

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 280**

51 Int. Cl.:

A01K 67/00 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/4188 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2010 E 10742690 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2464218**

54 Título: **Tratamiento de metástasis cerebrales con inhibidores de los receptores de endotelina en combinación con un agente quimioterapéutico citotóxico**

30 Prioridad:

10.08.2009 US 232687 P

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

17.08.2015

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
201 West Seventh Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**FIDLER, ISAIAH J. y
KIM, SUN-JIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 543 280 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

Tratamiento de metástasis cerebrales con inhibidores de los receptores de endotelina en combinación con un agente quimioterapéutico citotóxico

Antecedentes

5 La metástasis cerebral es uno de los retos más difíciles a los que se enfrenta la oncología. Los tumores metastásicos son resistentes a la mayor parte de los agentes de quimioterapia. Los tratamientos de la metástasis cerebral son principalmente la radioterapia del cerebro completo y la radioterapia enfocada, con resección quirúrgica de los tumores en una minoría de casos. La mayor parte de los regímenes de quimioterapia implican 2-3 agentes
10 tales como cisplatino, ciclofosfamida, etopósido, tenipósido, mitomicina, irinotecán, vinorelbina, etopósido, ifosfamida, temozolomida y fluorouracilo (5-FU). Estos agentes se administran en combinación con radioterapia. El efecto de estas quimioterapias sobre la prolongación de la supervivencia generalmente es inferior a un año. Una quimioterapia bastante nueva para los tumores cerebrales es la temozolomida utilizada con irradiación del cerebro completo. Los resultados son preliminares pero parece que la temozolomida tiene algún efecto limitado sobre la
15 velocidad de respuesta comparada con la radiación sola y parece que tiene alguna actividad clínica en combinación con la radiación en ensayos de fase II.

A pesar de intensos esfuerzos, las opciones médicas limitadas disponibles para la metástasis cerebral siguen siendo escasas y muy a menudo más paliativas que terapéuticamente eficaces. Esta situación ha sido reconocida desde hace tiempo pero, hasta la fecha, no se han materializado avances significativos. En consecuencia, existe una gran
20 necesidad médica actual de nuevas estrategias terapéuticas y nuevos productos farmacéuticos eficaces para tratar la metástasis cerebral.

La divulgación que sigue expone los antagonistas de los receptores de endotelina en relación con la metástasis cerebral. La endotelina-1 (de aquí en adelante "ET-1"), un péptido vasoactivo, se produce principalmente en el músculo liso vascular endotelial, y en las células epiteliales. La ET-1 ejerce su efecto fisiológico a través de dos
25 receptores de alta afinidad acoplados a la proteína G, los receptores de endotelina A (de aquí en adelante "ET_A") y los de endotelina B (de aquí en adelante "ET_B"). Los antagonistas de los receptores de endotelina (los ERA) son una clase bien establecida de compuestos capaces de inhibir estos receptores de endotelina (de aquí en adelante "los ETR"). Dentro de esta clase hay subclases de antagonistas específicos para ET_A o ET_B y una subclase eficaz frente a ambos (especificidad dual). Un miembro de la subclase de especificidad dual, bosentán, está aprobado actualmente para uso en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar.

30 Ciertos ERAs han sido investigados para uso en el tratamiento del cáncer. [Nelson JB, *et al.*, Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*, 2008 Nov 1; 113(9): 2376-8; Chiappori AA, *et al.* Phase I/II study of atrasentan, an ET_A receptor antagonist, in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2008 Mar 1; 14(5): 1464-9]. Estos estudios han excluido en gran parte a los pacientes con metástasis cerebral activa. *Ibid.* Esta
35 exclusión se hace por la opinión general de que las metástasis cerebrales existentes no responderán al tratamiento y, por lo tanto, la morbilidad y los síntomas debidos a estas metástasis podrían enmascarar los efectos del tratamiento de prueba sobre el tumor primario. [Carden CP, *et al.*, Eligibility of patients with brain metastases for Phase I trials: time for a rethink? *The Lancet Oncology*, Vol 9, Issue 10, Pages 1012-1017, October 2008 doi:10.1016/S1470-2045(08)70257-2]. Esta estrategia de diseño de ensayo clínico estándar sirve para poner de
40 relieve la expectativa general de que terapias eficaces frente a tumores primarios e incluso frente a tumores sin metástasis cerebral no tendrán efecto sobre los tumores con metástasis cerebral.

El documento WO2004/035057 describe el uso de una combinación que comprende un antagonista de un receptor de endotelina y un inhibidor de la tirosina cinasa (TKI) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) para el tratamiento o profilaxis del cáncer.

45 [Phuphanich S. *et al.*, Phase I safety study of escalating doses of atrasentan in adults with recurrent malignant glioma. *Neuro-Oncology* Vol. 10. Issue 4, 617-623, (2008)]. Este estudio de dosis final evalúa la seguridad y la toxicidad de atrasentán en el tratamiento del glioma maligno.

[Kefford R. *et al.*, Phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Investigational New Drugs*. Vol. 25, 247-252 (2007)]. Este estudio se refiere a
50 bosentán y su potencial actividad antitumoral en el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico.

[Bagnato *et al.*, Phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma relates, *Can. Physiol. Pharmacol.*, Vol. 86, 473-484 (2008)]. Esta publicación se refiere al papel de eje de endotelina y a la relevancia terapéutica de los antagonistas del receptor de endotelina-1 en el tratamiento del cáncer.

55 [Akhavan *et al.*, Endothelin Receptor A Blockade Enhances Taxane Effects in Prostate Cancer, *Neoplasia*, Vol. 8, 725-732 (2006)]. Este estudio demuestra que el antagonista de la endotelina A atrasentán tiene efectos

antitumorales aditivos cuando se usa en combinación con los fármacos citotóxicos de taxano, paclitaxel y docetaxel tanto *in vitro* como *in vivo*.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1: Se evaluaron cultivos *in vitro* de células (T) de cáncer de mama MDA-MB-231 y astrocitos murinos (A) por microscopía electrónica de barrido. El contacto directo entre los astrocitos (extendiendo los pies (pods-feet)) y las células tumorales es evidente;
- Figura 2: Los co-cultivos de astrocitos-células de cáncer metastásico demostraron la transferencia de color entre las células co-cultivadas;
- 10 Figura 3: El cultivo de células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 o células de cáncer de pulmón humano PC14Br4 con astrocitos (pero no con fibroblastos 3T3) redujo el índice apoptótico relativo (aumento de resistencia) de las células tumorales incubadas durante 72 horas con paclitaxel (5 ng/ml) en 58,3 + 8,9 % (media ± S.D., P<0,01) y 61,8 ± 6,7 % (media ± S.D., P<0,05), respectivamente (el índice apoptótico se comparó mediante la prueba t de Student);
- 15 Figura 4: Se cultivaron células de cáncer de pulmón humano PC14Br4 solas o con astrocitos (contacto directo célula a célula) en un medio que contenía adriamicina asociada a glucoproteína P (200 ng/ml), paclitaxel (5 ng/ml), vinblastina (3 ng/ml), vincristina (8 ng/ml), y 5-FU disociado de glucoproteína P (500 ng/ml) o cisplatino (2,4 µg/ml);
- Figura 5: La protección, mediada por astrocitos, de las células de metástasis cerebral frente a la muerte celular inducida por quimioterapia no dura más de 72 horas una vez que se ha perdido el contacto directo de las células de metástasis cerebral con los astrocitos;
- 20 Figura 6: Condiciones que caracterizan la transcripción génica diferenciadas entre el mRNA murino y humano;
- Figura 7: En las células MDA-MB-231, se expresaron diferencialmente 1069 genes, y en las células PC14Br4, 594 genes. Una comparación de una lista de dos genes reveló un aumento de la expresión de varios genes bien conocidos como asociados con la anti-apoptosis y la supervivencia: glutatión S transferasa 5 (GSTA5), BCL2L1, TWIST;
- 25 Figura 8: Se confirmó la expresión de varios genes anti-apoptosis y de supervivencia a nivel de proteínas mediante el análisis de transferencia Western;
- Figura 9: Se recogieron datos de transcripción génica de dos ciclos de experimentos de co-cultivo;
- Figura 10: Aumento de la expresión de ET_A-R en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 co-cultivadas con astrocitos pero no con fibroblastos (3T3);
- 30 Figura 11: Expresión de pAKT por células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 co-cultivadas con astrocitos/taxol;
- Figura 12: ACT-064992 añadido solo a células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 o con astrocitos o con fibroblastos 3T3 no produjo ningún efecto citotóxico medible;
- 35 Figura 13: ACT-064992 añadido solo a células de cáncer de pulmón PC14 o con astrocitos o con fibroblastos 3T3 no produjo ningún efecto citotóxico medible;
- Figura 14A-D: La inmunotinción de ET_AR y ET_BR en varios modelos experimentales *in vivo* de cáncer metastásico de cerebro demuestra una expresión relativamente alta asociada específicamente con los tumores y no con los tejidos del cerebro normal;
- 40 Figura 15: Terapia de combinación de paclitaxel y ACT-064992 en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 co-cultivadas con astrocitos o con fibroblastos 3T3;
- Figura 16: Terapia de combinación de paclitaxel y ACT-064992 en células de cáncer de pulmón humano PC14Br4 co-cultivadas con astrocitos o con fibroblastos 3T3;
- Figura 17: La adición de ACT-064992 a co-cultivos de astrocitos y células tumorales inhibió la expresión de los factores de supervivencia pAKT y pMAPK;
- 45 Figura 18: Se fijaron y se tiñeron secciones del cerebro para visualización de la metástasis cerebral. Control (vehículo) (Figura 18A); temozolomida ("TMZ") 10 mg/kg p.o., al día (Figura 18B); ACT-064992 50 mg/kg, p.o. al día (Figura 18C); o combinación TMZ + ACT-064992 (Figura 18D); combinación TMZ + ACT-064992 con más aumento (Figura 18E);

Figura 19: Se fijaron y se tiñeron secciones del cerebro para visualización de la metástasis cerebral. A. Control (inyectado con solución vehículo); B. Paclitaxel (8 mg/kg administrados intraperitonealmente una vez a la semana); C. ACT-064992 (50 mg/kg administrados oralmente una vez al día); y D. Combinación de ACT-064992 y paclitaxel;

5 Figura 20: Cortes representativos de cerebro procedentes de los cuatro grupos de tratamiento se tiñeron para detectar CD31 (marcador de células endoteliales) y Ki67 (marcador de proliferación celular): A. ratones control; B. ratones tratados sólo con paclitaxel; C. ACT-064992; D. paclitaxel y ACT-064992;

Figura 21: Se analizaron *in situ* cortes de cerebro de ratones procedentes de diferentes grupos de tratamiento mediante la técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase dUTP nick end labeling): A. control; B. tratado con paclitaxel; C. tratado con ACT-064992-; D. combinación de ACT-064992 más paclitaxel;

10 Figura 22: Cortes de cerebro de ratones procedentes de los cuatro grupos de tratamiento se sometieron a inmunotinción para ET_A (rojo) y fosfoserina (verde) la colocalización produjo un color amarillo anaranjado. A. cerebro control; B. cerebro de ratones tratados con paclitaxel; C. cerebro de ratones tratados con ACT-064992 solo; D. cerebro de ratones tratados con ACT-064992 + paclitaxel.

Descripción detallada

15 Definiciones

Como se usa en la presente memoria, el uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa conjuntamente con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno," pero también coincide con el significado de "uno o más," "al menos uno," y "uno o más de uno". Aún más, los términos "que tiene", "que contiene", "que incluye" y "que comprende" son intercambiables y los expertos en la técnica saben que estos términos son términos sin límites definidos.

20 El término "tratar" y "tratamiento" como se usa en la presente memoria se refiere a administrar a un sujeto una intervención médica terapéuticamente eficaz, tal como quimioterapia, de manera que el sujeto tenga una mejora de los parámetros relacionados con un cáncer. La mejora es cualquier mejora observable o medible incluyendo cambios en el tamaño de un tumor canceroso, reducción en la velocidad de crecimiento de un tumor canceroso, o medidas subjetivas u objetivas del dolor asociado con un tumor canceroso. Por lo tanto, los expertos en la técnica tienen en cuenta que un tratamiento puede mejorar la condición de un paciente pero puede que no sea una cura completa de la enfermedad.

El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente memoria se refiere a una cantidad que produce una mejora o remedio de los síntomas de la enfermedad o condición.

30 El término "tumor con metástasis cerebral" como se usa en la presente memoria se refiere a un tumor cerebral multicelular y una metástasis cerebral rodeada e infiltrada con astrocitos GFAP-positivos. Los tumores con metástasis cerebral existente son de dos tipos clínicamente distintos, micrometástasis, que son demasiado pequeñas para ser visualizadas por medios radiológicos, y metástasis visibles, que son aquellos tumores suficientemente grandes para ser apreciables por medios clínicos radiológicos, tales como imagen por resonancia magnética, tomografía computarizada, o tomografía por emisión de positrones. Estas lesiones metastásicas son distintas de las células cancerosas metastásicas de la circulación sistémica y de las células cancerosas individuales que se trasvasan al tejido cerebral o que permanecen allí en reposo. [Véase en general Johanna A. Joyce & Jeffrey W. Pollard, Microenvironmental regulation of metastasis, Nat Rev Cancer 9, 239-252 (April 2009) | doi:10.1038/nrc2618].

35 "Micrometástasis" como se usa en la presente memoria se define preferiblemente como un grupo de células cancerosas confluentes que miden más de 0,2 mm y/o que tienen más de 200 células mayores de 2 mm de anchura máxima. Más preferiblemente "micrometástasis" se define como un grupo de células cancerosas confluentes de 0,2 mm a 2 mm de anchura máxima. Véase The AJCC Cancer Staging Manual and Handbook, 7th ed. (2010), Edge, S.B.; Byrd, D.R.; Compton, CC; Fritz, A.G.; Greene, F.L.; Trotti, A. (Eds.), ISBN: 978-0-387-88440-0. Una definición alternativa preferida de "micrometástasis" es un grupo confluyente de al menos 1000 células cancerosas y al menos

40 0,1 mm en la dimensión más ancha hasta 1 mm en la dimensión más ancha. Las micrometástasis generalmente no son visibles por imagen de contraste de MRI estándar u otras técnicas clínicas de imagen. Sin embargo, en ciertos cánceres, anticuerpos radioactivos dirigidos a antígenos tumorales selectivos (p. ej. Her2 para la metástasis de cáncer de mama) permitirán la visualización de la micrometástasis. Otros métodos indirectos de detección incluyen la fuga de los medios de contraste a los sitios de micrometástasis cerebral debido a la fuga vascular inducida por VEGF. Yano S; *et al.* (2000), Expression of vascular endothelial growth factor is necessary but not sufficient for production and growth of brain metastasis. Cancer research 2000; 60(17): 4959-67. Se pueden aplicar también técnicas de imagen más sensibles para detectar las micrometástasis. Por ejemplo, se puede ver el volumen de sangre por MRI utilizando el agente alternativo de contraste USPIO (Molday Iron, Biopal, Worcester, MA, vendido como ION™ de Molday) para detectar la micrometástasis. Juan Yin J, *et al.* Noninvasive imaging of the functional effects of anti-VEGF therapy on tumor cell extravasation and regional blood volume in an experimental brain metastasis model. Clin Exp Metastasis. 2009; 26(5): 403-14. Epub 2009 Mar 11.

El término "protección mediada por astrocitos" como se usa en la presente memoria se refiere a la capacidad de un astrocito para reducir la citotoxicidad de un producto químico para otro tipo de células en contacto físico directo con

el astrocito. Este contacto físico incluye los astrocitos conectados a células cancerosas, en particular mediante comunicación por conexión comunicante (GJC).

5 El término "muerte celular inducida por quimioterapia citotóxica" como se usa en la presente memoria se refiere a la inducción de apoptosis o muerte celular necrótica por un producto químico citotóxico. La mayor parte de los agentes de quimioterapia utilizados médicamente funcionan para matar de este modo las células tumorales que se dividen rápidamente.

10 El término "antagonista del receptor de endotelina" como se usa en la presente memoria se refiere a la clase de compuestos reconocidos en la técnica como tales, y en particular a un compuesto que, cuando se somete al "Ensayo para la determinación de la IC_{50} de ET_A o de ET_B " descrito en la presente solicitud de patente, tiene una IC_{50} igual o inferior a $1 \mu M$ frente a ET_A , frente a ET_B o frente a ambas ET_A y ET_B . Un ERA es un fármaco que bloquea a los receptores de endotelina de la interacción con ET-1 o evita que un ETR responda a la ET-1 unida. Existen dos clases principales de ERAs: ERAs selectivos, tales como sitaxentán, ambrisentán y atrasentán, que afectan a los receptores de ET_A , y ERAs duales, tales como bosentán, que afectan tanto a los receptores de ET_A como a los receptores de ET_B . Miembros a modo de ejemplos de la clase ERA de compuestos se pueden encontrar en las publicaciones de patentes citadas en [HAM Mucke "Small-molecule endothelin receptor antagonists: A review of patenting activity across therapeutic areas" IDrugs 2009 12: 366-375]. ERAs representativos que ya han sido investigados en ensayos clínicos humanos o aprobados para uso médico incluyen sitaxentán, tezosentán, clazosentán, ambrisentán, bosentán, macitentán (conocido también como ACT-064992) y/o atrasentán.

