

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 408**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2012** **PCT/EP2012/075839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013** **WO13087937**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2012** **E 12808362 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016** **EP 2791674**

54 Título: **Método para cribar compuestos para el tratamiento de cáncer mediante la inhibición de la interacción de MYD88/ERK MAP cinasa**

30 Prioridad:

16.12.2011 EP 11306686

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

29.12.2016

73 Titular/es:

CENTRE LEON BERARD (20.0%)
28, Rue Laënnec
69008 Lyon, FR;
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
(20.0%);
LES HOSPICES CIVILS DE LYON (20.0%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (20.0%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%)

72 Inventor/es:

KFOURY, ALAIN;
COSTE-INVERNIZZI, ISABELLE;
LEBECQUE, SERGE y
RENNO, TOUFIC

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 595 408 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

Método para cribar compuestos para el tratamiento de cáncer mediante la inhibición de la interacción de MYD88/ERK MAP cinasa.

La presente invención se refiere a métodos para identificar nuevos compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente quimioterápico que induce daño al ADN para la utilización en el tratamiento de cáncer.

Es bien conocido que la inflamación actúa como un promotor de la carcinogénesis. MyD88, una proteína adaptadora en la ruta de señalización de TLR, se ha visto implicada por lo tanto en la carcinogénesis a través de su papel en la inflamación.

La presente descripción muestra sorprendentemente que MyD88 ejerce un papel intrínseco en la carcinogénesis dependiente de ras *in vitro* e *in vivo*. Específicamente, MyD88 se une a ERK MAP cinasa a través de un motivo conservado, bloqueando por lo tanto la inactivación de ERK por su fosfatasa específica MKP3, y conduciendo a la amplificación de la actividad de la ruta canónica de ras. La relevancia de este mecanismo en cánceres humanos está demostrada; MyD88 aparece sobreexpresada y asociada a fosfo-ERK en muchos cánceres humanos. Además, los datos experimentales muestran que MyD88 participa directamente en la ruta de señalización de ras y en la transformación maligna inducida por este oncogén.

Los inhibidores de la interacción MyD88/Erk MAP cinasa inducen apoptosis en células tumorales. De forma interesante, se observa un efecto sinérgico entre inhibidores de la MyD88/Erk MAP cinasa y la quimioterapia que induce daño al ADN. Por lo tanto, la presente descripción proporciona nuevas perspectivas terapéuticas en cánceres, en las que la terapia de primera línea se basa en agentes de quimioterapia que induce daño al ADN. La combinación de agentes de quimioterapia que induce daño al ADN con inhibición de la interacción MyD88/Erk MAP cinasa permite la reducción de la dosis en tumores sensibles e incrementa por lo tanto la tolerancia del paciente y reintroduce sensibilidad en estirpes celulares de cáncer resistentes que tienen mecanismos de reparación del ADN muy eficientes.

Coste et al. (2010) describen que MyD88 está implicada en carcinogénesis dependiente de ras a través de la unión a ERK/MAPK, previniendo de ese modo su desfosforilación e inactivación consiguiente.

Sung et al. (2010) describen que MyD88 promueve la tumorigénesis activando ERK y previniendo la degradación de c-Myc. Se muestra que los ratones genosuprimidos para MyD88 tienen menores niveles de ERK y tumorigénesis reducida.

El documento US 2006/141490 describe un ensayo a base de células para agentes anticancerosos que implica evaluar la capacidad de un compuesto para reducir la expresión de MyD88.

El documento US 2010/069297 describe péptidos de bloqueo para inhibir las rutas de señalización celulares dependientes de MyD88.

El documento US 2010/151050 describe un método de cribado a base de células para compuestos que pueden unirse a RSK1, en el que los compuestos identificados se pueden usar como un potenciador de cisplatino.

Sumario

Invención:

1) La presente invención se refiere a métodos para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer, que comprenden las siguientes etapas:

a) proporcionar al menos un compuesto candidato;

b) poner en contacto al menos un compuesto candidato con una proteína ERK MAPK y una proteína MyD88, en condiciones adecuadas para permitir que ERK MAPK y MyD88 interactúen en ausencia de la molécula candidata;

c) determinar la interacción de ERK MAPK y MyD88 según se mide en presencia y en ausencia de al menos un compuesto candidato; y

d) seleccionar un compuesto candidato que inhibe la interacción de ERK MAPK y MyD88.

2) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según 1, en el que una o ambas de ERK MAPK y

MyD88 están unidas a un marcador detectable.

- 3) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de 1-2, en el que la interacción de ERK MAPK y MyD88 se determina usando un sistema de dos híbridos, cromatografía de afinidad, coimmunoprecipitación, fraccionamiento subcelular y aislamiento de complejos moleculares grandes, inmunotransferencia, inmunomarcaje, un ensayo de ligación por proximidad, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de biacore o un ensayo de interacción por captura ("pull-down") con GST.
- 4) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de 1-3, en el que el agente de quimioterapia que induce daño al ADN se selecciona del grupo que consiste en oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etopósido, bleomicina, y mezclas de los mismos.
- 5) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de 1-4, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.
- 6) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer, que comprende las siguientes etapas:
 - a) proporcionar al menos un compuesto candidato;
 - b) proporcionar células transformadas que expresan de forma estable MyD88 bajo el control de un promotor inducible y que expresan un gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de MAPK seleccionado del promotor de SRE, el promotor de ELK y el promotor de MyC;
 - c) inducir la sobreexpresión de MYD88 en dichas células transformadas en presencia de al menos un compuesto candidato;
 - d) medir la expresión del gen indicador y seleccionar al menos un compuesto candidato que inhiba la expresión del gen indicador;
 - e) proporcionar fibroblastos inmortalizados transformados mediante transfección con los oncogenes de MyD88 y Myc;
 - f) monitorizar la formación de focos en presencia de al menos un compuesto candidato seleccionado en la etapa d) y en presencia de al menos un agente de quimioterapia que induce daño al ADN, y seleccionar un compuesto candidato que potencie el efecto inhibitor del agente de quimioterapia que induce daño al ADN sobre la formación de focos.
- 7) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según 6, en el que, en la etapa b), el promotor de la ruta de MAPK es el promotor de SRE.
- 8) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de 6-7, en el que el método comprende además las siguientes etapas:
 - proporcionar células transformadas que expresan de forma estable MyD88 bajo el control de un promotor inducible y que expresan un gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de inflamación seleccionado del promotor de Nf-kB y el promotor de ISRE;
 - inducir la sobreexpresión de MYD88 en dichas células transformadas en presencia de al menos un compuesto candidato;
 - medir la expresión del gen indicador y seleccionar un compuesto candidato que no inhiba la expresión del gen indicador.
- 9) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según 8, en el que el promotor de la ruta de inflamación es Nf-kB.
- 10) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de 6-9, en el que, en la etapa b),

las células se seleccionan de la estirpe celular HCT116, la estirpe celular A375 y una estirpe celular HeLa.

- 11) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de 6-10, en el que el promotor inducible es un promotor inducible por antibióticos.
- 12) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de 6-11, en el que el gen indicador es luciferasa.
- 13) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según 6-12, en el que los fibroblastos inmortalizados son fibroblastos inmortalizados NIH3T3.
- 14) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según 6-13, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.
- 15) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según 6-14, en el que el agente de quimioterapia que induce daño al ADN se selecciona de oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etopósido, bleomicina, y mezclas de los mismos.
- 16) Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según 6-14, en el que al menos un compuesto candidato de la etapa a) se selecciona según un método según cualquiera de 1-5.

Descripción:

La presente descripción se refiere a un método *in vitro* para seleccionar un compuesto para el tratamiento de cáncer, que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar compuestos candidatos;
- b) proporcionar células transformadas que expresan de forma estable MyD88 bajo el control de un promotor inducible y que expresan un gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de MAPK seleccionado del promotor de SRE, el promotor de ELK y el promotor de MyC;
- c) inducir la sobreexpresión de MYD88 en dichas células transformadas en presencia del compuesto candidato;
- d) medir la expresión del gen indicador y seleccionar un compuesto candidato que inhiba la expresión del gen indicador;
- e) proporcionar fibroblastos inmortalizados transformados mediante transfección con los oncogenes de MyD88 y Myc;
- f) monitorizar la formación de focos en presencia del compuesto candidato seleccionado en la etapa d) y seleccionar dicho compuesto si se inhibe la formación de focos.

