

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 091**

51 Int. Cl.:

A61K 31/135 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
C07D 263/06 (2006.01)
C07D 295/092 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2010 PCT/US2010/002383**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011 WO11025545**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2010 E 10757646 (4)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2496225**

54 Título: **Inhibidores de esfingosina Tipo I y métodos para preparar y emplear los mismos**

30 Prioridad:

31.08.2009 US 584131

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.06.2019

73 Titular/es:

ENZO THERAPEUTICS, INC. (50.0%)
Enzo Biochem Inc. 527 Madison Avenue 9th Floor
New York, NY 10022, US y
VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY
(50.0%)

72 Inventor/es:

ZIPKIN, ROBERT, ELLIOT;
ADAMS, JEFFREY, KROLL y
SPIEGEL, SARAH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 718 091 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

Inhibidores de esfingosina Tipo I y métodos para preparar y emplear los mismos

Campo de la invención

5 La invención generalmente se refiere al campo de las composiciones, que incluyen análogos e inhibidores de esfingosina que son útiles para la mediación, regulación e inhibición de esfingolípidos. Esta invención se refiere a un compuesto para emplear como se define en las reivindicaciones el cual inhibe o regula la quinasa esfingoquinasa Tipo I (SphK1). Este compuesto es útil en el tratamiento de un cáncer del sistema nervioso central, que incluye el glioblastoma multiforme.

Antecedentes de la invención

10 La esfingosina-1-fosfatasa (S1P), un potente mediador lipídico producido a partir de esfingosina mediante las esfingosinas quinasa (SphKs), regula muchos procesos importantes para la progresión del cáncer, incluyendo el crecimiento y la supervivencia celular (Spiegel et al. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 4:397-407, 2003). Al contrario de la S1P, sus precursores, esfingosina y ceramida, están asociados con la detención del crecimiento y la inducción de la apoptosis (Ogretman y Hannun, *Nature Rev Cancer* 4:604-616, 2004). Por tanto, el equilibrio entre estos metabolitos de esfingolípidos interconvertibles se ha considerado como un control determinante del futuro celular (Cuvillier et al., *Nature* 381:800-803, 1996). Numerosos estudios han demostrado que perturbaciones en el control de S1P/ceramida están implicadas en la regulación de la resistencia a la quimioterapia y a la terapia de radiación de células neoplásicas, incluyendo aquellas de origen hematopoyético (Ogretman et al., anteriormente citado; Hait et al., *Biochim Biophys Acta* 1758:2016-2026, 2006; y Milstien y Spiegel, *Cancer Cell* 9:148-150, 2006).