20 El término "antagonista de ET_A " como se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto que, cuando se somete al "Ensayo para la determinación de la IC_{50} de ET_A o de ET_B " descrito en la presente solicitud de patente, tiene una IC_{50} igual o inferior a $1 \mu M$ frente a ET_A .

El término "antagonista de ET_B " como se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto que, cuando se somete al "Ensayo para la determinación de la IC_{50} de ET_A o de ET_B " descrito en la presente solicitud de patente, tiene una IC_{50} igual o inferior a $1 \mu M$ frente a ET_B .

25 El término "antagonista dual de receptores de endotelina" o "ERAs duales" como se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto que, cuando se somete al "Ensayo para la determinación de la IC_{50} de ET_A o de ET_B " descrito en la presente solicitud de patente, tiene una IC_{50} igual o inferior a $1 \mu M$ frente a ET_A , y una IC_{50} igual o inferior a $1 \mu M$ frente a ET_B . Los ERA duales incluyen bosentán y macitentán.

30 El término "agente de quimioterapia citotóxico" como se usa en la presente memoria se refiere a una sustancia que induce la apoptosis o muerte celular necrótica. Los ejemplos de agentes de quimioterapia citotóxicos que se pueden usar en combinación con los ERA de acuerdo con la presente invención incluyen:

- agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, estreptozocina, carmustina, lomustina, melfalán, busulfán, dacarbazina, temozolomida, tiotepa o altretamina);
- fármacos de platino (por ejemplo cisplatino, carboplatino u oxaliplatino);
- 35 ▪ fármacos antimetabolitos (por ejemplo 5-fluorouracilo, capecitabina, 6-mercaptopurina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, fludarabina o pemetrexed);
- antibióticos anti-tumorales (por ejemplo daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, actinomicina-D, bleomicina, mitomicina-C o mitoxantrona); y
- 40 ▪ inhibidores mitóticos (por ejemplo paclitaxel, docetaxel, ixabepilona, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina o estramustina); y
- inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo etopósido, tenipósido, topotecán, irinotecán, diflomotecán o elomotecán).

45 "Super-sensibilización" o "Super-sensibilizar" se define como un aumento relativo de la muerte celular causada por un agente o agentes de quimioterapia citotóxicos en contacto físico con los astrocitos por encima de la que se ve en las células en ausencia de astrocitos o sin ningún contacto directo con astrocitos.

"Simultáneamente" o "simultáneo", cuando se refiere a un uso terapéutico, significa en la presente solicitud que el uso terapéutico referido consiste en la administración de dos o más ingredientes activos por la misma vía y al mismo tiempo.

50 "Separadamente" o "por separado", cuando se refiere a un uso terapéutico, significa en la presente solicitud que el uso terapéutico referido consiste en la administración de dos o más ingredientes activos a aproximadamente el mismo tiempo por al menos dos vías diferentes.

Por administración terapéutica "durante un período de tiempo" se quiere decir en la presente solicitud la administración de dos o más ingredientes a diferentes tiempos, y en particular un método de administración según el

cual la administración total de uno de los ingredientes activos se completa antes de que empiece la administración del otro u otros ingredientes. De este modo es posible administrar uno de los ingredientes activos durante varios días, semanas o meses antes de administrar el otro ingrediente o ingredientes activos. En este caso, no hay administración simultánea.

5 Divulgación

En el parénquima cerebral, el papel de los astrocitos en el mantenimiento de la homeostasis es ampliamente reconocido. Los astrocitos envuelven cada vaso sanguíneo con pies especializados y se comunican con otras células cerebrales, tales como las neuronas. Esta estructura única permite que los astrocitos transporten nutrientes esenciales, tales como glucosa y aminoácidos, de la circulación a neuronas dependientes, y se ha demostrado recientemente que la glucólisis en los astrocitos regula la actividad neuronal, el llamado "acoplamiento metabólico neurona-astrocito". En condiciones patológicas, tales como hipoxia, isquemia, y condiciones degenerativas, los astrocitos se activarán y expresarán una proteína denominada GFAP (proteína gliofibrilar ácida). Se ha demostrado que los astrocitos reactivos con GFAP protegen las neuronas de diferentes desafíos y salvan a las neuronas de la excitotoxicidad producida por acumulación de glutamato. Los astrocitos activados pueden proteger también a las neuronas de la apoptosis producida por etanol, peróxido de hidrógeno, y citotoxicidad de la cisteína catalizada por cobre.

Las metástasis cerebrales clínicas comúnmente están rodeadas e infiltradas por astrocitos activados (GFAP-positivos). [Yoshimine T, *et al.* (1985) Immunohistochemical study of metastatic brain tumors with astroprotein (GFAP), a glia-specific protein. Tissue architecture and the origin of blood vessels. J Neurosurg 62: 414-418]. Los inventores han confirmado este fenómeno que se reproduce en un modelo de xenotrasplante a continuación.

La presente invención se refiere al asunto de la reivindicación 1. Sin embargo, para su comprensión, se presentan varias realizaciones a continuación:

- 1) Un antagonista de los receptores de endotelina para uso en la prevención o tratamiento de metástasis cerebrales en combinación con un agente de quimioterapia citotóxica, con radioterapia o con ambos.
- 25 2) Según una principal variante de la realización 1), el antagonista de los receptores de endotelina será para uso en combinación con un agente de quimioterapia citotóxica.
- 3) Según una sub-realización de la realización 2), el agente de quimioterapia citotóxica comprenderá (y en particular será) un agente alquilante.
- 4) En particular, el agente alquilante de la realización 3) se seleccionará del grupo que consiste en mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, estreptozocina, carmustina, lomustina, melfalán, busulfán, dacarbazina, temozolomida, tiotepa y altretamina.
- 30 5) Según otra sub-realización de la realización 2), el agente de quimioterapia citotóxica comprenderá (y en particular será) un inhibidor mitótico.
- 6) En particular, el inhibidor mitótico de la realización 5) se seleccionará del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, ixabepilona, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina y estramustina.
- 7) En una sub-realización preferida de la realización 2), el agente de quimioterapia citotóxica se seleccionará del grupo que consiste en paclitaxel, doxorubicina, vinblastina, vincristina, 5-fluorouracilo, cisplatino, ciclofosfamida, etopósido, tenipósido, mitomicina-C, irinotecán, vinorelbina, ifosfamida y temozolomida (y en particular de paclitaxel y temozolomida).
- 40 8) En particular, el agente de quimioterapia citotóxica de la realización 7) se seleccionará de paclitaxel, temozolomida y una mezcla de paclitaxel y temozolomida.
- 9) Según una variante preferida de la realización 8), el antagonista de los receptores de endotelina de la realización 8) se seleccionará del grupo que consiste en bosentán, macitentán y una mezcla de macitentán y bosentán (y será especialmente macitentán).
- 45 10) Un antagonista de los receptores de endotelina para uso en combinación con al menos uno de los agentes quimioterapéuticos citotóxicos mencionados en una de las realizaciones 2) a 9) y con radioterapia.
- 11) Según una realización preferida, el antagonista de los receptores de endotelina usado en las realizaciones 1) a 10) comprenderá (y en particular será) un antagonista de receptores de endotelina dual.
- 12) En particular, el antagonista de receptores de endotelina dual de la realización 11) se seleccionará del grupo que consiste en bosentán, macitentán y una mezcla de bosentán y macitentán.
- 50 13) En una realización particularmente preferida, el antagonista de receptores de endotelina dual de la realización 12) será macitentán.

- 14) Según una variante de las realizaciones 1) a 13), el antagonista de los receptores de endotelina y el agente quimioterapéutico citotóxico serán administrados por separado.
- 15) Según otra variante de las realizaciones 1) a 13), el antagonista de los receptores de endotelina y el agente quimioterapéutico citotóxico serán administrados simultáneamente.
- 5 16) Según otra variante más de las realizaciones 1) a 13), el antagonista de los receptores de endotelina y el agente quimioterapéutico citotóxico serán administrados durante un período de tiempo.
- 17) Según otra variante principal más de la realización 1), el antagonista de los receptores de endotelina será para uso en combinación con radioterapia (donde esta radioterapia es preferiblemente radioterapia del cerebro completo o radiocirugía estereotáctica).
- 10 18) Según una realización preferida, el antagonista de los receptores de endotelina usado en la realización 17) comprenderá (y en particular será) un antagonista de receptores de endotelina dual.
- 19) En particular, el antagonista de receptores de endotelina dual de la realización 18) se seleccionará del grupo que consiste en bosentán, macitentán y una mezcla de bosentán y macitentán.
- 15 20) En una realización particularmente preferida, el antagonista de receptores de endotelina dual de la realización 19) será macitentán.
- 21) En otra variante, el antagonista de los receptores de endotelina para uso con un agente de quimioterapia citotóxico según una de las realizaciones 2) a 15) será para uso junto con radioterapia (donde esta radioterapia es preferiblemente radioterapia del cerebro completo o radiocirugía estereotáctica).
- 20 22) Otra variante, combinable con una cualquiera o más de las mencionadas realizaciones 1) a 21), es un antagonista de los receptores de endotelina para uso en el tratamiento de un tumor con metástasis cerebral en un sujeto en donde el tumor con metástasis cerebral es un tumor con micrometástasis tal como un tumor con micrometástasis seleccionado del grupo que consiste en un cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma o carcinoma renal, tumor con micrometástasis cerebral.

Sección experimental

- 25 Experimento 1 - Análisis inmunofluorescente de la metástasis cerebral.

Materiales y métodos

- Se produjeron metástasis cerebrales experimentales por la inyección de células de adenocarcinoma de pulmón humano PC14Br4 en la arteria carótida interna de ratones lampiños (S1). Se sacrificaron los ratones 5 semanas más tarde y se procesaron las muestras de tejido en compuesto OCT para preparar la sección congelada como se ha descrito previamente (S2). Se seccionaron los tejidos (8-10 μ m), se montaron sobre portaobjetos cargados positivamente, y se secaron al aire durante 30 minutos. Se realizó la fijación del tejido utilizando un protocolo que consiste en tres inmersiones secuenciales en soluciones enfriadas en hielo de acetona, acetona:cloroformo 50:50 (v/v), y acetona (5 minutos cada una). Se lavaron entonces las muestras tres veces con PBS, se incubaron con solución de bloqueo de la proteína que contenía 5 % de suero normal de caballo y 1 % de suero normal de cabra en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, y después se incubaron con una dilución 1:400 de anticuerpo policlonal anti-GFAP de conejo (Biocare Medical, Concord, CA) durante 18 horas a 4 °C. Se enjuagaron las muestras cuatro veces con PBS durante 3 minutos cada una y después se incubaron durante 1 hora con una dilución 1:1500 de anticuerpo Cy5 anti-conejo de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Se marcaron las muestras control con una concentración idéntica de anticuerpo isotipo control y anticuerpo Cy5 anti-conejo de cabra.
- 30 Se enjuagaron todas las muestras y después se incubaron brevemente con el colorante de ácido nucleico verde sytox (Eugene, OR). Se montaron las extensiones con una solución de glicerol/PBS que contenía 0,1 mol/L de galato de propilo (Sigma) para minimizar la decoloración fluorescente. Se tomaron imágenes confocales en un sistema de microscopio de barrido con láser Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) equipado con un microscopio motorizado Axioplan, láser argón, láser HeNe, control por LSM 510 y software de adquisición de imagen, y filtros apropiados (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT).
- 40
- 45

Se construyeron 18 imágenes compuestas con software Photoshop (Adobe Systems, Inc., Mountain View, CA).

Resultados

- Se determinaron los resultados a partir de imágenes en color (no se muestran) de muestras que han reaccionado inmunohistoquímicamente. Las células tumorales estaban rodeadas e infiltradas con astrocitos GFAP-positivos (rojo). Este experimento confirmó las observaciones anteriores de infiltración por astrocitos de muestras clínicas de metástasis cerebral. La misma infiltración por astrocitos GFAP-positivos se vio con un modelo murino singénico de ratón. Análisis inmunohistoquímico de carcinoma de pulmón de Lewis de ratón (3LL) en el cerebro de un ratón C57. Las células 3LL que se dividen (PCNA-positivas, azul) se infiltraron y se rodearon por astrocitos activados (GFAP-positivos, marrón). Juntos, estos experimentos validaron el modelo de xenoinjerto murino-humano que reprodujo el
- 50

fenómeno visto en las muestras clínicas humanas y en el modelo singénico de ratón. Un aspecto de la presente invención es por lo tanto un modelo de células de metástasis de cerebro ratón-humano *in vivo* que es útil, por ejemplo, para estudiar el fenómeno del cáncer de cerebro metastásico humano.

Experimento 2 – Estudios de microscopía electrónica de barrido

- 5 Habiendo establecido que los astrocitos murinos interactúan *in vivo* con las células tumorales humanas en la formación de metástasis cerebral del mismo modo que se ve en especímenes clínicos humanos primarios, los inventores examinaron las interacciones de estos dos tipos de células *in vitro* en un sistema simplificado de co-cultivo. No estaba claro si dicho sistema podría producir alguna interacción célula a célula, mucho menos que tuviera relevancia fisiológica directa para la situación *in vivo* descrita antes. Fue por lo tanto un descubrimiento sorprendente que se alcanzaran *in vitro* las interacciones intercelulares entre las líneas celulares de cáncer metastásico humano y los astrocitos murinos.

Materiales y métodos

- 15 Líneas celulares y condiciones de cultivo. Se mantuvieron la línea de células de cáncer de mama humano, MDA-231 (S3), una variante metastásica cerebral de la línea de células de adenocarcinoma de pulmón humano PC14Br4 (Si) y los fibroblastos murinos NIH 3T3 como cultivos monocapa en medio esencial mínimo de Eagle (CMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS; HyClone, Logan, UT), piruvato de L-glutamina, aminoácidos no esenciales, solución doble de vitamina, y penicilina estreptomocina (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA). Todos los reactivos usados para el cultivo de tejidos estaban exentos de endotoxinas determinadas por la prueba del lisado de amebocitos de limulus (Associate of Cape Cod, Woodshole, MA), y las líneas celulares estaban exentas de los siguientes patógenos murinos: Mycoplasma spp, virus Hantan, virus de la hepatitis, virus minuto, adenovirus (MAD1, MAD2), citomegalovirus, virus ectromelia, virus que aumenta la lactato deshidrogenasa, polioma virus, y Sendai virus (analizados por el Research Animal Diagnostic Laboratory, University of Missouri, Columbia, MO). Las células usadas en este estudio procedían de una reserva congelada y todos los experimentos se realizaron en 10 pases *in vitro* después de descongelar.

- 25 Aislamiento y mantenimiento de los astrocitos murinos. Se sacrificaron ratones homocigóticos neonatos para un antígeno T grande SV40 sensible a la temperatura- (ratones H-2Kb-tsA58; híbridos CBA/ca x C57BL/10; Charles River Laboratories, Wilmington, MA) en una cámara de dióxido de carbono, y se preparó la piel para cirugía de una manera estándar (S4). Se utilizaron micro fórceps estériles (Roboz Surgical Instrument Co., Gaithersburg, MD) para separar la piel del cráneo, y se utilizaron microtijeras para crear una incisión circular posterior desde la abertura de la oreja izquierda hasta la abertura de la oreja derecha. Se hizo otra incisión a lo largo de la línea media del cerebro, y se dividió el cráneo para permitir el acceso a la cavidad craneana. Se cortaron los nervios ópticos y se separó el cerebro con fórceps romo y se puso en 100 mm de solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo (PBS). Se disecaron los neocórtices completos, y se separaron el hipocampo y las estructuras internas para dejar solamente las capas corticales. Se separaron las meninges, y las capas corticales se cortaron en trozos con un escalpelo y se digirieron durante 30 minutos a 37 °C en medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 0,1 % de colagenasa (150 U/ml; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) y 40 pg/ml de desoxirribonucleasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se trituró entonces el tejido cortical en DMEM que contenía 10 % de FBS y se filtró a través de una malla estéril de 50 pm. La suspensión unicelular resultante se extendió en frascos de cultivo de tejido de 75 cm² que habían sido recubiertos previamente con 5 µg/ml de laminina de ratón (Sigma). Se dejó que crecieran las células durante 7 días en DMEM que contenía 10 % de FBS y suplementos (véase anteriormente) en una atmósfera de dióxido de carbono al 8 % (para alcanzar un tampón apropiado de pH a 33 °C). En este momento, las células astrogiales formaron una monocapa confluyente con las neuronas, oligodendrocitos, y fibroblastos creciendo encima. Se separaron estas células contaminantes mediante agitación rotatoria de los frascos durante la noche a 250 revoluciones por minuto en una sala templada. Los cultivos resultantes estaban compuestos de más del 95 % de astrocitos determinados por inmunorreactividad con anticuerpos dirigidos frente a GFAP. Se expandieron estos cultivos, se repitió el procedimiento, y se determinó que el porcentaje de astrocitos en estos cultivos excedía del 99 %.