Preferentemente, en los métodos de la presente descripción, el promotor de la ruta de MAPK en la etapa b) es el promotor de SRE.

En aspectos preferidos, los métodos de la presente descripción comprenden además las siguientes etapas:

- proporcionar células transformadas que expresan de forma estable MyD88 bajo el control de un promotor inducible y que expresan un gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de inflamación seleccionado del promotor de Nf-kB y el promotor de ISRE;
- inducir la sobreexpresión de MYD88 en dichas células transformadas en presencia del compuesto candidato;
- medir la expresión del gen indicador y seleccionar un compuesto candidato que no inhiba la expresión del gen indicador.

Preferentemente, el promotor de la ruta de inflamación es el promotor de Nf-kB.

En aspectos preferidos, las células se seleccionan de la estirpe celular HCT116, la estirpe celular A375 y una estirpe celular HeLa en los métodos de la presente invención.

Preferentemente, el promotor inducible es un promotor inducible por antibióticos.

5

Preferentemente, el gen indicador es luciferasa.

En los métodos, los fibroblastos inmortalizados son preferentemente fibroblastos inmortalizados HIH3T3.

10 La presente descripción también se refiere a un método *in vitro* para seleccionar un compuesto para el tratamiento de cáncer, que comprende determinar si dicho compuesto inhibe la interacción entre la proteína MyD88 y la ERK MAP cinasa mediante un ensayo de ligación por proximidad, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de biacore o un ensayo de interacción por captura con GST o un sistema de dos híbridos en levaduras.

15 La presente descripción también se refiere a un compuesto que inhibe la interacción de MyD88 y ERK MAP cinasa, seleccionado de péptidos que inhiben la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa y ARN de interferencia que inhibe la expresión de Myd88 humana, para uso en el tratamiento de cáncer al inducir apoptosis en células cancerosas.

20 Preferentemente, en el método, los cánceres se seleccionan de cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.

Ventajosamente, el cáncer es cáncer colorrectal.

25 La presente descripción también se refiere a una composición que comprende un agente de quimioterapia que induce daño al ADN y un compuesto que inhibe la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa seleccionado de péptidos que inhiben la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa y ARN de interferencia que inhibe la expresión de Myd88 humana, para uso en el tratamiento de cáncer.

30 La presente descripción se refiere además a una composición que comprende un compuesto que inhibe la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa seleccionado de péptidos que inhiben la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa y ARN de interferencia que inhibe la expresión de Myd88 humana, para uso en combinación con agentes de quimioterapia que induce daño al ADN en el tratamiento de cáncer.

35 En los métodos de la presente invención, el agente de quimioterapia que induce daño al ADN se selecciona preferentemente de oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etopósido, bleomicina, y mezclas de los mismos.

40 La presente descripción también se refiere a kits de partes que comprenden un agente de quimioterapia que induce daño al ADN y un compuesto que inhibe la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa seleccionado de péptidos que inhiben la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa y ARN de interferencia que inhibe la expresión de Myd88 humana, para uso en el tratamiento de cáncer.

Listado De Secuencias

45

SEC ID No. 1: ARNip anti-MyD88 MyD2

SEC ID No. 2: ARNip anti-MyF88 MyD3

50

SEC ID No.3: mirARNhp codificante anti-MyD88

SEC ID No.4: mirARNhp antisentido anti-MyD88

SEC ID No.5: mirARNhp anti-MyD88

55

Descripción detallada de la invención

60 Es bien conocido que la inflamación actúa como un promotor de la carcinogénesis. MyD88, una proteína adaptora en la ruta de señalización de TLR, se ha visto implicada por lo tanto en la carcinogénesis a través de su papel en la inflamación. La presente invención muestra ahora sorprendentemente que MyD88 desempeña un papel intrínseco en la carcinogénesis dependiente de ras *in vitro* e *in vivo*. La inhibición de MyD88 reduce la carcinogénesis *in vitro* e *in vivo* al inducir apoptosis en células cancerosas. Se observa un efecto sinérgico con quimioterapia que induce daño al ADN.

65 La presente descripción se refiere a métodos para seleccionar e identificar compuestos que inhiben específicamente la actividad de MyD88 a través de la ruta de MAPK/ERK. Estos compuestos inhiben la reparación del ADN y por lo

tanto potencian el efecto del agente de quimioterapia que induce daño al ADN usado clásicamente en el tratamiento de cáncer.

El término "MyD88" se refiere al polipéptido o gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide identificado por el número de Gene Bank U70451.1 (21-03-1997). MyD88 se ha descrito como una proteína adaptadora en la ruta de señalización de TLR. En la ruta de la inflamación, MyD88 activa el factor de transcripción NF- κ B. La presente invención muestra ahora sorprendentemente que MyD88 está implicada en la activación de la ruta de MAPK/ERK.

La expresión "ERK MAP cinasa" se refiere al gen de cinasa regulada por señales extracelulares identificado mediante el número de Gene Bank (Gene ID: 5595, NG_029936.1). La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de MAP cinasas. Las MAP cinasas, también conocidas como cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), actúan en una cascada de señalización que regula diversos procesos celulares tales como la proliferación, diferenciación, y progresión del ciclo celular en respuesta a una variedad de señales extracelulares. Esta cinasa es activada por cinasas aguas arriba, dando como resultado su translocación al núcleo, en el que fosforila dianas nucleares.

La expresión "compuesto que potencia el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN" se refiere a compuestos que pueden potenciar o incrementar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN. Estos compuestos pueden tener un efecto sinérgico con el agente de quimioterapia que induce daño al ADN. "Sinergia" se define como el efecto conjunto de dos fármacos tomados juntos, que es mayor que la suma de los efectos de los dos fármacos solos. Estos compuestos también pueden hacer a las células tumorales, que son resistentes a agentes de quimioterapia que induce daño al ADN, sensibles a estos agentes de quimioterapia que induce daño al ADN. Estos compuestos son que pueden hacer agentes de quimioterapia que induce daño al ADN más activos o más eficaces.

La combinación de agentes de quimioterapia que induce daño al ADN con la inhibición de la interacción MyD88/Erk MAP permite la reducción de la dosis en tumores sensibles y por lo tanto incrementa la tolerancia del paciente o reintroduce sensibilidad en estirpes celulares cancerosas resistentes que tienen mecanismos de reparación del ADN muy eficientes.

La expresión "agente de quimioterapia que induce daño al ADN" se refiere a agentes químicos que ocasionan aductos de ADN, modificación irreversible de nucleótidos del ADN, o ruptura de las hebras de ADN. Aunque los sistemas de reparación pueden arreglar daño menor, se produce la muerte celular si el daño no se puede reparar. Estos agentes comprenden diferentes familias de compuestos usados en el tratamiento de cáncer, en particular cánceres con una mutación o una activación de uno o más componentes de la ruta de Ras (por ejemplo EGFR, Ras, Raf, B-Raf, MEK, Erk, y otros), tales como cánceres del colon, intestino, pulmón, mama, hematopoyético, estómago, próstata, etc. El agente de quimioterapia que induce daño al ADN se selecciona preferentemente de oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etopósido, bleomicina y mezclas de los mismos.

La presente invención se refiere a métodos para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer, que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar al menos un compuesto candidato;
- b) poner en contacto al menos un compuesto candidato con una proteína ERK MAPK y una proteína MyD88, en condiciones adecuadas para permitir que ERK MAPK y MyD88 interaccionen en ausencia de la molécula candidata;
- c) determinar la interacción de ERK MAPK y MyD88 según se mide en presencia y en ausencia de al menos un compuesto candidato; y
- d) seleccionar un compuesto candidato que inhibe la interacción de ERK MAPK y MyD88.