20 Dos isoenzimas Sphk, SphK1 y SphK2, han descrito que, aunque comparten muchas características (Kohama et al., *J. Biol Chem* 273:23722-23728, 1998, y Liu et al., *J. Biol Chem* 275:19513-19520, 2000) muestran distintas funciones. SphK1 promueve el crecimiento y la supervivencia celular (Olivera et al., *J Cell Biol* 147:545-558, 1999; Xia et al., *J. Biol Chem* 277:7996-8003, 2002; Bonhoure et al., *Leukemia* 20:95-102, 2006; y Sukocheva et al., *J Cell Biol* 173:301-310, 2006), mientras que la SphK2, cuando se sobre-expresa, tiene los efectos contrarios (Maceyka et al., *J Biol Chem* 280:37118-37129, 2005; y Okada et al., *J Biol Chem* 280:36318-36325, 2005). SphK1 es una enzima clave que regula el control de S1P/ceramida (Maceyka et al., anteriormente citado; Berdyshev et al., *Cell Signal* 18:1779-1792, 2006; y Taha et al., *FASEB J* 20:482-484, 2006). De hecho, S1P y SphK1 se han relacionado hace mucho tiempo con la resistencia tanto de células leucémicas primarias como de líneas celulares de leucemia para la apoptosis inducida por los agentes citotóxicos empleados habitualmente (Cuvillier et al., *Nature*, 2004, anteriormente citado; Cuvillier et al., *J. Biol Chem* 273:2910-2916, 1998; Cuvillier et al., *Blood* 98:2828-2836, 2001; y Jendiroba et al., *Leuk Res* 26:301-310, 2002). Inhibidores específicos de SphKs no enzimáticos, tal como L-treo-dihidroesfingosina (safingol) y N,N-dimetilesfingosina (DMS), son citotóxicos para las células de leucemia (Jarvis et al., *Mol Pharmacol* 54:844-856, 1998; y Jendiroba et al., 2002, anteriormente citado). De manera interesante, las células leucémicas mielógenas HL-60 con resistencia múltiple a fármacos, fueron más sensibles a DMS que las células parentales (Jendiroba et al., 2002, anteriormente citado). Por otra parte, la actividad de SphK1 fue más baja en las células HL-60 sensibles a doxorubicina o etopósido que en las células HL-60 positivas a MDRI o MRP1. La expresión impuesta de SphK1 en células HL-60 sensibles bloquearon la apoptosis, mientras que la regulación a la baja de Sphk1 superó la quimio-resistencia mediante la inducción de la apoptosis dependiente de la mitocondria (Bonhoure et al., 2006, anteriormente citado). Estas observaciones adquieren mayor significancia a la luz de la evidencia de que la expresión de MDR es un fuerte indicador pronóstico en la leucemia mielógena aguda (AML, de sus siglas en inglés) (Filipits et al., *Leukemia* 14:68-76, 2000) y que el fenotipo MDR, que normalmente se alcanza después del tratamiento de la AML con antraciclinas o alcaloides basados en vegetales, se cree que representa un obstáculo para el éxito de la quimioterapia. Además, la resistencia de las células de leucemia mieloide crónica humana K562 a Imitinib, un inhibidor de la Bcr-Abl tirosina quinasa, se correlaciona con la expresión de SphK1 y la generación de S1P, mientras que la regulación a la baja de SphK1 incrementa la sensibilidad a la apoptosis inducida por Imitinib en las células resistentes (Baran et al., *J Biol Chem* 282:10922-10934, 2007). Por tanto, el desarrollo de inhibidores eficaces y específicos de SphK1 podrían ser útiles no sólo en la disminución de los niveles de S1P pro-supervivientes, sino también en la generación de ceramida potenciadora, un proceso que media, al menos en parte, las acciones pro-apoptóticas de determinados agentes citotóxicos (Maggio et al., *Cancer Res* 64:2590-2600, 2004; Rahmani et al., *Cancer Res* 65:2422-2432, 2005; y Rosato et al., *Mol Pharmacol* 69:216-225, 2006).

55 Los inhibidores de la esfingosina quinasa se han descrito (Kim et al., *Bioorg & Med Chem* 13:3475-3485, 2005; Kono et al., *J. Antibiotics* 53:459-466, 2000; Kono et al., *J. Antibiotics* 53:753-758, 2000; Marsolais & Rosen, *Nature Reviews/Drug Discovery* 8:297-307, 2009; y US 2008/0167352 A1 (Smith et al., publicada el 10 de Julio, 2008). Sin embargo, ninguna de estas publicaciones describe los nuevos inhibidores de esfingosina quinasa Tipo 1 de la presente memoria. Se han descrito también derivados de esfingosina de análogos modificados de haluro (Qu et al., *Bioorg & Med Cham Letters* 19:3382-3385 (2009).

En la Solicitud de Patente U.S. Nº de Serie 12/387.228 (archivado el 29 de Abril, 2009), se describe un potente inhibidor de SphK1 (SK1-I), soluble en agua, que desencadena múltiples perturbaciones en la activación de varias señales y proteínas relacionadas con la supervivencia. SK1-I induce notablemente la apoptosis en líneas celulares

de la leucemia humana, así como en blastos obtenidos a partir de pacientes con AML, e inhiben el crecimiento de tumores xenoinjertados de AML. El SK1-I sirve como modelo para otros compuestos relacionados que se describen además a continuación.

