del 86%.

25 Tabla 1: Producción de esfingolípido en cardiomiocitos cultivados durante normoxia, hipoxia y reoxigenación

	Normoxia	Hipoxia 12 horas para neonatos 7 horas para adultos	Reoxigenación 5 hrs
<b>Cardiomiocitos neonatales</b>			
% de células permeabilizadas	1,7 ± 1,3	3,15 ± 1,3	7,45 ± 2,5
% de células apoptóticas	1,17 ± 0,37	4,58 ± 0,74	*23,5 ± 2,7
TNF $\alpha$ (pg/106 células)	561 ± 13,4	*979 ± 26,7	-
SPH (pmol/106 células)	5,8 ± 0,43	*77,6 ± 6,24	-
<b>Cardiomiocitos adultos</b>			
% de células permeabilizadas	4,71 ± 1,18	9,5 ± 2,9	-
% de células apoptóticas	8,12 ± 1,76	*26,7 ± 2,9	-
TNF $\alpha$ (pg/106 células)	810 ± 155	*8660 ± 3150	-
SPH (pmol/106 células)	238 ± 39	*3860 ± 547	-

\* Significativo al nivel de p<0,05 o mayor.

30 Los datos también demuestran que S-1-P era muy estable en la sangre completa durante el periodo de tiempo de 15 horas del experimento. Solo después de varias horas fue evidente que la pequeña pero medible cantidad de t-2-hexadecanal (también conocido como palmitaldehído) se produjo como una consecuencia del bajo nivel de S-1-P liasa presente en las plaquetas que puede convertir el S-1-P a hexadecanal y fosfato de etanolamina (Yatomi et al., J. Biochem. 121:969-973, 1997; Yatomi et al., J. Biol. Chem. 272:5291-5297, 1997; Yatomi et al., Blood 86:193-202, 1995).

Es posible que las plaquetas de la sangre fueran el principal depósito de S-1-P derivado de SPH (Yatomi et al., J. Biochem. 121:969-973, 1997). Otro posible depósito de S-1-P podría ser las células cardíacas. Algunos estudios han indicado que el SPH se produce de forma intracelular por cardiomiocitos cultivados, aunque estos estudios no presentan evidencia de liberación/secreción de S-1-P (Patente de EE.UU. 6.210.976 B1 y Solicitud PCT publicada WO 98/57179).

Ejemplo 5: S-1-P en sangre es cardiotoxico y dependiente de los receptores de S-1-P

Durante el infarto de miocardio inducido por isquemia, varios sucesos importantes ocurren como una consecuencia de la patofisiología. En el 74% de los casos de IAM, la muerte cardíaca repentina se asocia con trombo significativo (coágulo de sangre) en la arteria coronaria que suministra sangre a la región infartada del miocardio (Davies et al., N. Engl. J. Med. 310:1137-1140, 1984). Las áreas "infartadas" son aquellas en que las células están muertas o han soportado tanto daño que están destinadas a morir. Hay un profundo efecto inotrópico negativo (es decir, pérdida de contractilidad) en las células de miocardio inducido por la isquemia en sí misma. El control de calcio intracelular se desregula con el calcio diastólico (en descanso) elevándose constantemente en un modo descontrolado acompañado por una disminución en el calcio sistólico (contráctil) llevando a una eventual "sobrecarga de calcio".

Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se cree que estos efectos son una consecuencia de la producción inicial de SPH por las células cardíacas isquémicas pre-IAM y post-IAM y la posterior producción de S-1-P por las plaquetas próximas. También se cree que S-1-P activa las plaquetas próximas a través de la desregulación de calcio de las plaquetas y que el S-1-P derivado de las plaquetas se libera en el suero.

El S-1-P aplicado de forma exógena es capaz de activar las plaquetas de la sangre (Yatomi et al., J. Biol. Chem. 272:5291-5297, 1997; Yatomi et al., Blood 86:193-202, 1995). Se ha sugerido que el S-1-P aumentado en suero tiene dos acciones principales, ambas de las cuales son cardiotoxicas. La primera es actuar en las plaquetas para promover la respuesta de coagulación y además exacerbar la isquemia. En segundo lugar, el S-1-P derivado de plaquetas actúa en un modo paracrino en células endoteliales y de miocardio cercanas para promover la desregulación de calcio y la apoptosis. En los cardiomiocitos, la consecuencia es promover la sobrecarga de calcio. La respuesta de la célula endotelial es promover la vasoconstricción y limitar adicionalmente el suministro de sangre a través de la vasculatura coronaria. Se ha demostrado que el S-1-P aplicado a cardiomiocitos cultivados dio por resultado la apoptosis y aumentos dramáticos en calcio diastólico seguido en minutos por disminuciones en calcio sistólico y eventual sobrecarga de calcio reminiscente de lo que ocurre al miocardio isquémico. Se ha demostrado también que tanto el tejido cardíaco de rata como de ser humano expresan genes para los recientemente identificados receptores de S-1-P de la familia de EDG (gen de diferenciación endotelial), y que estos receptores median la desregulación del calcio (Nakajima et al., Biophysical J. 78:319 A, 2000).

El S-1-P extracelular es el ligando para una nueva clase de receptores acoplados a la proteína G (GPCRs). Dichos receptores se describieron primero como unos GPCR huérfanos clonados de células endoteliales de la vena umbilical humana (Hla et al., J. Biol. Chem. 265:9308-9313, 1990; Lynch et al., Trends Pharmacol. Sci. 20:473-475, 1999). La expresión tisular de los genes EDG-1/3/5 en el sistema murino indica que el corazón y el pulmón tienen la mayor expresión total de estos tres genes (Zhang et al., Gene 227:89-99, 1999). Sin embargo, los tejidos cardíacos están compuestos de diversos tipos de células, que incluyen células endoteliales, que tienen altos niveles de expresión de EDG-1 (Hla et al., J. Biol. Chem. 265:9308-9313, 1990). Aunque EDG-1/3/5 se expresan en mioblastos del músculo esquelético C2C12 (Meacci et al., FEBS Letters 457:184-188, 1999), la expresión específica en el cardiomiocito de los genes EDG no se ha dilucidado. Recientemente un gen EDG-1 y su proteína de expresión se determinaron en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata y en tejido ventricular de rata adulta (Nakajima et al., Biophysical J. 78:319 A, 2000). Los cardiomiocitos cultivados se usaron para evaluar el papel funcional de los receptores de EDG, incluyendo la capacidad de S-1-P para modular los niveles de calcio intracelular.

De forma importante, las respuestas desreguladoras de calcio provocadas por S-1-P en cardiomiocitos cultivados son bastante similares a las desregulación de calcio vista en modelos de infarto agudo de miocardio (Lee et al., Circ. 78:1047-1059, 1988; Smith et al., Amer. Heart J. 103:716-723, 1982; Kihara et al., Circ. Res. 65:1029-1044, 1989). Estas respuestas características incluyen: aumentos en calcio diastólico (y sobrecarga de calcio), disminuciones en calcio sistólico (el estado inotrópico negativo) y la producción de comportamiento de latido oscilatorio anormal (arritmias) y cese de actividad, todo lo cual se vieron en los cardiomiocitos cuando se trataron con S-1-P. De forma adicional, el nivel de calcio promedio combinando las respuestas tanto diastólicas como sistólicas está significativamente aumentado por tratamiento de S-1-P. Tomado junto, estos datos sugieren que S-1-P, posiblemente actuando por medio de EDGRs, aumenta el flujo de calcio extracelular que provoca entonces la sobrecarga de calcio.

Se sabe bien que la desregulación de calcio es un prerrequisito a la apoptosis (Magnelli et al., Bioch. Biophys. Res. Comm. 204:84-90, 1994). Los datos publicados previamente indican que los cardiomiocitos de rata en cultivo sufren muerte celular apoptótica cuando se exponen a esfingosina (Krown et al., J. Clin. Invest. 98:2854-2865, 1996). También se sugiere que el S-1-P presente en altos niveles putativos en la circulación cardíaca podría actuar en receptores de S-1-P de células cardíacas para producir profundos efectos inotrópicos negativos y muerte celular por apoptosis.

Así, es probable que el miocardio isquémico pre-IAM produzca los instrumentos iniciales de su propia destrucción, a saber, varias citoquinas y, de forma importante, SPH. El SPH secretado, que actúa de forma indirecta a través de S-1-P derivado de plaquetas, promueve la activación de receptores de S-1-P en las plaquetas, células endoteliales y cardiomiocitos. La coagulación de la sangre, vasoconstricción y sobrecarga de calcio en el miocardio son las consecuencias con infarto de miocardio como el resultado último. Como la isquemia creciente y el área de infarto desafía más tejido cardíaco, se libera SPH adicional y un bucle de retroalimentación positiva resulta hasta que se da la muerte celular esencial.

Aunque sin desear limitarse a ninguna teoría particular, es posible que durante niveles bajos de isquemia y tensión cardíaca (por ejemplo, hipertensión), las células cardíacas produzcan citoquinas y esfingolípidos como moléculas de señalización extracelular que sirven para condicionar previamente al corazón a estas tensiones. La protección puede venir de condicionar previamente al corazón en sí mismo por medio de protección contra la sobrecarga de calcio, muerte celular y arritmias o produciendo un estado de miocardio hipernadante para disminuir las demandas de energía durante la isquemia.

Ejemplo 6: Uso de anticuerpos en terapia basada en esfingolípidos

Este ejemplo describe como la terapia cardiovascular basada en esfingolípidos puede realizarse mediante el uso de anticuerpos y derivados de los mismos ( Fv de cadena sencilla, CDR, etc.) que se unen de forma específica a ciertas moléculas como agentes terapéuticos. Dichos anticuerpos están dirigidos a, por medio de ejemplo no limitante, anticuerpos a esfingolípidos y receptores de los mismos.

Anticuerpos a receptores de esfingolípidos

Un tipo de anticuerpo terapéutico específicamente receptores de esfingolípidos que llevan a cabo la internalización celular de esfingolípidos indeseables. En algunos casos, el reparto en la célula de un esfingolípidos indeseable da por resultado una secuencia de sucesos que tienen un efecto indeseable. Los anticuerpos para dichos receptores evitan la entrada del esfingolípidos indeseable en las células, evitando así las consecuencias indeseables de dicha entrada. Por ejemplo, el esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico S-1-P tiene muchas acciones que son dependientes de la unión a receptores de esfingolípidos, incluyendo sin limitación los receptores Edg (Ejemplo 15). Los anticuerpos para receptores que bloquean la unión de un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico se desarrollan y ensayan por su capacidad para inhibir la unión de S-1-P a sus receptores, además de por su capacidad para bloquear los sucesos posteriores a la unión que llevan a efectos cardiotoxicos. Los anticuerpos a receptores de Edg se conocen, y están en algunos ejemplos comercialmente disponibles. Por ejemplo, los anticuerpos a Edg-1, -7 y -8 están disponibles de Oncogene Research Products; los anticuerpos a Edg-2 están disponibles de Calbiochem; los anticuerpos a Edg-4 están disponibles de Antibody Solutions (Palo Alto, CA); y los anticuerpos a Edg-5 están disponibles de Exalpha Biologicals, Inc. (Boston, MA).

Anticuerpos a esfingolípidos

Un tipo de anticuerpo terapéutico se une específicamente a esfingolípidos indeseables. Dichos anticuerpos se unen a esfingolípidos para alcanzar efectos beneficiosos tales como, por ejemplo, (1) disminuir la concentración efectiva de esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotoxicos, disponibles (es decir, no unidos) (y/o la concentración de sus precursores metabólicos) que estarían libres de otra forma para ejercer sus efectos nocivos en las células (incluyendo, por medio de ejemplo no limitante, la eliminación de esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotoxicos y sus precursores metabólicos de la sangre por medio de tratamientos *ex vivo*); (2) inhibir la unión de un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico a un receptor celular por ello, y/o disminuir la concentración de un esfingolípidos que está disponible para la unión a dicho receptor; y/o (3) evitar la conversión metabólica de un primer esfingolípidos en un segundo y más indeseable, tóxico y/o cardiotoxico esfingolípidos, y/o disminuir la concentración de dicho precursor que está disponible para conversión enzimática en un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico.

Ejemplos de dichos efectos terapéuticos incluyen aunque no están limitados al uso de (i) anticuerpos anti-S-1-P para disminuir la concentración de S-1-P disponible, bloqueando así o al menos limitando los efectos cardiotoxicos y trombogénicos de S-1-P, y/o (ii) anticuerpos anti-SPH para evitar la conversión metabólica de SPH al esfingolípidos más indeseable, tóxico y/o cardiotoxico S-1-P.

Para producir mAb a fosfolípidos, se administran *Salmonella minnesota* tratadas con ácido directamente en un bazo de ratón usando protocolos esencialmente según los métodos de Umeda et al. que se han usado para hacer mAbs a fosfatidilserina (J. Immunol. 143:2273-2279, 1989; véase también Reza et al., FEBS Lett. 339:229-233, 1994).

Para la producción de anticuerpos anti-SPH, los *S. minnesota* tratados con ácidos se recubren con SPH y se inyectan en el bazo de ratón antes de la fusión celular para producir un hibridoma que secreta mAb anti-SPH. Métodos similares se usan para producir mAb anti-S-1-P y mAb anti-SPC.

Adicional o alternativamente, los conjugados de BSA-esfingolípidos libres de ácidos grasos se usan como el inmunogen para presentar epitopos únicos al animal. Se toman etapas apropiadas para asegurar que los mAb

producidos en este modo se dirigen a los esfingolípidos de elección y no a lípido oxidado o aductos de proteína-lípido (Horkko et al., J. Clin. Invest. 98:815-825, 1996; Palinski et al., J. Clin. Invest. 98:800-814, 1996).

#### Anticuerpos a S-1-P

5 Para desarrollar anticuerpos para S-1-P, se inmunizaron cobayas IP una vez a la semana durante 4 semanas con 1 mg de esfingolípidos derivados de KLH. Los protocolos que se usaron son esencialmente los de Horkko et al. (J. Clin. Invest. 98:815-825, 1996) y Palinski et al. (J. Clin. Invest. 98:800-814, 1996).

10 En breve, a los animales se les dieron inyecciones semanales durante un periodo de varias semanas. En la primera semana, se inyectaron 150 ug de inmunogen en adyuvante de Freund completo. Durante la segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta semana, se inyectaron 100 ug de inmunogen en adyuvante de Freund incompleto en las cobayas. Se mostró que las muestras de suero recogidas de las cobayas inmunizadas contenían anticuerpos para S-1-P mediante el uso de un ensayo ELISA. El ELISA se realizó esencialmente según los procedimientos descritos por Horkko et al. (J. Clin. Invest. 98:815-825, 1996) y Palinski et al. (J. Clin. Invest. 98:800-814, 1996). Las muestras de suero tenían un título de 140.000 Unidades Luminescentes Relativas/100 ms.

#### Ejemplo de referencia 7: Modulación del metabolismo de esfingosina-1-fosfato (S-1-P)

15 La concentración del esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico S-1-P se disminuye (i) estimulando reacciones que utilizan S-1-P como un reactivo (es decir, reacciones que degradan S-1-P, por ejemplo, Rxns. núm. 1 y núm. 2 en Fig. 2) y, adicional o alternativamente, (ii) inhibiendo las reacciones químicas que dan S-1-P como un producto (es decir, reacciones que producen, S-1-P, por ejemplo, Rxn. núm. 3 en Fig. 2). Dicha estimulación y/o inhibición se alcanza, por ejemplo, (1) aumentando la cantidad de, y/o elevando la actividad de, enzimas que catalizan el catabolismo (degradación) de S-1-P y, adicional o alternativamente, (2) reduciendo la cantidad de, y/o o inhibiendo o bloqueando completamente la actividad de, enzimas que catalizan el anabolismo (producción) de S-1-P.

20 En ejemplos donde el objetivo es aumentar la concentración de enzimas que degradan S-1-P, las formulaciones farmacéuticas de dichas enzimas se administran a un paciente. Las enzimas que degradan S-1-P se purifican a partir de una variedad de mamíferos y otros animales, o se producen *in vitro* a partir de células usando técnicas de ADN recombinante.

#### Inhibición de la producción de S-1-P

La inhibición de enzimas que catalizan las reacciones que dan S-1-P (es decir, reacciones que tienen S-1-P como un producto) se espera que den por resultado la reducción o inhibición completa de la producción de S-1-P. Dichas enzimas incluyen aunque no están limitadas a las siguientes:

30 Esfingosina quinasa (SPH quinasa) cataliza la conversión de SPH a S-1-P (Rxn. núm. 3 en Fig. 2; véase también la Fig. 1). Se ha descrito una secuencia genética que codifica SPH quinasa humana (Meléndez et al., Gene 251:19-26, 2000). Se han descrito tres homólogos humanos de SPH quinasa (SKA, SKB y SKC) (solicitud de patente PCT publicada WO 00/52173). También se ha descrito SPH quinasa de murina (Kohama et al., J Biol. Chem. 273:23722-23728, 1998; y se ha publicado (solicitud de patente PCT WO 99/61581). La solicitud de patente PCT publicada WO 99/61581 a Spiegel se afirma que describe ácidos nucleicos que codifican una esfingosina quinasa. La solicitud de patente PCT publicada WO 00/52173 a Munroe et al. se afirma que describe ácidos nucleicos que codifican homólogos de esfingosina quinasa. Otras SPH quinasa se describen por Pitson et al., "Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes", Biochem J. 350:429-441, 2000; y la solicitud PCT publicada WO 00/70028 a Pitson et al.; y Liu et al., "Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Mammalian Sphingosine Kinase Type 2 Isoform", The Journal of Biological Chemistry, 275:19513-19520, 2000; Vadas et al., "Sphingosine Kinase and Uses Thereof", documento PCT/AU01/100539, publicado como documento WO 01/85953 el 15 de noviembre de 2001; Rastelli, "Novel Sphingosine Kinases", documento PCT/US01/04789, publicado como documento WO 01/60990 el 23 de agosto de 2001; Allen et al., "Human Sphingosine Kinase Gene", documento PCT/EP00/09498, publicado como documento WO 01/31029 el 3 de mayo de 2001.

Los inhibidores de SPH quinasa incluyen aunque no están limitados a N,N-dimetilesfingosina (DMS) (Edsall et al., Biochem. 37:12892-12898, 1998); D-treo-dihidroesfingosina (Olivera et al., Nature 365:557-560, 1993); y bases esfingoides (Jonghe et al., "Structure-Activity Relationship of Short-Chain Sphingoid Bases As Inhibitors of Sphingosine Kinase", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 9:3175-3180, 1999)

50 Ensayos de SPH quinasa útiles para evaluar estos y otros inhibidores de SPH quinasa conocidos o potenciales incluyen los descritos por Olivera et al., "Assaying Sphingosine Kinase Activity", Methods in Enzymology, 311:215-223, 1999; Caligan et al., "A High-Performance Liquid Chromatographic Method to Measure Sphingosine 1-Phosphate and Related Compounds from Sphingosine Kinase Assays and Other Biological Samples", Analytical Biochemistry, 281:36-44, 2000.