En los métodos de la presente invención, una o ambas de ERK MAPK y MyD88 están unidas preferentemente a un marcador detectable.

En los métodos de la presente invención, la interacción de ERK MAPK y MyD88 se determina preferentemente usando un sistema de dos híbridos, cromatografía de afinidad, co-inmunoprecipitación, fraccionamiento subcelular y aislamiento de grandes complejos moleculares, inmunotransferencia, inmunomarcaje, un ensayo de ligación por proximidad, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de biacore o un ensayo de interacción por captura con GST.

En los métodos de la presente invención, el agente de quimioterapia que induce daño al ADN se selecciona del grupo que consiste en oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etopósido, bleomicina y mezclas de los mismos.

Los métodos de la presente invención son preferentemente para seleccionar compuestos para uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.

La invención se refiere más particularmente a un método para cribar o seleccionar compuestos candidatos, en el que un compuesto candidato se evalúa en busca de su capacidad para modular la interacción de la proteína MyD88 con la proteína ERK MAP cinasa, es decir, para prevenir la unión de MyD88 con ERK MAP cinasa, o también para disociar, parcial o totalmente, los complejos de MyD88/ERK MAP cinasa así formados. Preferentemente, la invención se refiere a un método para cribar compuestos que pueden modular la interacción MyD88/ERK MAPK, y en particular compuestos útiles para el tratamiento de cáncer, en el que se identifica un antagonista de la interacción MyD88/ERK MAPK. El compuesto candidato se puede evaluar para determinar su capacidad para interferir con o interrumpir la interacción de MyD88 con ERK MAPK. Ventajosamente, una proteína MyD88, una proteína ERK MAPK y al menos un compuesto candidato se ponen en contacto y se incuban en condiciones adecuadas para permitir que interaccionen, y en particular para disociar complejos de ERK MAPK/MyD88. Como alternativa, una proteína MyD88 y una proteína ERK MAPK se ponen en contacto en condiciones adecuadas para la formación de complejos de ERK MAPK/MyD88. Se añade además al menos un compuesto candidato, y los tres componentes se ponen en contacto en condiciones adecuadas para permitirles que interaccionen, y opcionalmente para permitir disociar complejos de ERK MAPK/MyD88.

La determinación de la capacidad del compuesto candidato para modular la interacción de MyD88 con ERK MAPK, o para unir y modular un complejo de MyD88/ERK MAPK, se puede lograr por cualquier medio apropiado bien conocido por un experto en la técnica, tal como métodos clásicos de separación y/o detección. Por ejemplo, los complejos de MyD88/ERK MAPK se pueden cuantificar en presencia de concentraciones crecientes de compuestos candidatos. La unión de MyD88/ERK MAPK se puede llevar a cabo usando procedimientos de análisis clásicos tales como ensayos *in vitro* de unión de proteínas o de péptidos, por ejemplo, en los que uno o ambos de los componentes de MYD88 o ERK MAPK se unen a un marcador detectable (BRET, FRET, HTRF), y/o se inmovilizan. En general, para identificar compuestos que interfieren o interrumpen dicha interacción, también se pueden usar métodos usados clásicamente para la detección de una interacción positiva proteína-proteína, tal como el sistema de dos híbridos, cromatografía de afinidad, co-inmunoprecipitación, fraccionamiento subcelular y aislamiento de complejos moleculares grandes, inmunotransferencia, o inmunomarcaje, ensayo de ligación por proximidad, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de biacore, un ensayo de interacción por captura con GST o un ensayo de dos híbridos en levaduras, opcionalmente en asociación con marcadores detectables tales como marcaje fluorescente, isotópico o cromogénico.

La presente invención también se refiere a métodos para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer, que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar al menos un compuesto candidato;
- b) proporcionar células transformadas que expresan de forma estable MyD88 bajo el control de un promotor inducible y que expresan un gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de MAPK seleccionado del promotor de SRE, el promotor de ELK y el promotor de Myc;
- c) inducir la sobreexpresión de MYD88 en dichas células transformadas en presencia de al menos un compuesto candidato;
- d) medir la expresión del gen indicador y seleccionar al menos un compuesto candidato que inhiba la expresión del gen indicador;
- e) proporcionar fibroblastos inmortalizados transformados mediante transfección con los oncogenes de MyD88 y Myc;
- f) monitorizar la formación de focos en presencia de al menos un compuesto candidato seleccionado en la etapa d) y en presencia de al menos un agente de quimioterapia que induce daño al ADN, y seleccionar un compuesto candidato que potencie el efecto inhibitor del agente de quimioterapia que induce daño al ADN sobre la formación de focos.

Los métodos de la presente invención proporcionan selección de compuestos que inhiben la activación de la ruta de MAPK/ERK por MyD88.

Las expresiones "ruta de MAPK", "ruta de ERK" y "ruta de MAPK/ERK" se usan en la presente memoria de forma indiferente y se refieren a una ruta de transducción de señales que implica una cascada de proteína cinasas que regulan la transcripción de diversos genes. Esta ruta se ha visto implicada en diversos cánceres.

En los métodos de la presente invención se puede seleccionar cualquier compuesto candidato. En las formas de realización preferidas, el compuesto candidato es un compuesto pequeño capaz de difundirse en una célula, tal como un compuesto químico o un péptido.

5 Los ensayos de la presente invención se basan en células transformadas que expresan tanto MyD88 bajo el control de un promotor inducible y que expresan un gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de MAPK seleccionado del promotor de SRE, el promotor de ELK y el promotor de MyC.

10 En los métodos de la presente invención se pueden usar cualesquiera células adecuadas; preferentemente, las células son células eucariotas, y muy preferentemente, células de mamífero. En los métodos de la presente invención se prefieren estirpes celulares inmortalizadas. Ventajosamente, las células se seleccionan del grupo que consiste en la estirpe celular HCT116, la estirpe celular A375 y las estirpes celulares HeLa. Las células se transforman según técnicas conocidas.

15 MyD88 se expresa en las células transformadas bajo el control de un promotor inducible. En los métodos de la presente invención se pueden usar cualesquiera promotores inducibles y cualquier factor que los active conocidos por la persona experta. En formas de realización preferidas, el promotor inducible es un promotor inducible por antibióticos, y el factor/inductor es un antibiótico. En una forma de realización preferida, el promotor es inducible por doxiciclina.

20 Las células transformadas expresan posteriormente un gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de MAPK seleccionado del promotor de SRE, el promotor de ELK, y el promotor de MyC. En los métodos de la presente invención se puede usar cualquier gen indicador cuya expresión se identifique y mida fácilmente. La luciferasa y GFP son ejemplos de genes informadores usados habitualmente. En formas de realización preferidas, el gen indicador es luciferasa. El gen indicador cuya actividad se mide se expresa bajo el control del promotor de SRE, el promotor de ELK o el promotor de MyC.

25 La expresión "promotor de SRE" se refiere a "elementos de respuesta al suero", que es una secuencia de ADN (CC(A/T)6GG) que se usa en dirección 5' de genes informadores y que se sabe que es el sitio de unión de las proteínas del SRF (factor de respuesta al suero) codificadas por el gen de SRF identificado por el número de Gene Bank (Gen ID: 6722, NM_003131.2).

30 La expresión "promotor de ELK" se refiere al promotor del gen del factor de transcripción similar a veintiséis E (ETS) identificado por el número de Gene Bank (Gen ID: 2002, NG_009222.1). La proteína codificada por este gen es una diana nuclear para la cascada de señalización de ras-raf-MAPK.

35 La expresión "promotor de MyC" se refiere al promotor del gen homólogo del oncogén viral de mielocitomatosis C identificado por el número de Gene Bank (Gen ID: 4609, NG_007161.1). Myc se activa con diversas señales mitogénicas tales como EGF (vía la ruta de MAPK/ERK). Al modificar la expresión de sus genes diana, la activación de Myc da como resultado numerosos efectos biológicos, como la activación de la proliferación celular, la regulación del crecimiento celular, la apoptosis, la diferenciación y autorrenovación de células madre.