- Imagen por microscopio electrónico de barrido de células tumorales y astrocitos cultivados. Se extendieron en placas células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y astrocitos murinos en DMEM que contenía 5 % de FBS sobre cubreobjetos de vidrio esterilizados, en placas de 24 pocillos a una densidad de $2,4 \times 10^4$ células. Después de 48 horas, se separaron los cubreobjetos y se fijaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución que contenía 3 % de glutaraldehído/2 % de para-formaldehído/7,5 % de sacarosa en tampón de cacodilato 0,1 M (pH 7,3). Se lavaron entonces las muestras con tampón de cacodilato 0,1 M y después se fijaron durante 1 hora con tetróxido de osmio al 1 % tamponado con cacodilato que contenía 7,5 % de sacarosa. Se lavaron las muestras con tampón de cacodilato 0,1 M seguido por agua destilada y se trataron secuencialmente durante 30 minutos en la oscuridad con ácido tánico acuoso al 1 % filtrado por Millipore, se lavaron en agua destilada y acetato de uranilo acuoso al 1 % filtrado por Millipore durante 1 hora en la oscuridad. Se lavaron las muestras meticulosamente con agua destilada, se deshidrataron a través de una serie ascendente de etanoles, y después se transfirieron durante 5 minutos cada una a una serie ordenada de concentraciones crecientes de hexametildisilazano y se dejaron secar al aire durante la noche. Se montaron las muestras sobre pequeñas piezas de carbono de doble espesor (Ted Pella, Inc., Redding, CA) que habían sido previamente montadas sobre soportes de espécimen de aluminio (Electron

Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA). Se recubrieron entonces las muestras a vacío utilizando un evaporador Balzer MED 010 (Technotrade International, Manchester, NH) con aleación de platino para un espesor de 25 nm y después se recubrieron inmediatamente con carbono ligero a vacío. Se transfirieron las muestras a un desecador para examen en fecha posterior. Se examinaron las muestras utilizando un microscopio electrónico de barrido JSM-5910 (JEOL, Inc., Peabody, MA) a un voltaje de aceleración de 5 kV.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 1. Se evaluó por microscopía electrónica de barrido el cultivo *in vitro* de células (T) de cáncer de mama MDA-MB-231 y astrocitos murinos (A). Es evidente el contacto directo entre los astrocitos (que extienden los pies) y las células tumorales. Un único astrocito puede tener contacto con múltiples células tumorales. Parece que se forman completamente conexiones comunicantes de la clase vista entre los astrocitos y las neuronas del sistema nervioso central. Similares resultados se ven con las líneas celulares de melanoma, cáncer de mama y cáncer de pulmón (no se muestran).

Experimento 3 – Ensayos de conexiones comunicantes

Para validar adicionalmente la naturaleza funcional de las conexiones comunicantes mostradas en la Figura 1, los inventores realizaron experimentos de transferencia de color para determinar si las estructuras tipo conexión comunicante vistas en el Experimento 2 eran funcionales.

Materiales y métodos

Comunicación por conexiones comunicantes. Se analizó la comunicación por conexiones comunicantes entre las células tumorales receptoras (MDA-MB-231) y las células donantes (astrocitos, células 3T3, MDA-MB-231) por citometría de flujo midiendo la transferencia de color. En resumen, las células receptoras (300.000 células/pocillo) se extendieron en una placa de 6-pocillos y se cultivaron toda la noche. En ese momento, las células donantes se marcaron durante 45 minutos con 1 µg/ml de verde calceína-AM (Molecular Probes) seguido por un extenso lavado. Las células donantes (60.000 células/pocillo) se co-cultivaron durante 5 horas con células receptoras ya sea directamente o en una cámara de migración *transwell* (Transwell-Boyden Chamber, tamaño de poro 0,4 µm; Costar, Corning, NY). Se recogieron las células, se lavaron, se fijaron en etanol, y se analizaron por citometría de flujo. La formación de conexiones comunicantes se calculó como el tanto por ciento de picos de FITC desplazados (S9- S11).

Resultados

Como se muestra en la Figura 2, los co-cultivos de células de cáncer metastásico y astrocitos demostraron la transferencia de color entre las células co-cultivadas. El sistema de co-cultivo de los inventores produce de este modo conexiones comunicantes activas que se forman entre los astrocitos murinos y las líneas celulares de cáncer metastásico humano. Los experimentos de control en *transwell* demuestran que esto es una interacción genuina célula-célula. Un segundo aspecto de la presente invención es por lo tanto un sistema de co-cultivo de células metastásicas humanas y astrocitos de ratón *in vitro* que es útil, por ejemplo, para estudiar el fenómeno de la interacción del cáncer cerebral metastásico humano con los astrocitos en un ámbito manipulable *ex vivo*.

Experimento 4 – Ensayos de quimioprotección

El modelado de la quimiorresistencia de la metástasis cerebral es y será un uso principal para los dos sistemas mencionados el sistema de modelo *in vivo* y el sistema de co-cultivo celular *in vitro*. Puesto que el sistema de co-cultivo basado en células es más fácil para la manipulación experimental, se evaluó además para determinar si la quimiorresistencia de las metástasis cerebrales vistas *in vivo* se repetía por el sistema de cultivo basado en células.

Materiales y métodos

Ensayo de quimioprotección con el co-cultivo *in vitro*. Los astrocitos y los fibroblastos NIH 3T3 se transfectaron con genes GFP como se ha descrito previamente (S5, S6). Se recogieron las células tumorales dianas, los astrocitos, o los fibroblastos 3T3 a partir de un cultivo con una confluencia del 60-70 % mediante una breve exposición (2 minutos) a tripsina al 0,25 % en una solución de EDTA al 0,1 %/PBS. Se separaron las células sacudiendo fuertemente los frascos de cultivo y se resuspendieron en CMEM. Los astrocitos murinos, los fibroblastos 3T3, y las células tumorales se pusieron en placas solas o como co-cultivo en una relación de células tumorales/astrocitos/células 3T3 de 1:2 sobre cada uno de los pocillos de 35 mm de diámetro de la placa multipocillos de cultivo de tejidos de 6 pocillos, estéril. Se dejó que se adhirieran las células durante la noche en un incubador humidificado a 37 °C en una atmósfera de dióxido de carbono al 6,4 % más aire. Se lavaron entonces los cultivos y se incubaron con CMEM fresco (control negativo) o con medio que contenía diferentes concentraciones de TAXOL® (Paclitaxel; NDC 0015-3476-30, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ) y otros fármacos quimioterapéuticos (véase más adelante). Después de 72 horas se clasificaron los astrocitos marcados con GFP o las células NIH 3T3 y se determinó la fracción apoptótica de las células tumorales mediante tinción con yoduro de propidio y análisis FACS (véase más adelante). Para determinar si el contacto directo entre las células tumorales y los astrocitos (o los fibroblastos que sirven de control) era un prerrequisito para producir la inducción de resistencia a la quimioterapia, se realizó el ensayo de co-cultivo utilizando una cámara Transwell-Boyden, esto es, extendiendo en placas las células

tumorales en la cámara y los ImmortoAstrocitos (o fibroblastos) en el pocillo. Después de 72 horas de incubación, se determinó el índice apoptótico relativo de las células tumorales como se describe a continuación.

- En el segundo conjunto de estudios *in vitro*, se ha determinado si la inducción, mediada por astrocitos, de la resistencia de las células tumorales a los fármacos quimioterapéuticos es transitoria o permanente. Las células PC14Br4 de cáncer de pulmón humano se co-cultivaron con astrocitos o con fibroblastos 3T3 en medio solo o en medio que contenía 5 ng/ml de paclitaxel. Después de 72 horas, los astrocitos o las células 3T3 se separaron de las células tumorales por FACS, y se determinó el índice apoptótico relativo de las células tumorales en pocillos múltiples por tinción con yoduro de propidio como se describe a continuación. De los pocillos paralelos, se recogieron las células tumorales supervivientes y se volvieron a poner en placas sobre diferentes monocapas de astrocitos o células 3T3. Estos co-cultivos eran de células tumorales co-cultivadas en primer lugar con astrocitos y después con astrocitos o con células 3T3, o de células tumorales cultivadas en primer lugar con células 3T3 y después con células 3T3 o con astrocitos. La segunda ronda de co-cultivos recibió entonces un medio que contenía 5 ng/ml de paclitaxel. Después de 72 horas, se determinó el índice apoptótico relativo de las células tumorales mediante tinción con yoduro de propidio y análisis FACS.
- Preparación para tinción con yoduro de propidio y análisis FACS. Se recogió de cada placa el medio sobrenadante que contenía células flotantes y se pasó a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml. Se recogieron las células unidas exponiendo brevemente las células a tripsina al 0,25 % en una solución que contenía EDTA al 0,1 %/PBS. Se reunieron las células con el correspondiente medio sobrenadante. Se sedimentaron las muestras por centrifugación a 100 g durante 5 minutos. Se resuspendieron los sedimentos en 10 ml de HBSS y se sedimentaron adicionalmente a 100 g durante 5 minutos. Se resuspendieron las muestras mediante vórtex y se fijaron las células en 1 ml de paraformaldehído al 1 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron entonces las muestras a tubos de microcentrifuga de polipropileno y las células fijadas se lavaron en 1 ml de PBS y después se sedimentaron a 10.000 g durante 1 minuto. Se resuspendieron los sedimentos mediante vórtex y se fijaron las células durante la noche en 1 ml de etanol a -20 °C. Las células se agitaron seguidamente con vórtex y se sedimentaron por medio de una microcentrifuga a 10.000 g durante 1 minuto. Se sometieron entonces las muestras a vórtex y los sedimentos se resuspendieron y se tiñeron en 300 de yoduro de propidio (50 µg/ml; Cat. P4864, Sigma) que contenía RNAsa (15 µg/ml; Cat. A7973, Promega, Madison, WI) durante 20-30 minutos a 37 °C. Finalmente se transfirieron las muestras a tubos de cultivo de plástico de 5 ml para análisis FACS utilizando un Coulter EPICS Cytometer (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA). Se determinó el índice apoptótico relativo comparando el índice apoptótico de células tumorales/índice apoptótico de células tumorales e ImmortoAstrocitos o células tumorales y fibroblastos NIH 3T3 x 100 (%) (S7).

Resultados

- El cultivo de células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano o células PC14Br4 de cáncer de pulmón humano con astrocitos (pero no con fibroblastos 3T3) redujo el índice apoptótico relativo (esto es, aumentó la quimiorresistencia) de las células tumorales incubadas durante 72 horas con paclitaxel (5 ng/ml) en un 58,3 + 8,9 % (media ± S.D., P<0,01) y un 61,8 ± 6,7 % (media ± S.D., P<0,05), respectivamente (el índice apoptótico se comparó mediante la prueba t de Student) (Figura 3). Esta reducción era dependiente del contacto directo entre las células tumorales y los astrocitos. Los inventores basan esta conclusión en los datos que muestran que cuando las células tumorales y los astrocitos se separaron por una membrana semi-permeable (cámara de Transwell-Boyden, membrana con tamaño de poro 0,4 µm; Costar, Corning, NY), no se observó el efecto quimio protector de los astrocitos. El co-cultivo de células tumorales con fibroblastos 3T3 no protegió a las células tumorales de la quimioterapia (Figura 3). El co-cultivo de células tumorales humanas con un control alternativo que utiliza fibroblastos aislados de ratón H-2kb-tsA58 tampoco protegió a las células tumorales de los agentes quimioterapéuticos (no se muestran datos). Se vieron resultados análogos utilizando ensayos MTT estándar para determinar el grado de citotoxicidad (no se muestran datos). [Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (July, 1991) "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture." Cancer Communications 3 (7): 207-212].

- Estos datos validan el sistema de co-cultivo basado en células descrito en la presente memoria ya que reproduce el fenómeno de quimiorresistencia de la metástasis cerebral. La capacidad inesperada del sistema de co-cultivo para reproducir la quimiorresistencia hace que este sea adecuado para estudiar el mecanismo de quimiorresistencia y las potenciales intervenciones terapéuticas para eliminar la quimiorresistencia en la metástasis cerebral existente *in vivo*.

- Para ampliar estos experimentos iniciales, los inventores han ensayado varios agentes de quimioterapia adicionales, representativos de las principales clases de fármacos en uso a fecha de hoy. Se cultivaron células PC14Br4 de cáncer de pulmón humano solas o con astrocitos (contacto directo célula a célula) en un medio que contenía adriamicina asociada a glucoproteína P (200 ng/ml), paclitaxel (5 ng/ml), vinblastina (3 ng/ml), vincristina (8 ng/ml), y 5-FU disociado de glucoproteína P (500 ng/ml) o cisplatino (2,4 µg/ml). El co-cultivo con astrocitos indujo una protección significativa (P<0,01) frente a todos los fármacos (Figura 4). Este hallazgo inesperado valida adicionalmente el sistema de co-cultivo basado en células. El sistema de cultivo celular demuestra la robustez de la quimiorresistencia inducida por los astrocitos de una manera que es directamente comparable a la quimiorresistencia de la metástasis cerebral observada *in vivo* en el ámbito clínico. Un tercer aspecto de la presente

invención es por lo tanto un ensayo de quimiorresistencia basada en células *in vitro* que es útil, por ejemplo, en el estudio del fenómeno de la protección, mediada por los astrocitos, de las células de la metástasis cerebral frente a la muerte celular inducida por la quimioterapia citotóxica. En realizaciones particulares el ensayo de quimiorresistencia basado en células *in vitro* se puede utilizar para cribar uno o más candidatos de agentes de quimioterapia para evaluar el grado de protección mediada por astrocitos frente a los efectos citotóxicos de los agentes de quimioterapia.

Los experimentos adicionales resumidos en la Figura 5 demuestran que la protección, mediada por los astrocitos, de las células de la metástasis cerebral frente a la muerte celular inducida por la quimioterapia citotóxica no dura más de 72 horas una vez que se ha perdido el contacto directo astrocito-célula de metástasis cerebral. Además, las células que han perdido el efecto protector ofrecido por el anterior contacto de los astrocitos se pueden volver a proteger por un segundo co-cultivo con astrocitos para recuperar la protección mediada por astrocitos frente a los efectos citotóxicos de los agentes de quimioterapia. Esto refleja las observaciones clínicas de tumores primarios e incluso otras metástasis no cerebrales que son quimiosensibles mientras que sus metástasis cerebrales derivadas son quimiorresistentes.

Experimento 5 - Mecanismo de quimiorresistencia mediada por astrocitos

Los inventores aplicaron el ensayo anterior de quimiorresistencia basado en células para investigar los mecanismos potenciales subyacentes al fenómeno. Se utilizaron el perfil de expresión génica más la confirmación por transferencia Western de la producción de proteína para investigar la protección, mediada por astrocitos, de las células de la metástasis cerebral frente a la muerte celular inducida por la quimioterapia citotóxica.

Materiales y métodos

Perfiles de expresión génica mediante análisis de micromatrices de RNA. En el primer conjunto de experimentos, se incubaron células MDA-MB-231 o PC14Br4 solas, con astrocitos murinos, o con fibroblastos NIH 3T3 en una placa de 6 pocillos con un diámetro de 35 mm (Cat. 353046, BD Falcon TM, San Jose, CA). Para establecer el contacto célula a célula, la relación de células tumorales a astrocitos murinos o células NIH 3T3 fue 1:2. Después de 72 horas, los astrocitos murinos marcados con GFP o los fibroblastos se separaron por FACS, y las células tumorales se procesaron por análisis de micromatrices. En el segundo conjunto de experimentos, se determinó si la expresión de genes asociados con la resistencia de las células tumorales a los fármacos quimioterapéuticos era dependiente de un contacto continuo con los astrocitos. Se co-cultivaron las células MDA-231 o PC14Br4 con astrocitos murinos o células NIH 3T3 durante 72 horas. Se separaron los astrocitos murinos o las células NIH 3T3, y las células tumorales fueron procesadas para determinar los perfiles de expresión génica por análisis de micromatrices o se pusieron en placas para una segunda ronda de co-cultivo con astrocitos murinos o con fibroblastos. De este modo, las células tumorales cultivadas en primer lugar con astrocitos murinos, se co-cultivaron de nuevo con astrocitos murinos o con fibroblastos y, a la inversa, las células tumorales cultivadas inicialmente con fibroblastos se co-cultivaron de nuevo con fibroblastos o con astrocitos. Después de una incubación de 72 horas, se separaron los astrocitos murinos o los fibroblastos y se procesaron las células tumorales para análisis de micromatrices.