55 Las composiciones farmacéuticas de estos y otros inhibidores de SPH quinasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

La inhibición de SPH quinasa puede llevar a una acumulación de su sustrato, SPH, que es también un esfingolípido indeseable, no obstante, generalmente menos dañino que S-1-P. Para evitar o mitigar que este efecto se dé, se administran al mismo tiempo agentes adicionales para (i) estimular una enzima que tiene SPH como un sustrato, con la condición de que la enzima no debe ser una que tenga S-1-P como un producto (tal como, por ejemplo, ceramida sintasa; véase a continuación); y, adicional o alternativamente, (ii) inhibir una enzima que tiene SPH como un producto.

#### Estimulación de la destrucción de S-1-P

La estimulación de enzimas que catalizan las reacciones que degradan S-1-P (es decir, reacciones que tienen S-1-P como un reactivo) se espera que den por resultado la estimulación de degradación de moléculas de S-1-P. Dichas enzimas incluyen aunque no están limitadas a las siguientes:

S-1-P Liasa cataliza la conversión de S-1-P a etanolamina-P y (también conocida como t-2-hexadecanal) palmitaldehído (Veldhoven et al., Adv. Lipid Res. 26:67-97, 1993; Van Veldhoven, "Sphingosine-1-phosphate Lyase" Methods in Enzymology, 311:244-254, 1999; Rxn. núm. 1 en Fig. 2). Se han descrito genes de S-1-P liasa de levadura (Lanterman et al., Biochem. J. 332:525-531, 1998), murina (Zhou et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 242:502-507, 1998) y humano (solicitudes de patente PCT publicadas WO 99/38983 y WO 99/16888). La solicitud de patente PCT publicada WO 99/16888 a Saba et al. se afirma que describe secuencias de ADN y proteína de S-1-P liasa. La patente de EE.UU. núm. 6.187.562, solicitud de patente PCT publicada WO 99/38983 a Duckworth et al. se afirma que describe una S-1-P liasa. Véase también Van Veldhoven et al., "Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q221", Biochimica et Biophysica Acta 1487:128-134, 2000); y Mandala et al., "Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death", PNAS, 97:7859-7864, 2000.

Las composiciones farmacéuticas de agentes que son estimulantes de S-1-P liasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

S-1-P fosfatasa (también conocida como SPP fosfohidrolasa) es una enzima de mamífero que cataliza la conversión de S-1-P a esfingosina (Rxn. núm. 2 en Fig. 2) (Mandala et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 95:150-155, 1998; Mandala et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 97:7859-7864, 2000; Mandala, "Sphingosine-1-Phosphate Phosphatases", Prostaglandins & other Lipid Mediators, 64:143-156, 2001; Brindley et al., "Analysis of Ceramide 1-phosphate and Sphingosine-1-phosphate Phosphatase Activities", Methods in Enzymology, 311:233-244, 1999). Dos S-1-P fosfatasas, LBP1 y LBP2, se han aislado de la levadura (Mandala et al., J. Biol. Chem. 272:32709-32714, 1997). Mandala et al., "Mammalian Sphingosine-1-Phosphate Phosphatase", documento PCT/UW01/03879, publicado como documento WO01/57057 el 9 de agosto de 2001.

Las composiciones farmacéuticas de agentes que son estimulantes de S-1-P fosfatasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

#### Ejemplo de referencia 8: Modulación del metabolismo de esfingosina (SPH)

La concentración del esfingolípido indeseable, tóxico y/o cardiotoxico SPH se disminuye (i) estimulando las reacciones que utilizan SPH como un reactivo (es decir, reacciones que degradan SPH sin producir S-1-P) y, adicional o alternativamente, (ii) inhibiendo las reacciones químicas que dan SPH como un producto (es decir, reacciones que producen SPH, por ejemplo, Rxn. núm. 5 en Fig. 2). Dicha estimulación y/o inhibición se alcanza, por ejemplo, (1) aumentando la cantidad de, y/o elevando la actividad de, enzimas que catalizan el catabolismo (degradación) de SPH y, adicional o alternativamente, (2) reduciendo la cantidad de, y/o o inhibiendo o bloqueando completamente la actividad de, enzimas que catalizan el anabolismo (producción) de SPH. Porque SPH se convierte en S-1-P por enzimas tales como SPH quinasa (Rxn. núm. 3 en Fig. 2), disminuyendo la concentración del esfingolípido indeseable, tóxico y/o cardiotoxico SPH no es solo terapéutico en si mismo sino que, si se hace sin convertir SPH a S-1-P, tiene el beneficio terapéutico adicional de disminuir la producción del esfingolípido más indeseable, tóxico y/o cardiotoxico S-1-P.

En ejemplos donde el objetivo es aumentar la concentración de enzimas que degradan SPH, las formulaciones farmacéuticas de dichas enzimas se administran a un paciente. Las enzimas que degradan SPH, tal como SPH quinasa y ceramida sintasa (Rxns. núm. 3 y 4, respectivamente, en Fig. 2) se purifican de una variedad de mamíferos, que incluyen seres humanos, y otros animales; o se producen *in vitro* usando, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante.

#### Inhibición de producción de SPH

La inhibición de enzimas que catalizan las reacciones que dan SPH (es decir, reacciones que tienen SPH como un producto) se espera que den por resultado la reducción o inhibición completa de la producción de SPH. Dichas enzimas incluyen aunque no están limitadas a las siguientes:

La ceramidasa (CDasa) cataliza la conversión de ceramida a SPH (Rxn. núm. 5 en Fig. 2; véase también la Fig. 1). Para una revisión, véase Nikolova-Karakashian et al., "Ceramidases", *Methods in Enzymology*, 311:194-201, 1999. Al menos dos tipos de ceramidasa se conocen en la técnica, ceramidasa I y ceramidasa II, que difieren en términos de pH óptimo (Sugita et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 398:125-131, 1975; Yada et al., *J. Biol. Chem.* 270:12677-12684, 1995). Las ceramidasa se describen por Tani et al., "Purification and Characterization of a Neutral Ceramidase from Mouse Liver: A Single Protein Catalyzes the Reversible Reaction in Which Ceramide is Both Hydrolyzed and Synthesized", *The Journal of Biological Chemistry* 275:3462-3468, 2000; Mao et al., "Cloning and Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* Alkaline Ceramidase with Specificity for Dihydroceramide", *The Journal of Biological Chemistry* 275:31369-31378, 2000; Zhang et al., "Human Acid Ceramidase Gene: Novel Mutations in Farber Disease", *Molecular Genetics and Metabolism* 70:301-309, 2000; Mao et al., "Cloning of an Alkaline Ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*: An Enzyme with Reverse (CoA-Independent) Ceramide Synthase Activity", *The Journal of Biological Chemistry* 275:6876-6884, 2000; Okino et al., "Molecular Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Encoding Alkaline Ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*: Cloning of A Ceramidase Homologue from *Mycobacterium tuberculosis*", 274:36616-36622, 1999; Kita et al., "Reverse hydrolysis reaction of a recombinant alkaline ceramidase of *Pseudomonas aeruginosa*" *Biochimica et Biophysica Acta* 1485:111-120, 2000; Li et al., "The Human Acid Ceramidase Genes (ASAH): Structure, Chromosomal Location, Mutation Analysis, and Expression", *Genomics*, 62:223-231, 1999; Mao et al., "Cloning and Characterization of a Novel Human Alkaline Ceramidase: A Mammalian Enzyme That Hydrolyzes Phytoceramide", *The Journal of Biological Chemistry*, 276:26577-26588, 2001; Mitsutake et al., "Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Subcellular Distribution of Neutral Ceramidase of Rat Kidney", *The Journal of Biological Chemistry*, 276:26249-26259, 2001; Ito et al., "Ceramidase Gene", documento PCT/JP00/01802, publicado como WO00/58448 el 5 de octubre de 2000; Okino et al., "Molecular Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Encoding Alkaline Ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, 17 de diciembre de 1999, págs. 36616-36622; y Bawab et al., "Molecular Cloning and Characterization of a Human Mitochondrial Ceramidase", *The Journal of Biological Chemistry*, 275:21508-21513, 2000

Los inhibidores de ceramidasa incluyen aunque no están limitados a D-eritro-MAPP y L-eritro-MAPP (Bielawska et al., *J. Biol. Chem.* 271:12646-12654, 1996; Hannun et al., "Inhibitor of Ceramidase", documento PCT/US96/17769, publicado como documento WO97/44019 el 27 de noviembre de 1997); y N-oleoil-etanolamina (NOE; Sugita et al., 1975; Yada et al., *J. Biol. Chem.* 270:12677-12684, 1995; Meroni et al., "Effect of N-Acetylsphingosine (C2) and the Ceramidase Inhibitor (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol on the Regulation of Sertoli Cell Function", *Journal of Andrology*, 20:619-625, 1999). Como CDasa se inhibe por esfingolípidos endógenos tal como SPH y SM (Hise et al., *J. Clin. Invest.* 77:768-773, 1986); los esfingolípidos sintéticos no tóxicos que inhiben CDasa también se usan. Véase también Hannun et al., "Inhibitors of Ceramidase", Patente de EE.UU. núm. 5.851.782, expedida el 22 de diciembre de 1998.

Los métodos para probar la actividad de ceramidasa se describen por He et al.; "A Fluorescence-Based High-Performance Liquid Chromatography Assay to Determine Acid Ceramidase Activity", *Analytical Biochemistry*, 274:264-269, 1999. Las composiciones farmacéuticas de estos y otros inhibidores de CDasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

S-1-P fosfatasa (también conocida como SPP fosfohidrolasa) cataliza la conversión de S-1-P a esfingosina (Rxn. núm. 2 en Fig. 2) y se describe en más detalle en el Ejemplo 7 anterior. La inhibición de S-1-P fosfatasa tiene el resultado beneficioso de disminuir la producción de SPH; sin embargo, la inhibición de S-1-P fosfatasa incluye potencialmente el efecto indeseable de inhibir la degradación de S-1-P. Es así útil incluir uno o más estimuladores de una enzima que degrada S-1-P (tal como, por ejemplo, S-1-P liasa; véase anteriormente), en composiciones farmacéuticas usadas para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

#### Estimulación de la destrucción de SPH

La estimulación de enzimas que catalizan reacciones que degradan el SPH (es decir, reacciones que tienen SPH como un reactivo, por ejemplo, Rxns. núm. 3 y núm. 4 en Fig. 2) se espera que de por resultado la estimulación de degradación de moléculas de SPH. En general, es preferible que dichas reacciones no den un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico, especialmente S-1-P, como un producto (por ejemplo, Rxn. núm. 4 en Fig. 2, que se cataliza por ceramida sintasa). La SPH quinasa puede estimularse para aumentar la degradación de SPH aunque la reacción que cataliza produce el Esfingolípidos indeseable S-1-P; por consiguiente, los estimuladores de SPH quinasa se combinan preferiblemente con estimuladores de enzimas que degradan S-1-P, por ejemplo, S-1-P liasa (Rxn. núm. 1 en Fig. 2).

#### Ejemplo de referencia 9: Modulación del metabolismo de ceramida (CER)

La concentración de CER se disminuye (i) estimulando reacciones que utilizan CER como un reactivo (es decir, reacciones que degradan CER), preferiblemente aquellas reacciones que no dan SPH como un producto (por ejemplo, Rxn. núm. 5 en Fig. 2); y, adicional o alternativamente, (ii) inhibiendo reacciones químicas que dan CER como un producto (es decir, reacciones que producen CER), preferiblemente aquellas reacciones que no usan SPH como un reactivo (por ejemplo, Rxn. núm. 4 en Fig. 2). Dicha estimulación y/o inhibición se alcanza, por ejemplo, (1)

5 aumentando la cantidad de, y/o elevando la actividad de, enzimas que catalizan el catabolismo (degradación) de CER y, adicional o alternativamente, (2) reduciendo la cantidad de, y/o inhibiendo o bloqueando completamente la actividad de, enzimas que catalizan el anabolismo (producción) de CER. Sin embargo, dichas enzimas que producen CER no usan SPH como un sustrato, como inhibición de dichas enzimas (por ejemplo, ceramida sintasa) se espera que de por resultado un aumento en el nivel de SPH. Porque CER se convierte directamente en el esfingolípido más indeseable, tóxico y/o cardiotóxico SPH por enzimas tales como ceramidasa (Rxn. núm. 5 en Fig. 2), disminuyendo la concentración de CER tiene el beneficio terapéutico de disminuir la producción del esfingolípido más indeseable, tóxico y/o cardiotóxico SPH; este efecto que da por resultado en una producción disminuida de S-1-P por SPH quinasa.

10 En ejemplos donde el objetivo es aumentar la concentración de enzimas que degradan SPH, las formulaciones farmacéuticas de dichas enzimas se administran a un paciente. Las enzimas que degradan SPH se purifican de una variedad de mamíferos, que incluyen seres humanos, y otros animales; o se producen *in vitro* de células usando técnicas de ADN recombinante.

#### Inhibición de producción de CER

15 La inhibición de enzimas que catalizan las reacciones que dan CER (es decir, reacciones que tienen CER como un producto) se espera que den por resultado la reducción o inhibición completa de la producción de CER. Dichas enzimas incluyen aunque no están limitadas a las siguientes:

La ceramida sintasa (CER sintasa), también conocida como esfingosina N-acetiltransferasa, cataliza la acetilación de dihidroesfingosina (Rxn. núm. 10 en Fig. 2) que lleva a la producción de ceramida.

20 Los inhibidores de CER sintasa incluyen la toxina fúngica Fumonisina B1 (Merrill et al., J. Lipid Res. 26:215-234A, 1993; Wang et al., Adv. Lipid Res. 26:215-234, 1993; Lee et al., Biochem. J. 334:457-461, 1998; Xu et al., J. Biol. Chem. 273:16521-16526, 1998; Lochhead et al., Kidney Int. 54:373-381, 1998; Tsunoda et al., J. Biochem. Mol. Toxicol. 12:281-289, 1998); derivados de fumonisina (Humpf et al., J. Biol. Chem. 273:19060-19064, 1998); toxinas de alternaria (Id. and Mandala et al., J. Antibiot. 48:349-356, 1995); viridifunginas (Merrill et al., J. Lipid Res. 26:215-234A, 1993); astralifunginas (Mandala et al., J. Antibiot. 48:349-356, 1995; Furneisen et al., Biochim. Biophys. Acta. 1484:71-82, 2000); y D-*eritro*-N-miristoil 2-amino-1-fenilpropanol (Hunnam, Science 274:1855-1859, 1996). Las composiciones farmacéuticas de estos y otros inhibidores de CER sintasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

30 La ceramida-1-P fosfatasa (CER-1-P fosfatasa) cataliza la producción de ceramida a partir de ceramida 1-P (Rxn. núm. 17 en Fig. 2). Véase Shinghal et al., "Ceramide 1-Phosphate Phosphatase Activity in Brain", Journal of Neurochemistry, 61:2279-2285, 1993; Boudker et al., "Detection and Characterization of Ceramide-1-phosphate Phosphatase Activity in Rat Liver Plasma Membrane", The Journal of Biological Chemistry, 268:22150-22155, 1993.

35 Los inhibidores de CER-1-P fosfatasa incluyen aunque no están limitados a manganeso; cobalto; NaF; propanolol; fenilgloxal; y n-etilmaleimida (Fureisen et al., Biochim. Biophys. Acta. 1484:71-82, 2000). Las composiciones farmacéuticas de estos y otros inhibidores de CER-1-P fosfatasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

40 La esfingomielinasa (SMasa) cataliza la conversión de esfingomielina a ceramida (Rxn. núm. 7 en Fig. 2; véase también la Fig. 1). Varias isoformas de SMasa se han descrito. Estas incluyen nSMasas (n para isoforma de pH neutro), aSMasas (a para isoforma de pH ácido), y SMasas alcalinas que incluyen una isoforma SMasa encontrada en el intestino. Tanto las formas ácida como neutra de SMasa son endógenas al tejido cardiaco (Andrieu-Abadie et al., FASEB J. 13:1501-1510, 1999), y una nueva forma de esfingomielina de alto volumen localizada en las membranas de T-túbulo nodales (Ghosh et al., Mol. Cellular Biochem. 189:161-168, 1998). La forma neutra de SMasa se expone a la superficie extracelular de la membrana (Mohan et al., Biochem Biophys Acta 777:339-342, 1984) y sería así accesible a los agentes insolubles en lípido. Las SMasas se describen en mayor detalle en el

45 Ejemplo 13.

Se ha demostrado que el inhibidor de esfingomielinasa, L-carnitina, bloquea la apoptosis inducida por doxorubicina coincidente con la inhibición de producción de ceramida (Andrieu-Abadie et al., FASEB J. 13:1501-1510, 1999; Katircioglu, et al., J. Cardiovasc. Surg. 41:45-50, 1999; Gunther, Eur. J. Pharma. 406:123-126, 2000).

50 Los inhibidores de SMasa incluyen aunque no están limitados a gentamicina (Ghosh et al., J. Biol. Chem. 262:12550-12556, 1987) y derivados de gentamicina, y otros aminoglucósidos, como se describe en más detalle en otra parte de esta memoria.

55 Se han preparado varios inhibidores de SMasa que se basan en las estructuras de los compuestos que se dan de forma natural Escifostatina y Manumicina. Además de los compuestos que se dan de forma natural tal como Escifostatina y Manumicinas A-D, varios inhibidores se han sintetizado *in vitro*. Estos incluyen sin limitación los descritos por Arenz et al., "Synthesis and Biochemical Investigation of Scyphostatin Analogues as Inhibitors of Neutral Sphingomyelinase", Bioorganic & Medicinal Chemistry, 9:2901-2904, 2001; Arenz et al., "Synthesis of the First Selective Irreversible Inhibitor of Neutral Sphingomyelinase", Eur. J. Org. Chem., 137-140, 2001; Arenz et al.,

"Synthese des ersten selektiven irreveriblen Inhibitors der neutralen Sphingomyelinase", *Angew Chem.*, 112:1498-1500, 2000; Tanaka et al., "Structural Elucidation of Scyphostatin, an Inhibitor of Membrane-Bound Neutral Sphingomyelinase", *J. Am. Chem. Soc.* 119:7871-7872, 1997; Saito et al., "Absolute Configuration of Scyphostatin", *Organic Letters*, 2:505-506, 2000; Hoye et al., "Synthesis (and Alternative Proof of Configuration) of the Scyphostatin C(1')-C(20') Trienoyl Fragment", *Organic Letters*, 2:1481-1483, 2000; Izuhara et al., "Studies toward the Total Synthesis of Scyphostatin: First Entry to the Highly Functionalized Cyclohexenone Segment", *Organic Letters*, 3:1653-1656, 2001; Runcie et al., "A Short and Efficient Route to Novel Scyphostatin Analogues", *Organic Letters*, 3:3237-3239, 2001; Chau et al., "Synthesis of Simple Aryl Neutral Sphingomyelinase Inhibitors", *Asbtr. Pap. - Am. Chem. Soc.*, 2001; Arenz et al., "Manumycin A and Its Analogues Are Irreversible Inhibitors of Neutral Sphingomyelinase", *ChemiBiochem.*, 2:141-143, 2001; Zeeck et al., "Manumycin derivatives and the use thereof", Patente de EE.UU. 5.079.263, expedida el 7 de enero de 1992; y Patel et al., "Manumycin Compounds", Patente de EE.UU. 5.444.087, expedida el 22 de agosto de 1995.