40 Preferentemente, en los métodos de la presente invención, el promotor de la ruta de MAPK en la etapa b) es el promotor de SRE.

45 La sobreexpresión de MyD88 se induce cuando se añade el factor/inductor al medio de cultivo, o se apaga al recuperar el inductor. La sobreexpresión de MyD88 activa la ruta de MAPK/ERK. En los métodos de la presente invención, la sobreexpresión de MyD88 se induce en presencia del compuesto candidato. La inhibición de la activación de la ruta de ERK/MAPK por MyD88 mediante el compuesto candidato se monitoriza midiendo la expresión del gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de MAPK/ERK seleccionado de SRE, ELK y MyC. En los métodos de la presente invención se seleccionan compuestos candidatos que inhiban la expresión del gen indicador en las células transformadas.

50 Puesto que se sabe que MyD88 activa la ruta de inflamación, los métodos de la presente invención pueden comprender ventajosamente etapas para eliminar compuestos que inhiban la ruta de inflamación, o seleccionar compuestos que no inhiban significativamente la ruta de inflamación. Por lo tanto, los métodos de la presente invención también pueden comprender las siguientes etapas:

- 60 - proporcionar células transformadas que expresan de forma estable MyD88 bajo el control de un promotor inducible y que expresan un gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de inflamación seleccionado del promotor de Nf-kB y el promotor de ISRE;
- inducir la sobreexpresión de MYD88 en dichas células transformadas en presencia del compuesto candidato;
- 65 - medir la expresión del gen indicador y seleccionar un compuesto candidato que no inhiba la expresión del gen indicador.

Estas etapas adicionales se llevan a cabo como se describe anteriormente.

La expresión "promotor de Nf- κ B" se refiere al promotor del potenciador de cadena ligera kappa del factor nuclear de células B activadas; está compuesto de un dímero de proteínas p65 RELA/p50 codificadas por genes identificados mediante números de Gene Bank (p65 RELA = Gen ID: 5970, NG_029971.1 / p50 = Gen ID: 4790, NM_001165412.1). NF- κ B es claramente uno de los reguladores más importantes de la expresión de genes proinflamatorios. La síntesis de citocinas, tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-8, está mediada por NF- κ B, como lo está la expresión de ciclooxigenasa 2 (Cox-2).

La expresión "promotor de ISRE" se refiere a elemento de respuesta sensible a interferón, una secuencia de ADN (TTTCAT) que se usa en dirección 5' de genes informadores y que se sabe que es el sitio de unión de las proteínas de la familia STAT (transductores de señales y activadores de la proteína de transcripción) como STAT3 (NG_007370.1, NM_003150.3) y las proteínas de la familia IRF (factores de respuesta a interferón) como IRF3 (NG_031810.1, NM_001197122.1). La ruta de STAT es una ruta de señalización importante que convierte la señal de citocinas en programas de expresión génica que regulan la proliferación y diferenciación de las células inmunitarias. Varios miembros de la familia de proteínas STAT actúan como factores de transcripción en la modulación de respuestas pro- y anti-inflamatorias.

Preferentemente, el promotor de la ruta de inflamación es el promotor de Nf- κ B.

Estas etapas adicionales seleccionan un compuesto, que no interfiere con el papel de MyD88 en la ruta de inflamación. Se pueden realizar simultáneamente o tras seleccionar compuestos candidatos que inhiben la activación de la ruta de MAPK/ERK.

Los métodos descritos anteriormente proporcionan un compuesto candidato que inhibe la activación de la ruta de MAPK/ERK por MyD88 y que ventajosamente no interfieren con el papel de MyD88 en la ruta de inflamación.

Los compuestos candidatos seleccionados se criban adicionalmente en busca de su capacidad para potenciar el efecto inhibitorio de los agentes de quimioterapia que induce daño al ADN sobre la carcinogénesis activada por MyD88 en fibroblastos. Fibroblastos inmortalizados se transforman con los oncogenes de MyD88 y Myc. El término "Myc" se refiere al gen homólogo del oncogén viral de la mielocitomatosis C identificado mediante el número de Gene Bank (Gen ID: 4609, NG_007161.1). Myc se activa con diversas señales mitogénicas tales como EGF (vía la ruta de MAPK/ERK). Modificando la expresión de sus genes diana, la activación de Myc da como resultado numerosos efectos biológicos, como el accionamiento de la proliferación celular, la regulación del crecimiento celular, la apoptosis, la diferenciación y la autorrenovación de células madre.

En los métodos de la presente invención, los fibroblastos inmortalizados son preferentemente fibroblastos inmortalizados NIH3T3.

La formación de focos de los fibroblastos se monitoriza en presencia de al menos un compuesto candidato seleccionado como se describe anteriormente y en presencia de al menos un agente de quimioterapia que induce daño al ADN. Se selecciona al menos un compuesto candidato que potencia el efecto inhibitorio del agente de quimioterapia que induce daño al ADN sobre la formación de focos en cultivo celular *in vitro*.

Preferentemente, los métodos de la presente invención proporcionan la selección de compuestos para uso en el tratamiento de cáncer, en los que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.

En los métodos descritos anteriormente, el agente de quimioterapia que induce daño al ADN se selecciona preferentemente de oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etopósido, bleomicina, y mezclas de los mismos.

Otro objeto de la presente invención es el cribado de un compuesto que inhibe la interacción de MyD88 y ERK MAP cinasa seleccionado de péptidos que inhiben la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa y ARN de interferencia que inhibe la expresión de MyD88 humana, para uso en el tratamiento de cáncer mediante la inducción de apoptosis en células cancerosas.

El término "péptido" se refiere a péptidos y péptidos modificados.

En formas de realización preferidas, el compuesto que inhibe la interacción de MyD88 y ERK MAP cinasa es un ARN de interferencia que inhibe la expresión de MyD88 humana.

Las moléculas de ARN de interferencia se usan para seleccionar específicamente como diana ARN mensajero (ARNm): el ARN de interferencia se hibrida con el ARNm e inhibe en consecuencia la traducción de la proteína correspondiente, ya sea mediante impedimento estérico simple o promoviendo la escisión del ARNm.

El ARN de interferencia se puede escoger de una pluralidad de formas, tales como: ARN antisentido, ARN bicatenario, ARN "pequeño de interferencia" (ARNip), ARN "horquillado pequeño" (ARNhp), o ARN ribosómico.

- 5 El ARNip, por "ARN pequeño de interferencia", son secuencias cortas de alrededor de 15 a 30 pares de bases. Incluyen una primera hebra y una hebra adicional idéntica a la región seleccionada como diana del ARN del gen diana.

- 10 El ARNhp, por "ARN horquillado pequeño", es ARN bicatenario producido mediante una secuencia clonada en un vector de expresión, que codifica una molécula de ARN que adoptará una forma de horquilla de pelo tras la escisión mediante el complejo de Dicer y Loquacious.

El diseño y preparación del ARN de interferencia, y su uso, son bien conocidos, y se describen ampliamente en numerosas publicaciones.

- 15 En formas de realización preferidas, el ARNip se selecciona del ARNip de SEC ID No. 1 y el ARNip de SEC ID No. 2. En otra forma de realización, el ARN de interferencia es un mirARNhp que comprende las secuencias de SEC ID Nos. 3-4. Lo más preferible, el ARN de interferencia es el mirARNhp de SEC ID No. 5.

- 20 La presente descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden:

- a) una cantidad eficaz de un compuesto como se describe anteriormente, y
- b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser inerte o fisiológicamente activo.

- 25 Como se usa en la presente memoria, "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen uno o más de agua, disolución salina, disolución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y similares, así como la combinación de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, o cloruro de sodio, en la composición. En particular, los ejemplos relevantes de vehículo adecuado incluyen: (1) disolución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco, pH ~ 7,4, que contiene o no aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de seroalbúmina humana, (2) disolución salina al 0,9% (cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% p/v), y (3) dextrosa al 5% (p/v); y también pueden contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizante tal como Tween 20.