Análisis de micromatrices (microarrays). Se usaron los RNA totales (500 ng) para marcado e hibridación según los protocolos del fabricante (Illumina, Inc., San Diego, CA). En resumen, se generó cDNA a partir de RNA total utilizando el kit IlluminaR Total Prep RNA Amplification Kit (Applied Biosystem, Austin, TX). A continuación, se realizó la transcripción *in vitro* para incorporar nucleótidos marcados con biotina al cRNA durante 4 horas a 37 °C. Un total de 1500 ng de cRNA marcado con biotina se hibridaron con beadchips de expresión 6-v2 humanos SentrixR de Illumina a 58 °C durante la noche (16 horas) según las instrucciones del fabricante. El cRNA biotinilado hibridado se detectó con 1 µg/ml de cianina 3-estreptavidina (GE Healthcare, Piscataway, NJ), y se hizo un barrido de las BeadChips con el lector Illumina BeadArray Reader (Illumina, Inc.). Los resultados de los datos de las micromatrices se extrajeron con Bead Studio 3.7 (Illumina, Inc), sin ninguna normalización ni sustracción del ruido de fondo. Se normalizaron los datos de expresión génica utilizando el método de normalización por cuantiles del paquete LIMMA en R (www.r-project.org) (S12). El nivel de expresión de cada gen se transformó en un log2 antes de posterior análisis. Para seleccionar genes que se expresan diferencialmente en dos grupos de tejidos, se utilizó una clase de dispositivo de comparación de BRB Array Tools (v 3.6; Biometrics Research Branch, National Cancer Institute, Bethesda, MD) como un método para pruebas t de dos muestras con la estimación de FDR.

Análisis de transferencia Western. Se utilizó la transferencia Western para confirmar los resultados de las micromatrices. En resumen, se prepararon lisados de células completas de células tumorales clasificadas por FACS utilizando 1 ml de tampón de lisis (Tris 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM, SDS al 0,1 %, desoxicolato al 1 %, NP40 al 1 %, NaCl 0,14 M, 1 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de aprotinina, y 1 µg/ml de pepstatina) que contenía una mezcla de inhibidor de la proteasa (Roche, Indianapolis, IN). Se separaron las muestras que contenían cantidades iguales de proteína (30 fag) por electroforesis sobre geles con Nu-PAGE a 4-12 % (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear con TTBS (TBS + Tween 20 al 0,1 %) que contenía 5 % de leche desnatada, se incubaron las membranas a 4 °C durante la noche con anticuerpo monoclonal de ratón frente a BCL2 (1:1000, BD PharMingen, San Diego, CA), anticuerpo monoclonal de conejo frente a BCL2L1 (1:1000, Cell Signaling, Beverly, MA), anticuerpo monoclonal de conejo frente a TWIST (1:1000, Cell Signaling), anticuerpo monoclonal de ratón frente a glutatión S-transferasa (1:1000, BD PharMingen), y anticuerpo monoclonal de ratón frente a I3-actina

(Sigma). Las manchas se expusieron entonces a anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (1:3000) y se visualizaron por el sistema mejorado de quimioluminiscencia de Amersham (Piscataway, NJ). Se confirmó igual carga de proteína arrancando las manchas y volviéndolas a probar con un anticuerpo anti-13-actina.

5 Análisis estadístico. Para el análisis estadístico de los perfiles de expresión génica, el nivel de expresión de cada gen se transformó en un log2 antes del posterior análisis. El dispositivo de comparación de clase de BRB Array Tools (v3.6; Biometrics Research Branch, National Cancer Institute, Baltimore, MD) para una prueba t de dos muestras con la estimación de FDR fue el método utilizado para determinar la significancia estadística de los genes expresados diferencialmente entre células tumorales co-cultivadas con diferentes células hospedantes. Los genes para el diagrama de Venn se seleccionaron por una prueba univariada (prueba t de dos muestras) con prueba de permutación multivariada (10.000 permutaciones aleatorias). Se aplicó un valor p de corte de menos de 0,001 para retenir los genes cuya expresión es significativamente diferente entre dos grupos de tejidos examinados.

Resultados

15 Los inventores identificaron genes de células tumorales cuya expresión se ve comúnmente alterada después del co-cultivo con astrocitos aplicando pruebas t de dos muestras ($P < 0,001$). Utilizando este procedimiento, los inventores identificaron en las células MDA-MB-231, 1069 genes, y en las células PC14Br4, 594 genes que estaban expresados diferencialmente (Figura 7). Una comparación de la lista de dos genes reveló el aumento de la expresión de varios genes bien conocidos que están asociados con la anti-apoptosis y la supervivencia: glutatión S transferasa 5 (GSTA5), BCL2L1, TWIST (Figura 7). La expresión de estos genes se confirmó al nivel de proteínas mediante el análisis de transferencia Western (Figura 8). Los inventores determinaron entonces si el patrón de expresión génica alterado en las células tumorales co-cultivadas con astrocitos (pero no con fibroblastos) era permanente o transitorio. Los inventores co-cultivaron células tumorales durante un ciclo con astrocitos o fibroblastos, y después recogieron las células tumorales y las pusieron en placas en una segunda ronda con astrocitos o fibroblastos. Cuando se recogieron los datos de la expresión génica de los dos ciclos de experimentos de co-cultivo, la influencia del segundo co-cultivo era dominante en los patrones de expresión génica de las células cancerosas. A pesar de la primera condición de co-cultivo, las células cancerosas co-cultivadas con astrocitos en el segundo ciclo presentaron una señal distintiva de expresión génica que fue detectada en el primer ciclo de los experimentos de cultivo (alta expresión de GSTA5, BCL2L1, y TWIST), mientras que las células cancerosas co-cultivadas con astrocitos en la primera ronda perdieron las señales específicas de expresión génica cuando fueron co-cultivadas con fibroblastos en la segunda ronda (Figura 9). Este resultado es paralelo a los resultados del ensayo de quimioprotección *in vitro* resumido en la Figura 5 y prueba que el patrón de expresión génica en las células tumorales depende del contacto constante con los astrocitos. Las células tumorales co-cultivadas en la segunda ronda con astrocitos también expresaron un alto nivel de genes TCF4, CD24, CARD14, y EFNB2 (no se muestran datos). Los estudios clínicos han demostrado que la expresión de estos genes en células tumorales está correlacionada con un mal pronóstico. Un cuarto aspecto de la presente invención es por lo tanto un ensayo de quimiorresistencia basado en células *in vitro* que tiene un componente de diagnóstico molecular que es útil, por ejemplo, para estudiar el fenómeno de la protección, mediada por los astrocitos, de las células de la metástasis cerebral frente a la muerte celular inducida por la quimioterapia citotóxica en un ámbito *ex vivo*. En ciertas realizaciones, el componente de diagnóstico molecular es uno o más de una etapa de caracterización de la expresión génica y un análisis de concentraciones de proteína celular. En realizaciones específicas, se usa una señal predeterminada de expresión génica para evaluar los efectos de intervenciones experimentales para eliminar, p. ej., la protección mediada por los astrocitos. Un quinto aspecto de la invención es una señal de expresión génica o una combinación de los perfiles de nivel de proteína indicativos de la protección, mediada por los astrocitos, de las células de la metástasis cerebral frente a la muerte celular inducida por la quimioterapia citotóxica. Un sexto aspecto es el proceso de producir dicha señal génica o perfiles del nivel de proteína como se ha descrito y ejemplificado antes.

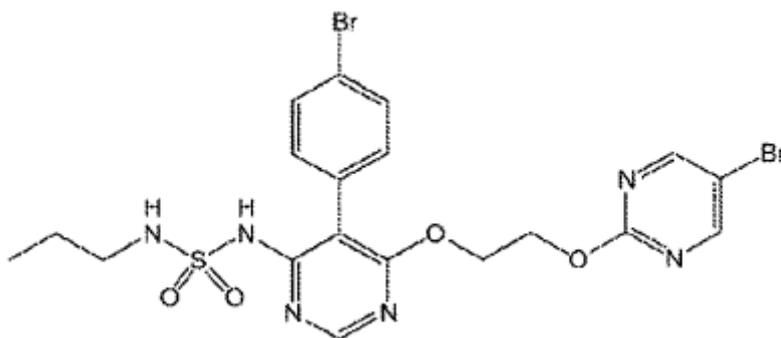
45 Experimento 6 - Expresión de los receptores de endotelina por células tumorales y astrocitos

Se cultivaron 300.000 células MDA-MB-231 de cáncer de mama humano durante 24 horas con 600.000 astrocitos marcados con GFP o con fibroblastos 3T3 marcados con GFP. Se recogieron después las células y se clasificaron para aislar las células MDA-MB-231. Se extrajeron las proteínas, se analizaron por transferencia Western, y se hibridaron con anticuerpo anti-ET_AR. Los datos mostrados en la Figura 10 demuestran claramente que las células tumorales co-cultivadas con astrocitos expresan un alto nivel de ET_AR.

55 En el siguiente conjunto de estudios, 10.000 células MDA-MB-231 marcadas con GFP se co-cultivaron con 20.000 astrocitos en placas. Veinticuatro horas más tarde, se trataron los cultivos durante 24 horas con taxol (15 ng/ml) y después se tiñeron para detectar la pAKT fosforilada (fijación de PFA al 4 %). Como se muestra en la Figura 11, las células tumorales co-cultivadas con astrocitos (y taxol) expresaron altos niveles de pAKT. Por lo tanto, el co-cultivo con astrocitos produce un aumento de la expresión de ETR y de los factores de supervivencia por las células tumorales que está correlacionado con el aumento de la resistencia de las células tumorales a los fármacos quimioterapéuticos. Estudios similares con un anticuerpo anti-ET_BR revelaron la expresión de ET_BR.

Experimento 7 – Los antagonistas de los receptores de endotelina no producen efectos citotóxicos frente a las células tumorales

Utilizando el esquema del ensayo de quimiorresistencia basado en células *in vitro* descrito antes, los inventores analizaron dos antagonistas de los receptores de endotelina que tienen afinidad dual para ET_AR y ET_BR para evaluar el grado de protección, mediada por los astrocitos, frente a los efectos citotóxicos del agente de quimioterapia. Un antagonista ETR ensayado fue bosentán que está aprobado por la EMEA para uso en el tratamiento de la hipertensión de la arteria pulmonar (PAH). El segundo fármaco ensayado se denominó ACT-064992 y es un derivado de bosentán que tiene también afinidad dual ET_AR/ET_BR. El ACT-064992 se denomina formalmente macitentán, y tiene la estructura [N-[5-(4-bromofenil)-6-(2-(5-bromopirimidin-2-iloxi)etoxi)-pirimidin-4-il]-N'-propilaminosulfonamida]:



Macitentán

Iglarz M, *et al.*, Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist, J Pharmacol Exp Ther. 2008 Dec; 327(3): 736-45. Epub 2008 Sep 9. La descripción original de la molécula de ACT-064992, su síntesis y su actividad farmacológica se pueden encontrar en el documento WO02/053557. El ACT-064992 es aproximadamente tres veces más activo farmacológicamente que el bosentán (esto es, requiere 1/3 de la dosis). Los datos detallados en la presente memoria se refieren a los experimentos con ACT-064992, sin embargo se consiguen resultados análogos con experimentos con bosentán a dosis más altas.

Se añadió ACT-064992 (100 nM) al ensayo del co-cultivo basado en células descrito antes con una relación de células tumorales:células de astrocitos de 1:2 o células tumorales:fibroblastos 3T3 durante 48 horas, y se midió el grado de apoptosis como se ha descrito antes. Como se muestra en la Figura 12 (cáncer de mama MDA-231) y en la Figura 13 (cáncer de pulmón PC14), el ACT-064992 añadido solo o con astrocitos o con fibroblastos 3T3 no produjo ningún efecto citotóxico medible.

Experimento 8 - Antagonistas de los receptores de endotelina en combinación con agentes quimioterapéuticos

Los antagonistas de ETR como se ha mostrado antes fueron ineficaces como un único agente de quimioterapia. Este resultado negativo hizo que el efecto espectacular visto con los antagonistas de ETR como un componente de las terapias de combinación fuera altamente inesperado. En los experimentos de co-cultivo, las relaciones de los cultivos de células fueron células tumorales:células de: astrocitos 1:2 (50.000:100.000), y los tratamientos fueron utilizar paclitaxel (TAXOL®) (6 ng/ml) y/o ACT-064992 (100 nM) durante 48 horas (Figura 15; *p<0,01). Para los experimentos de control que utilizan células MDA-MB-231, tuvo lugar la misma protección mediada por astrocitos, frente al paclitaxel como en anteriores experimentos. Hubo dos resultados sorprendentes de estos experimentos de combinación. En primer lugar, la combinación de paclitaxel y ACT-064992 en los controles que carecían de astrocitos no produjo ningún aumento significativo en la muerte celular comparado con el paclitaxel solo. Esto se vio en al menos tres experimentos independientes (Figura 15). Estos resultados se reprodujeron utilizando células PC14Br4 de cáncer de pulmón humano (Figura 16). Por lo tanto, en las condiciones ensayadas, los antagonistas de ETR también fueron ineficaces en combinación como se observó en el Experimento 6 como un único agente. En los co-cultivos de células tumorales-astrocitos, el ACT-064992 demostró la inesperada capacidad de invalidar la protección mediada por astrocitos, frente al paclitaxel. Aún más sorprendente, el ACT-064992 realmente mejoró la eficacia del paclitaxel, en comparación con los experimentos control sin astrocitos, para supersensibilizar las células tumorales metastásicas frente al paclitaxel. La adición de ACT-064992 a los co-cultivos de astrocitos y células tumorales inhibió la expresión de los factores de supervivencia pAKT y pMAPK (Figura 17). Esta inhibición estuvo directamente correlacionada con el aumento de la muerte de las células tumorales mediada por el fármaco quimioterapéutico. Este sinergismo se hace incluso más sorprendente porque los experimentos que carecen de astrocitos no demostraron ni siquiera efectos aditivos. Estos resultados espectaculares demostraron la importancia de los nuevos métodos de cribado de co-cultivo descritos en la presente memoria porque los efectos de los antagonistas de ETR en terapia de combinación no se habrían visto en un esquema de ensayo con una línea de células tumorales estándar que carecen de astrocitos co-cultivados. Un séptimo aspecto de la presente invención es por tanto el uso de antagonistas de los receptores de endotelina en combinación con uno o más de otros agentes de quimioterapia citotóxicos y/o con radioterapia para tratar un tumor con metástasis cerebral en un sujeto. En realizaciones particulares, esta terapia de combinación super-sensibiliza la metástasis cerebral existente a los agentes de quimioterapia citotóxicos y/o a la radioterapia coadministrada con el antagonista de ETR.

Terapia con antagonistas de los receptores de endotelina *in vivo* para la metástasis cerebral existente

La administración *in vivo* de un antagonista o antagonistas de los receptores de endotelina y la co-administración de agentes de quimioterapia se puede llevar a cabo por la misma administración oral y/o sistémica ya desarrollada y utilizada en ensayos clínicos previos para diferentes miembros de esta clase de compuestos. El desarrollo y optimización de dichos regímenes terapéuticos es rutina en la técnica. [Clinical trials: a practical guide to design, analysis and reporting Edited by Ameet Bakhai and Duolao Wang. Remedica, London 2005]. Un problema específico de los cánceres de cerebro es el impacto de la barrera hematoencefálica. Aunque esto ha sido citado durante mucho tiempo como un problema técnico que descarta los tratamientos sistémicos para la metástasis cerebral, la técnica ha reconocido ahora que incluso en la micrometástasis, la barrera hematoencefálica se rompe parcialmente. [Cavaliere R. and Schiff D., Chemotherapy and cerebral metastases: misperception or reality? Neurosurg Focus. 2007 Mar 15; 22(3): E6]. Por lo tanto es razonable esperar que la administración sistémica de los antagonistas de los receptores de endotelina penetre y tenga efecto terapéutico en los tumores con metástasis cerebral. Además, ciertos miembros de la familia de los antagonistas de los receptores de endotelina tienen la capacidad de cruzar incluso la barrera hematoencefálica intacta, lo que les hace por tanto particularmente adecuados para uso en la terapia tumoral de la metástasis cerebral *in vivo*. [Vatter H, *et al.*, Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist shown to be clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part II: effect on endothelin(B) receptor-mediated relaxation. J Neurosurg. 2005 Jun; 102(6): 1108-14]. Finalmente, la perfusión o inyección directa al tumor de los antagonistas de los receptores de endotelina puede ser adecuada cuando el tamaño de los tumores metastásicos la convierte en una estrategia viable.

20 Terapia *in vivo* para la metástasis cerebral en ratones

Para validar adicionalmente la eficacia de la terapia con un antagonista de los receptores de endotelina para la metástasis cerebral existente, los inventores realizaron a modo de ejemplo experimentos *in vivo* utilizando ratones. Se inyectaron ratones lampiños con 10.000 células MDA231 viables de ratones a través de la arteria carótida interna. El trabajo preliminar de patología reveló que las metástasis establecidas visibles se formaron en dos semanas, después de la inyección (no se muestran datos). Los inventores empezaron por lo tanto el tratamiento en este momento.