Otros inhibidores de SMasa que pueden servir como agentes terapéuticos o compuestos de partida, o pueden proporcionar un marco químico para preparar bibliotecas químicas enfocadas que pueden cribarse para inhibidores de SMasa, incluyen pero no están limitadas a L-carnitina (Andrien-Abadie et al., *FASEB J.* 13:1501-1510, 1999), y compuestos relacionados (Patente de EE.UU. 6.284.798); ubiquinol y homólogos de ubiquinona (Martin et al., *J. Bioenerg Biomember* 33:143-153, 2001); antioxidantes tales como ascorbato y alfa-tocoferol (Hernández et al., *Circ. Res.* 86:198-204, 2000); glutatión (forma oxidada) (Liu et al., *J. Biol. Chem.* 272:16281-16287, 1997; Liu et al., *J. Biol. Chem.* 273:11313-11320, 1998; Yoshimura et al., *J. Neurochem.* 73:675-683, 1999; y Yoshimura et al., "Inhibition of Neutral Sphingomyelinase Activation and Ceramide Formation by Glutathione in Hypoxic PC12 Cell Death", *Journal of Neurochemistry*, 73:675-683, 1999); Alutenusina, una proteína producida por *Penicillium* spp. (Uchida et al., *J. Antibiotics* 52:572-574, 1999); SR 3357 (2-isopropil-1-4-[3-N-metil-N-3,4-dimetoxifenetilamino]propiloxibencenosulfonilindolizina) (Higuchi et al., *J. Immunol.* 157:297-304, 1996; Lee et al., *Biochem J.* 334:457-461, 1998); desipramina (Lee et al., *Biochem J.* 334:457-461, 1998; Xu et al., *J. Biol. Chem.* 273:16521-16526, 1998); DTT (Yamanaka et al., *J. Neurochem.* 38:1753-1764, 1982); análogos de esfingomielina de metileno (Hakogi et al., Stereocontrolled synthesis of a sphingomyelin methylene analogue as a sphingomyelinase inhibitor, *Org Lett* 2:2627-2629, 2000); y aminoácidos sustituidos (Patente de EE.UU. 6.306.911 B1 a Wachter et al. Solicitudes PCT publicadas WO 99/41265 y WO 00/58491 describen compuestos llamados KF-1040A, KF-1040B, KF-1040T4A, KF-1040T4B, KF-1040T5A y KF-1040T7B, que se afirma que son inhibidores de SMasa. Otros inhibidores de SMasa se describen en la solicitud PCT publicada WO 00/72833 A2. Los derivados de esfingomielina que son inhibidores de SMasa se describen por Lister et al. (*Biochimica et Biophysica Acta* 1256:25-30, 1995); Tazabekova et al. (*Bioorg Khim Mayo* de 1987; 13:648-653, 1987); y Hakogi et al. (Stereocontrolled synthesis of a sphingomyelin methylene analogue as a sphingomyelinase inhibitor, *Org Lett* 2:2627-2629, 2000).

Las composiciones farmacéuticas de estos y otros inhibidores de SMasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

La desaturasa cataliza la conversión de dihidroceramida a ceramida (Rxn. núm. 9 en Fig. 2). La dihidroceramidasa desaturasa se describen en Geeraert et al., "Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase", *Biochem J.*, 327:125-132, 1997; Triola et al., "Synthesis of a Cyclopropene Analogue of Ceramide, a Potent Inhibitor of Dihydroceramide Desaturase", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40:1960-1962, 2001; Heinz et al., "Sphingolipid-Desaturase", documento PCT/DE99/01859, publicado como documento WO00/00593 el 6 de enero de 2000; Michel et al., "Characterization of Ceramide Synthesis: A Dihydroceramide Desaturase Introduces The 4,5-TRANS-Double Bond of Sphingosine at the Level of Dihydroceramide", 272:22432-22437, 1997. Los inhibidores de desaturasa se describen en Triola et al., "Synthesis of a Cyclopropene Analogue of Ceramide, a Potent Inhibitor of Dihydroceramide Desaturase", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40:1960-1962, 2001.

Las composiciones farmacéuticas de inhibidores de desaturasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

Las cerebrosidasas catalizan la producción de ceramida a partir de glucosilceramida (Rxn. núm. 14 en Fig. 2). Las composiciones farmacéuticas de inhibidores de una o más cerebrosidasas, especialmente aquellas que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

50 Estimulación de la destrucción de CER

La estimulación de enzimas que catalizan las reacciones que degradan CER (es decir, reacciones que tienen CER como un reactivo) se espera que den por resultado la estimulación de degradación de moléculas de CER. En general, es preferible que dichas reacciones no den un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotóxico, tal como SPH, como un producto (un ejemplo de una enzima de este tipo es ceramidasa). Otras enzimas que pueden estimularse para aumentar la degradación de CER incluyen aunque no están limitadas a las siguientes:

La esfingomielina sintasa cataliza la conversión de ceramida a esfingomielina (Rxn. núm. 6 en Fig. 2); véase, por ejemplo, Luberto, et al., "Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *PubMed, J. Biol Chem.*, 273:14550-14559, 1998. Inhibidores de SM



5 sintasa incluyen metabolitos de esfingomielina; Vivekananda et al., "Sphingomyelin metabolites inhibit sphingomyelin synthase and CTP:phosphocholine cytidyltransferase", *Am J. Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2281:L91-L107, 2001. Las CER quinasa se describen por Bajjalieh et al., "Ceramide Kinase", *Methods in Enzymology*, 311:207-215, 1999; Kolesnick et al., "Characterization of a Ceramide Kinase Activity from Human Leukemia (HL-60) Cells: Separation From Diacylglycerol Kinase Activity", *The Journal of Biological Chemistry*, 265:18803-18808, 1990. Las composiciones farmacéuticas de estimuladores de esfingomielina sintasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

10 La ceramida (CER quinasa) cataliza la conversión de ceramida a ceramida-1-P (Rxn. núm. 16 en Fig. 2). Las composiciones farmacéuticas de estimuladores de CER quinasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

15 La glucosilceramida sintasa cataliza la conversión de ceramida a glucosilceramida (Rxn. núm. 13 en Fig. 2). Para revisiones, véase Shayman et al., "Glucosylceramide Synthase: Assay and Properties", *Methods in Enzymology*, 311:42-49, 1999 y Marks et al., "Methods for Studying Glucosylceramide Synthase", *Methods in Enzymology*, 311:50-59, 1999. Las composiciones farmacéuticas de estimuladores de glucosilceramida sintasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

20 Los inhibidores de glucosilceramida sintasa se conocen. Véase la Patente de EE.UU. 6.051.598 a Shayman et al.; Rani et al., "Cell Cycle Arrest Induced by an Inhibitor of Glucosylceramide Synthase", *The Journal of Biological Chemistry*, 270:2859-2867, 1995; Abe et al., "Use of Sulfobutyl Ether  $\beta$ -Cyclodextrin as a Vehicle for D-threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropanol-Related Glucosylceramide Synthase Inhibitors", *Analytical Biochemistry*, 287:344-347, 2000; Oshefski et al., "Glucosylceramide Synthase Inhibition Enhances Vincristine-Induced Cytotoxicity", *Int. J. Cancer*, 93:131-138, 2001; Abe et al., "Glycosphingolipid depletion in Fabry disease lymphoblasts with potent inhibitors of glucosylceramide synthase", *Kidney International*, 57:446-454, 2000; Lee et al., "Improved Inhibitors of Glucosylceramide Synthase", *The Journal of Biological Chemistry*, 274:14662-14669, 1999; Abe et al., "Structural and stereochemical studies of potent inhibitors and glucosylceramide synthase and tumor cell growth", *Journal of Lipid Research*, 36:611-621, 1995; Shayman et al., "Inhibitors of Glucosylceramide Synthase", *Methods in Enzymology*, 311:373-387, 1999; Jimbo et al., "Development of a New Inhibitor of Glucosylceramide Synthase", *J. Biochem* 127:485-491, 2000; y Marks et al., "Methods for Studying Glucosylceramide Synthase", *Methods in Enzymology*, 311:50-59, 1999.

30 Las enzimas que catalizan la producción de galactosilceramida a partir de CER (Rxn. núm. 15 en Fig. 2) se estimulan para aumentar la degradación de CER. Las composiciones farmacéuticas de estimuladores de dichas enzimas, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

Ejemplo de referencia 10: Modulación de precursores metabólicos de CER

35 La concentración de esfingolípidos dañinos se disminuye inhibiendo reacciones que dan precursores metabólicos de ceramida (CER), que es un precursor metabólico de SPH y S-1-P. Las enzimas que catalizan dichas reacciones incluyen aunque no están limitadas a las siguientes.

Inhibición de la producción de precursores metabólicos de CER

40 La concentración de esfingolípidos dañinos se disminuye inhibiendo las reacciones que dan precursores metabólicos de ceramida (CER), que es un precursor metabólico de SPH y S-1-P. Las enzimas que catalizan dichas reacciones incluyen aunque no están limitadas a las siguientes.

La serina palmitoil transferasa cataliza la producción de 3-ceto esfingina (Rxn. núm. 12 en Fig. 2), un precursor en la síntesis de ceramida. Para una revisión, véase Dickson et al., "Serine Palmitoyltransferase", *Methods in Enzymology*, 311:1-9, 1999.

45 Los inhibidores de serina palmitoil transferasa incluyen aunque no están limitados a viridifunginas (Mandala et al., *J. Antibiot. (Tokio)* 50:339-343, 1997; y (Mandala et al., "Isolation and Characterization of Novel Inhibitors of Sphingolipid Synthesis: Australifungin, Viridifungins, Rustmicin, and Khafrefungin", *Methods in Enzymology*, 311:335-348, 1999), lipoxamicina (Mandala et al., *J. Antibiot. (Tokio)* 47:376-379, 1994), y esfingofunginas E y F (Horn et al., *J. Antibiot. (Tokio)* 45:1692-1696, 1992). Otros inhibidores de SPT se describen por Hanada et al., "Specificity of Inhibitors of Serine Palmitoyltransferase (SPT), a Key Enzyme in Sphingolipid Biosynthesis, in Intact Cells", *Biochemical Pharmacology*, 59:1211-1216, 2000; Zweerink et al., "Characterization of a Novel, Potent, and Specific Inhibitor of Serine Palmitoyltransferase", *The Journal of Biological Chemistry*, 267:25032-25038, 1992; y Riley et al., "Fermentation, Partial Purification, and Use of Serine Palmitoyltransferase Inhibitors from *Isaria (=Cordyceps) sinclairii*", *Methods in Enzymology*, 311:348-361, 1999.

55 Las composiciones farmacéuticas de inhibidores de serina palmitoil transferasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

La 3-cetoesfingarina Reductasa cataliza la producción de esfingarina (dihidroesfingosina) (Rxn. núm. 11 en Fig. 2), un precursor en la síntesis de ceramida. Véase Beeler et al., "The *Saccharomyces cerevisiae* TSC10/YBR265 $\omega$  Gene Encoding 3-Ketosphinganine Reductase Is Identified in a Screen for Temperature-sensitive Suppressors of the CA2+-sensitive *csg2* $\Delta$  Mutant", *The Journal of Biological Chemistry*, 273:30688-30694, 1998. Las composiciones farmacéuticas de inhibidores de 3-cetoesfingarina reductasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

La dihidroceramida sintasa cataliza la acetilación de dihidroesfingosina (Rxn. núm. 10 en Fig. 2) que lleva a la producción de dihidroceramida, un precursor directo de ceramida. Sin desear unirse a cualquier teoría particular, la dihidroceramida sintasa puede ser la misma enzima que la ceramida sintasa (Rxn. núm. 4 en Fig. 2).

Los inhibidores de ceramida sintasa incluyen Fumonisina B1 (una toxina fúngica) (Merrill et al., *J. Lipid Res.* 26:215-234A, 1993; Wang et al., *Adv. Lipid Res.* 26:215-234, 1993; Tsunoda et al., *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12:281-289, 1998); derivados de fumonisina (Humpf et al., *J. Biol. Chem.* 273:19060-19064, 1998); toxinas de alternaria (Id. y Mandala et al., *J. Antibiot.* 48:349-356, 1995); viridifunginas (Merrill et al., *J. Lipid Res.* 26:215-234A, 1993); astralifunginas (Mandala et al., *J. Antibiot.* 48:349-356, 1995; Furneisen et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1484:71-82, 2000); y D-eritro-N-miristoil 2-amino-1-fenilpropanol (Hunnam, *Science* 274:1855-1859, 1996). Las composiciones farmacéuticas de inhibidores de dihidroceramida sintasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

Estimulación de la destrucción de precursores metabólicos de CER

La concentración de esfingolípidos dañinos se disminuye estimulando reacciones que degradan los precursores metabólicos de ceramida (CER), que es un precursor metabólico de SPH y S-1-P. Las enzimas que catalizan dichas reacciones incluyen aunque no están limitadas a las siguientes.

La esfingomielina desacilasa (SM desacilasa) cataliza la producción de esfingoilfosforilcolina (SPC) a partir de esfingomielina (Rxn. núm. 8 en Fig. 2; véase también la Fig. 1). Las composiciones farmacéuticas de estimuladores de SM desacilasa, especialmente aquellos que se formulan para rápido reparto cardiaco, se usan para esta forma de terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

Ejemplo de referencia 11: Un inhibidor de esfingomielinasa bloquea la producción de esfingosina inducida por hipoxia en un modelo celular

L-carnitina es un inhibidor conocido de SMasa (Andrien-Abadie et al., *FASEB J.* 13:1501-1510, 1999; véase también la Patente de EE.UU. 6.284.798). Este ejemplo demuestra que la L-carnitina bloquea la producción de esfingosina inducida por hipoxia en un modelo celular.

Los cardiomiocitos se cultivaron en platos de plástico que se colocaron en una cámara incubadora modular humidificada (ICN Biomedicals, Aurora, OH) presurizada a 275,79-344,73 Pa (0,04-0,05 psi) mediante la mezcla de gas particular usada en el tratamiento. La disolución de Tyrode caliente (37°C) que contiene BSA 0,2 mM, ampicilina (50 mg/mL), canamicina (100 mg/mL) y fungizona (20  $\mu$ g/mL) se gasificó durante 15 minutos con 95% de N<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub> antes del tratamiento celular. La pO<sub>2</sub> se monitorizó mediante un electrodo de oxígeno Micro pO<sub>2</sub> System (Lasar Research Labs, Los Ángeles, CA) y se encontró que era 4,0 mm de Hg para la duración del proceso de hipoxia. La cámara se mantuvo a 37°C durante los tiempos designados. Las células de control (normoxia) se trataron igual excepto por el uso de 95% de O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub> y se incubaron en una incubadora estándar. La pO<sub>2</sub> del tratamiento de normoxia fue 7,3 mm de Hg. El pH de los cultivos celulares de control y experimental se monitorizó con un micro electrodo de pH (Beetrode pH Electrodes, Sarasota, FL) y permaneció constante a pH=7,26 +/- 0,02 para las células normóxicas y 7,15 +/- 0,03 para células hipóxicas a lo largo del experimento. Los cardiomiocitos adultos se cultivaron bajo condiciones de normoxia o hipoxia durante 5 horas.

La disolución de Tyrode acondicionada para la célula se recogió y las células se rasparon del plato de cultivo. Tanto los esfingolípidos celulares como extracelulares se extrajeron y después se cuantificaron por HPLC en fase inversa. Los tiempos de retención de los esfingolípidos clave (SPH, SPC, S1P, DHSPH) seguidos en estos experimentos se muestran en la Figura 4. La hipoxia dio por resultado un aumento sustancial en un pico que corresponde a D-eritroesfingosina (SPH).

Se muestran las veces de aumentos en SPH y TNF-alfa (inserción) en respuesta a la hipoxia. Las células se pretrataron durante 30 minutos con o bien TNFRII:Fc (0,5 ng/mL) o L-carnitina (20 ng/mL) antes de la hipoxia. Los datos son medias +/- DEM de 19 experimentos separados. La Figura 4 muestra la cantidad de SPH y TNF-alfa (inserción) liberada en el medio condicionado por la célula y se expresa en términos de veces de aumento asociados con la hipoxia. Estos datos demuestran que la respuesta de SPH (~20 veces de aumento sobre la normoxia) fue más profunda que la respuesta de TNF-alfa (~10 veces de aumento sobre la normoxia, inserción). Además, la Figura 4 muestra que tanto TNFRII:Fc como el inhibidor de esfingomielinasa L-carnitina eran capaces de reducir significativamente (p<0,01) la cantidad total de SPH.

Ejemplo de referencia 12: Un inhibidor de esfingomielinasa bloquea los efectos de la isquemia global en un modelo animal

Un modelo de rata de isquemia y reperfusión se usó para evaluar el potencial terapéutico de una gentamicina, un aminoglucósido que inhibe la esfingomielinasa.

5 Reactivos

Se preparó tampón de Krebs-Henseleit (KH) combinando los siguientes componentes:

Compuesto químico	Conc. (mM)	Cantidad por litro (g)
NaHCO <sub>3</sub>	25,0	2,10
NaCl	118	6,90
KCl	4,7	0,35
MgSO <sub>4</sub> (anhi)	1,2	0,145
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	0,145
CaCl <sub>2</sub>	1,2	0,175
Glucosa	11	1,98

Las siguientes etapas se siguen para preparar el tampón KH. Primero, 95% de O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub> se burbujea a través de agua estéril (Gibco Cat. Núm. 15230-147), que se calienta simultáneamente a 37°C. Segundo, los ingredientes anteriores se añaden y el pH se ajusta a 7,4. Finalmente, el tampón se esteriliza por filtración.

- 10 La disolución vehículo de gentamicina se preparó como sigue. Una disolución madre de gentamicina 0,1 M se preparó añadiendo 70 mg de sulfato de gentamicina (Sigma, G1264) a 1 ml de tampón KH. El tampón KH (150 mL) se combinó con 150 µl de la disolución madre para dar una disolución 0,1 mM.

Protocolo

- 15 El protocolo usado fue esencialmente el que se describe por Sakai et al. (A device for recording left ventricular contraction and electrocardiogram in nonworking isolated perfused rat heart, *Jpn J Pharmacol* 28:223-9, 1978), y Zelinski et al., (Phosphatidylcholine biosynthesis in isolated hamster heart, *J Biol Chem.* 255:11423-8, 1980) con la excepción, en el último ejemplo, de que se usaron estudios de rata en los experimentos descritos en esta memoria en vez de corazones de hámsteres.