Las composiciones farmacéuticas englobadas por la presente descripción también pueden contener un agente terapéutico adicional para el tratamiento de cánceres, particularmente para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.

- 40 Las composiciones de la descripción pueden estar en una variedad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas, y sólidas, pero la forma preferida depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de disoluciones inyectables o infusibles. El modo preferido de administración es parenteral (por ejemplo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo). En una forma de realización preferida, las composiciones de la descripción se administran intravenosamente como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo. En otra forma de realización preferida, se inyectan mediante vías intramusculares, subcutáneas, intraarticulares, intrasinoviales, intratumorales, peritumorales, intralesionales, o perilesionales, para ejercer efectos terapéuticos locales así como sistémicos.

- 50 Las composiciones estériles para administración parenteral se pueden preparar incorporando el compuesto en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, seguido de la esterilización mediante microfiltración. Como disolvente o vehículo, se pueden usar agua, disolución salina, disolución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y similares, así como la combinación de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, o cloruro de sodio. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, en particular agentes humectantes, isotonicantes, emulsionantes, dispersantes o estabilizantes. Las composiciones estériles para administración parenteral también se pueden preparar en forma de composiciones sólidas estériles, que se pueden disolver en el momento de uso en agua estéril o cualquier otro medio estéril inyectable.

- 60 Las composiciones que comprenden un compuesto como se describe en la presente memoria también se pueden administrar oralmente. Como composiciones sólidas para administración oral, se pueden usar comprimidos, pastillas, polvos (cápsulas de gelatina, saquitos) o gránulos. En estas composiciones, el principio activo según la invención se mezcla con uno o más diluyentes inertes, tales como almidón, celulosa, sacarosa, lactosa o sílice, en una corriente de argón. Estas composiciones también pueden comprender sustancias distintas de diluyentes, por ejemplo uno o más lubricantes tales como estearato de magnesio o calcio, un colorante, un revestimiento

(comprimido revestido con azúcar) o un glaseado.

Como composiciones líquidas para administración oral, se pueden usar disoluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes tales como agua, etanol, glicerol, aceites vegetales o aceite de parafina. Estas composiciones pueden comprender sustancias distintas de diluyentes, por ejemplo productos humectantes, edulcorantes, espesantes, saborizantes o estabilizantes.

La dosis depende del efecto deseado, de la duración del tratamiento y de la vía de administración usada.

La descripción también se refiere al uso de un compuesto como se describe anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cánceres, y particularmente para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.

La presente descripción también proporciona métodos para tratar cánceres, que incluyen administrar una cantidad eficaz de un compuesto como se describe anteriormente a un ser humano o a un paciente que lo necesite. En una forma de realización preferida, la invención se refiere a métodos para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.

La presente descripción también se refiere a una composición que comprende un agente de quimioterapia que induce daño al ADN y un compuesto que inhibe la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa seleccionado de péptidos que inhiben la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa y ARN de interferencia que inhibe la expresión de Myd88 humana, para uso en el tratamiento de cáncer.

La presente descripción también se refiere a métodos para tratar cánceres, que incluyen administrar una cantidad eficaz de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN y un compuesto que inhibe la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa seleccionado de péptidos que inhiben la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa y ARN de interferencia que inhibe la expresión de Myd88 humana a un ser humano o a un paciente que lo necesite.

El agente de quimioterapia que induce daño al ADN y el compuesto que inhibe la interacción de MyD88 con ERKMAP cinasa se pueden administrar simultánea o independientemente.

La combinación de agentes de quimioterapia que induce daño al ADN con la inhibición de la interacción MyD88/Erk MAP cinasa permite la reducción de la dosis en tumores sensibles, y por lo tanto aumenta la tolerancia del paciente o reinduce sensibilidad en estirpes celulares de cáncer resistentes que tienen mecanismos de reparación del ADN muy eficientes.

La presente descripción se refiere además a una composición que comprende un compuesto que inhibe la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa seleccionado de péptidos que inhiben la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa y ARN de interferencia que inhibe la expresión de Myd88 humana, para uso en combinación con agentes de quimioterapia que induce daño al ADN en el tratamiento de cáncer.

En los métodos, el agente de quimioterapia que induce daño al ADN se selecciona preferentemente de oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etopósido, bleomicina y mezclas de los mismos.

La presente descripción también se refiere a kits de partes que comprenden un agente de quimioterapia que induce daño al ADN y un compuesto que inhibe la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa seleccionado de péptidos que inhiben la interacción de MyD88 con ERK MAP cinasa y ARN de interferencia que inhibe la expresión de Myd88 humana, para uso en el tratamiento de cáncer.

En los aspectos preferidos, los compuestos y composiciones de la presente descripción son para uso en el tratamiento de cáncer, y más particularmente en el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino. Lo más ventajosamente, los compuestos son para uso en el tratamiento de cáncer colorrectal.

Ventajosamente, los compuestos y composiciones de la presente descripción son para uso en el tratamiento de cáncer al inducir apoptosis en células cancerosas.

Figuras

Figura 1: El silenciamiento de MyD88 induce apoptosis dependiente de p53 en estirpes celulares de cáncer de colon. A - Análisis de la apoptosis en diferentes estirpes celulares de cáncer de colon al silenciar Myd88 mediante ARNip. B - Análisis de la apoptosis en células HCT116 p53+/+ o p53-/- al silenciar MyD88 mediante dos ARNip diferentes.

Figura 2: Ensayo de combinación *in vivo*.

Ejemplos

Ejemplo 1: La extinción de MyD88 activa p53 e induce apoptosis

Habiendo mostrado previamente que MyD88 está implicada en el inicio del tumor, se cuestiona si MyD88 puede desempeñar un papel en el mantenimiento del fenotipo tumoral de tumores consolidados. Con la extinción de MyD88 mediante ARNip específico, las células sufren apoptosis. Para elucidar el papel de la proteína p53 supresora de tumores en la apoptosis, se usaron las estirpes celulares HCT116 p53+/+ o p53-/-. Se observó una apoptosis masiva al inhibir MyD88 en las estirpes celulares p53+/+ en comparación con la estirpe celular p53-/-, junto con estabilización de la proteína p53. Se realizan los mismos experimentos en diferentes estirpes celulares de cáncer de colon humano y se confirma que la inhibición de MyD88 induce una apoptosis dependiente de p53 en estas estirpes celulares, sugiriendo que esto podría ser un mecanismo general, al menos en el colon.

Después, se genera HCT116 p53+/+ o p53-/- que expresan de forma estable un ARNhp de MyD88 inducible por doxiciclina. Estas estirpes celulares se implantaron subcutáneamente en ratones atímicos, y después los ratones se trataron o no con doxiciclina para inducir la extinción de MyD88 en el tumor. Este experimento mostró que la inhibición de MyD88 en células tumorales bloquea el crecimiento tumoral *in vivo*.

Ejemplo 2: Papel de MyD88 en el mantenimiento de la integridad genómica

MyD88 es necesaria para la ruta de señalización de Ras/ERK. Se sabe que la ruta de MAPK está implicada en la inducción de mecanismos de reparación del ADN. Por lo tanto, se postula que, con la inhibición de MyD88, la disminución en la fosforilación de ERK inducirá una carencia en los mecanismos de reparación del ADN que induce a acumulación de daño al ADN y accionamiento de una apoptosis dependiente de p53. Los datos confirman esta hipótesis. De hecho, la transfección de células HCT116 p53+/+ shMyD88 con un plásmido que expresa constitutivamente MEK cinasa activada reduce su apoptosis inducida con el tratamiento con doxiciclina, indicando que la apoptosis inducida por la extinción de MyD88 es debida a inhibición de la ruta de MAPK. La ruta de MAPK está implicada en mecanismos de reparación del ADN, especialmente en la regulación de algunos genes implicados en la reparación del ADN, como la proteína ERCC1; por lo tanto, se cuantifican los niveles de proteína ERCC1 con la inhibición de MyD88. Se observa una disminución en los niveles de proteína ERCC1 y una acumulación de pH2AX, indicando acumulación de daño al ADN bicatenario.