Experimento 9 – Efectos de ACT-064992 y temozolomida sobre el crecimiento de un tumor *in vivo*

Se inyectaron ratones lampiños en la arteria carótida interna con 10.000 células MDA231 viables. Los grupos de tratamiento a las dos semanas post inyección fueron: control (vehículo) (Figura 18A); temozolomida ("TMZ") 10 mg/kg p.o., al día (Figura 18B); ACT-064992 50 mg/kg, p.o. al día (Figura 18C); o combinación TMZ + ACT-064992 (Figura 18D).

Todos los ratones fueron sacrificados el día 28 de tratamiento. Se fijaron y se tiñeron secciones del cerebro. Las metástasis cerebrales se evaluaron visualmente. Especímenes a modo de ejemplo se presentan en las Figuras 18A-D con los mismos aumentos. Como se puede ver en más detalle en la Figura 18E, la combinación TMZ y ACT-064992 redujo espectacularmente el tamaño y la densidad de los tumores con metástasis en comparación con la TMZ sola. Esto demuestra que los resultados del sistema de cultivo celular se corresponden directamente con los efectos observados *in vivo*.

Experimento 10 - Efectos de ACT-064992 y paclitaxel sobre el crecimiento de un tumor *in vivo*

Se inyectaron ratones lampiños hembras (10-12 semanas de edad) en la arteria carótida interna con 10.000 células MDA231 viables. Dos semanas después de la inyección cuando se establecieron las metástasis cerebrales, se distribuyeron los ratones aleatoriamente en 4 grupos de tratamiento (n=10): 1) Control (inyectado con solución vehículo); 2) Paclitaxel (8 mg/kg administrado intraperitonealmente una vez a la semana); 3) ACT-064992 (50 mg/kg administrado oralmente una vez al día); y 4) Combinación de ACT-064992 y paclitaxel. Se sacrificaron todos los ratones después de 28 días de tratamiento y se les hizo la autopsia. Se recogieron los cerebros para estudio histológico e inmunohistoquímico. Resultados a modo de ejemplo se muestran en la Figura 19. A. Control (19A), ACT-064992 (19B) y paclitaxel (19C) todos tenían tumores metastásicos bien definidos. El grupo de ACT-064992 + paclitaxel (19D) por contraste tuvo colonias mucho más pequeñas de células tumorales.

Los resultados con temozolomida y paclitaxel demuestran que la terapia con antagonistas de los receptores de endotelina generalmente sensibiliza la metástasis cerebral frente a los agentes de quimioterapia.

50 Experimento 11 - Efectos de ACT-064992 y paclitaxel sobre la proliferación de las células tumorales *in vivo*

Cortes representativos de cerebro de los cuatro grupos de tratamiento se tiñeron para detectar CD31 (marcador de células endoteliales) y Ki67 (marcador de proliferación celular). Los cerebros de los ratones control, ratones tratados con paclitaxel solo, o con ACT-064992 solo contenían un gran número de células proliferantes. En marcado contraste, los cerebros de ratones tratados con ambos, paclitaxel y ACT-064992, contenían solamente algunas células en división. Figuras 20A, B, C y D, respectivamente.

Experimento 12 - Efectos de ACT-064992 y paclitaxel sobre la apoptosis de células tumorales *in vivo*

- 5 Se analizaron *in situ* cortes de cerebro de ratones de diferentes grupos de tratamiento por el sistema TUNEL (Terminal desoxinucleotidil transferasa dUTP nick end labeling). Negoescu A, *et al.*, J. Histochem Cytochem. 1996 Sep; 44(9): 959-68. Los cerebros de los ratones control, los tratados con taxol, y los tratados con ACT-064992 tuvieron pocas o ninguna células apoptóticas. Figuras 21 A-C. En marcado contraste, los cerebros de ratones tratados con la combinación de ACT-064992 más taxol tuvo un gran número de células tumorales apoptóticas (verde) y de células epiteliales apoptóticas (amarillo) (Figura 21D).

Experimento 13

- 10 Se realizó la inmunotinción de cortes de cerebro de ratones de los cuatro grupos de tratamiento para detectar ET_AR (rojo) y fosfoserina (verde) la colocalización produjo color amarillo anaranjado. Los cerebros control expresaron ET_AR fosforilado como lo hicieron los cerebros de ratones tratados con paclitaxel (Figuras 22A- B). El tratamiento con ACT-064992 solo, y el tratamiento con ACT-064992 + paclitaxel, evitaron la fosforilación del ET_AR. (Figuras 22C-D). Este resultado confirma la correlación de la actividad de los antagonistas de los receptores de endotelina y la sensibilización de los tumores metastásicos frente a los agentes de quimioterapia.

15 Experimento 14

Estudio de supervivencia para el tratamiento de metástasis cerebral de cáncer de mama MDA231 humano experimental con ACT064992 y taxol

Detalles experimentales

- 20 Se inyectaron 5×10^3 células MDA231 según el protocolo del Experimento 10. El tratamiento empezó el día 14 después de la inyección según el protocolo del Experimento 10. Se dibuja una curva de supervivencia y se deriva el valor p para comparar la significancia estadística entre grupos de tratamiento.

Grupos de tratamiento

Control (vehículo): administraciones orales diarias y una vez por semana inyecciones i.p.

Paclitaxel (5 mg/kg): administraciones de vehículo orales diarias y una vez por semana inyección i.p. de paclitaxel.

- 25 ACT064992 (10 mg/kg): administraciones de ACT064992 orales diarias y una vez por semana inyecciones i.p. de paclitaxel.

Resultados

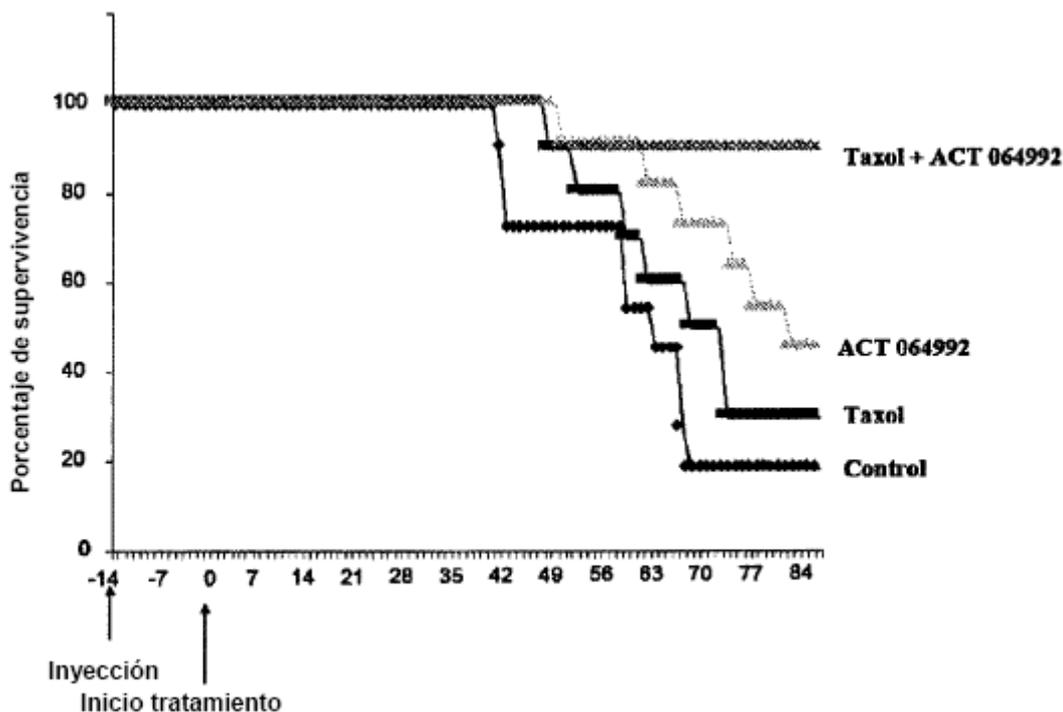
Día de la muerte (después de tratamiento)

Control: 42, 43, 53, 60, 64, 68, 68, 69, 69

- 30 Paclitaxel: 49, 53, 60, 63, 74, 74, 78

ACT064992: 51, 63, 68, 75, 78, 82

Paclitaxel + ACT: 48



Ensayo para la determinación de la IC_{50} de ET_A o ET_B :

5 Para los estudios de unión por competición, se utilizaron membranas de células CHO que expresan los receptores de ET_A o ET_B humanos recombinantes. Se preparan membranas microsómicas de células CHO recombinantes y se realiza el ensayo de unión como se ha descrito previamente (Breu V., *et al*, FEBS Lett. (1993), 334, 210).

10 Se realiza el ensayo en 200 μ L de tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, que incluye $MnCl_2$ 25 mM, EDTA 1 mM y BSA al 0,5 % (p/v) en placas de microtitulación de polipropileno. Se incubaron las membranas que contenían 0,5 μ g de proteína durante 2 h a 20 $^{\circ}$ C con [125 I]ET-1 8 pM (4000 cpm) y concentraciones crecientes de antagonistas sin marcar. Se estiman las uniones máxima y mínima en las muestras sin y con ET-1 100 nM, respectivamente.

15 Todos los compuestos de ensayo se disuelven, se diluyen y se añaden en DMSO. El ensayo se realiza en presencia de DMSO al 2,5 % que se encontró que no interfiere de modo significativo con la unión. Se calcula la IC_{50} como la concentración de antagonista que inhibe el 50 % de la unión específica de ET-1.

Referencias antecedentes:

1. HAM Mucke "Small-molecule endothelin receptor antagonists: A review of patenting activity across therapeutic areas" *IDrugs* 2009 12: 366-375.
- 5 2. Yoshimine T, *et al.* (1985) Immunohistochemical study of metastatic brain tumors with astroprotein (GFAP), a glia-specific protein. Tissue architecture and the origin of blood vessels. *J Neurosurg* 62: 414-418.
3. Nelson JB, *et al.*, Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*. 2008 Nov 1; 113(9):2376-8.
- 10 4. Chiappori AA, *et al.* Phase I/II study of atrasentan, an endothelin A receptor antagonist, in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 1; 14(5): 1464-9.
5. Carden CP, *et al.*, Eligibility of patients with brain metastases for phase I trials: time for a rethink? *The Lancet Oncology*, Volume 9, Issue 10, Pages 1012 - 1017, October 2008 doi:10.1016/S1470-2045(08)70257-2.
6. Johanna A. Joycel & Jeffrey W. Pollard, Microenvironmental regulation of metastasis, *Nature Reviews Cancer* 9, 239-252 (April 2009) | doi:10.1038/nrc2618
- 15 7. Cavaliere R. and Schiff D., Chemotherapy and cerebral metastases: misperception or reality? *Neurosurg Focus*. 2007 Mar 15; 22(3): E6.
8. Vatter H, *et al.*, Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist shown to be clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part II: effect on endothelin(B) receptor-mediated relaxation. *J Neurosurg*. 2005 Jun;102(6): 1108-14.
- 20 9. Iglarz M, *et al.*, Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist, *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Dec; 327(3): 736-45. Epub 2008 Sep 9.
10. WO 02/053557

Referencias técnicas:

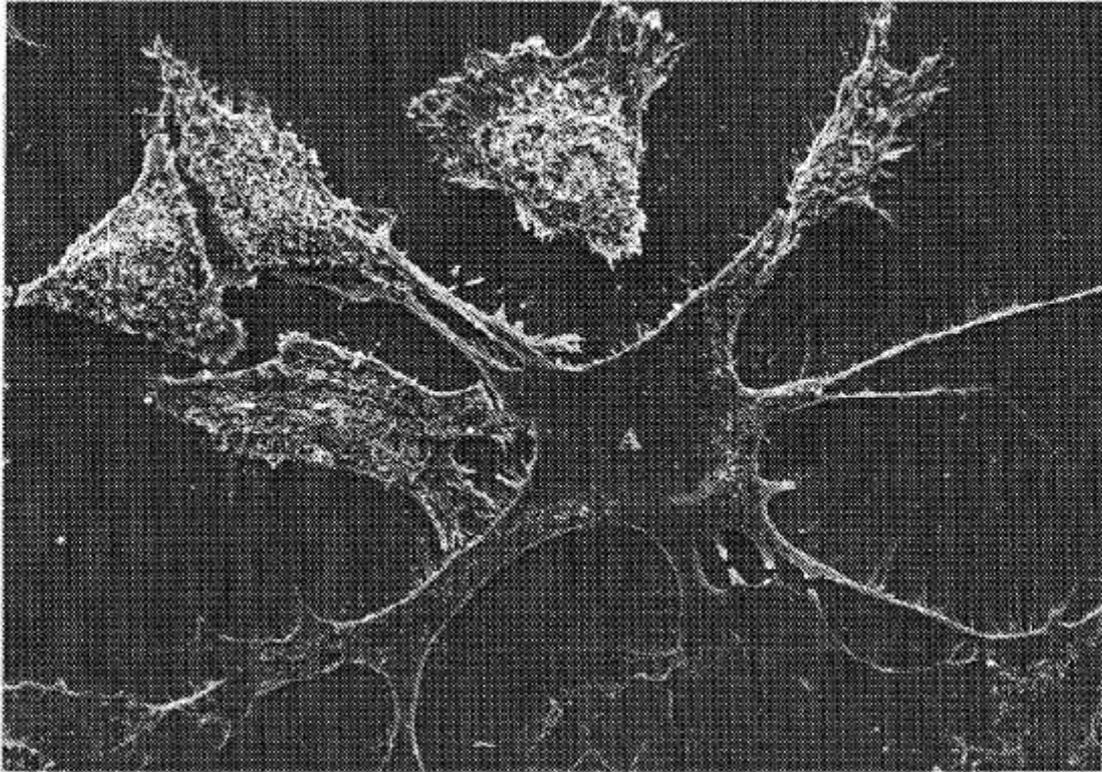
- S. Yano *et al.* *Clin. Cancer Res*. 6, 957-965 (2000).
- 25 S. J. Kim *et al.* *J Natl. Cancer Inst*. 98, 783-793 (2006).
- D. Chelouche Lev *et al.* *Clin. Cancer Res*. 11, 306-314 (2005).
- R. R. Langley *et al.* *Cancer Res*. 64, 3727-3730 (2004).
- T. Dull *et al.* *J Virol*. 72, 8463-8471 (1998)
- J. Galipeau *et al.* *Cancer Res*. 59, 2384-2394 (1999).
- 30 L. Zamai *et al.* *Cytometry* 44, 57-64 (2001).
- D. Fan *et al.* *Cancer Res*. 50, 3619-3626 (1990).
- M. H. Wade, J. E. Trosko, M. Schindler, *Science* 232, 525-528 (1986).
- J. H. Lin *et al.* *Nat. Neurosci*. 1, 494-500 (1998).
- P. C. Fonseca *et al.* *Cytometry* 69A, 487-493 (2006).
- 35 B. M. Bolstad, R. A. Irizarry, M. Astrand, T. P. Speed, *Bioinformatics* 19, 185-193 (2003).
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (July 1991). "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture." *Cancer communications* 3 (7): 207-12.
- Clinical trials: a practical guide to design, analysis and reporting Edited by Ameet Bakhai and Duolao Wang, Remedica, London 2005.
- 40 Negoescu A, *et al.*, *J Histochem Cytochem*. 1996 Sep; 44(9): 959-68.

Todas las referencias citadas o identificadas de otra manera en la presente memoria se incorporan de este modo como referencia en su totalidad y particularmente para cualquier información específica para la que se citan.