- 20 En breve, las ratas se anestesiaron y sus corazones se cortaron. Los corazones aislados se canularon y se unieron al aparato de perfusión de Langendorff, y se perfundieron con tampón KH. Los corazones se dejaron estabilizar durante 5-10 min. Después de la estabilización, los corazones deberían estar tranquilos y la velocidad de goteo debería estar entre 5 y 10 ml por minuto.

- 25 Se cortó un pequeño agujero en la aurícula izquierda de cada animal para exponer la válvula mitral. Un globo transductor desinflado se introdujo en el ventrículo izquierdo a través del agujero en la aurícula izquierda. El tubo transductor se pegó y ajustó de manera que no hubo presión en el corazón. La presión ventricular izquierda se midió y se grabó usando el programa MacLab. El globo transductor se llenó ajustando la cantidad de agua usando una jeringa unida al transductor por medio de una llave de paso de manera que la presión diastólica estuvo entre 0 y 5 mm de Hg. Los corazones se dejaron estabilizar durante 10 min. Una vez estabilizados, los corazones deberían estar tranquilos con un mínimo de 100 latidos por minuto (bpm). La presión sistólica sería al menos
- 30 aproximadamente 80 mm de Hg, dando por resultado una presión ventricular izquierda desarrollada de al menos aproximadamente 80 mm de Hg.

El flujo de tampón KH se cambió a disolución de vehículo de gentamicina usando la llave de paso al final de la cánula. La disolución de vehículo de gentamicina se dejó recircular durante 30 min., después de cuyo tiempo se recogieron dos alícuotas de 1,5 mL y se congelaron de forma repentina en nitrógeno líquido.

- 35 Después, todo el perfusado se apagó durante 40 min. para comenzar la isquemia global. El montaje del aparato de Langendorff se ajustó de manera que la bomba peristáltica se unió de forma segura y todo el aire se sacó de la tubería para empezar la reperfusión. El flujo de tampón KH se apagó después de 40 min., y dos alícuotas de 1,5 mL de perfusado que gotea del corazón se recogieron y se congelaron de forma repentina. El corazón se reperfundió entonces durante 45 min. El perfusado se recogió a intervalos de 2 min. y se congeló de forma repentina.

- 40 Después de aproximadamente 45 min., el perfusado se apagó y la presión ventricular no se grabó más tiempo. Las aurículas se cortaron, el transductor de presión se eliminó, y los ventrículos se congelaron en un tubo cónico de 50 mL.

Los resultados, mostrados en la Figura 5, muestran que la gentamicina inhibidora de esfingomielinasa neutra mitigó la isquemia y la lesión por reperusión en el modelo de isquemia de corazón de rata de Langendorff.

Ejemplo de referencia 13: Cribado de HTS por agentes terapéuticos que inhiben la esfingomielinasa

5 Este Ejemplo describe un ensayo de cribado ejemplar que se usa para cribar e identificar compuestos útiles en los métodos terapéuticos. El ensayo de cribado de este Ejemplo, que se diseña para aislar inhibidores de esfingomielinasa (SMasa) de una biblioteca de compuestos basados en la estructura de aminoglucósidos, puede estar en formatos usados de cribado de alto rendimiento (HTS).

10 Este Ejemplo describe un ensayo de proximidad de centelleo (SPA) de cribado de alto rendimiento (HTS) diseñado para identificar inhibidores aminoglucosídicos de esfingomielinasa (SMasa). El HTS-SPA del Ejemplo implica ensayos radiométricos homogéneos de alto volumen, basados en el principio de proximidad por centelleo. Aunque los ensayos de un único plato se describen en este Ejemplo, se entiende que muchos de dichos platos se prepararían y ensayarían en cribado de alto rendimiento.

Esfingomielinasas

15 La esfingomielinasa (esfingomielina colina fosfohidrolasa) (SMasa) cataliza la escisión hidrolítica de esfingomielina (SM) por medio de reacción que lleva a la generación de ceramida y fosocolina (Brady, R.O., Kanfer, J.N., Moek, M.B., y Fredrickson, D.S. 1966. The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:366). Cualquier esfingomielinasa puede usarse en los ensayos de HTS, aunque las SMasas de mamífero, particularmente SMasas neutras, son de interés particular.

Se han identificado varios tipos diferentes de SMasas de mamífero, es decir,

20 (1) Las SMasas estimuladas con Mg<sup>2+</sup>, asociadas a la membrana, neutras, se encontraron predominantemente en cerebro y riñón (Spence, M.W. 1993. Sphingomyelinases. Adv. Lipid Res. 26:3-23), que se conocen por surgir de un gen separado de SMasa lisosómica (Gatt, S., Dinur, T., y Kopolovic, J. 1978. Niemann Pick disease: presence of the magnesium-dependent sphingomyelinase in brain of the infantile form of the disease. J. Neurochem. 31:547-550). Para revisión de SMasas neutras, véase Chatterjee, "Neutral Sphingomyelinase", Advances in Lipid Research, 26:25-49, 1993; y Chatterjee, "Neutral sphingomyelinase: past, present and future", Chemistry and Physics of Lipids, 102: 79-96, 1999. Al menos dos tipos estructuralmente diferentes de SMasa neutra de mamífero (nSMasa) se han clonado:

30 (a) La nSMasa descrita por Stoffel et al., es decir, una SMasa neutra humana clonada descrita en Tomiuk et al., Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: Functions in sphingolipid signaling? Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 95: 3638-3643; Hofman et al., Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg<sup>2+</sup>-dependent neutral sphingomyelinase Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 97:5895-5900, 2000; y la solicitud PCT publicada WO 99/07855 a Stoffel et al., titulada "Neutral Sphingomyelinase, " se presentó el 11 de agosto de 1998 y se publicó el 18 de febrero de 1999.

35 (b) La nSMasa descrita en la Patente de EE.UU. núm. 5.919.687 a Chatterjee, titulada "Recombinant N-SMases and Nucleic Acids Encoding Same", solicitud PCT publicada WO 98/28445 a Chatterjee, titulada "Recombinant N-SMases and Nucleic Acids Encoding Same", y Chatterjee, Molecular Cloning, Characterization, and Expression of a Novel Human Neutral Sphingomyelinase, J. Biol. Chem. 274:37407-37412, 1999). En la última referencia, la nSMasa de Chatterjee se afirma que no está relacionado a la nSMasa de Stoffel et al. ya que las dos nSMasas tienen diferentes secuencias de aminoácido (pág. 37412, columna izquierda, ll. 33-34).

40 (2) Las SMasas lisosomales que actúan de forma óptima a bajo pH y no muestran dependencia de cationes divalentes (Kanfer, J.N., Young, O., Shapiro, D., y Brady, R.O. 1966. The metabolism of sphingomyelin. I. Purification and properties of a sphingomyelin-cleaving enzyme from rat liver tissue. J. Biol. Chem. 241:1081; Levade, T., Salvayre, R., y Blazy-Douste, L. 1986. Sphingomyelinases and Niemann-Pick disease. J. Clin. Chem. Biochem. 24:205-220);

45 (3) Las SMasas estimuladas por Zn<sup>2+</sup>, ácidas, presentes en suero bovino fetal y a un menor grado en suero humano de recién nacido (Spence, M.W., Byers, D.M., Palmer, F.B.St. C., y Cook, H.W. 1989. A new Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. J. Biol. Chem. 264:5358-5363), y también secretadas por varios tipos de células humanas durante varios procesos patofisiológicos (Schissel, S.L., Shuchman, E.H., Williams, K.J., y Tabas, I. 1996. Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. J. Biol. Chem. 271:18431-18436);

50 (4) Las SMasas citosólicas que, como SMasas neutras dependientes de Mg<sup>2+</sup>, tienen un pH neutro óptimo pero no dependencia de cationes divalentes (Okazaki, T., Bielawska, A., Domae, N., Bell, R.M., y Hannun, Y.A. 1994. Characteristics and partial purification of a novel cytosolic magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced HL-60 cell differentiation. J. Biol. Chem. 269:4070-4077).

(5) SMasas de placenta (García-Ruiz, Human placenta sphingomyelinase, an exogenous acidic pH-optimum sphingomyelinase, induces oxidative stress, glutathione depletion, and apoptosis in rat hepatocytes, *Hepatology* 32:56-65, 2000).

5 (6) Se han descrito SMasas específicas del cerebro (Yamanaka et al., *J. Neurochem.* 38:1753-1764, 1982); Hofman et al., "Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg<sup>2+</sup>-dependent neutral sphingomyelinase" *PNAS*, 97:5895-5900, 2000; Bemardo et al., "Purification and Characterization of a Magnesium-dependent Neutral Sphingomyelinase from Bovine Brain", *The Journal of Biological Chemistry*, 275:7641-7647, 2000; Liu et al., "Purification and Characterization of a Membrane Bound Neutral pH Optimum Magnesium-dependent and Phosphatidylserine-stimulated Sphingomyelinase from Rat Brain", *The Journal of Biological Chemistry*, 273:34472-34479, 1998. Una SMasa de cerebro de rata está comercialmente disponible (MDS Panlabs).

Las SMasas de especies que no son mamíferos incluyen:

15 (1) SMasas bacterianas, tal como la Fosfolipasa C bien caracterizada de *Bacillus cereus* (Ikezawa et al., *Studies on sphingomyelinase of Bacillus cereus. I. Purification and properties*, *Biochim Biophys Acta* 27 de Feb 1978; 528(2):247-56; Hetland et al., *Phospholipase C from Bacillus cereus has sphingomyelinase activity*, *Scand J Clin Lab Invest* Feb de 1982; 42(1):57-61; Gilmore et al., *A Bacillus cereus cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage*, *J Bacteriol* Feb 1989; 171(2):744-53; Yamada et al., *Nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of the gene coding for sphingomyelinase of Bacillus cereus*, *Eur J Biochem* 1 de agosto 1988; 175(2):213-20; Johansen et al., *Bacillus cereus strain SE-1: nucleotide sequence of the sphingomyelinase C gene*, *Nucleic Acids Res.* 16:103770, 1998; Fujii et al., *Mg<sup>2+</sup> binding and catalytic function of sphingomyelinase from Bacillus cereus*, *J Biochem (Tokio)* 124:1178-1187, 1998; Gavrilenko et al., *Nucleotide sequence of phospholipase C and sphingomyelinase genes from Bacillus cereus BKM-B164*, *Bioorg Khim* 19:133-138, 1993; Tomita et al., *Secondary structure of sphingomyelinase from Bacillus cereus*, *J Biochem (Tokio)* 108:811-815, 1990; y Tamura et al., *Mass production of sphingomyelinase of Bacillus cereus by a protein-hyperproducing strain, Bacillus brevis 47, and its purification*, *J Biochem (Tokio)* 112:488-491, 1992).

30 Otras SMasas bacterianas se conocen e incluyen, por medio de ejemplos no limitantes, las de *Helicobacter pylori* (Chan et al., *Purification and characterization of neutral sphingomyelinase from Helicobacter pylori*, *Biochemistry* 39:4838-4845, 2000; Lin et al., *Identification of neutral and acidic sphingomyelinases in Helicobacter pylori*, *FEBS Lett* 423:249-253, 1998); *Listeria ivanovii* (González-Zorn et al., *The smcL gene of Listeria ivanovii encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole*, *Mol Microbiol* 33:510-523, 1999); *Staphylococcus aureus* (Walev et al., *Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of Staphylococcus aureus*, *Infect Immun* 64:2974-2979, 1996); y *Clostridium perfringens* (Saint-Joanis et al., *Gene cloning shows the alpha-toxin of Clostridium perfringens to contain both sphingomyelinase and lecithinase activities*, *Mol Gen Genet* Nov 1989; 219(3):453-60).

35 (2) SMasas aracnoides, tales como la esfingomielinasa D citotóxica de la araña reclusa parda (*Loxosceles reclusa*) (Gates et al., *Serum amyloid p component: its role in platelet activation stimulated by sphingomyelinase d purified from the venom of the brown recluse spider (Loxosceles reclusa)*. *Toxicon* 28: 1303-1315, 1990).

40 (3) Los homólogos de SMasas, tal como ISC1 (YER019w) de *Saccharomyces cerevisiae* (Sawai et al., *Identification of ISC1 (YER019w) as Inositol Phosphosphingolipid Phospholipase C in Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 275:39793-39798, 2000), que pueden tener actividad SMasa in vitro incluso aunque la esfingomielina no esté presente en células del organismo del que se prepara el homólogo de SMasa. Esto es, un homólogo de SMasa puede actuar en sustratos distintos de la esfingomielina in vivo aunque sin embargo tienen actividad SMasa confiable in vitro.

45 Otras SMasas que pueden usarse incluyen sin limitación Romiti et al., "Characterization of sphingomyelinase activity released by thrombin-stimulated platelets", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 205:75-81, 200; Sawai et al., "Function of the Cloned Putative Neutral Sphingomyelinase as Lyso-platelet Activating Factor-Phospholipase C", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, Núm. 53, 31 de diciembre de 1999, págs. 38131-38139; Fensome et al., "A Neutral Magnesium-dependent Sphingomyelinase Isoform Associated with Intracellular Membranes and Reversibly Inhibited by Reactive Oxygen Species", *The Journal of Biological Chemistry*, 275:1128-1136, 2000; Holopainen et al., "Sphingomyelinase Activity Associated with Human Plasma Low Density Lipoprotein", *The Journal of Biological Chemistry*, 275:16484-16489, 2000; y Hinkovska-Glacheva et al., "Activation of a Plasma Membrane-Associated Neutral Sphingomyelinase and Concomitant Ceramide Accumulation During IgC-Dependent Phagocytosis in Human Polymorphonuclear Leukocytes", *Blood*, 91:4761-4769, 1998.

## Bibliotecas químicas basadas en estructuras de aminoglucósido

- Las bibliotecas químicas combinatorias que se usan en este ensayo de cribado son preferiblemente "parciales" en el sentido de que se preparan usando la estructura básica de aminoglucósido como un marco para producir moléculas aminoglucosídicas que tienen una multitud de posiciones donde pueden incorporarse grupos "R" alternos. La estructura mostrada en la Figura 6, que tiene 13 grupos "R", se usa. En los siguientes antibióticos de aminoglucósido que se dan de forma natural, la estructura mostrada en la Figura 6 tiene los siguientes grupos R que pueden sustituirse; en todos estos compuestos, R11 es NH<sub>2</sub>, y R12 es OH, y R13 es OH.

Aminoglucósido	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Canamicina A	OH	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	H	H
Canamicina B	NH <sub>2</sub>	OH	OH	H	M-12	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	H	CH <sub>3</sub>
Canamicina C	NH <sub>2</sub>	OH	OH	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	H	H
Gentamicina C1	NH <sub>2</sub>	H	H	NHCH <sub>3</sub>	NHCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
Gentamicina C1a	NH <sub>2</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
Gentamicina C2	NH <sub>2</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	H	H	H <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
Gentamicina C26	NH <sub>2</sub>	H	H	NHCH <sub>3</sub>	NHCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
Gentamicina B	NH <sub>2</sub>	H	H	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
Tobramicina	NH <sub>2</sub>	H	OH	H	NH <sub>2</sub>	H	H	OH	H	H
Dibecacina	NH <sub>2</sub>	H	H	H	NO <sub>2</sub>	H	H	OH	H	H
Abercicina	NH <sub>2</sub>	H	H	H	NH <sub>2</sub>	COR'	COR'	OH	H	H
Isepamicina	OH	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	COR	COR	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>

- Una biblioteca combinatoria de aminoglucósidos y derivados de aminoglucósido se prepara usando métodos tratados en Sucheck et al. (Combinatorial synthesis of aminoglycoside libraries, *Curr Opin Drug Discov Devel* 4:462-70, 2001); Hofstadler et al., (Multiplexed screening of neutral mass-tagged RNA targets against ligand libraries with electrospray ionization FTICR MS: a paradigm for high-throughput affinity screening, *Anal Chem* 71:3436-40, 1999), y referencias citadas en ellos.

## Estudios anteriores al ensayo

- Un plato de microtítulo FlashPlate® (NEN Life Science Products, Boston, MA) se usa en el ensayo. El interior de cada pocillo del plato de microtítulo se recubre permanentemente con una capa fina de centelleante basado en poliestireno que produce una señal cuando la superficie del pocillo está en estrecha proximidad a cualquiera de una variedad de isótopos (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>14</sup>C y <sup>33</sup>P). Porque el centelleante está unido permanentemente a los pocillos del plato, no necesita añadirse un cóctel de centelleo líquido a los pocillos durante el ensayo.
- Un sustrato radiomarcado para SMasa se recubre o se une a la superficie de los pocillos en un FlashPlate. La desintegración radiactiva asociada con el radiomarcaje provoca un efecto de centelleo de superficie de microplato detectable en un contador de centelleo de microplato. La radiomarca que se libera del sustrato radiomarcado por la actividad enzimática de SMasa no activa el centelleante. Así, después de añadirse SMasa, la señal de la radiomarca disminuye a lo largo del tiempo. Si un inhibidor de SMasa está presente en un pocillo, la radiomarca se libera a una velocidad menor, y la señal mediada por el centelleante disminuye así a una velocidad menor.

- En el presente Ejemplo, el sustrato de SMasa radiomarcado que se recubre en la superficie de los pocillos en un FlashPlate es [<sup>3</sup>H]esfingomielina (NEN Life Sciences). Antes de que comience HTS, se hacen estudios para determinar las medias y condiciones óptimas para el recubrimiento de pocillos con el sustrato. Alícuotas de [<sup>3</sup>H]esfingomielina, que tienen concentraciones que oscilan de 0,1 a 10 u Ci/ml, se preparan en un volumen constante de tampón Tris. Las alícuotas se añaden a 0,2 ml/pocillo a temperatura ambiente y la señal de los platos de microtítulo recubiertos se lee a intervalos regulares usando un Contador de Centelleo y Luminiscencia de Microplato TopCount NXT (Packard BioScience). Dos parámetros se optimizan en estos estudios. Primero, el tiempo al que se alcanza el máximo de conteos/pocillo antes de que la señal alcance una meseta; típicamente, esto ocurre después de 10 horas. Segundo, el intervalo de [<sup>3</sup>H]esfingomielina que puede añadirse a los pocillos y mostrar todavía un aumento lineal en la señal; típicamente, se usa 0,2 uCi/pocillo.

Después, se hacen estudios para determinar la cantidad de tiempo necesario para hidrolizar la cantidad máxima de sustrato a una concentración elegida. Un plato se recubre usando las condiciones optimizadas descritas anteriormente, es decir, 0,2 uCi/pocillo con 10 horas de incubación anterior al ensayo. La SMasa que se usa en el ensayo se añade (0,2 u/ml, diluida en PBS con 1 mg/ml de CaCl<sub>2</sub> y 1 mg/ml-MgCl<sub>2</sub>). El plato se incuba a temperatura ambiente y se leen los conteos en puntos temporales regulares durante un periodo de 24 horas. La hidrólisis del sustrato se da rápidamente al principio antes de alcanzar la meseta, típicamente después de aproximadamente las primeras 3 horas de incubación.