5 El glioblastoma multiforme (GBM) es de los tumores del sistema nervioso central primario más prevalente y de tipo letal, con una media de supervivencia de 10-12 meses, incluso después de cirugía agresiva, radiación y quimioterapia avanzada (Maher et al., *Genes Dev* 15:1311-1333, 2001). Un mal pronóstico de los pacientes con GBM se ha correlacionado recientemente con la expresión elevada de la esfingosina quinasa Tipo 1 (SphK1) (Van Brocklyn et al., *J Neuropathol Exp Neurol* 64:695-705, 2005, Li et al., *Clin Cancer Res* 14:6996-7003, 2008), una de las isoenzimas SphK que genera el mediador lipídico pleiotrópico, la esfingosina-1-fosfatasa (S1P). La S1P se ha implicado en la etiología de la GMB debido a su implicación en varios procesos celulares importantes particularmente para la progresión del cáncer, incluyendo el crecimiento, supervivencia, migración, invasión, crecimiento tumoral, angiogénesis, y metástasis (Van Brocklyn et al., *Cancer Lett* 181:195-204, 2002; Lepley et al., *Cancer Res.* 65:3788-3795, 2002; Radeff-Huang et al., *J Biol Chem* 282:863-870, 2007; y Young et al., *Exp Cell Res* 313:1615-1627, 2007). Los efectos biológicos de este lípido transmitido en el suero están mediados por una familia de cinco receptores unidos a la proteína G específica, designados como S1P₁₋₅. (Murph y Mills, *Expert Rev Mod Med* 9:1-18, 2007). De estos, S1P_{1,3}, se expresan en la mayoría de las líneas celulares del glioblastoma humano y están implicados en la proliferación mediada por S1P (Van Brocklyn et al., *Cancer Lett* 181:195-204, 2002, anteriormente citado). Aunque S1P no tiene efecto en la secreción de metaloproteinasas de la matriz, mejora la adhesión celular del glioblastoma y estimula también su motilidad e invasividad (Van Brocklyn et al., *Cancer Lett* 199:53-60, 2003). Debido a que S1P está presente a altos niveles en el tejido cerebral, es posible que la señalización autocrina o paracrina mediante S1P a través de sus receptores mejore tanto la proliferación de células del glioma como la invasividad (Anelli et al., *J Biol Chem* 283:3365-3375, 2008).

Para explorar las implicaciones terapéuticas del SphK1 diana para el tratamiento de GBM, se examinaron los efectos de un inhibidor de SphK1 específico de isoenzima recién desarrollado, SK1-I (Paugh et al., *Blood* 112:1382-1391, 2008), y se encontró que inhibe el crecimiento de GMB *in vitro* e *in vivo*. Estos inhibidores SphK1 específicos son útiles para el tratamiento, bien en solitario o en combinación, con agentes quimioterapéuticos avanzados.

Jeremias et al., *Acta Neurochirurgica*, 2004, 146(7):721-729 describe el uso de ceramida en el tratamiento del glioblastoma multiforme (GBM). Bektas et al., *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2009, 64(5):1053-1058 describe el uso de 2-(P-hidroxianilino)-4-(p-clorofenil)-tiazol como un inhibidor de la esfingosina quinasa Tipo 1 (Sphk1) en el tratamiento del GBM.

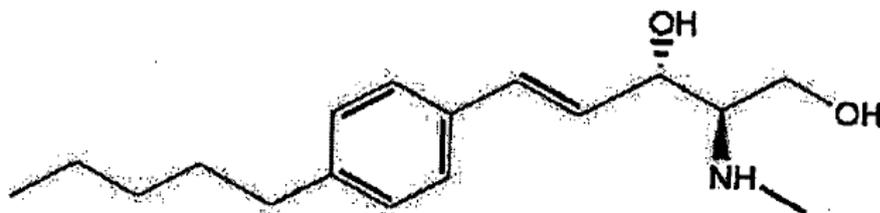
Delgado et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1758(12):1957-1977, Wong et al., *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 52(12):3618-3626 y de Jonghe et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1999, 9(21):3175-3180 describen otros inhibidores de Esfingosina Quinasas.

Van Brocklyn examina en *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2007, 7(10):984-990 las rutas de señalización de esfingolípidos como dianas terapéuticas potenciales en gliomas. En van Brocklyn et al., *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2005, 64(8):695-705, el ARN de interferencia se emplea para genosuprimir la cantidad de SphK1 o SphK2. Además, en van Brocklyn et al., *Cancer Letters*, 2003, 199(1):53-60, se describe el efecto promotor de esfingosina-1-fosfato en la motilidad e invasividad de las células del glioblastoma multiforme humano.