La extinción de MyD88 compromete algunos sistemas de reparación del ADN, de manera que la inducción del daño al ADN en células cancerosas usando agentes de quimioterapia genotóxicos debería de incrementar enormemente la apoptosis en ausencia de MyD88 en estas células. Y de hecho se muestra que la inhibición de MyD88 amplifica sinérgicamente la apoptosis inducida por agente de quimioterapia que induce daño al ADN y no por quimioterapia que actúa en otras rutas.

Ejemplo 3: Cribado para compuestos que inhiben la interacción entre MyD88 y ERK MAP cinasa

El objetivo es seleccionar de diferentes bibliotecas pequeñas moléculas o péptidos que pueden inhibir la interacción de MyD88 con fosfo-ERK. Sobre la base de nuestros datos, es conocido que la sobreexpresión de MyD88 en una célula induce la activación de las rutas tanto de ERK como de Nf-kB, ilustrado mediante la fosforilación de ERK, la translocación nuclear de Nf-kB, y la activación de factores de transcripción aguas abajo. Por lo tanto, se diseña una técnica de cribado de dos etapas.

Se utilizan estirpes celulares (HCT116, A375, Hela) que expresan de forma estable al mismo tiempo dos constructos diferentes:

- 1 – ADNc de luciferasa bajo el control del promotor de SRE (ruta de ERK) o el promotor de Nf-kB (ruta de Nf-kB).
- 2 – ADNc de MyD88 bajo el control de un promotor inducible por antibiótico (doxiciclina).

En estas células, 24 h al añadir doxiciclina en el medio de cultivo, se induce la sobreexpresión de MyD88 y se activa tanto la ruta de ERK como de Nf-kB, activando por lo tanto la actividad de luciferasa.

Para evaluar el efecto de pequeñas moléculas o péptidos, sobre las interacciones de MyD88, se añadirán moléculas candidato al mismo tiempo que la doxiciclina en el medio, y la actividad de luciferasa se monitorizará 24 h posteriormente. En esta etapa se observan cuatro resultados diferentes como se muestra a continuación:

	Actividad de luciferasa en células que expresan SRE-Luc	Actividad de luciferasa en células que expresan Nf-kB Luc	Relevancia biológica
Caso 1	SÍ	SÍ	Ninguna actividad inhibidora para la molécula
Caso 2	SÍ	NO	Inhibición específica de la interacción MyD88-IRAK 1.

Caso 3	NO	SÍ	Inhibición específica de la interacción MyD88-ERK
Caso 4	NO	NO	Inhibición de la interacción de MyD88 en ambas rutas.

Este ensayo se puede adaptar para que se adapte en análisis de cribado de alto rendimiento.

Las moléculas detectadas en el primer ensayo de cribado, que muestran capacidades inhibitoras para las interacciones MyD88-ERK, se usan en un segundo ensayo funcional basado en un ensayo de formación de focos.

Es sabido que los fibroblastos inmortalizados NIH3T3 se pueden transformar mediante la transfección de la combinación de los oncogenes Ras y Myc. Se muestra que la sustitución de Ras por MyD88 también puede inducir transformación, pero una forma mutada de MyD88, incapaz de unirse a ERK, no induce la transformación. La lectura para este ensayo es tinción con violeta de cristal.

Sobre la base de estos datos, las células NIH3T3 son transfectadas con MyD88 y el oncogén Myc, y se tratan al mismo tiempo con las moléculas seleccionadas procedentes del primer cribado, y se monitoriza la formación de focos. Si una molécula es capaz de bloquear la interacción MyD88-ERK, ésta bloquea la formación de focos.

Ejemplo 4: Ensayos de combinación

Los ensayos de combinación se llevaron a cabo en las estirpes celulares HCT116 p53+/+ o p53-/- shMyD88, en las que la extinción de MyD88 se obtiene tras 48 h de tratamiento con doxiciclina. Se usaron cuatro agentes de quimioterapia diferentes (cisplatino, oxaliplatino, etopósido, y paclitaxel). Cada ensayo de combinación está compuesto de tres conjuntos:

Conjunto 1 = células + doxiciclina sola

Conjunto 2 = células + quimioterapia sola

Conjunto 3 = células + doxiciclina + quimioterapia.

Cada conjunto contiene un intervalo de 5 concentraciones diferentes (realizadas por duplicado) como sigue:

- Tratamiento con doxiciclina: 0-1-2-4-8-16 µg/ml
- Tratamiento con cisplatino: 0-6,25-12,5-25-50-100 µM.
- Tratamiento con oxaliplatino: 0-8,75-17,5-35-70-140 µM.
- Tratamiento con etopósido: 0-520,5-1041-2082-4164-8328 nM.
- Tratamiento con paclitaxel: 0-4,5-9-18-36-72 nM.

En el día 0, las estirpes celulares HCT116 shMyd88 p53+/+ o p53-/- se colocaron en placas de 96 pocillos a 10000 células/pocillo.

En el día 1, las células del Conjunto 1 y 3 se trataron con doxiciclina, y las células del Conjunto 2 se dejaron en medio de cultivo.

En el día 3, las células del Conjunto 1 se dejaron en medio que contiene doxiciclina, las células del Conjunto 2 y 3 se trataron con quimioterapia.

En el día 6, el porcentaje de células viables en cada pocillo se midió mediante un ensayo de MTS. Los datos en bruto se analizaron usando el software CompuSyn, y se generaron índices de combinación que indican la presencia o ausencia de sinergia.

Los resultados demuestran que el silenciamiento de Myd88 sinergiza con quimioterapia que induce daño al ADN.

A continuación, en la tabla se muestra el índice de combinación para diversas condiciones de combinación entre silenciamiento de MyD88 (tratamiento con doxiciclina) y diferentes agentes de quimioterapia en células shMyD88 inducibles por DOX HCT116 p53+/+ o p53-/-.

Índice de Combinación (CI)				
	HCT116 p53+/+ shMyD88		HCT116 p53-/- shMyD88	
Combinación	ED50	ED90	ED50	ED90
Doxiciclina-Cisplatino	0,80617	0,55211	0,77924	0,33163
Doxiciclina-Oxaliplatino	1,31915	0,34733	2,57479	0,79354
Doxiciclina-Etopósido	1,29922	3,88214	6,94130	1,53727
Doxiciclina-Paclitaxel	1,72610	6,14818	3,18398	3,32329

Sinergia = IC < 1

Sin Sinergia = IC > 1

Ejemplo 5: Protocolo de ensayo de combinación *in vivo*

Células HCT116 p53+/+ shMyD88 se inyectaron subcutáneamente en el flanco de ratones atímicos. Tras el inicio del tumor (200 mm³), se crearon cuatro grupos de ratones:

- Grupo de control: ratones que reciben glucosa al 3% en agua de beber.
- Grupo de doxiciclina: ratones que reciben glucosa al 3% + doxiciclina 2 mg/ml en agua de beber.
- Grupo de cisplatino: ratones que reciben glucosa al 3% en agua de beber, y cada dos días inyección intraperitoneal de cisplatino a una dosis de 0,5 mg/kg.
- Grupo de combinación: ratones que reciben glucosa al 3% + doxiciclina 2 mg/ml en agua de beber, y cada dos días inyección intraperitoneal de cisplatino a una dosis de 0,5 mg/kg.

El volumen tumoral se midió cada 3 días y se monitorizó hasta el final del protocolo.

Ejemplo 6: Ensayos para medir la inhibición de la interacción entre MYD88 y ERK MAP CINASA1) Ensayo de ligación por proximidad

El ensayo de ligación por proximidad se usa para determinar la interacción endógena de proteína-proteína, basado en dos anticuerpos primarios creados en diferentes especies que reconocen los antígenos diana. Los anticuerpos secundarios específicos de las especies, denominados sondas PLA, cada una con una única hebra de ADN corto unida a él, se unen a los anticuerpos primarios.