En estos estudios iniciales, y en platos usados en HTS, se usan varios pocillos de control. En un tipo de control, se añaden SMasas disponibles comercialmente (Sigma) a pocillos de control para confirmar la actividad del ensayo, que incluyen SMasas bacterianas (de *Staphylococcus aureus* o *Bacillus cereus*) o una SMasa de placenta humana. Si la SMasa diana es dependiente de un catión divalente, se añade un agente quelante tal como EDTA a uno o más pocillos de control.

#### Ensayos de HTS

Una SMasa diana de interés se prepara por tecnología de ADN recombinante. Las SMasas diana en este Ejemplo son SMasas neutras de mamífero. La nSMasa descrita por Chatterjee (Patente de EE.UU. 5.919.687) y la nSMasa descrita por Stoffel et al. (documento WO 98/28445) se ensayan ambas porque tienen secuencias de aminoácidos no relacionadas, y cualquiera o ambas pueden estar implicadas en el metabolismo de esfingolípidos y/o señalización en tejidos cardiovasculares.

En el HTS-SPA, se preparan muchos platos de microtítulo como se describe anteriormente. En pocillos que no son de control, un miembro de la biblioteca química de aminoglucósidos se añade a cada pocillo, seguido por la adición de la SMasa diana, y las señales de los pocillos de los platos se leen. Cuando se van a cribar grandes números de platos, puede añadirse un apilador de platos externo al Contador de Centelleo y Luminiscencia de Microplatos TopCount NXT, lo que permite que más de 15.000 muestras se carguen y ensayen sin atención. Los pocillos en que la señal de un sustrato no hidrolizado no disminuye, o disminuye menos rápidamente que en un pocillo de control que comprende solo la SMasa diana, identifican miembros de la biblioteca que son inhibidores candidatos de la SMasa diana. La actividad de estos compuestos candidatos se confirma por ensayos repetidos.

Los compuestos se caracterizan adicionalmente en términos de otros atributos deseables. Por ejemplo, la seguridad y eficacia de las composiciones y métodos para terapia cardiovascular basada en esfingolípidos se evalúan inicialmente en cultivo celular (por ejemplo, cardiomiocitos cultivados) y modelos animales. Ejemplos no limitantes de dichos modelos animales incluyen modelos de infarto de rata y cerdo (Olivetti et al., *Cardioscience* 6:101-106, 1995; Jacobs et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31:1949-1959, 1999; Gunther et al., *Eur. J. Pharma.* 406:123-126, 2000; y Holmes et al., *Circulation* 90:411-420, 1994).

#### Ejemplo de referencia 14: Modulación de la ruta de señalización de esfingomielina

La ruta de señalización de esfingomielina (también conocida como la ruta de SM) es una "cascada" de sucesos bioquímicos en que las proteínas en la ruta se activan (por modificación química enzimática o de otra forma) con el resultado final de que se afecta el metabolismo de esfingosina. En la mayoría de ejemplos, la activación de la ruta de SM lleva a producción aumentada de ceramida. Para revisiones de la biología molecular de la ruta de señalización de esfingomielina, véase Hannun et al., *Adv. Lipid Res.* 25:27-41, 1993; Liu et al., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 36:511-573, 1999; Igarashi, Y., *J. Biochem.* 122:1080-1087, 1997; y Oral et al., *J. Biol. Chem.* 272:4836-4842, 1997.

Se ha sugerido que la ruta de transducción de la señal de esfingomielina se activa durante la isquemia/hipoxia cardiaca (Bielawska et al., *Am. J. Pathol.* 151:1257-1263, 1997; Meldrum, *Am. J. Pathol.* 274:577-595, 1998; y Cain et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31:931-947, 1999). Si es así, debe haber un factor o proceso que medie la producción de SPH inducida por isquemia. El candidato más probable para el mediador es la citoquina pro-inflamatoria, factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ). En varios modelos animales de isquemia, el miocardio produce TNF $\alpha$  (Squadrito et al., *Eur. J. Pharmacol.* 237:223-230, 1993; Herrmann et al., *European Journal of Clinical Investigation* 28:59-66, 1998; Meldrum, *Ann. Thorac. Surg.* 65:439-443, 1998). Evidencia reciente demuestra que los cardiomiocitos en sí mismos producen TNF $\alpha$  y secretan la citoquina en el fluido extracelular (Comstock et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:2761-2775, 1998). Como los receptores de TNF $\alpha$  se expresan por cardiomiocitos (Krown et al., *FEBS Letters* 376:24-30, 1995; Torre-Amione et al., *Circulation* 92:1487-1493, 1995), se ha sugerido un papel autocrino/paracrino para TNF $\alpha$  (Meldrum, *Ann. Thorac. Surg.* 65:439-443, 1998). De forma significativa, TNF $\alpha$  induce la producción de SPH y la apoptosis en miocitos cardiacos (Krown et al., *J. Clin. Invest.* 98:2854-2865, 1996), presumiblemente actuando por unión al cardiomiocito complementario de receptores de TNF $\alpha$ .

La activación de la cascada de transducción de la señal de esfingomielina es un suceso temprano clave en los efectos citotóxicos (apoptóticos) de la TNF $\alpha$  de citoquina (Zhang et al., *Endo.* 136:4157-4160, 1995). TNF $\alpha$  puede provocar apoptosis significativa en cardiomiocitos de rata cultivados y se ha sugerido que la producción de SPH inducida por TNF $\alpha$  es responsable de la muerte celular desencadenada por TNF $\alpha$  (Krown et al., *J. Clin. Invest.* 98:2854-2865, 1996).

#### Inhibidores de citoquinas que activan la ruta de señalización de esfingomielina

La ruta de SM, muchas etapas de las cuales se dan de forma intracelular, se induce por una variedad de estímulos extracelulares. En la terapia cardiovascular basada en esfingolípidos, dichos estímulos están al menos parcialmente bloqueados. Los agentes inductores de la ruta de SM con que se interfieren deseablemente incluyen aunque no están limitadas a las citoquinas. Las citoquinas de interés particular incluyen aunque no están limitadas a citoquinas pro-inflamatorias, interferonas y quimioquinas. Las citoquinas pro-inflamatorias de interés particular incluyen aunque no están limitadas a TNF-alfa; interleuquinas tales como IL-1beta, IL-2, IL-10, interferonas de interés particular incluyen aunque no están limitadas a gamma-IFN. Las quimioquinas de interés particular son aquellas implicadas en el proceso isquémico que incluyen aunque no están limitadas a interleuquina-8 (IL-8), y las proteínas quimiotáxicas de monocito MCP-1 y MCP-2. Un ejemplo no limitante de un agente que puede usarse para modular la ruta de SM (en particular, apoptosis inducida por ictus) es el inmunosupresor FK506 (Herr et al., *Brain Res.* 826:210-219, 1999).

#### Agentes que bloquean la activación inducida por citoquina de la ruta de SM.

Los agentes terapéuticos cardiacos basados en esfingolípidos que se usan para inhibir las acciones de citoquinas incluyen aunque no están limitados a un anticuerpo dirigido a una citoquina o a un receptor de citoquina; un fragmento de receptor de citoquina que se une a una citoquina pero es biológicamente inactiva de otra forma; y un análogo de citoquina que se une al receptor de citoquina pero es biológicamente inactiva de otra forma.

Como ejemplo, un anticuerpo dirigido a una citoquina o un receptor de citoquina se usa como un agente terapéutico en terapia cardiovascular basada en esfingolípidos. Dichos anticuerpos se generan en una respuesta inmunoreactiva a una citoquina, un receptor de citoquina, o un polipéptido sintético derivado de los mismos. Un tipo preferido de anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que se aísla inicialmente de un hibridoma; más preferido es un anticuerpo monoclonal que se ha "humanizado" por medio de manipulación genética molecular. Se prefieren también fragmentos, preferiblemente solubles, que están derivados de anticuerpos para una citoquina y retienen la capacidad de unirse a una citoquina, tal como, por ejemplo, análogos de Fv de cadena sencilla (scFv). El aislamiento, producción, humanización y derivación de anticuerpos se describe en Ramnarayan et al., *Am. Biotechnol. Lab.*:26-28, 1995; Gavilondo et al., *BioTechniques* 29:128-145, 2000; Kling, J., *Modern Drug Discovery* 2:33-45, 1999; Morrow, K.J. Jr., *American Laboratory* 32:15-19, 2000; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88, 1991; Johnson et al., *Methods in Enzymology* 203:88-98, 1991; Güssow et al., *Methods in Enzymology* 203:99-121, 1991; y referencias citadas en ellos.

Un anticuerpo preferido que se usa como un agente terapéutico en terapia cardiovascular basado en esfingolípidos es uno que bloquea la unión de una citoquina a su receptor. Los ensayos para determinar el grado de inhibición de la unión de una citoquina a su receptor (véase, por ejemplo, Murata et al., *Anal. Biochem.* 282:11-120, 2000) se usan en las evaluaciones iniciales de la efectividad de dichos anticuerpos.

Como otro ejemplo, un fragmento de receptor que se une a una citoquina pero que es biológicamente inactivo de otra forma se usa como un agente terapéutico en la terapia cardiovascular basada en esfingolípidos. Por ejemplo, la inhibición terapéutica de la ruta de SM se alcanza bloqueando la unión de la TNF-alfa extracelular a un receptor celular (TNFR); esto a su vez evita la activación de la ruta de SM. La unión de TNF-alfa a un TNFR se inhibe de forma directa o competitiva. Un ejemplo de un agente para la inhibición competitiva de la unión es un fragmento de receptor de TNF-alfa soluble tal como TNRFII:Fc. El fragmento de receptor TNRFII:Fc, que se vende como Embrel<sup>R</sup> (de Immunex Corporation, Seattle, WA). Esta proteína de fusión soluble se hizo a partir del dominio de unión extracelular del receptor de TNF tipo II y una parte de Fc de inmunoglobulina de IgG1. Esta proteína de fusión soluble tiene una afinidad muy alta para TNF (Im et al., *J. Biol. Chem* 275:14281-14286, 2000).

Como otro ejemplo, moléculas pequeñas que sirven como inhibidores y/o antagonistas de receptores de esfingolípidos se usan como agentes terapéuticos en terapia cardiovascular basada en esfingolípidos. Dichas moléculas incluyen sumarina, que bloquea la acción de EDG-3 (Mandala et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:7859-7864, 2000), y la toxina pertusis, que bloquea los receptores EDG que usan Gi (Gonda et al., *Biochem. J.* 337:67-75, 1999).

Además de TNF y Fas, otros ejemplos de agentes extracelulares que activan la ruta de SM interactuando con sus receptores incluyen aunque no están limitados a Fas y el receptor de Fas (Brenner et al., *J. Biol. Chem.* 272:22173-22181, 1997; y el factor de crecimiento del nervio (NGF) y el receptor de neutrotrofina p75 (p75NTR) (Dobrowsky et al., *Science* 265:1596-1599, 1994).

#### Otros agentes dirigidos a la ruta de señalización de esfingomielina

La terapia cardiovascular basada en esfingolípidos también se alcanza mediante el uso de compuestos que se unen a receptores de esfingolípidos que inician y estimulan la ruta de señalización de esfingomielina. Esta ruta da por resultado finalmente la producción de ceramida aumentada. Un nivel aumentado de ceramida, se esperaría, a su vez, que de por resultado concentraciones elevadas de esfingolípidos indeseables tales como, por ejemplo, S-1-P y SPH. Dichos agentes de unión al receptor pueden ser, por medio de un ejemplo no limitante, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, pequeñas moléculas (orgánicas) o derivados de esfingolípidos que se unen a los receptores pero activan la ruta de señalización de SMA. Las síntesis de derivados de esfingolípidos representativos



se describen en, por medio de ejemplo no limitante, la solicitud de patente publicada PCT WO 99/12890; Patentes de EE.UU. 5.663.404 y 6.051.598, y Patentes de EE.UU. 5.260.288 y 5.391.800.

5 En otros ejemplos, como se explica en detalle en otra parte de esta memoria, los componentes de la ruta de SM se usan para crear proteínas terapéuticas que retienen la capacidad de unirse a esfingolípidos pero son biológicamente inactivos de otra forma. Además, varias etapas en la ruta de SM se inhiben específicamente por derivados negativos dominantes de proteínas implicadas en una etapa particular en la cascada, moléculas antisentido y construcciones, y compuestos terapéuticos génicos.

Ejemplo de referencia 15: Derivados de proteína de unión a esfingolípidos

10 Los derivados de proteína de unión a esfingolípidos se usan para terapia cardiovascular basada en esfingolípidos. Dichos derivados de proteína retienen la capacidad de unirse a esfingolípidos, incluso si otras funciones, actividades bioquímicas y/o características de la proteína se alteran, se comprometen o están ausentes en el derivado de proteína. Los derivados de proteína pueden ser oligopéptidos sintetizados *in vitro*, proteínas que se han purificado de un animal y se han modificado químicamente o de otra forma, proteínas producidas por medio de tecnología de ADN recombinante, o combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de derivados de proteína de unión a  
15 esfingolípidos incluyen derivados de enzima, y derivados de receptor. Un derivado de enzima de unión a esfingolípidos puede ser, por ejemplo, un derivado no catalítico de una enzima implicada en metabolismo de esfingolípidos que retiene la capacidad de unirse a esfingolípidos. Un derivado de receptor de unión a esfingolípidos puede ser, por ejemplo, un derivado soluble de un receptor de esfingolípidos unido a la membrana que se une a esfingolípidos, por ejemplo, derivados solubles de un miembro de la familia de receptores EDG o SCaMPER. Un  
20 "derivado de proteína de unión a esfingolípidos" puede ser también un anticuerpo o derivado de anticuerpo; "proteínas de derivado de anticuerpo" son fragmentos de anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a esfingolípidos. Dichos fragmentos de anticuerpo son, por medio de ejemplo no limitante, análogos de FV de cadena sencilla (scFv), regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y similares, y proteínas de fusión que comprenden dichos fragmentos de anticuerpo. Véase Gaviolondo et al., *BioTechniques* 29:128-145, 2000; y Verma et al., *Journal of Immunological Methods* 216:165-181, 1998.

Dichos derivados de proteína de unión a esfingolípidos pueden derivarse, aunque no necesitan estarlo, de una enzima o receptor del animal que se pretende tratar. Dichos derivados pueden prepararse a partir de enzimas homólogas o receptores de un mamífero no humano (por ejemplo, un derivado de SMasa de felino) o de enzimas análogas o receptores de un organismo que pertenece a una Familia, Orden, Clase o Reino biológico diferente (por  
30 ejemplo, una SMasa de arácnido o bacteriana).

Derivados de enzima de unión a esfingolípidos

Las enzimas de las que se obtienen derivados de unión a esfingolípidos biológicamente inactivos (no catalíticos) incluyen aunque no están limitados a los siguientes. Dichos derivados de estas enzimas se unen a su sustrato, que es un esfingolípidos indeseable, tóxico y/o cardiotoxico, y disminuyen así la concentración real o disponible del  
35 esfingolípidos, y/o deja al esfingolípidos biológicamente inactivo con respecto a sus efectos cardiotoxicos. Preferiblemente, dichos derivados son solubles y pueden formularse en una composición farmacéutica adecuada para terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

S-1-P se une mediante enzimas que tienen S-1-P como un sustrato, tal como, por medio de ejemplo no limitante, S-1-P liasa y S-1-P fosfatasa. Derivados no catalíticos de estas enzimas se unen a S-1-P e interfieren con sus efectos  
40 dañinos.

SPH se une mediante enzimas que tienen SPH como un sustrato, tal como, por medio de ejemplo no limitante, SPH quinasa y ceramida sintasa. Derivados no catalíticos de dichas enzimas se unen a SPH e interfieren con sus efectos dañinos.

La ceramida se une mediante enzimas que tienen ceramida como un sustrato, tal como, por medio de ejemplo no limitante, ceramidasa, SM sintasa, ceramida quinasa y glucosilceramida sintasa. Derivados no catalíticos de dichas  
45 enzimas se unen a ceramida e interfieren con los efectos dañinos de sus metabolitos, tal como, en particular, SPH y S-1-P.

La esfingomielina se une mediante enzimas que tienen esfingomielina como un sustrato, tal como, por medio de ejemplo no limitante, SMasa. Derivados no catalíticos de dichas enzimas se unen a esfingomielina e interfieren con los efectos dañinos de sus metabolitos, tal como, por ejemplo, ceramida, SPH y S-1-P.  
50

Derivados de receptor de unión a esfingolípidos

Los receptores de los que se obtienen derivados de unión a esfingolípidos biológicamente inactivos (por ejemplo, que no transducen señal) incluyen aunque no están limitados a los siguientes. Dichos derivados de estos receptores se unen a su ligando, que es un esfingolípidos cardiotoxico, y disminuyen así la concentración real o disponible del  
55 esfingolípidos, y/o deja al esfingolípidos biológicamente inactivo con respecto a sus efectos cardiotoxicos.

Preferiblemente, dichos derivados son solubles y pueden formularse en una composición farmacéutica adecuada para terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

#### Receptores de EDG

5 Se usan receptores que se unen a S-1-P (para una revisión de algunos receptores de unión a S-1-P, véase Spiegel et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1484:107-116, 2000).

EDG-1 fue el primer miembro identificado de una clase de receptores derivados de endotelio acoplados con proteína G (EDG). Dichos receptores incluyen aunque no están limitados a miembros de la familia EDG de receptores (también conocidos como receptores IpA, Chun, *Crit. Rev. Neuro.* 13:151-168, 1999), e isoformas y homólogos de los mismos tal como NRG1 y AGR16.

10 Para revisiones, véase Goetzl et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 469:259-264, 1999; Chun et al., *Cell. Biochem. Biophys.* 30:213-242, 1999; Sato, "A new role of lipid receptors in vascular and cardiac morphogenesis", *The Journal of Clinical Investigation*, 6:939-940, 2000.

15 EDG-1 se describe por Lee et al. (*Ann. NY Acad. Sci.* 845:19-31, 1998). Los genes y proteínas de EDG-1c humano se describen en la solicitud PCT publicada WO 99/46277 a Bergsma et al. descrita en Au-Young, et al., Patente de EE.UU. núm. 5.912.144, expedida el 15 de junio de 1999, "EDG-1 Receptor Homolog"; Bergsma et al., documento WO 97/46277, publicado el 16 de septiembre de 1999, "Human EDG-1c Polynucleotides and Polypeptides and Methods of Use"; y Okamoto et al., "EDG1 Is a Functional Sphingosine-1-Phosphate Receptor That Is Linked via a Gi/o to Multiple Signaling Pathways, Including Phospholipase C Activation, Ca<sup>2+</sup> Mobilization, Ras-Mitogen-activated Protein Kinase Activation, and Adenylate Cyclase Inhibition", *The Journal of Biological Chemistry*, 273:27104-27110, 1998.