REIVINDICACIONES

1. Macitentan para uso en la prevención o tratamiento de metástasis cerebrales en combinación
- con un agente de quimioterapia citotóxico seleccionado de paclitaxel, temozolomida y una mezcla de paclitaxel y temozolomida, o
- 5 - con radioterapia, o
- con ambos, radioterapia y un agente de quimioterapia citotóxico seleccionado de paclitaxel, temozolomida y una mezcla de paclitaxel y temozolomida.
2. Macitentan para uso en la prevención o tratamiento de metástasis cerebrales según la reivindicación 1, cuyo uso es en combinación con un agente de quimioterapia citotóxico seleccionado de paclitaxel, temozolomida y una mezcla de paclitaxel y temozolomida.
- 10 3. Macitentan para uso en la prevención o tratamiento de metástasis cerebrales según la reivindicación 1, cuyo uso es en combinación con radioterapia.
4. Macitentan para uso en la prevención o tratamiento de metástasis cerebrales según la reivindicación 1, cuyo uso es en combinación con ambos, radioterapia y un agente de quimioterapia citotóxico seleccionado de paclitaxel, temozolomida y una mezcla de paclitaxel y temozolomida.
- 15 5. Macitentan para uso en la prevención o tratamiento de metástasis cerebrales según las reivindicaciones 1 a 4, en donde la radioterapia es radioterapia del cerebro completo o radiocirugía estereotáctica.
6. Macitentan para uso en la prevención o tratamiento de metástasis cerebrales según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el uso es en la reducción del riesgo y/o en la reducción de la velocidad de expansión de las metástasis cerebrales.
- 20

FIGURA 1



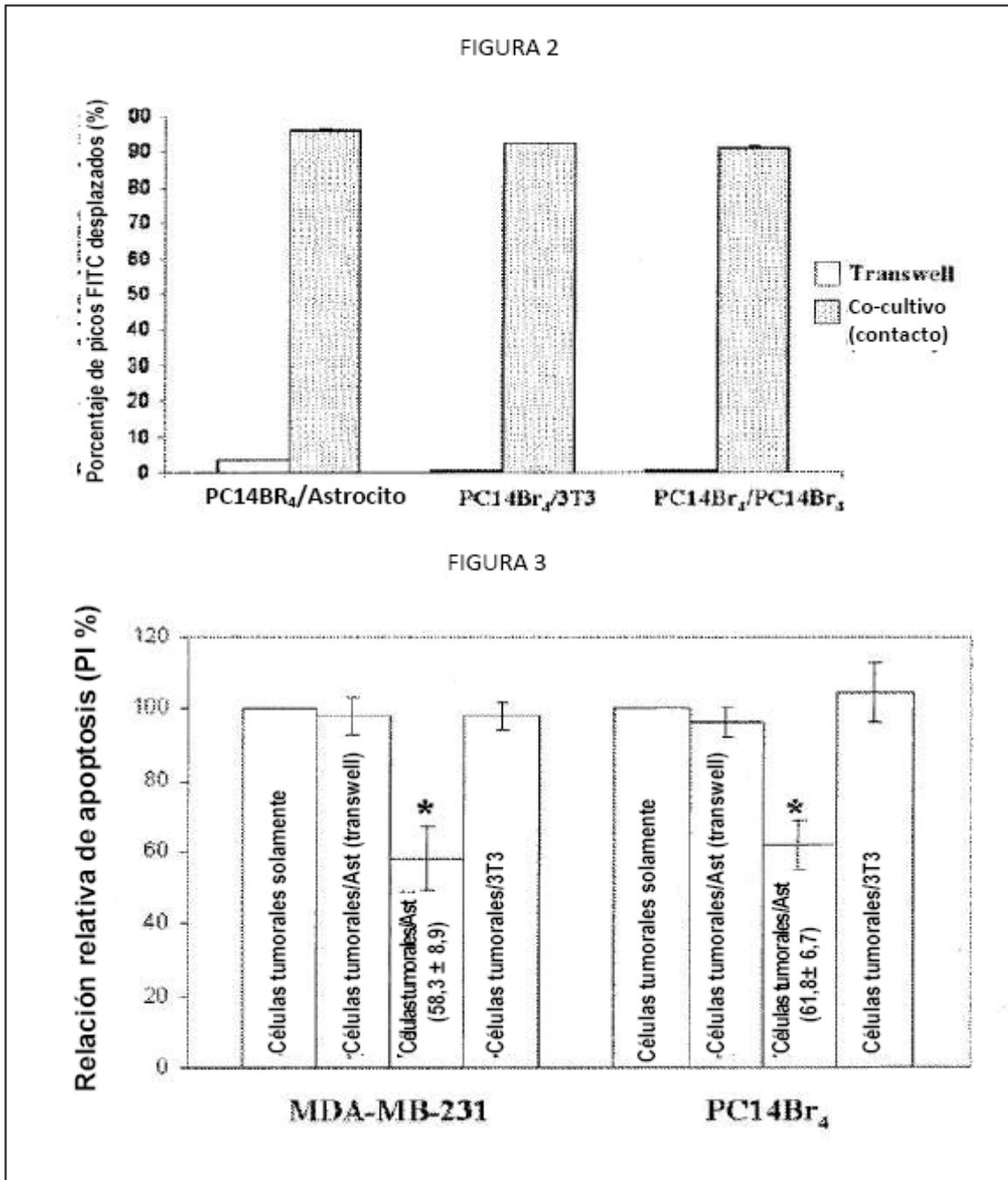


FIGURA 4

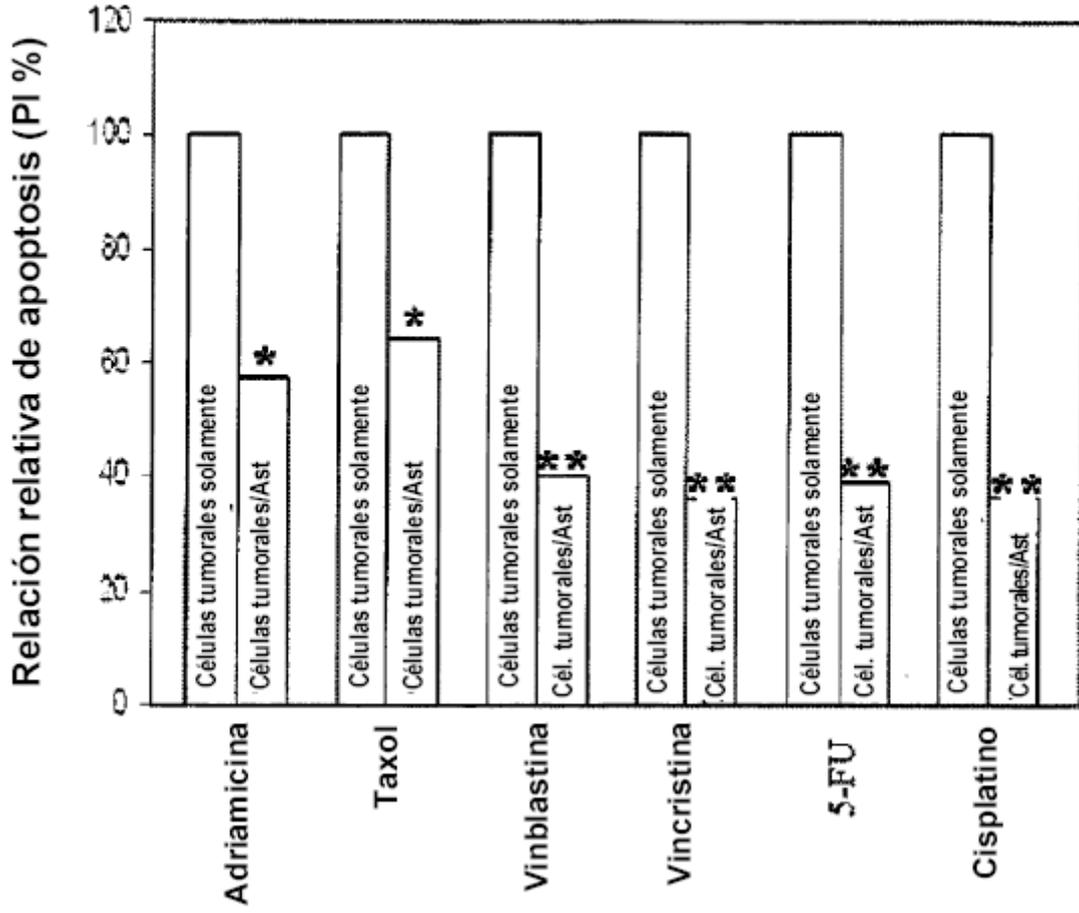


FIGURA 5

PROTECCIÓN, MEDIADA POR ASTROCITOS, DE LAS CÉLULAS TUMORALES FRENTE A LA QUIMIOTERAPIA

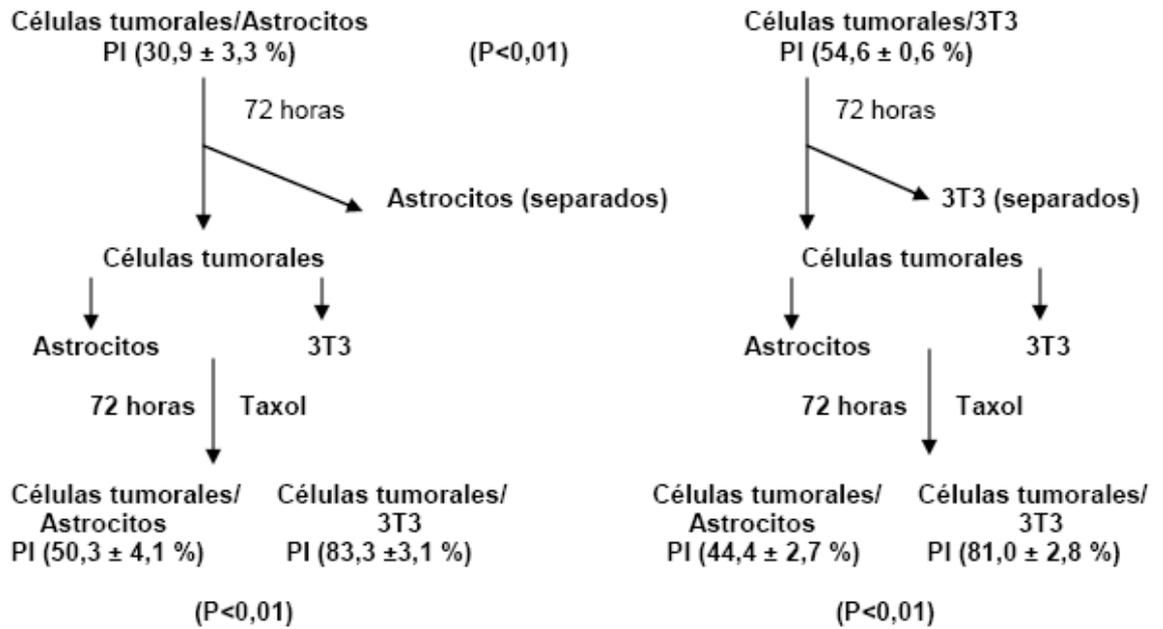


FIGURA 6

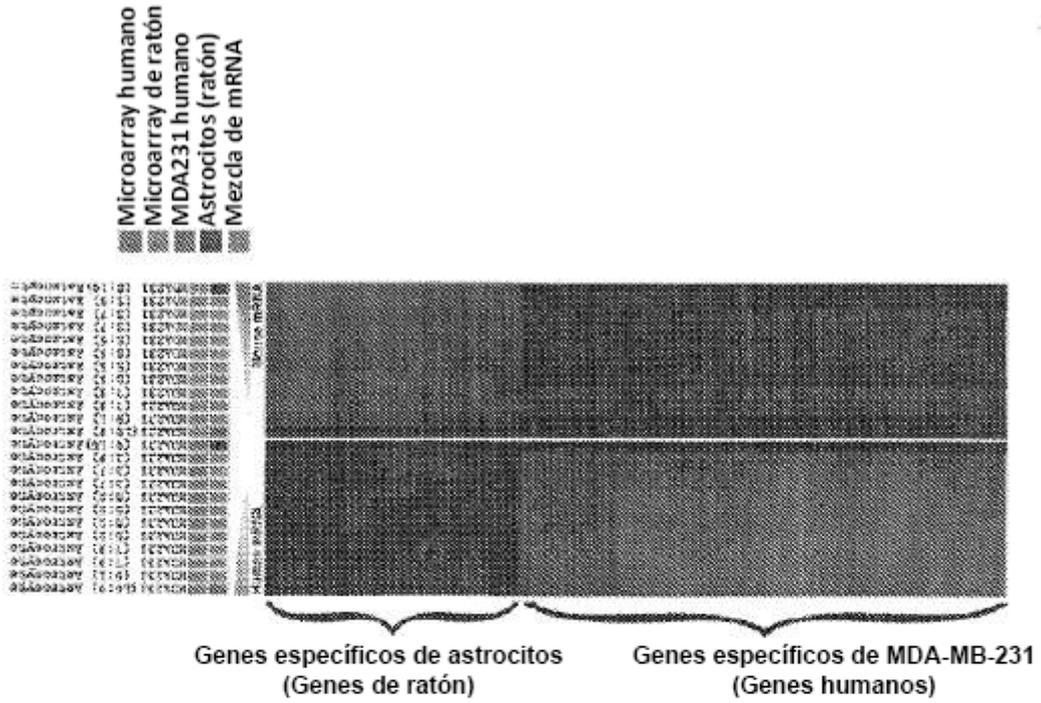


FIGURA 7

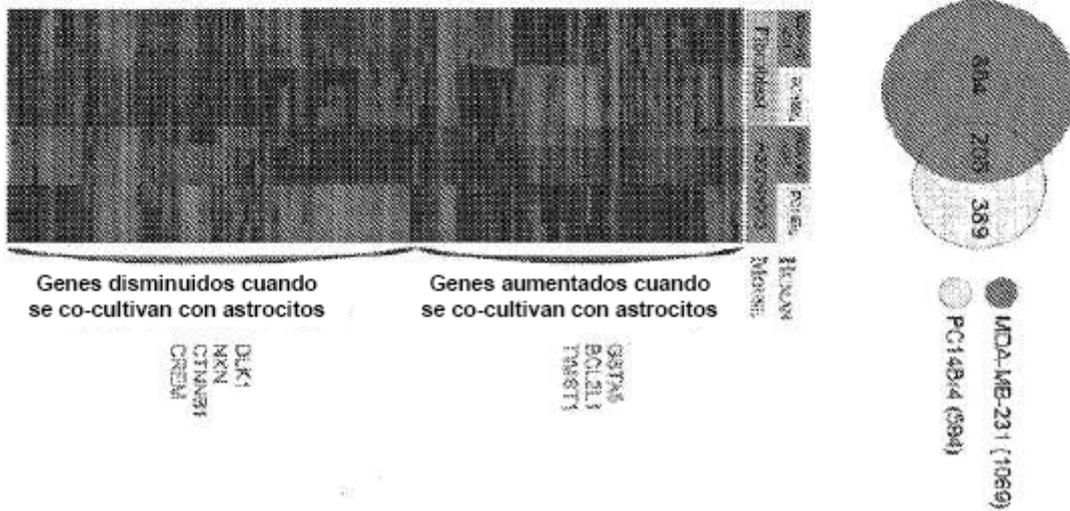


FIGURA 8

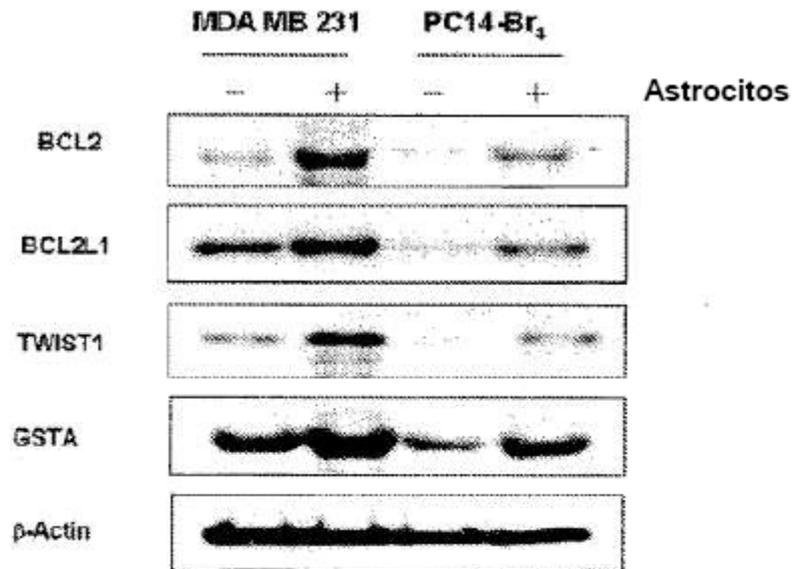


FIGURA 9

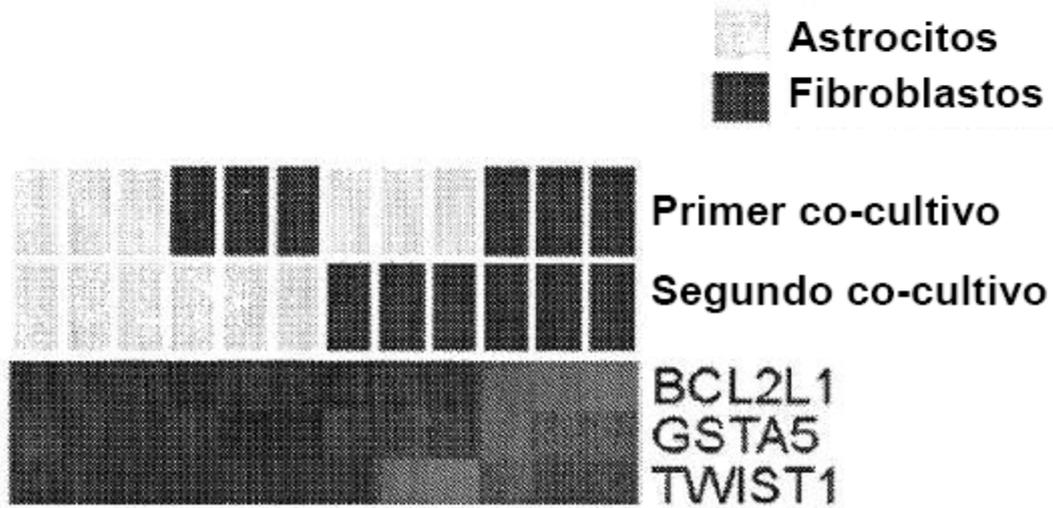


FIGURA 10

Aumento de la expresión de ET_A-R en células de cáncer de mama humano MDA231 co-cultivadas con astrocitos pero no con fibroblastos (3T3)