Compendio de la invención

40 Esta invención proporciona:

[1] una composición que comprende el compuesto



para usar en el tratamiento de un tumor del sistema nerviosos central, en donde el tumor es un glioblastoma.

Se proporciona además la composición para el uso de [1], en donde el tumor es un glioblastoma multiforme.

45 Esta divulgación proporciona también un método para controlar el transcurso farmacocinético de un fármaco y detectar el fármaco administrado en intervalos seleccionados, monitoreando de esta manera el transcurso

farmacocinético del fármaco.

Esta invención proporciona un uso, como se define en las reivindicaciones, para tratar tumores del sistema nervioso central en el que el compuesto descrito anteriormente se administra a un sujeto o paciente que tiene un tumor o tumores del sistema nervioso central.

5 A continuación se proporcionan en detalle otros aspectos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 son gráficas y blottings que muestran que la expresión a la baja de SphK1 o su inhibición mediante SK1-I reduce el crecimiento de las células del glioma.

10 La Figura 2 son gráficas y blottings que muestran que SK1-I atenúa la migración y la invasión de células del glioblastoma.

La Figura 3 son gráficas y blottings que muestran el efecto de SK1-I sobre los metabolitos de esfingolípidos y JNK.

La Figura 4 son gráficas y blottings que muestran el efecto de SK1-I sobre las células del glioblastoma no estabilizadas.

15 La Figura 5 son gráficas y fotografías que muestran que SK1-I disminuye el crecimiento *in vivo* del tumor xenoinjertado de glioblastoma de ratones nu/nu.

La Figura 6 ilustra la histología del tumor en la que secciones del tumor embebidas en parafina se tiñeron con H y E (hematoxilina-Eosina) o se inmuno-tiñeron con CD31.

La Figura 7 son gráficas y micrográficas que muestran que SK1-I mejora la supervivencia de los ratones con células LN229 implantadas intracranealmente.

20 La Figura 8 son gráficas y micrográficas que muestran el efecto de regulación a la baja o de inhibición de SphK1 en la formación de lamelipodios inducidos por PMA.

La Figura 9 son gráficas y blottings que muestran que SK1-I atenúa la migración y la fosforilación de Akt en células U373.

La Figura 10 son gráficas y blottings que muestran que SK1-I induce la apoptosis de las células LN229.

25 Descripción detallada de la invención

Como se emplea en la presente memoria, las formas en singular “un”, “una” y “el” se destinan a incluir también las formas en plural, a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. Además, el uso de “o” está destinado a incluir “y/o”, a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera.

30 Las composiciones y los análogos descritos se diseñan de distintas formas, que incluyen su similitud al sustrato, al producto formado mediante reacción del sustrato y la enzima, por ejemplo, esfingosina quinasa que incluyen esfingosina quinasa Tipo 1, y cualquiera de los intermedios formados en la reacción. Los productos de la reacción se caracterizan normalmente por una baja afinidad de unión, por ejemplo, baja Km. Aún así, proporcionando la suficiente afinidad de unión a los productos de reacción, las composiciones y análogos de la presente invención son útiles y producen de esta manera efectos inhibidores o reguladores útiles frente a la enzima deseada.

35 Inhibición preferente de SphK1

Es deseable la capacidad para identificar compuestos y análogos que inhiben o regulan preferentemente a SphK1 en lugar de a SphK2. Es particularmente útil que la inhibición de SphK1 sea de cinco e incluso diez veces más que sobre SphK2.

40 La capacidad para inhibir SphK1 de manera diferencial a partir de SphK2 permite evaluar las actividades de SphK1 y SphK2 individualmente cuando ambas actividades están presentes en el extracto celular. Esto es fácil de llevar a cabo mediante un análisis de la cantidad de actividad SphK total (es decir, transformación de Sph en Sph-P) en ausencia del inhibidor (que deberá ser un compuesto de las actividades de SphK1 y SphK2 individuales) y en presencia del inhibidor SphK1 donde la actividad se deberá generar sólo por el SphK2. Ya que la actividad total, así como la contribución derivada del SphK2, son conocidas, una simple resta proporciona una estimación de la contribución inicial de SphK1 en el ensayo llevado a cabo en ausencia del inhibidor. Esto es útil para evaluaciones de diagnóstico o de pronóstico cuando son revisados en el contexto de enfermedades donde estos niveles son anormales en comparación con el estado saludable de un individuo.