20 EDG-3 se describe por Okamoto et al. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:203-208, 1999) y An et al. (*FEBS Letts.* 417:279-282, 1997). Véase también An et al., *J. Biol. Chem.* 275:288-296, 2000; EDG-3 (también conocido como LP(B4)); Tsui, Patente de EE.UU. núm. 6.130.067, expedido el 10 de octubre de 2000, "Human EDG3SB Gene"; y Siehler et al., "Sphingosine 1-Phosphate Activates Nuclear Factor- $\kappa$ B through Edg Receptors; Activation Through Edg-3 and Edg-5, but not Edg-1, in Human Embryonic Kidney 293 Cells," *JBC Papers in Press* publicado el 22 de octubre de 2001, como Manuscrito M01107220.

25 Los genes EDG-5 humanos y de mamíferos se describen en la Patente de EE.UU. núm. 6.057.126 a Munroe et al. y la solicitud PCT publicada WO 99/33972 a Munroe et al. El homólogo de rata, *H218* (también conocido como ARG16) se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.585.476 a MacLennan et al. Van Brocklyn et al., *J. Biol. Chem.* 274:4626-4632, 1999; y Gonda et al., *Biochem. J.* 337:67-75, 1999. Véase también An et al., *J. Biol. Chem.* 275:288-296, 2000.

EDG-6 se describe por Graler et al. (*Genomics* 53:164-169, 1998) y Yamazaki et al. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:583-589, 2000).

35 EDG-8 de cerebro de rata se describe por Im et al., (*J. Biol. Chem.* 275:14281-14286, 2000). Los homólogos de EDG-8 de otras especies, que incluyen seres humanos, también pueden usarse.

El receptor Mil (Mil es una abreviatura para "millas de separación") se une a S-1-P y regula la migración celular durante el desarrollo de corazón de vertebrados. El receptor Mil del pez cebra se describe por Mohler et al. (*J. Immunol.* 151:1548-1561, 1993). Otro receptor de S-1-P es NRG 1 (gen 1 regulado por el factor de crecimiento del nervio), la versión de rata del que se ha identificado (Glickman et al., *Mol. Cel. Neurosci.* 14:141-152, 1999).

40 Los receptores que se unen a SPC se usan también. Dichos receptores incluyen aunque no están limitados a miembros de la familia de receptores S<sub>Ca</sub>MPER (Mao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:1993-1996, 1996; Betto et al., *Biochem. J.* 322:327-333, 1997), y un receptor 1 acoplado a la proteína G del cáncer de ovario; Xu et al., "Sphingosylphosphorylcholine is a ligand for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1", *Nature Cell Biology*, 2:261-267, 2000.

45 Alguna evidencia sugiere que EDG-3 puede unirse a SPC además de a S-1-P (Okamoto et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:203-208, 1999). Se usan derivados de EDG-3 que se unen tanto a S-1-P como a SPC. También es usable el receptor descrito en Ames et al., documento WO 01/04139 A2, publicado el 18 de enero de 2001, "Polynucleotide and Polypeptide Sequences of Human AXOR29 Receptor and Methods of Screening for Agonists and Antagonists of the Interaction Between Human AXOR29 Receptor and its Ligands".

50 También se usan los receptores que se unen a LPA (ácido lisofosfático). Los receptores de LPA se describen por Im et al., "Molecular Cloning and Characterization of a Lysophosphatidic Acid Receptor, Edg-7, Expressed in Prostate", *Molecular Pharmacology*, 57:753-759, 2000; An et al., "Characterization of a Novel Subtype of Human G Protein-coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid", *The Journal of Biological Chemistry*, 273:7906-7910, 1998; Fukushima et al., "A single receptor encoded by vzg -1/lpAledg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:6151-6156, 1998; Chun et al., Patente de EE.UU.

55

núm. 6.140.060 expedida el 31 de octubre de 2000, "Closed Lysophosphatidic Acid Receptors"; y Kimura et al., "Two Novel Xenopus Homologs of Mammalian LPEDG-2 Function as Lysophosphatidic Acid Receptor Xenopus Oocytes and Mammalian Cells", JBC Papers in Press publicada en la red el 5 de febrero de 2001 como Manuscrito M011588200.

5 Los fragmentos de receptor solubles son derivados de receptores unidos a membrana en que las partes transmembrana del receptor se han eliminado. Los polipéptidos derivados del receptor que son solubles, es decir, han perdido su parte transmembrana, y que retienen su capacidad para unirse al sustrato del receptor, son fragmentos de receptor solubles que pueden tener valor terapéutico como agentes que se unen a esfingolípidos indeseables. Los estudios que han identificados partes de los receptores Edg que se unen a S-1-P son útiles como guías para diseñar fragmentos de receptor solubles (Parrill et al., Identification of Edg1 Receptor Residues That Recognize Sphingosine 1-Phosphate, The Journal of Biological Chemistry, 275:39379-39384, 2000; y Wang et al., A Single Amino Acid Determines Lysophospholipid Specificity of the S1P1(EDG1) and LPA1 (EDG2) Phospholipid Growth Factor Receptors, JBC Papers in Press publicada en la red el 16 de octubre de 2001 como Manuscrito M107301200.

15 Proteínas de unión a esfingolípidos de fuentes naturales

Las proteínas de unión a esfingolípidos que pueden usarse incluyen las aisladas de fuentes naturales. Un ejemplo no limitante de dicha proteína es lisenina, una proteína que se une a la esfingomielina, que se ha preparado a partir del gusano de tierra *Eisenia foetida* (Yamaji et al., J. Biol. Chem. 273:5300-5306, 1998).

Ejemplo 16: Clonado de genes Scamper de rata y humano.

20 Los genes SCaMPER de rata y humano se obtuvieron usando una combinación de reacciones de transcripción inversa y de cadena polimerasa (RT-PCR) como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich, ed., 1989).

25 El tejido se preparó de varias fuentes humanas y de rata como sigue. Se recogió tejido cardíaco humano de un paciente fallecido por fallo cardíaco, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C. Se obtuvo recientemente tejido cardíaco y esquelético de rata procedente de ratas Sprague-Dawley adultas sacrificadas. El ARN de estos tejidos se aisló usando el Mini Equipo Rneasy Qiagen disponible comercialmente según los protocolos del fabricante (Qiagen, Valencia, CA).

Se realizó la amplificación por PCR de las secuencias diana usando un equipo RT-PCR de una etapa de Qiagen disponible comercialmente según los protocolos del fabricante. Los conjuntos de cebadores incluyeron:

30 5'- CCAGGATTCATCATATGTTAAAAG - 3' (superior) (SEQ ID NO.: 1); y

5' - ATCAGTGGGTGCATCAGTAGC - 3' (inferior) (SEQ ID NO.:2) para el marco de lectura abierta (OR<sub>F</sub>) y la 3'-secuencia de SCaMPER (diseñada a partir del número de acceso de GenBank U33628).

35 La amplificación utilizó regímenes cíclicos según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las reacciones se optimizaron usando 40 ciclos de PCR, consistiendo cada ciclo de 45 segundos de desnaturalización a 95°C, 45 segundos de hibridación a 50°C, y 1 minuto de polimerización a 72°C. Los productos de PCR resultantes se subclonaron en pCR3.1 TOPO o pCDNA3.1-VS/HIS TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando técnicas estándar. La secuenciación con un cebador T7 se realizó en la Instalación de Núcleo de ADN de la Universidad Estatal de San Diego (San Diego, CA). Las secuencias SCaMPER resultantes se presentan como SEQ ID NO.: 3, el marco de lectura abierta del gen SCaMPER de rata y SEQ ID NO.: 4, el marco de lectura abierta del gen SCaMPER humano.

40

## ES 2 523 856 T3

ORF ScaMPER de rata (SEQ ID No.:3)

```
001 ATGTTAAAAG TGAGCAGGGT CTCAAGTGAA GGTTTAATAT CACTTTCTAT CACTGAGGCA
061 CCTGATCTTA AGATCAGGGA TCCTAAGATA GAGAACTCT ACCTTCCAGT TTTTATTTA
121 AATGCACACA TCTACTTAAA TGCACTCAGT ACTCTCCTGA ACTCTCATTG TGGCGAGAAC
181 TGTTTTCAT GGTTATGAAC AATTACAGAA TGCCACTTTT CCAGTTTGA GAAATATATT
241 CATTATATA AACAGGGTCA GGAACACCAA GAGGCAAGGA GGAGGGGGTG GTGTGAGTGG
301 GAAAGGTGAG ATGAAGCAGT GCTTCCTCTC TTAA
```

ORF ScaMPER humano (SEQ ID NO.:4)

```
ATGTTAAAAGTGAGCAGGGTCTCAAGTGAAGGTTTAATATCACTTTCTATCACTGA
5 GGCACCTGATCTTAAGATCAGGGATCCTAAGATAGAGAACTCTACCTTCCAGTTT
TTTATTTAAATGCACACATCTACTTAAATGCACTCAGTACTCTCCTGAACTCTCAT
TGTGGCGAGAACTGTTTTTCATGGTTATGAACAATTACAGAATGCCACTTTTCCAGT
TTGGAGAAATATATTCATTTATATAAACAGGGTCAGGAACATCAAGAGGCAAGGAG
GAGGGGGTGGTGTGAGTGGGAAAGGTGAGATGAAGCAGTGCTTCCTCTCTTAA
```

Ejemplo 17: Clonación de genes EDG-3 de rata

10 El gen Edg-3 de rata se obtuvo usando una combinación de reacciones de transcripción inversa y de cadena polimerasa (RT-PCR) como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich, ed., 1989).

Tejido cardíaco, hepático y de músculo esquelético de rata se obtuvo recientemente de ratas sacrificadas. El ARN de estos tejidos se aisló usando el Mini Equipo Rneasy Qiagen disponible comercialmente según los protocolos del fabricante (Qiagen, Valencia, CA).

15 Se realizó la amplificación por PCR de las secuencias diana usando el equipo RT-PCR de una etapa de Qiagen disponible comercialmente según los protocolos del fabricante. Los conjuntos de cebadores incluyeron:

5' - TTATGGCAACCACGCACGCGCAGG - 3' (superior) (SEQ ID NO.:5)

5' - AGACCGTCACTTGCAGAGGAC - 3' (inferior) (SEQ ID NO.:6)

20 La amplificación utilizó regímenes cíclicos según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las reacciones se comenzaron a 50°C durante 30 minutos, seguido por 95°C durante 15 minutos; y después se optimizaron usando 40 ciclos de PCR, consistiendo cada ciclo de 45 segundos de desnaturalización a 95°C, 45 segundos de hibridación a 63±5°C, y 1 minuto de polimerización a 72°C. Los productos de PCR resultantes se subclonaron en vector pCR3.1 usando el equipo de clonación de Invitrogen TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando técnicas estándar. Brevemente, después de RT-PCR, se usó un 1% de gel de agarosa para separar los productos de PCR de los cebadores no  
25 usados y dNTPs electroforéticamente. El fragmento de aproximadamente 1200 pb se escindió entonces rápidamente bajo luz UV y el equipo Bio101 GeneClean se usó entonces para purificar el ADN. El ADN purificado se unió entonces al vector PCR3.1. La mezcla de ligado se transformó entonces en células químicamente competentes Invitrogen Top10 con choque de calor. Después de 1 hora de incubación agitando a 37°C, las células se extendieron en un plato LB que contenía ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Se eligieron varias colonias

## ES 2 523 856 T3

individuales y se usaron para inocular tubos de cultivo que contenían 3 ml de medios de LB-ampicilina. Después de 8-12 horas de agitación a 37°C, 1,5 ml del cultivo se usó en el equipo Qiaspin miniprep para aislar plásmido de ADN. La enzima de restricción EcoR1 se usó para confirmar que el plásmido contenía un pedazo de ADN que era de aproximadamente 1200 pb.

- 5 La secuenciación con un cebador T7 se realizó en la Instalación de Núcleo de ADN de la Universidad Estatal de San Diego (San Diego, CA). La secuencia Edg-3 de rata resultante se presenta como SEQ ID NO.: 7.

Secuencia Edg-3 de rata (SEQ ID NO.: 7)

```
0001 ATGGCAACCA CGCACGCGCA GGGGCACCCG CCAGTCTTGG GGAATGATAC TCTCCGGGAA
0061 CATTATGATT ACGTGGGGAA GCTGGCAGGC AGGCTGCGGG ATCCCCCTGA GGGTAGCACC
0121 CTCATCACCA CCATCCTCTT CTTGGTCACC TG TAGCTTCA TCGTCTTGGA GAACCTGATG
0181 GTTTTGATTG CCATCTGGAA AAACAATAAA TTTCATAACC GCATGTACTT TTTCATCGGC
0241 AACTTGGCTC TCTGCGACCT GCTGGCCGGC ATAGCCTACA AGGTCAACAT TCTGATGTCC
0301 GGTAGGAAGA CGTTCAGCCT GTCTCCAACA GTGTGGTTCC TCAGGGAGGG CAGTATGTTC
0361 GTAGCCCTGG GCGCATCCAC ATGCAGCTTA TTGGCCATTG CCATTGAGCG GCACCTGACC
0421 ATGATCAAGA TGAGGCCGTA CGACGCCAAC AAGAAGCACC GCGTGTTTCCT TCTGATTGGG
0481 ATGTGCTGGC TAATTGCCTT CTCGCTGGGT GCCCTGCCCA TCCTGGGCTG GAACTGCCTG
0541 GAGAACTTTC CCGACTGCTC TACCATCTTG CCCCTCTACT CCAAGAAATA CATTGCCTTT
```

0601 CTCATCAGCA TCTTCACAGC CATTCTGGTG ACCATCGTCA TCTTGTACGC GCGCATCTAC  
0661 TTCTGGTCA AGTCCAGCAG CCGCAGGGTG GCCAACCACA ACTCCGAGAG ATCCATGGCC  
0721 CTTCTGCGGA CCGTAGTGAT CGTGGTGAGC GTGTTCATCG CCTGTTGGTC CCCCCTTTTC  
0781 ATCCTCTTCC TCATCGATGT GGCCTGCAGG GCGAAGGAGT GCTCCATCCT CTTCAAGAGT  
0841 CAGTGGTTCA TCATGCTGGC TGTCCTCAAC TCGGCCATGA ACCCTGTCAT CTACACGCTG  
0901 GCCAGCAAAG AGATGCGGCG TGCTTTCTTC CGGTTGGTGT GCGGCTGTCT GGTCAAGGGC  
0961 AAGGGGACCC AGGCCTCCCC GATGCAGCCT GCTCTTGACC CGAGCAGAAG TAAATCAAGC  
1021 TCCAGTAACA ACAGCAGCAG CCACTCTCCA AAGGTCAAGG AAGACCTGCC CCATGTGGCT  
1081 ACCTCTTCCT GCGTCACTGA CAAAACGAGG TCGCTTCAGA ATGGGGTCCT CTGCAAGTGA  
1141 CGGTCT

Ejemplo de referencia 18: Aproximaciones de genética molecular a la terapia cardiovascular basada en esfingolípidos

- 5 Además de las aproximaciones tradicionales a agentes terapéuticos, las aproximaciones basadas en genética molecular y tecnología de ADN recombinante se usan para producir agentes para terapia cardiovascular basada en esfingolípidos.

Proteínas mutantes negativas dominantes

- 10 Las proteínas mutantes negativas dominantes de enzimas que catalizan reacciones que llevan a la producción de esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotoxicos, o de receptores de esfingolípidos, se usan como agentes para terapia cardiovascular basada en esfingolípidos. Dichas proteínas se reparten a tejido cardiaco u otros tejidos para disminuir la producción de esfingolípidos y/o minimizar los efectos cardiotoxicos de esfingolípidos circulantes. Enzimas de interés particular incluyen ceramidasa, esfingomielinasa y SPH quinasa. Los receptores de interés particular incluyen miembros de la familia de EDG de receptores, especialmente los conocidos actualmente por unirse a S-1-P, es decir, EDG-1, EDG-3 y EDG-5.

- 20 Los mutantes negativos dominantes se preparan en una variedad de formas. En general, los mutantes negativos dominantes de proteínas retienen su capacidad para interactuar con otras moléculas aunque han perdido alguna otra función presente en la proteína natural. Por ejemplo, un mutante negativo dominante de una enzima multimérica implicada en el metabolismo de esfingolípidos sería una que retiene la capacidad de formar multímeros pero tiene un dominio catalítico que se ha inactivado por supresión o mutación de residuos de aminoácidos en el dominio catalítico. Dichas supresiones y mutaciones se crean por mutagénesis dirigida al sitio, por mutagénesis aleatoria o por cualquier otro procedimiento adecuado.

- 25 Un ejemplo no limitante de un mutante negativo dominante que puede usarse es un mutante negativo dominante de la SPH quinasa humana. Esta mutación (Gly82Asp), que se creó por mutagénesis dirigida al sitio del dominio catalítico presupuesto de la enzima, se afirma que bloquea la activación de SPH quinasa endógena por TNF-alfa e IL-1-beta (Pitson et al., J Biol. Chem. 275:33945-33950, 2000).

Antisentido

- 30 Oligonucleótidos antisentido frente a ARNm de enzimas de producción de esfingolípidos clave (por ejemplo, esfingomielinasa, ceramidasa, esfingosina quinasa) se reparten a tejido cardiaco y/u otros tejidos para inhibir o bloquear completamente la producción y/o efectos dañinos de esfingolípidos indeseables, tóxicos y/o cardiotoxicos.

Los oligonucleótidos antisentido se diseñan para disminuir la expresión de proteínas de unión a esfingolípidos clave o receptores tales como EDG y SCaMPER se reparten a tejidos cardiacos y/u otros para minimizar los efectos cardiotoxicos de esfingolípidos circulantes. Los ribozimas que degradan dichos ARNm también se usan. De forma adicional o alternativa, las construcciones de expresión antisentido, que transcriben moléculas de ARN antisentido *in vivo*, pueden introducirse en un animal, que puede ser humano, que las necesita.

#### Terapia génica

Varias formas de terapia génica se usan para llevar a cabo la terapia cardiovascular basada en esfingolípidos. La molécula de ácido nucleico terapéutica ("construcción de terapia génica") que se introduce en un paciente que lo necesita generalmente comprende ácidos nucleicos que tienen los siguientes elementos genéticos: (i) un "marco de lectura abierto (ORF)," es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que se desea que se expresa, y (ii) un "vector de terapia génica," que proporciona las secuencias genéticas necesarias para la expresión de un ORF introducido en él, la replicación del vector y/o recombinación con otros ácidos nucleicos. Un gen o proteína se dice que se "expresa" cuando se crean de forma activa moléculas de ARNm que tienen la secuencia de nucleótidos del ORF de un gen (transcripción); y, que usan estas moléculas de ARNm como patrones, produciendo proteínas que tienen secuencias de aminoácidos específicas (traducción). Se entiende en la técnica que la transcripción y traducción no necesita que se den simultáneamente. También se entiende en la técnica que una proteína es un tipo de producto génico, aunque otros productos génicos que pueden expresarse por construcciones de terapia génica pueden ser ácidos nucleicos, por ejemplo, transcritos antisentido, o moléculas de ARN estructural o enzimático.