Cuando las sondas PLA están muy próximas (< 40 nm), las hebras de ADN pueden interaccionar a través de una adición subsiguiente de otros dos oligonucleótidos de ADN que forman un círculo. Tras la unión de los dos oligonucleótidos añadidos mediante ligación enzimática, se amplifican vía amplificación de círculo rodante usando una polimerasa.

Por lo tanto, se ha producido la replicación varios cientos de veces del círculo de ADN, y las sondas oligonucleotídicas complementarias marcadas resaltan el producto. La concentración elevada resultante de fluorescencia en cada producto de amplificación de una sola molécula es fácilmente visible como un punto brillante distinto cuando se visualiza con un microscopio de fluorescencia.

Protocolo detallado:

- Las células se estimularon con 10% de FCS durante 5 y 10 minutos, se fijaron con 4% de PFA, se permeabilizaron y se bloquearon con 0,3% de saponina, 10% de BSA en PBS.
- Entonces las células se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios contra MyD88 (Assay Designs) y p-ERK (Sigma-Aldrich).
- Después de 3 lavados con PBS 1X, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados enlazados a ADN (PLA) durante 2 horas a 37°C.
- Después de 2 lavados con PBS 1X, se añade la disolución de hibridación, 15 min. a 37°C.
- Después de 2 lavados con TBS-T, se añade Duolink polimerasa durante 90 min. a 37°C.
- Después de 2 lavados con TBS-T, se añade disolución de detección durante 60 min. a 37°C.
- Después se realizan secuencialmente lavados de 2 min. como se cita: SSC 2X, SSC 1X, SSC 0,2X, SSC

0,02X y EtOH 70%.

- Las células se montan usando medio de montaje Duolink.

5 2) Ensayo de inmunoprecipitación:

El ensayo de inmunoprecipitación se usa para visualizar la interacción proteína-proteína.

- Siémbrense $3 \cdot 10^6$ células HEK293T en placas de 10 cm.
- Después de 24 h, transféctense las HEK293T mediante 3 µg del plásmido de interés.
- 48 h después de la transfección, las células se cosechan y se lisan usando un amortiguador de lisis que contiene: 1% de NP40, 20 mM de Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, y 2 mM de EDTA.
- Tras la lisis y la dosificación de proteína, se usan 1-2 mg de proteínas por condición para llevar a cabo el experimento de inmunoprecipitación.
- Los lisados se incuban con 30 µl de perlas de proteína A sefarosa durante 30 minutos en el rotor a 4°C.
- Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 2000 rpm a 4°C.
- Transferir los sobrenadantes a nuevos tubos.
- Añadir 2-5 µg del anticuerpo a los lisados aclarados previamente. Incubar durante 2-4 horas en el rotor a 4°C.
- Añadir 50 µl de perlas de proteína A sefarosa. Incubar los tubos en el rotor durante 1 hora a 4°C.
- Centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante, y conservar las perlas.
- Lavar las perlas 3-4 veces con 1 ml de amortiguador de lisis. Centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm a 4°C.
- Añadir 50 µl de amortiguador de Laemmli 2X a las perlas a fin de eluir las proteínas.
- La interacción entre las 2 proteínas se visualiza mediante WB.

Referencias

Rakoff-Nahoum S. *et al.* 2007, *Science* Coste I *et al.* 2010 *J Clin Invest*
 Sung Hee Lee *et al.*, 2010, *Nature Medicine* Dai Y *et al.* 2008. *Blood*
 Yacoub A. *et al.* 2003. *Radiat Res*

45 Listado de secuencias

<110> CENTRE LEON BERARD

<120> Tratamiento de cáncer mediante inhibición de la interacción de MYD88/ERK MAP cinasa

<130> D29805

<150> EP11306686.4

<151> 2011-12-16

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNip MyD2

ES 2 595 408 T3

	<400> 1		
	ggaaugugac uuccagaccu u	21	
5	<210> 2		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> ARNip MyD3		
10	<400> 2		
	auuugcacuc agccucucu uuu	23	
	<210> 3		
	<211> 22		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> mirARNhp codificante		
20	<400> 3		
	cggaccctaa atccaataga aa	22	
	<210> 4		
25	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> mirARNhp antisentido		
	<400> 4		
	ttctattgg atttagggtc ct	22	
35	<210> 5		
	<211> 97		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> mirARNhp inducible lentiviral TRIPZ humano		
	<400> 5		
	tgctgttgac agtgagcgcg gaccctaaat ccaatagaaa tagtgaagcc acagatgtat	60	
45	ttctattgga tttaggggtcc ttgcctactg cctcgga	97	

REIVINDICACIONES

1. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer, que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar por lo menos un compuesto candidato;
- b) poner en contacto por lo menos un compuesto candidato con una proteína ERK MAPK y una proteína MyD88, en condiciones adecuadas para permitir que ERK MAPK y MyD88 interactúen en ausencia de la molécula candidata;
- c) determinar la interacción de ERK MAPK y MyD88 como se mide en presencia y en ausencia de por lo menos un compuesto candidato; y
- d) seleccionar un compuesto candidato que inhibe la interacción de ERK MAPK y MyD88.

2. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según la reivindicación 1, en el que una o ambas de ERK MAPK y MyD88 están unidas a un marcador detectable.

3. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la interacción de ERK MAPK y MyD88 se determina usando un sistema de dos híbridos, cromatografía de afinidad, coimmunoprecipitación, fraccionamiento subcelular y aislamiento de complejos moleculares grandes, inmunotransferencia, inmunomarcado, un ensayo de ligación por proximidad, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de biacore o un ensayo de interacción por captura con GST.

4. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente de quimioterapia que induce daño al ADN se selecciona de entre el grupo que consiste en oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etopósido, bleomicina, y mezclas de los mismos.

5. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.

6. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer, que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar por lo menos un compuesto candidato;
- b) proporcionar unas células transformadas que expresan de manera estable MyD88 bajo el control de un promotor inducible y que expresan un gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de MAPK seleccionado de entre el promotor de SRE, el promotor de ELK y el promotor de Myc;
- c) inducir la sobreexpresión de MYD88 en dichas células transformadas en presencia de por lo menos un compuesto candidato;
- d) medir la expresión del gen indicador y seleccionar por lo menos un compuesto candidato que inhiba la expresión del gen indicador;
- e) proporcionar unos fibroblastos inmortalizados transformados mediante transfección con los oncogenes MyD88 y Myc;
- f) monitorizar la formación de focos en presencia de por lo menos un compuesto candidato seleccionado en la etapa d) y en presencia de por lo menos un agente de quimioterapia que induce daño al ADN, y seleccionar un compuesto candidato que potencie el efecto inhibitorio del agente de quimioterapia que induce daño al ADN sobre la formación de focos.

7. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según la reivindicación 6, en el que en la etapa b), el promotor de la ruta de MAPK es el promotor de SRE.

8. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que el

método comprende además las etapas siguientes:

- 5 - proporcionar unas células transformadas que expresan de manera estable MyD88 bajo el control de un promotor inducible y que expresan un gen indicador bajo el control de un promotor de la ruta de inflamación seleccionado de entre el promotor de Nf-kB y el promotor de ISRE;
 - inducir la sobreexpresión de MYD88 en dichas células transformadas en presencia de por lo menos un compuesto candidato;
 - 10 - medir la expresión del gen indicador y seleccionar un compuesto candidato que no inhiba la expresión del gen indicador.
9. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según la reivindicación 8, en el que el promotor de la ruta de inflamación es el Nf-kB.
- 15
10. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que en la etapa b), las células se seleccionan de entre la estirpe celular HCT116, la estirpe celular A375 y una estirpe celular HeLa.
- 20
11. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el promotor inducible es un promotor inducible por antibióticos.
- 25
12. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que los fibroblastos inmortalizados son fibroblastos inmortalizados NIH3T3.
- 30
13. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer intestinal, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino.
- 35
14. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en el que el agente de quimioterapia que induce daño al ADN se selecciona de entre oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, etopósido, bleomicina, y mezclas de los mismos.
- 40
15. Método para seleccionar *in vitro* compuestos que pueden potenciar el efecto de un agente de quimioterapia que induce daño al ADN para el tratamiento de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en el que el compuesto candidato de la etapa a) se selecciona según un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

FIG. 1A

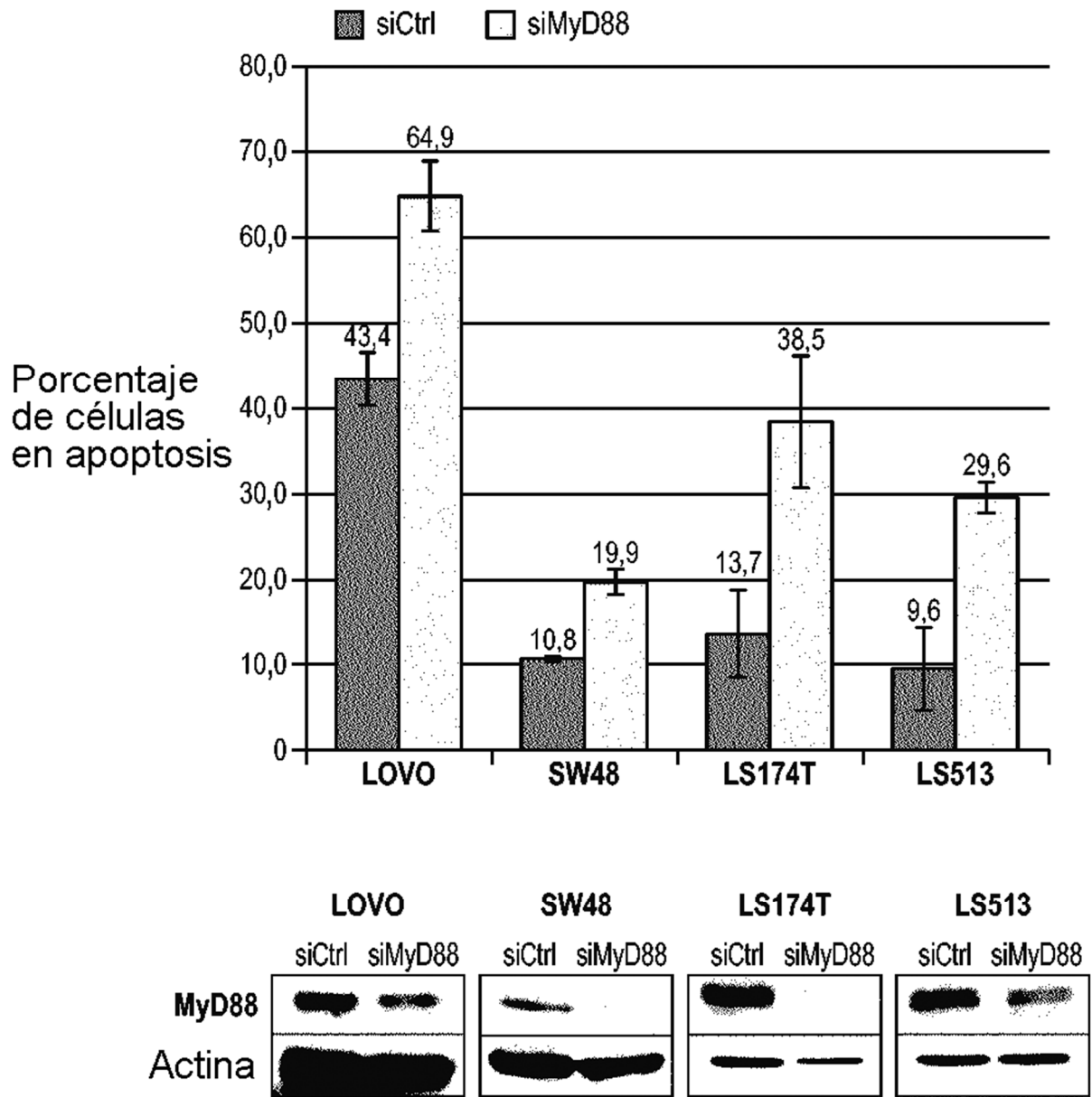


FIG. 1B

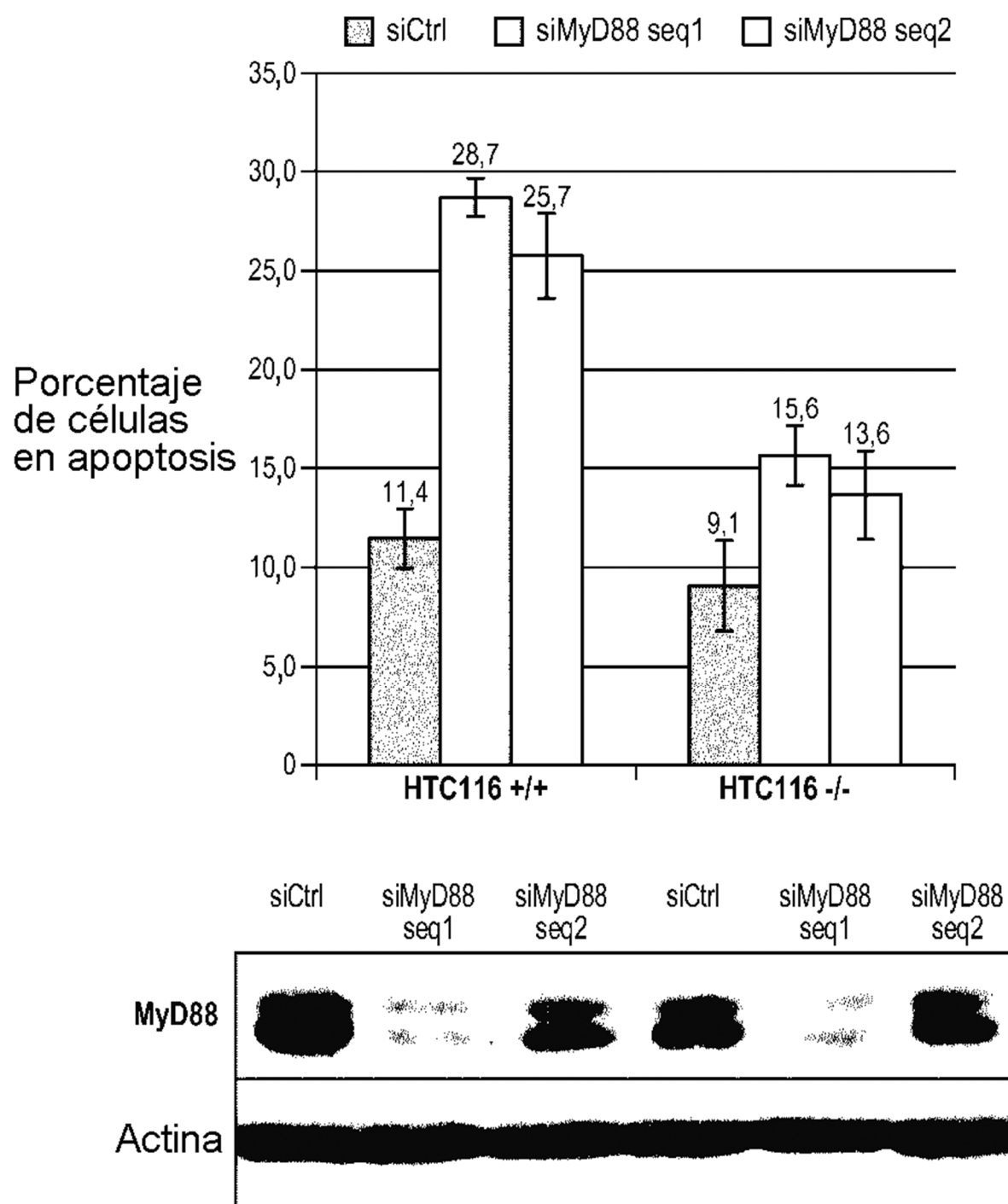


FIG. 2