45 La presente invención proporciona una composición para usar como se define en la reivindicación 1.

La composición descrita puede comprender además un marcador detectable. Tales marcadores detectables son

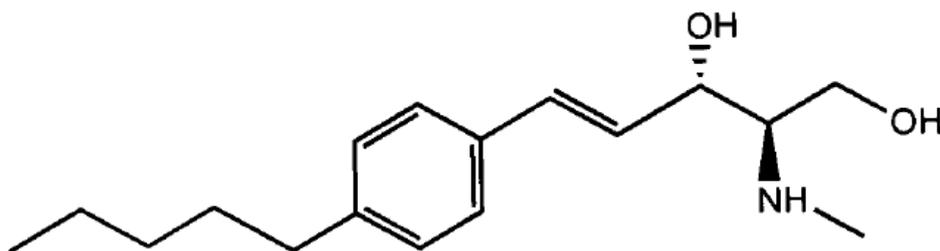
habituales y bien conocidos en la técnica. El marcador detectable puede comprender un ligando o un tinte fluorescente. En el caso del primero, se contemplan y son útiles biotina, digoxigenina o fluoresceína. Si se contemplan los tintes fluorescentes, se puede emplear un número de tales tintes, incluyendo la fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), 6-carboxifluoresceína (6-FAM), naftofluoresceína, rodamina, rodamina 6G, rodamina X, rhodol, sulforodamina 101, tetrametilrodamina (TAMRA), tetrametilrodaminaisotiocianato (TRITC), 4,7-diclororodamina, eosina, eosinisotiocianato (EITC), dansilo, hidroxycumarina, metoxicumarina o ácido p-(dimetil aminofenilazo) benzoico (DABCYL), tintes de cianina o derivados, y cualquier combinación de los anteriores.

Farmacocinéticas y manejo del paciente

Otro aspecto de la presente divulgación es el control del transcurso farmacocinético de un fármaco. En este aspecto, se administra a un sujeto o paciente un fármaco que comprende el compuesto descrito anteriormente. El fármaco administrado se puede detectar a intervalos seleccionados, controlando de esta manera el transcurso de las farmacocinéticas del fármaco. Esto es útil en el estudio y el control del manejo del paciente ya que se puede seguir, dentro de células, órganos o el sujeto o paciente como un todo, el transcurso y el progreso del fármaco administrado. Mediante la unión de las fracciones de señalización al compuesto y a los análogos, se puede llevar a cabo la toma de imágenes *in vivo* para detectar la presencia del fármaco dentro de células del sujeto o paciente. La tinción celular se puede llevar a cabo también para localizar la presencia del fármaco dentro de células de la muestra del paciente o espécimen. Se puede utilizar también radiactividad en forma de fármacos marcados radiactivamente, es decir, compuestos o análogos.

Indicaciones/Enfermedades

La característica importante de esta invención como se define en las reivindicaciones es para usarse en tratar tumores del sistema nervioso central. Este uso comprende que a un sujeto o paciente que tiene un tumor o tumores del sistema nervioso central se le administre el compuesto descrito anteriormente. Los tumores del sistema nervioso central comprenden el glioblastoma, y más particularmente, el glioblastoma multiforme (GBM). Es útil en el tratamiento del GBM el compuesto descrito anteriormente que inhibe SphK1, SK1-I, que tiene la estructura



El compuesto y los análogos descritos anteriormente pueden ser útiles para el tratamiento y el control de varias indicaciones y enfermedades. En la Serie N° 12/387.228, archivada el 29 de Abril, 2009, se divulgan las siguientes indicaciones y enfermedades: muerte o daño de células cancerosas (células de leucemia, células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer pancreático, células de cáncer de glioma, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de ovario, células de melanoma, células de cáncer renal); que causan que las células cancerosas experimenten la apoptosis; inhibición del crecimiento, de la metástasis y el desarrollo de quimio-resistencia en células cancerosas, tratamiento o reducción de los síntomas de la leucemia; incremento de la capacidad del agente anticanceroso para matar células cancerosas; inhibición de la señalización de la supervivencia en células cancerosas; atenuación de la reactividad inmunológica; y reducción de los síntomas de la esclerosis múltiple.