La expresión de proteínas que influyen en la concentración y/o actividad de esfingolípidos por medio de la administración de construcciones de terapia génica que comprenden un ORF que codifica una proteína de interés es un tipo de terapia génica. Dichas proteínas pueden expresarse a un nivel que es aproximadamente igual al que se encuentra normalmente en individuos sanos, "sobre-expresarse" (es decir, expresarse a un nivel que es mayor que la cantidad que se encuentra normalmente en individuos sanos), o expresarse constitutivamente (es decir, expresarse a un nivel constante).

Otro tipo de terapia génica, en que una deficiencia genética (pérdida de función de una proteína debida a mutación) se compensa por medio de la expresión *in vivo* de una proteína natural de una construcción de terapia génica, se denomina generalmente "terapia de sustitución". Este tipo de terapia génica puede usarse para tratar pacientes que tienen deficiencias genéticas que reducen la cantidad, actividad o distribución en enzimas implicadas en el metabolismo de esfingolípidos, o en receptores de esfingolípidos.

En otro tipo de terapia génica, las proteínas que degradan esfingolípidos indeseables, o estimuladores de los mismos, se sobreexpresan para el tratamiento inmediato y/o a largo plazo de trastornos cardiacos. Para alcanzar la terapia génica de este tipo, las construcciones de terapia génica se diseñan, por medio de ejemplo no limitante, para codificar y sobreexpresar una enzima que degrada un esfingolípidos indeseable o metabolito del mismo. Dichas enzimas incluyen, por ejemplo, S-1-P liasa, esfingomielina sintasa, SM desacilasa, ceramida sintasa, glucosilceramida sintasa, ceramida quinasa y S-1-P fosfatasa. Una forma indirecta de realizar este tipo de terapia génica implica la administración de construcciones de terapia génica que codifican proteínas que son inhibidores o activadores de enzimas implicadas en el metabolismo de esfingolípidos o receptores de esfingolípidos (véase Ejemplos 7 a 10).

En otro tipo de terapia génica, las proteínas que se unen a esfingolípidos indeseables se sobreexpresan para el tratamiento inmediato y/o a largo plazo de trastornos cardiacos. Para alcanzar la terapia génica de este tipo, se diseñan construcciones de terapia génica que codifican, por medio de ejemplo no limitante, anticuerpos o derivados de anticuerpo dirigidos a un esfingolípidos indeseable (Ejemplo 6); proteínas que se dan de forma natural, tal como lisenina, que se unen a un esfingolípidos indeseable; o derivados polipeptídicos de receptores y enzimas que se unen a esfingolípidos indeseables (Ejemplo 15).

Otro tipo de terapia génica implica la administración de construcciones de terapia génica que expresan un ARN que tiene una secuencia de nucleótidos que es el antisentido (hibridante) de todo o una parte de un ARNm que codifica una enzima de esfingolípidos que produce, o un receptor que facilita la absorción celular de, un esfingolípidos indeseable. La unión del transcrito antisentido reduce o evita la expresión del ARNm que codifica la enzima o el receptor. Dichas enzimas incluyen aunque no están limitadas a SMasa, SPH quinasa, ceramidasa, cerebrosidasa, desaturasa, ceramida sintasa, ceramida-1-fosfatasa, serina palmitoil transferasa y reductasa dependiente de NADPH. Dichos receptores incluyen aunque no están limitados a miembros de la familia de EDG de receptores (Ejemplo 15).

Otro tipo de terapia génica implica el uso de construcciones de terapia génica que codifican y expresan mutantes negativos dominantes de enzimas de producción de esfingolípidos clave (por ejemplo, SPH quinasa, esfingomielinasa, etc.) o receptores de esfingolípidos (por ejemplo, la familia de EDG de receptores). Estas construcciones de expresión se reparten a tejidos cardiacos y otros para disminuir la producción de esfingolípidos y/o minimizar los efectos de esfingolípidos circulantes indeseables, tóxicos y/o cardiotoxicos.

## Vectores de terapia génica

Las construcciones de terapia génica para la producción *in vivo* de transcritos antisentido y mutantes negativos dominantes, y para terapia génica, pueden estar contenidos en cualquier vector de expresión adecuado conocido en la técnica, tal como un plásmido, cósmido o vector vírico. Los vectores víricos tales como vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores del virus del herpes simplex, virus vacuna y similares son particularmente útiles para la administración de estas construcciones de expresión. La elección del vector y la ruta de administración del vector dependerá, por ejemplo, de las células, tejidos y animal diana particulares (que incluyen un ser humano), que se enfocan como objetivo para el reparto de fármaco, y pueden determinarse por el experto en la técnica.

Ejemplos no limitantes de vectores para terapia génica incluyen, en general, aquellos que son no víricos (Li et al., *Gene Ther.* 7:31-34, 2000; episomales (Van Craenenbroeck et al., *Eur. J. Biochem.* 267:5665-6678, 2000); víricos (Walther et al., *Drugs* 60:249-271, 2000), que incluyen en particular, aquellos derivados de retrovirus (Kurian et al., *Mol. Pathol.* 53:173-176, 2000; Takeuchi et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 465:23-35, 2000) y otros virus de ARN (Hewson, *Mol. Med. Today* 6:28-35, 2000). Ejemplos no limitantes de vectores de terapia génica particulares incluyen los derivados de adenovirus (véase, Danthinne et al., *Gene Ther.* 7:1707-1704, 2000); AAV, virus adeno-asociados (Athanasopoulos et al., *Int. J. Mol. Med.* 6:363-375, 2000; Tal, *J. Biomed. Sci.* 7:279-291, 2000; Monahan et al., *Gene Ther.* 7:24-30, 2000); HSV-1, virus de herpes simplex (Sean-Esteves et al., *Mol. Ther.* 2:9-15, 2000; Latchman, *Mol. Med. Today* 6:28-35, 2000); y vectores lentivirales (Vigna et al., *J. Gene Med.* 2:308-316, 2000; Buchschacher et al., *Blood* 95:2499-2504, 2000; Trono, *Gene Ther.* 7:20-23, 2000).

Los vectores y construcciones de terapia génica pueden diseñarse para dirigirse a células o tejidos específicos (Hallenbeck et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 465:37-46, 2000). Los vectores de terapia génica diseñados para dirigirse a células y tejidos de miocardio, y estrategias para el uso de los mismos, se usan preferiblemente en ciertas modalidades de terapia génica. Véase Patente de EE.UU. 6.121.246; Allen, *Ann. Thorac. Surg.* 68:1924-1928, 1999; Ponder, *Trends Cardiovasc. Med.* 9:158-162, 1999; Yla-Herttuala et al., *Lancet* 355:213-222, 2000; Duckers et al., *Med. Clin. North Am.* 84:199-213, 2000; Sinnaeve et al., *Cardiovasc. Res.* 44:498-506, 1999; Hiltunen et al., *Vasc. Med.* 5:41-48, 2000; Hajjar et al., *Circ. Res.* 86:616-621, 2000; Stephan et al., *Ann. Endocrinol. (Paris)* 61:85-90, 2000; O'Brien et al., *Mayo Clin. Proc.* 75:831-834, 2000; Dedieu et al., *Curr. Cardiol. Rep.* 2:39-47, 2000.

## Ejemplo 19: Terapias de combinación

Las composiciones terapéuticas y métodos de la invención pueden usarse en combinación las unas con las otras y/o con otros agentes para terapia cardiovascular, es decir, agentes terapéuticos no basados en esfingolípidos. En dichos ejemplos, las composiciones farmacéuticas, dispositivos médicos, equipos de emergencia y similares contienen dos o más de los agentes terapéuticos de la invención; o al menos uno de los agentes terapéuticos de la invención y al menos un agente terapéutico no basado en esfingolípidos; o dos o más de los agentes terapéuticos de la invención y dos o más de otros agentes terapéuticos. Esto es, composiciones, dispositivos, métodos y similares que se usan en terapias de combinación pueden describirse como las que tienen o usan al menos un miembro de dos o más de a, b y c, en donde "a" es un primera agente terapéutico de la invención; "b" es un segundo (es decir, distinto de "a") agente terapéutico de la invención; y "c" es un agente terapéutico no basado en esfingolípido.

En general, cualquier agente terapéutico puede combinarse con los agentes terapéuticos de la invención mientras ningún agente tenga un impacto negativo en la actividad del otro agente. Los agentes terapéuticos que pueden combinarse con los agentes terapéuticos de la invención incluyen agentes conocidos actualmente para la terapia cardiovascular, además de agentes que se descubren o crean posteriormente a la presentación de la actual solicitud.

Agentes conocidos actualmente para la terapia cardiovascular incluyen aunque no están limitados a fármacos bloqueantes alfa y beta adrenérgicos; fármacos parasimpáticos; bloqueantes del canal de calcio; fármacos que afectan al sistema renina-angiotensina; terapia diurética; magnesio, potasio y calcio; digitalis y otros agentes inotrópicos; nitratos orgánicos y nitroprusiato; fármacos antiadrenérgicos con acción central; bloqueantes gangliónicos y agentes de disminución neuronal; vasodilatadores antihipertensores no específicos; fármacos antiarrítmicos; fármacos anti-plaquetas y antitrombóticos distintos; agentes trombolíticos; fármacos que disminuyen los lípidos; agonistas del receptor de dopamina selectivos; y prostaciclina. Véase *Cardiovascular Pharmacy Companion Handbook*, Wm. H. Frishman y Edmund. H Sonnenblick, McGraw Hill, NY, 1998.

Como se anota en los Ejemplos anteriores, ciertos agentes terapéuticos de la invención se usan preferiblemente en combinación con un segundo agente terapéutico diseñado para mejorar los potenciales efectos secundarios indeseados que pueden darse como resultado del tratamiento con el primer agente terapéutico.

Por medio de un ejemplo de referencia, la inhibición de SPH quinasa dará por resultado la producción disminuida del esfingolípido dañino S-1-P, aunque puede llevar a una acumulación de SPH, que es también un esfingolípido indeseable, no obstante generalmente menos dañino que S-1-P. Para evitar o mitigar que este efecto se dé, se administran agentes adicionales que disminuyen la concentración de SPH disponible. Dichos agentes incluyen aunque no están limitados a unos que (i) estimulan o son enzimas que tienen SPH como un sustrato, con la condición que dichas enzimas no sean unas que produzcan S-1-P; (ii) inhiben enzimas que tienen SPH como



5 producto; (iii) son derivados de receptor de SPH, o anticuerpos de SPH, que se unen a moléculas de SPH, secuestrándolas así de las posiciones en el cuerpo donde ejercen sus efectos tóxicos; (iii) inhiben la acción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias; (iv) son moléculas antisentido, o construcciones genéticas que expresan transcritos antisentido, que actúan para reducir la expresión de una proteína que aumenta las concentraciones de SPH, por ejemplo, una enzima que cataliza las reacciones que producen SPH; (v) un derivado negativo dominante de una proteína que aumenta las concentraciones de SPH, por ejemplo, una enzima que cataliza las reacciones que producen SPH; y (vi) una construcción de terapia génica que codifica y expresa una proteína que lleva a función y/o concentración disminuida de SPH, que incluye, por medio de ejemplo no limitante, una proteína que se caracteriza como que es del tipo que se abarca por las clases definidas anteriormente en (i), (ii), (iii) y/o (v).

10 Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionadas, además de las inherentes a ellas. Los métodos, procedimientos, tratamientos, dispositivos y composiciones descritas en esta memoria son actualmente representativas de realizaciones preferidas, son ejemplares y no se pretenden como limitaciones en el alcance de la invención. Al leer esta memoria, se les ocurrirán cambios en ella y otros usos a los expertos en la técnica, cada uno  
15 de los cuales está abarcado en el espíritu de la invención como se define por las reivindicaciones añadidas.

La invención descrita de forma ilustrativa en esta memoria de forma adecuada puede practicarse en ausencia de cualquier elemento o elementos, o limitación o limitaciones, que no se describan específicamente en esta memoria.

20 Así, por ejemplo, en cada ejemplo en esta memoria cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en", y "que consiste en" pueden sustituirse con cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, aunque se reconoce que varias modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención reivindicada. Así, debería entenderse que aunque la presente invención se ha descrito de forma específica para realizaciones preferidas y características opcionales, la modificación y variación de los conceptos descritos en  
25 esta memoria pueden recurrirse por los expertos en la técnica, y que dichas modificaciones y variaciones se considera que están dentro del alcance de esta invención como se define por las reivindicaciones añadidas. Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> SABBADINI, ROGER A.

5 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES Y TRASTORNOS CARDIOVASCULARES, Y PARA IDENTIFICAR AGENTES TERAPÉUTICOS DE LAS MISMAS

<130> 078853-0302

10 <140> documento 10/029.372  
<141> 21-12-2001

15 <150> documento 60/257.926  
<151> 22-12-2000

<160> 7

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador

<400> 1  
30 ccaggattca tcatatgta aaag 24

<210> 2  
<211> 21  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador

<400> 2  
atcagtggt gcatcagtag c 21

45 <210> 3  
<211> 333  
<212> ADN  
<213> Rattus sp.

50 <400> 3  
atgttaaaag tgagcagggt ctcaagtga ggtttaatat cactttctat cactgaggca 60  
cctgatctta agatcagga tcctaagata gagaaactct accttccagt tttttattta 120  
aatgcacaca tctacttaaa tgcactcagt actctcctga actctcattg tggcgagaac 180  
tgttttcatg gttatgaaca attacagaat gccacttttc cagtttggag aaatatattc 240  
atztatataa acagggtcag gaacaccaag aggcaaggag gagggggtgg tgtgagtggg 300  
aaaggtgaga tgaagcagtg cttcctctct taa 333

<210> 4  
55 <211> 333  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
60

```

atgttaaaag tgagcagggt ctcaagtgaa ggtttaatat cactttctat cactgaggca 60
cctgatctta agatcagga tcctaagata gagaaactct accttcagt tttttattta 120
aatgcacaca tctacttaaa tgcactcagt actctcctga actctcattg tggcgagaac 180
tgttttcatg gttatgaaca attacagaat gccacttttc cagtttggag aaatatattc 240
atztatataa acagggtcag gaacatcaag aggcaaggag gagggggtgg tgtgagtggg 300
aaaggtgaga tgaagcagtg cttcctctct taa 333

```

<210> 5

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador

10

<400> 5

ttatggcaac cagcaccg cagg 24

15 <210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador

<400> 6

25 agaccgtcac ttgcagagga c 21

<210> 7

<211> 1146

<212> ADN

30 <213> Rattus sp.

<400> 7

```

atggcaacca cgcacgcgca ggggcacccg ccagtcttgg ggaatgatac tctccgggaa 60
cattatgatt acgtggggaa gctggcaggc aggctgcggg atccccctga gggtagcacc 120
ctcatcacca ccatcctctt cttggtcacc tgtagcttca tcgtcttggg gaacctgatg 180
gttttgattg ccatctggaa aaacaataaa tttcataacc gcatgtactt tttcatcggc 240
aacttggctc tctgcgacct gctggccggc atagcctaca aggtcaacat tctgatgtcc 300
ggtaggaaga cgttcagcct gtctccaaca gtgtggttcc tcagggaggg cagtatgttc 360
gtagccctgg gcgcatccac atgcagctta ttggccattg ccattgagcg gcacctgacc 420
atgatcaaga tgaggccgta cgacgccaac aagaagcacc gcgtgttctt tctgattggg 480
atgtgctggc taattgcctt ctgctgggt gccctgccc tcttgggctg gaactgcctg 540
gagaactttc cggactgctc taccatcttg cccctctact ccaagaaata cattgccttt 600
ctcatcagca tcttcacagc cattctgggt accatcgtca tcttgtacgc gcgcatctac 660
ttcctgggtc agtccagcag ccgcaggggt gcccaaccaca actccgagag atccatggcc 720
cttctgcgga ccgtagtgat cgtgggtgagc gtgttcatcg cctgttggtc ccccctttc 780
atcctcttcc tcatcgatgt ggcctgcagg gcgaaggagt gctccatcct cttcaagagt 840
cagtggttca tcatgctggc tgcctcaac tcggccatga accctgtcat ctacacgctg 900
gccagcaaag agatgcggcg tgctttctc cggttggtgt gcggctgtct ggtcaagggc 960
aaggggacc aggcctccc gatgcagcct gctcttgacc cgagcagaag taaatcaagc 1020
tccagtaaca acagcagcag ccactctcca aaggtcaagg aagacctgcc ccatgtggct 1080
acctcttct gcgtcactga caaaacgagg tcgcttcaga atggggctct ctgcaagtga 1140
cggctc
1146

```

35

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de un anticuerpo que se une a esfingosina-1-fosfato (S-1-P) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular o cerebrovascular isquémica o hipóxica, cáncer, un trastorno angiogénico, un trastorno inflamatorio y un trastorno de fibrogénesis.
2. El uso según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo disminuye la concentración efectiva de esfingosina-1-fosfato (S-1-P) en un paciente al que se administra dicho medicamento.
3. El uso según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 4. El uso según la reivindicación 3, en donde dicho anticuerpo monoclonal es un fragmento de un anticuerpo monoclonal, en donde el fragmento de dicho anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a esfingosina-1-fosfato (S-1-P) y se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', unos fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fab biespecífico y un dominio de VH camélido.
5. El uso según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
6. El uso según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se ha humanizado.
- 15 7. El anticuerpo que se une a esfingosina-1-fosfato para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular o cerebrovascular isquémica o hipóxica, cáncer, un trastorno angiogénico, un trastorno inflamatorio y un trastorno de fibrogénesis.
8. El anticuerpo para usar según la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo disminuye la concentración efectiva de esfingosina-1-fosfato (S-1-P) en un paciente.
- 20 9. El anticuerpo para usar según la reivindicación 7 u 8, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
10. El anticuerpo para usar según la reivindicación 9, en donde dicho anticuerpo monoclonal es un fragmento de un anticuerpo monoclonal, en donde el fragmento de dicho anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a esfingosina-1-fosfato (S-1-P) y se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fab biespecífico y un dominio de VH camélido.
- 25 11. El anticuerpo para usar según la reivindicación 7 u 8, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
12. El anticuerpo para usar según la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo se ha humanizado.