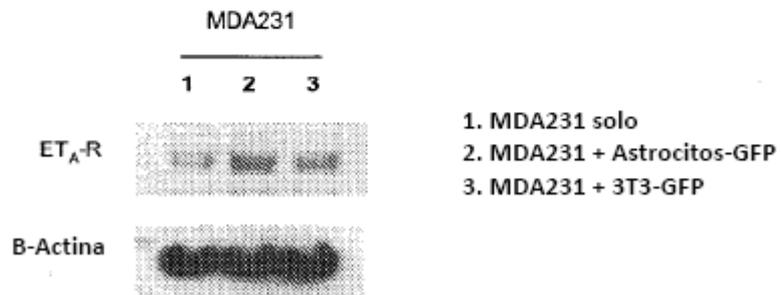
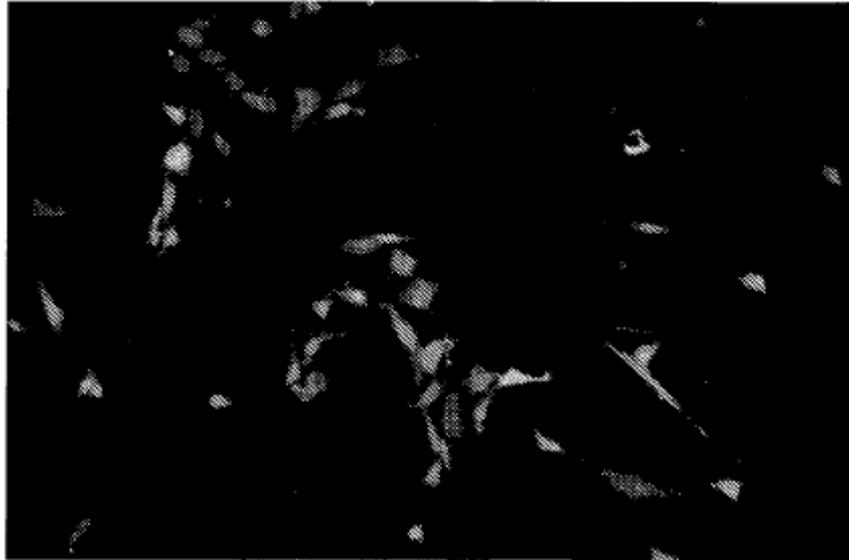


FIGURA 11

Expresión de pAKT por células de cáncer de mama humano MDA231 co-cultivadas con astrocitos/Taxol



Verde = MDA231
Rojo = p-Akt
Azul = núcleo

FIGURA 12

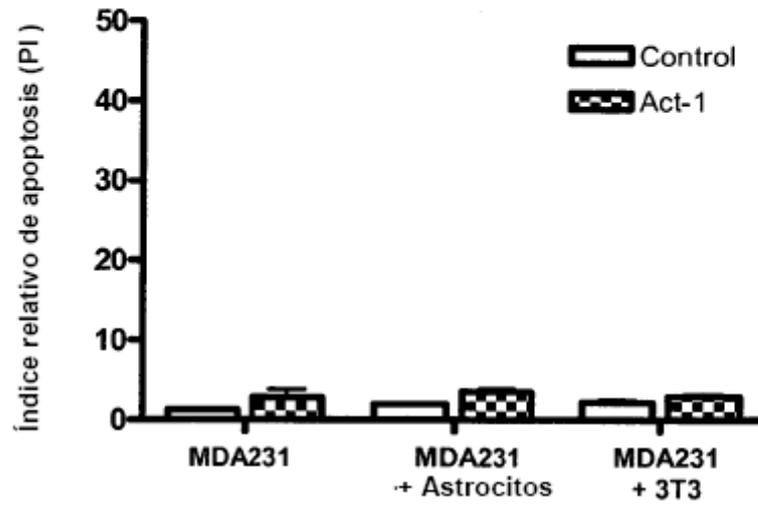


FIGURA 13

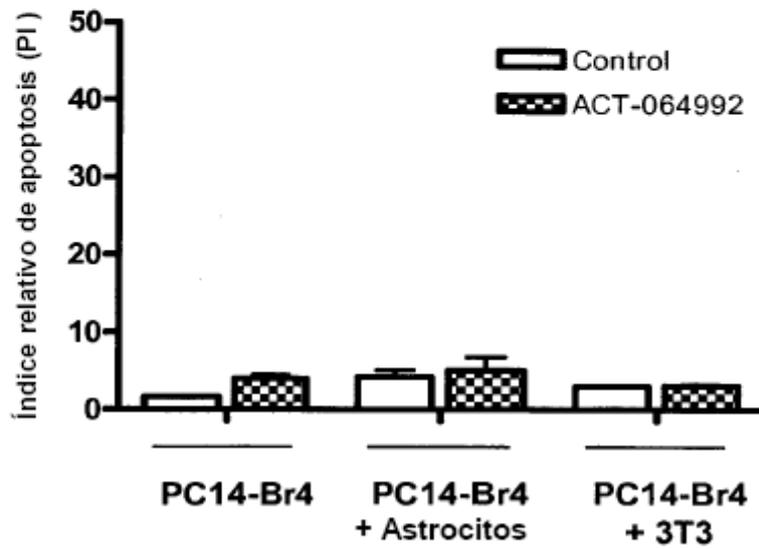


FIGURA 14A

Modelo de ratón
CD31/ β T_A/DAPI

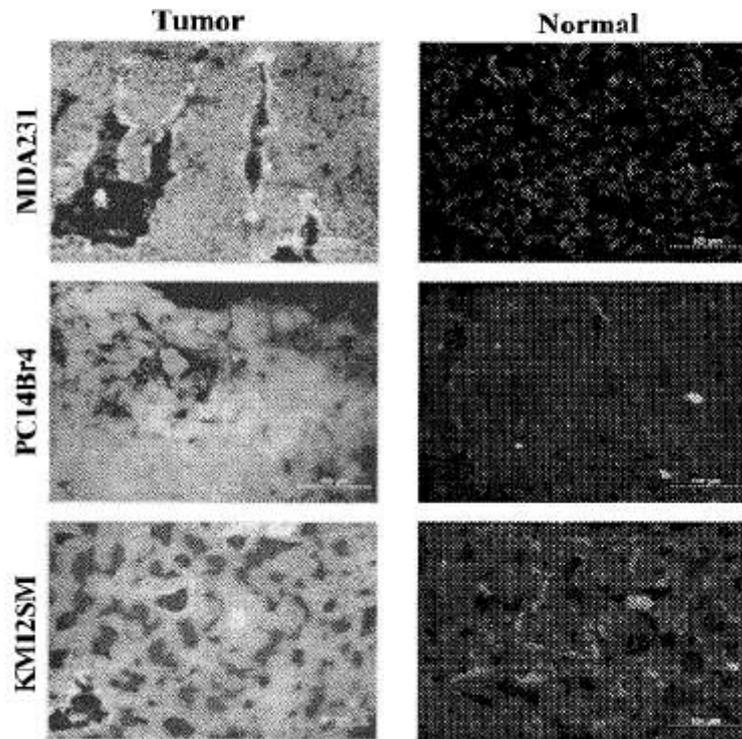


FIGURA 14B

Modelo de ratón
CD31/ET_AR/DAPI

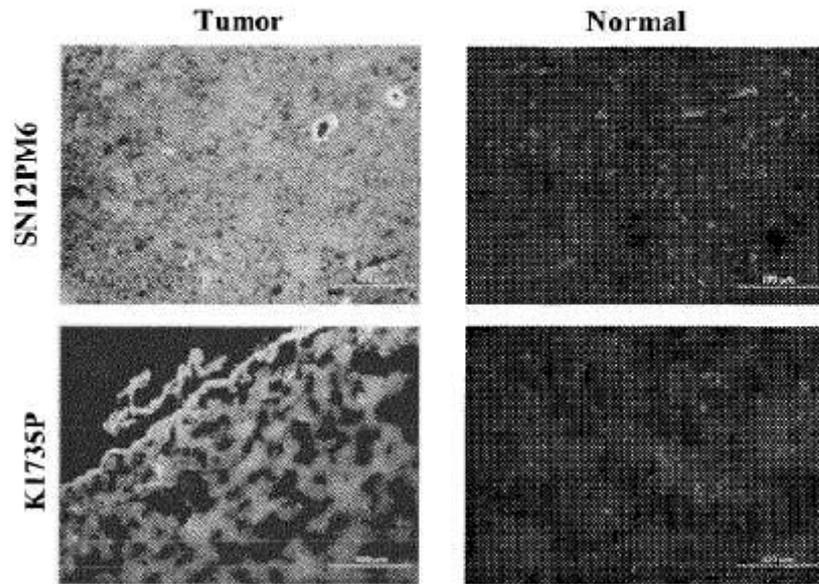


FIGURA 14C

Modelo de ratón
CD31/ET₈R/DAPI

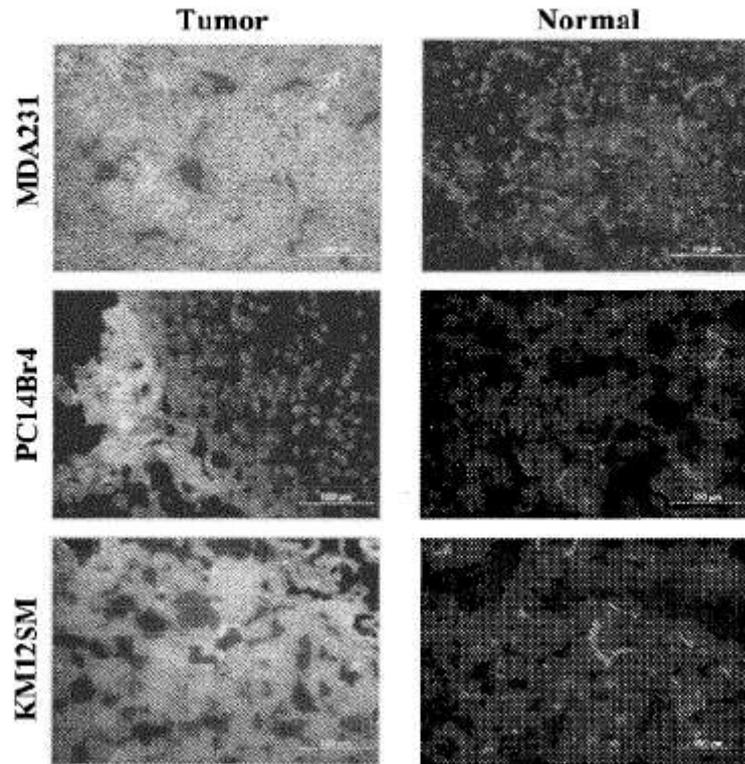


FIGURA 14D

Modelo de ratón
CD31/ET₁/DAPI

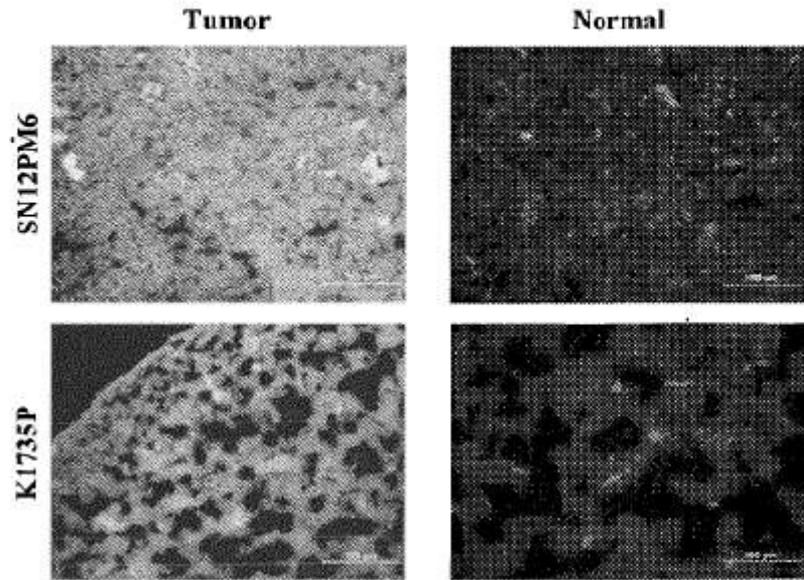


FIGURA 15

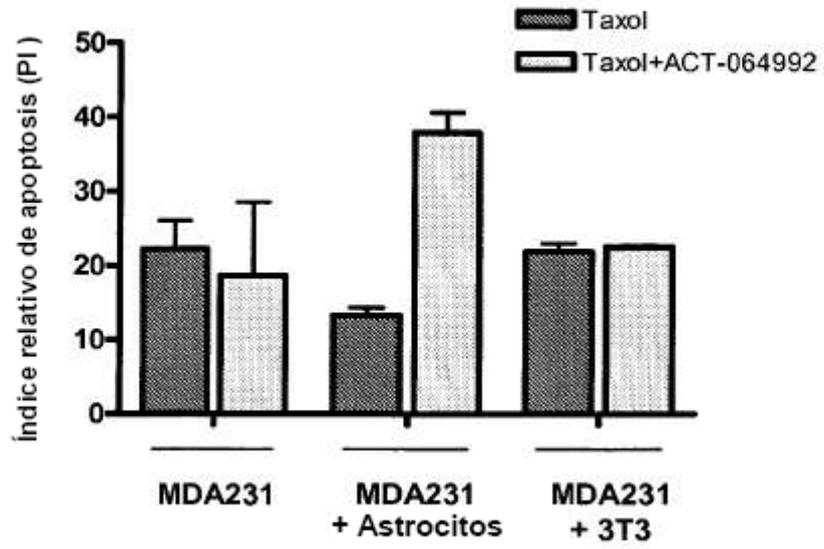


FIGURA 16

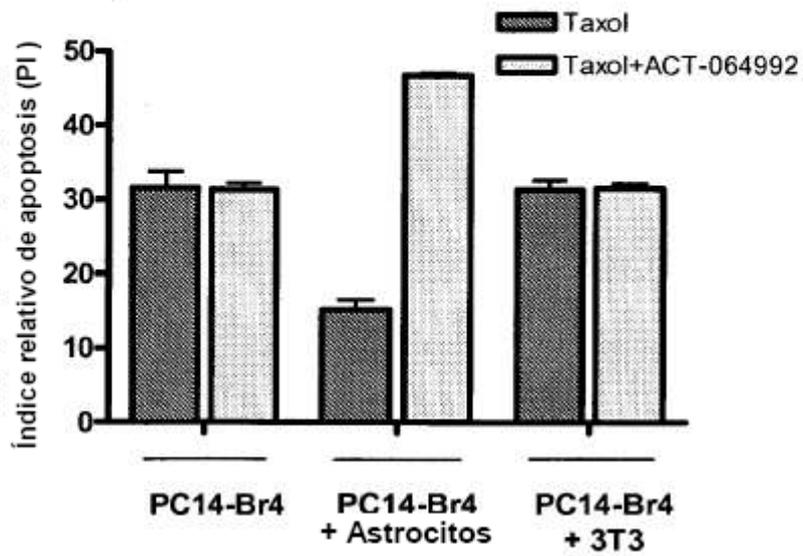
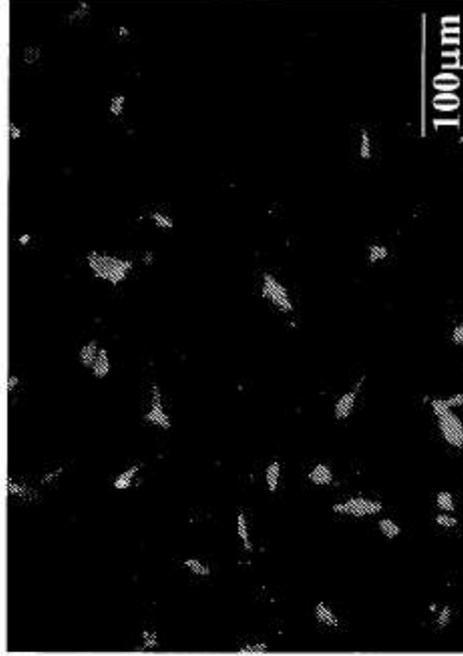