Además de las indicaciones y enfermedades anteriormente nombradas, el compuesto y los análogos pueden ser útiles para enfermedades asociadas con la muerte de células neuronales o la muerte de células musculares, tal como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral aminotrófica y distrofia muscular, SIDA, hepatitis fulminante, y enfermedades ligadas a la degeneración del cerebro (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, retinitis pigmentosa y degeneración cerebelar, mielodisplasias (por ejemplo, anemia aplásica, enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio, enfermedades hepáticas, tales como la hepatitis alcohólica, hepatitis B y hepatitis C, enfermedades articulares, tales como la osteoartritis, aterosclerosis, alopecia, daño de la piel debido a la luz ultravioleta, liquen plano, atrofia de la piel, cataratas y rechazos de injertos. Este compuesto y los análogos descritos en la presente memoria se pueden aplicar a la inmunopatología causada por el virus de la influenza. Otras enfermedades pueden incluir aquellas que implican endocitosis caveolar, formación de un microdominio de la membrana plasmática, señalización de la transmembrana o función de la integrina (por ejemplo, enfermedades inflamatorias que incluyen el cáncer, esclerosis múltiple (MS), riesgo protrombótico, colitis ulcerosa y enfermedad renal). Éstas podrían aparecer como resultado de una infección por bacterias, hongos o especies virales determinadas, por ejemplo, el virus SV40.

Entre otros usos del compuesto y análogos de la presente divulgación puede estar la inhibición de la angiogénesis en tumores, la modulación del sistema inmunológico mediante la alteración del tráfico linfocitario para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o la prolongación de la supervivencia de trasplantes de aloinjertos, y la prevención, inhibición o tratamiento del dolor neuropático. Se describe también el uso del presente compuesto y los análogos para el tratamiento o la prevención de trastornos o síndromes que incluyen trastornos proliferativos celulares, por ejemplo, cáncer, isquemia o reestenosis. El compuesto y los análogos de la presente divulgación se pueden usar también para investigar un modulador de trastornos/síndromes que incluyen los trastornos celulares proliferativos anteriormente mencionados (cánceres, isquemia o reestenosis).

Este compuesto y análogos pueden ser aplicables para el uso en el tratamiento o la atenuación de complicaciones en sujetos o pacientes que padecen de trauma o sepsis.

Otras afecciones patológicas que se pueden abordar a través del uso y la aplicación del presente compuesto y análogos incluyen enfermedades cardiovasculares, diabetes, derrames, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, enfermedades alérgicas, tales como la dermatitis, de linfocitos T colaboradores 1, enfermedades relacionadas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, cáncer y trastornos neurodegenerativos, algunas de las cuales ya se han descrito anteriormente.

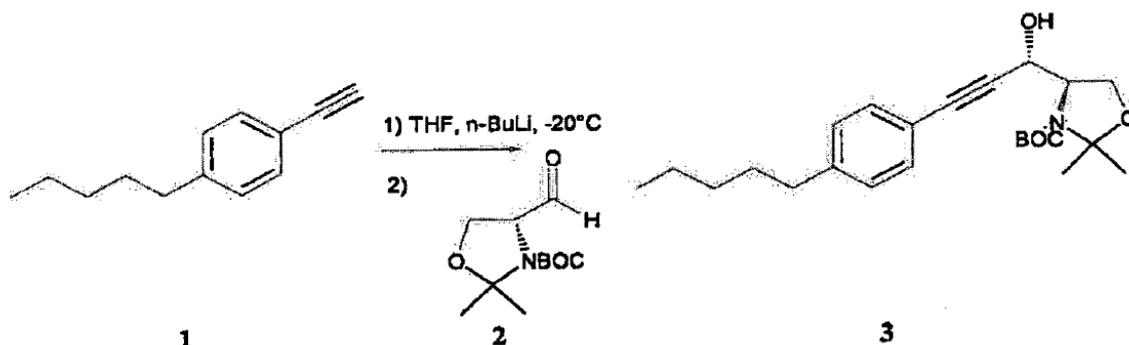
Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