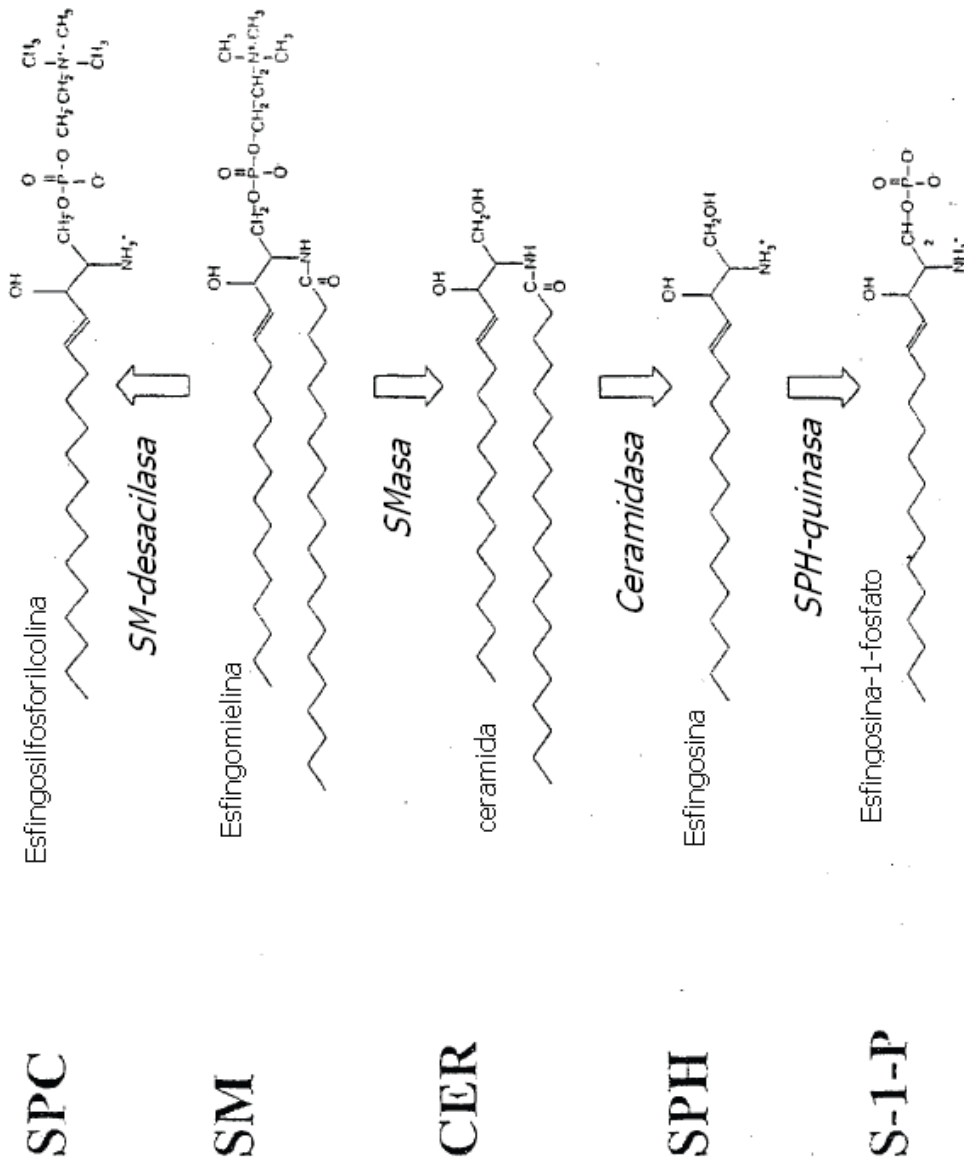
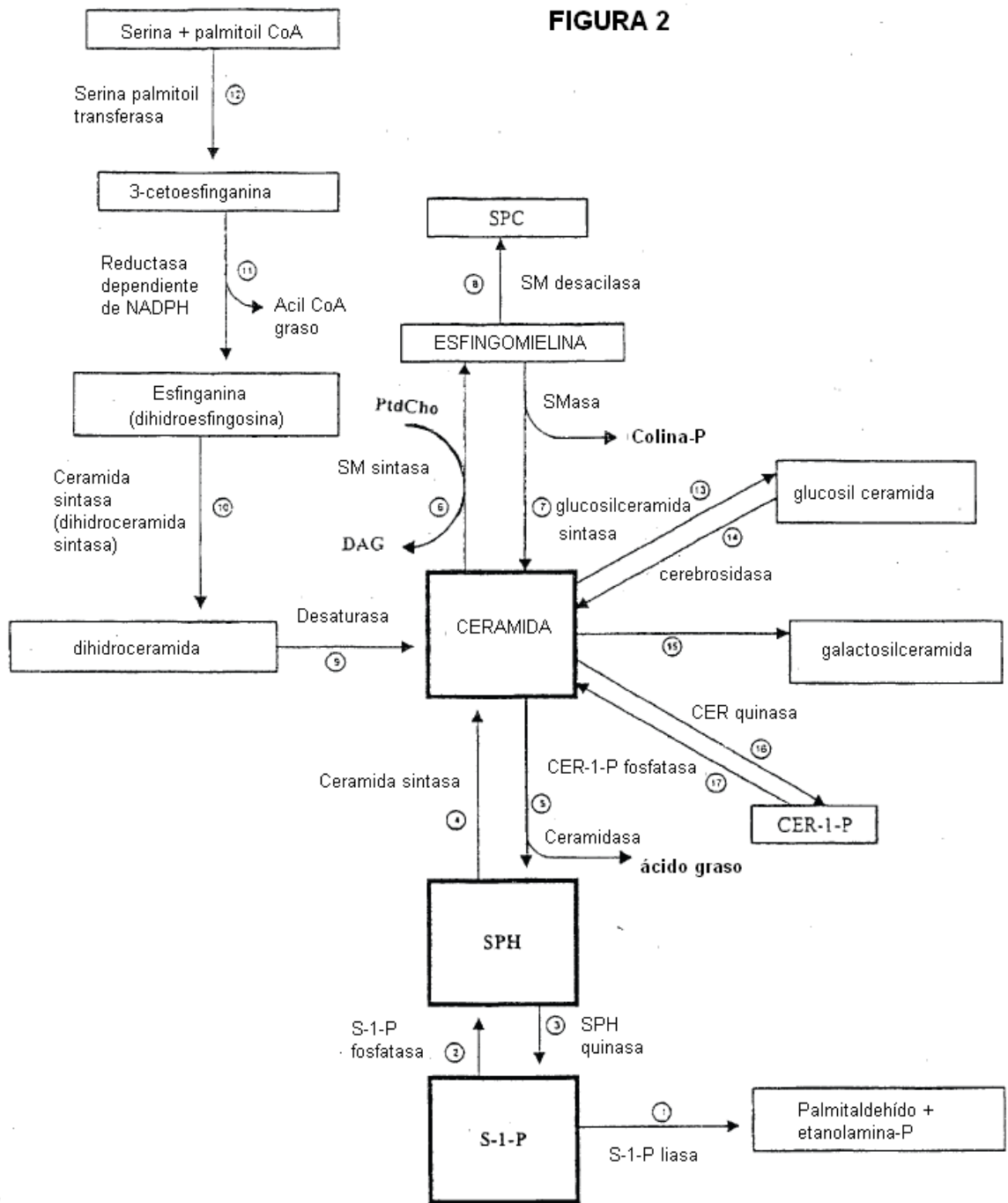


FIGURA 1

FIGURA 2



CONVERSIÓN DE SPH A S1P EN SANGRE HUMANA COMPLETA

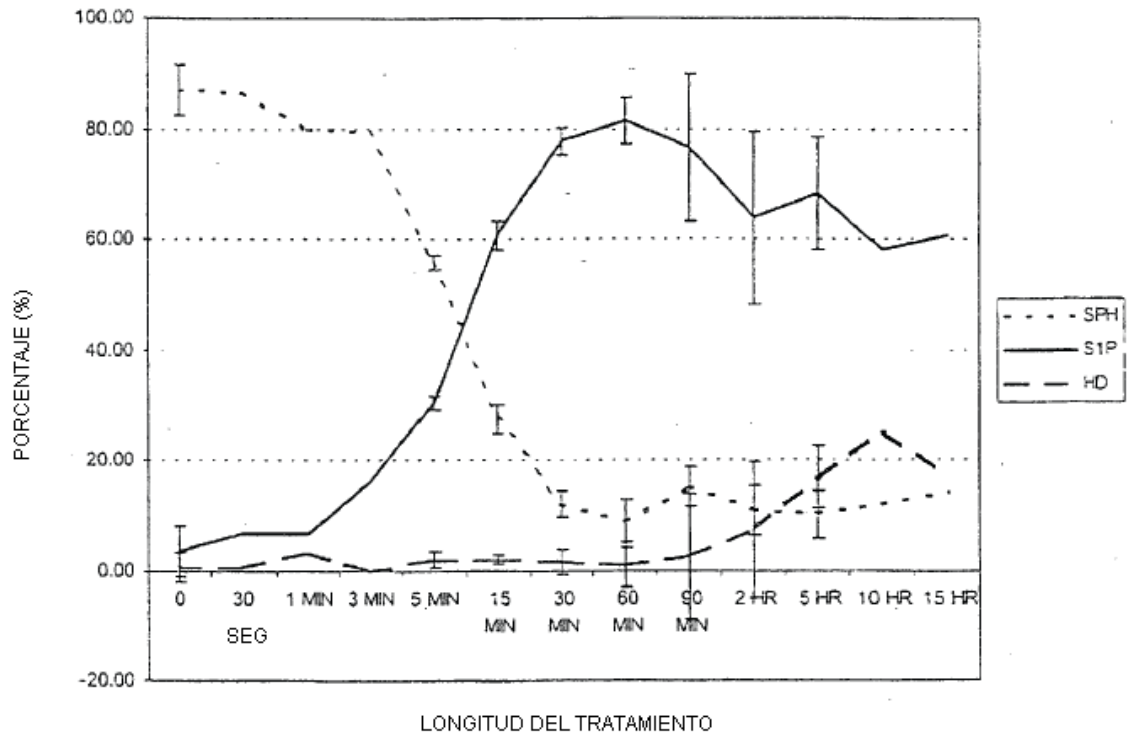
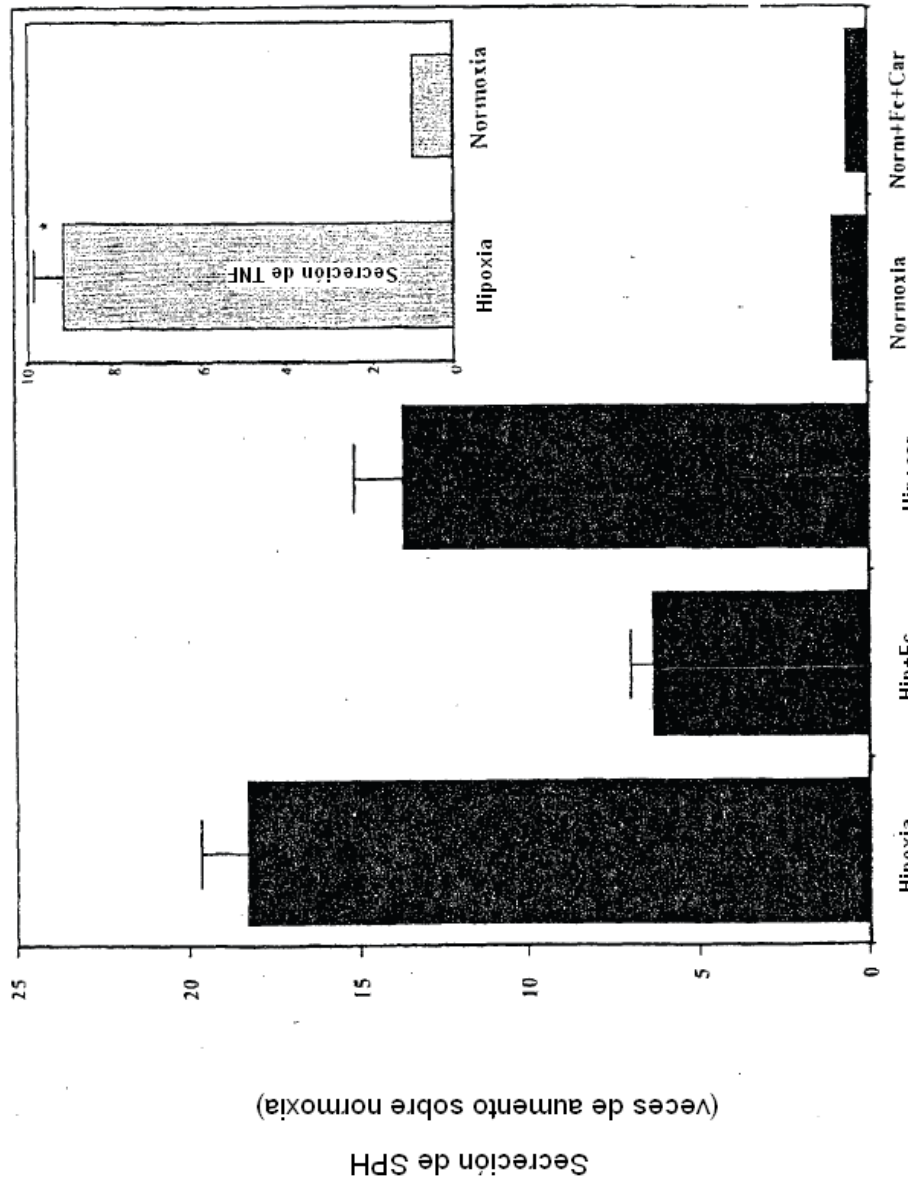
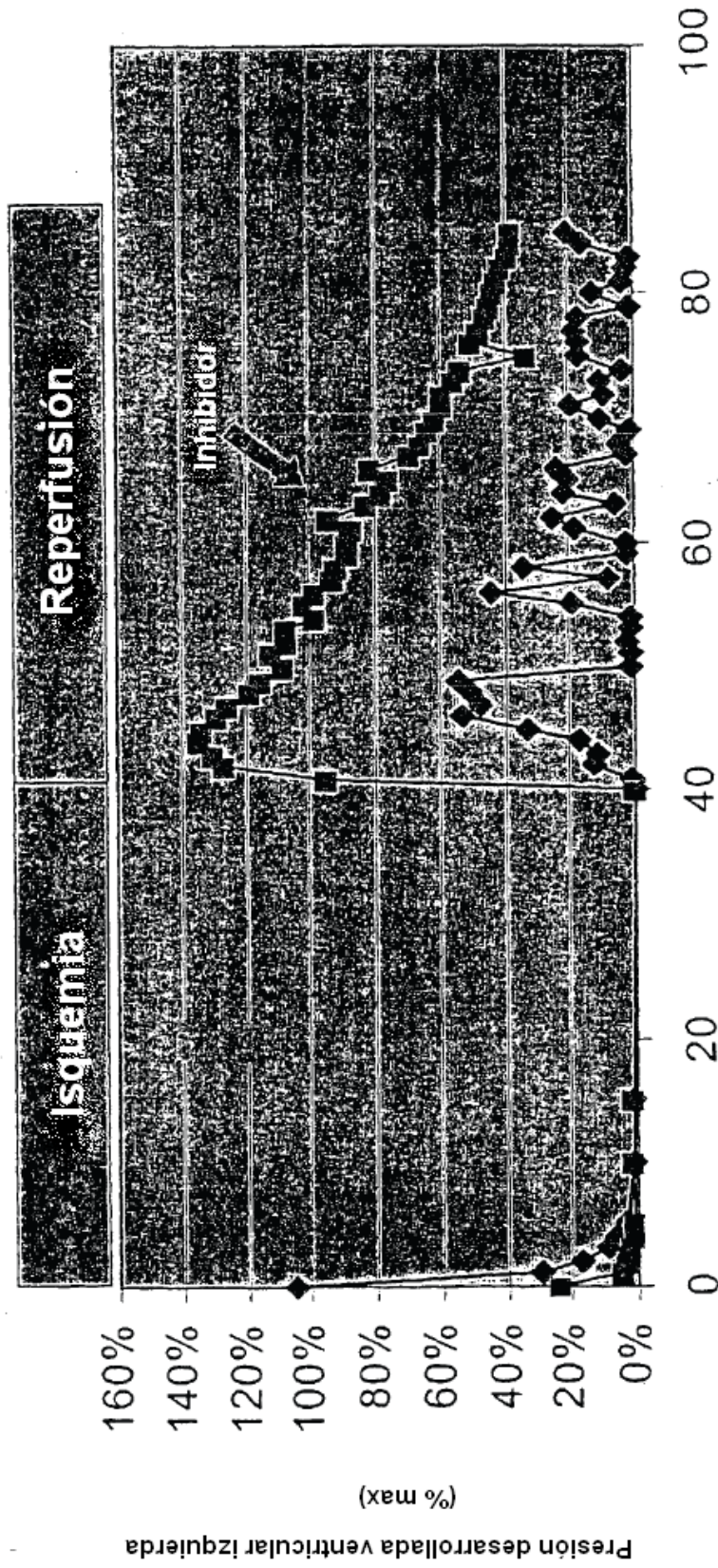


FIGURA 3



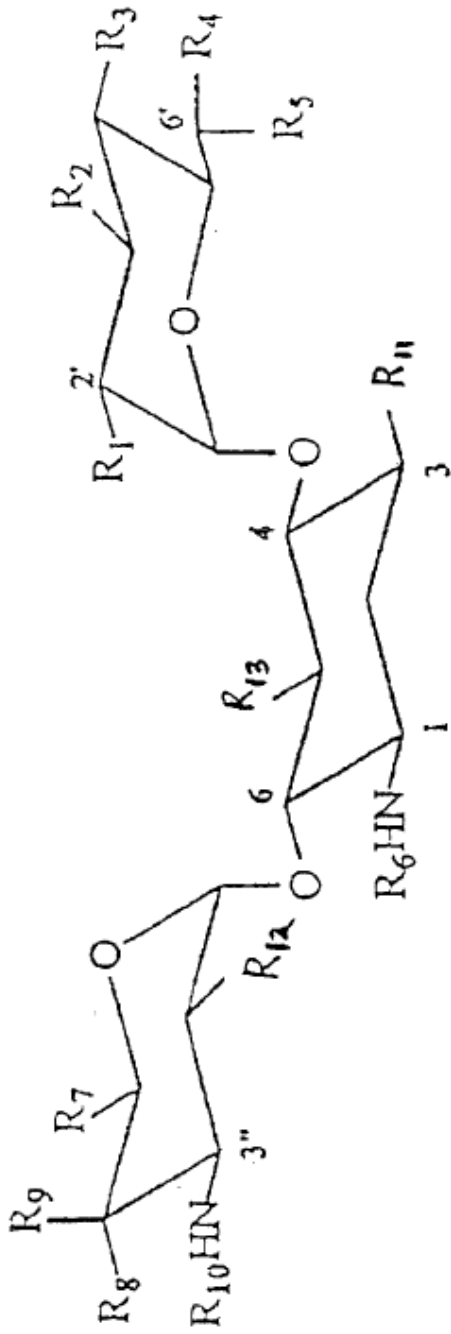
**FIGURA 4**





Tiempo desde el principio de la isquemia (minutos)

**FIGURA 5**



**FIGURA 6**