FIGURA 17

Análisis inmunohistoquímico

MDA231 / Astrocitos / Taxol MDA231 / Astrocitos / Taxol / Act-064992



Verde = MDA231
Rojo = p-Akt
Azul = núcleo

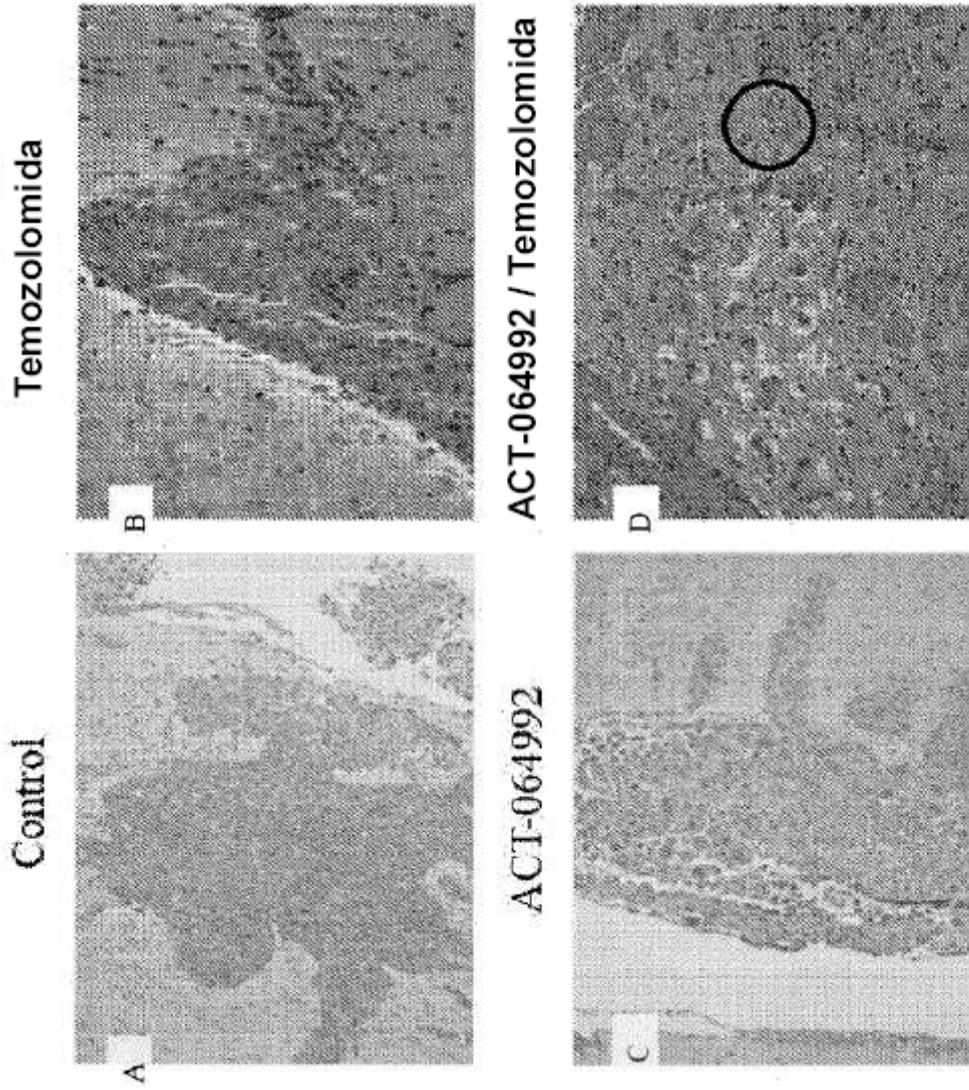


FIGURA 18 A-D

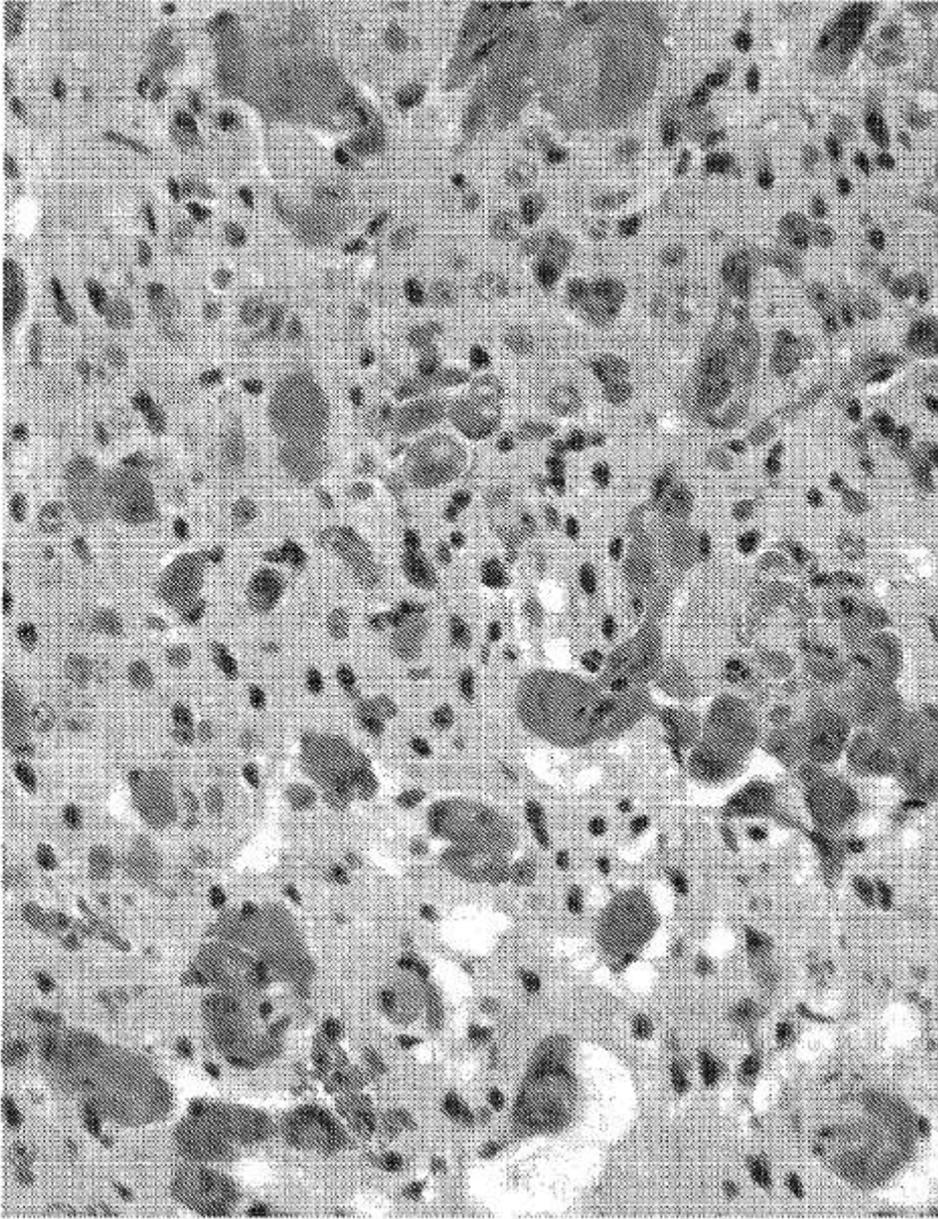


FIGURA 18E

FIGURA 19

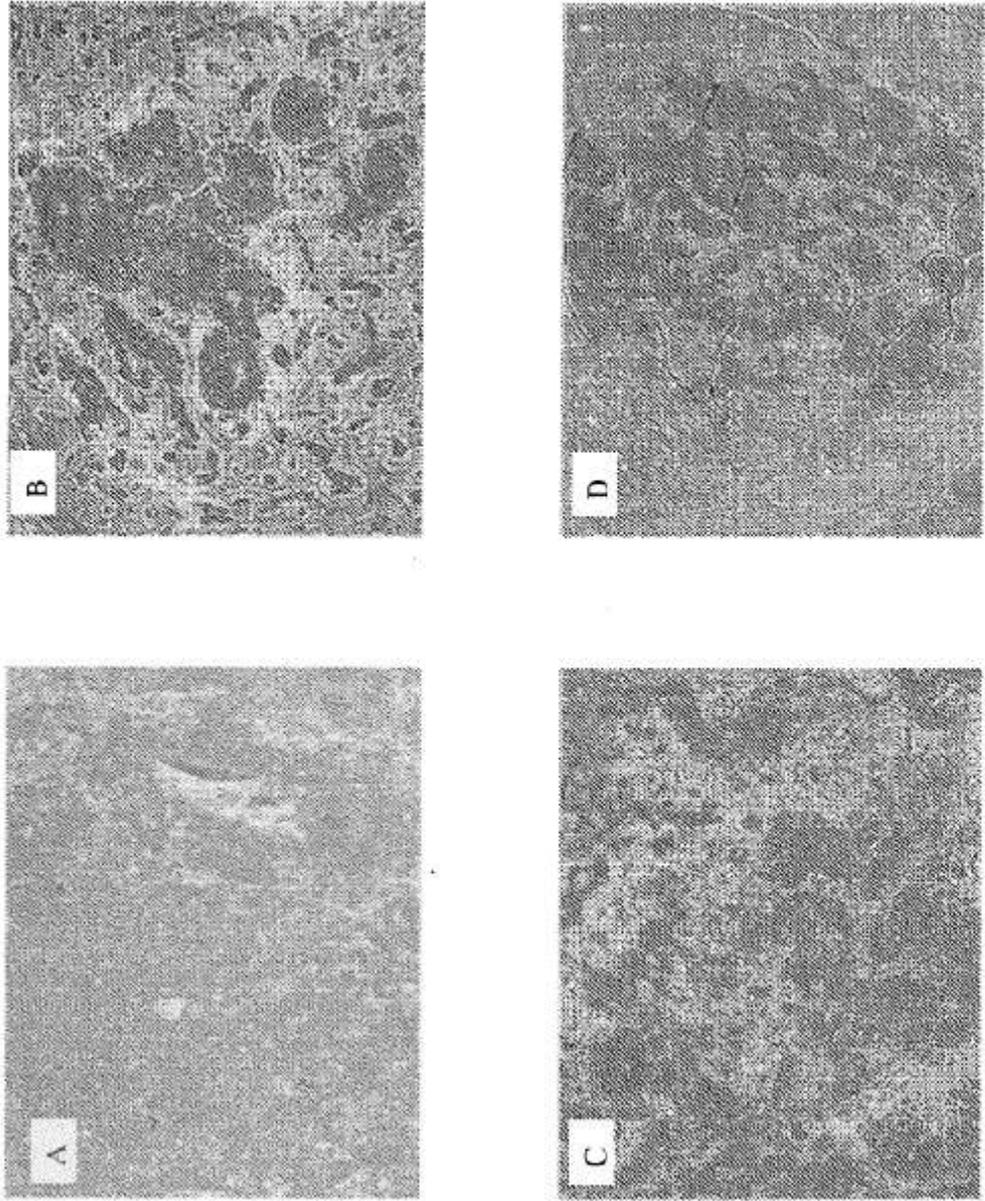


FIGURA 20

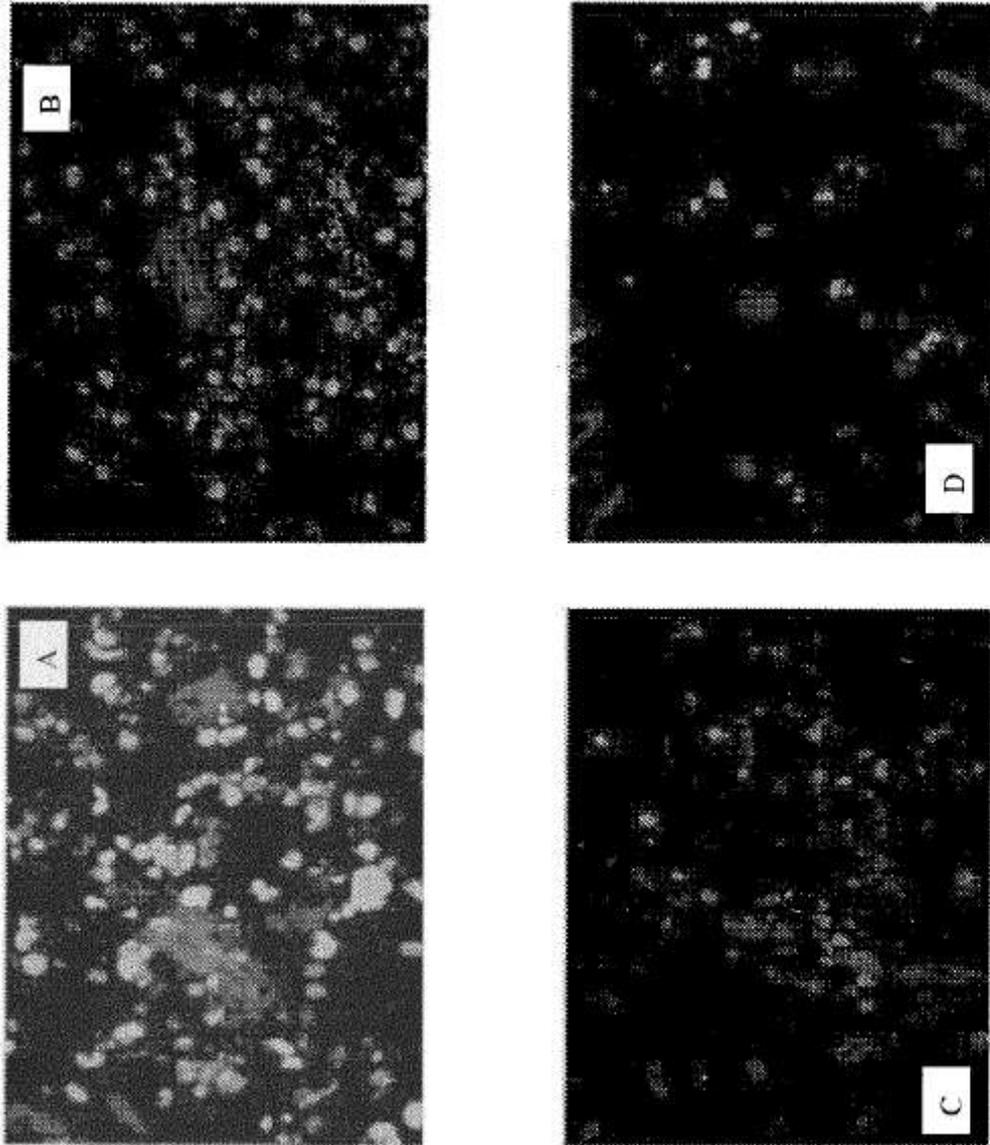
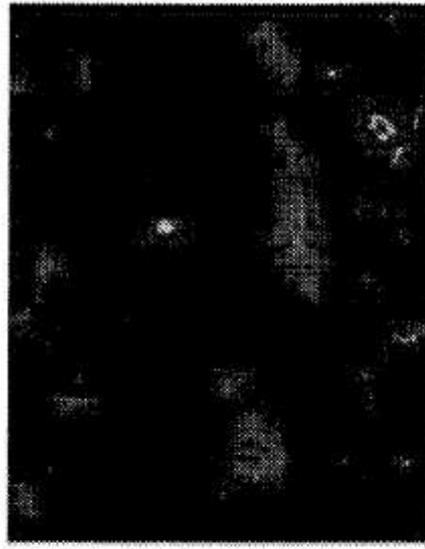
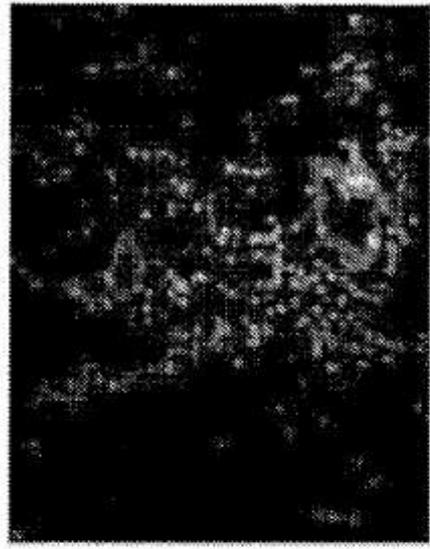


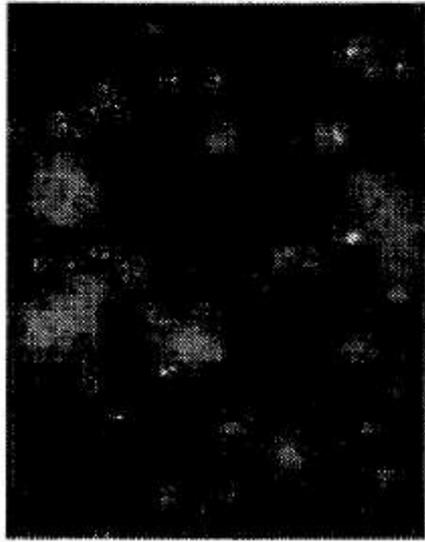
FIGURA 21



B



D



A



C

FIGURA 22