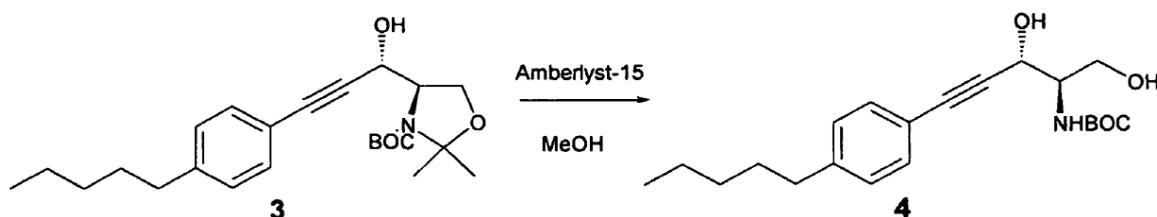
Ejemplo 1. Síntesis de BML-258

El compuesto descrito y empleado a continuación, BML-258, se sintetizó según el siguiente protocolo y procedimientos.

Protocolo sintético de BML-258



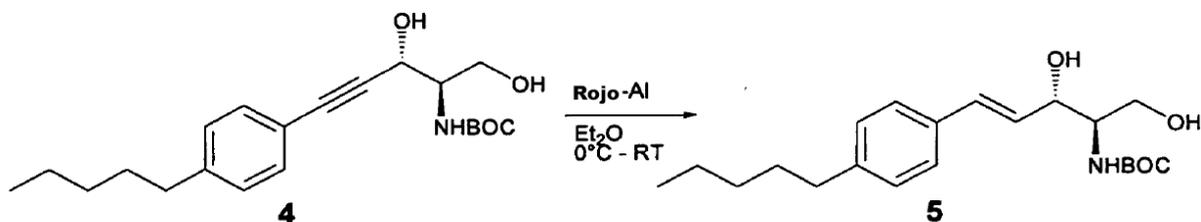
A 4-n-pentilfenilacetileno 1 (3,343 g, 0,01776 mol) en 65 mL de THF seco a -20°C bajo una atmósfera de N_2 , se añadió n-BuLi (10,2 mL de 1,6M en hexanos, 0,01628 moles) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a -20°C durante 2 horas. Se añadió metil (R)-(+)-3-(t-butoxicarbonilo)-2,2-dimetil-4-oxazolidinacarboxilato 2 (3,393 g, 0,01480 moles) en 25 mL de THF seco a través de una cánula/ N_2 . La reacción se agitó durante la noche a -20°C . La TLC (Cromatografía en capa fina, de sus siglas en inglés) (acetato de etilo 20%/hexanos) indicó el fin de la reacción. La mezcla se diluyó con Et_2O y se lavó cuidadosamente con agua y salmuera. La cromatografía en columna flash (acetato de etilo 12%/hexanos, sílica gel) produjo 4,50 g (73%) de una mezcla de productos eritro y treo. La HPLC preparatoria (Dynamax Si, acetato de etilo 15%/hexanos, 260 nm) produjo 3,71 g de eritro 3 y 0,49 g de treo. $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ eritro: 7,34-7,32(d, 2H), 7,12-7,09(d,2H), 5,19-5,16(d, 1H), 4,73-4,70(d, 1H), 4,26-3,96(m, 3H), 2,61-2,56(t, 2H), 1,62(s,3H), 1,60-1,50(m,2H), 1,54(s, 3H), 1,50(s,9H), 1,34-1,27(m,4H), 0,91-0,86(t,3H).



A oxazolidina 3 (3,48 g, 0,00814 moles) en 100 mL de MeOH se añadió Amberlyst-15 (200 mg). La reacción se agitó

durante la noche a temperatura ambiente (RT, de sus siglas en inglés). El TLC (Acetato de etilo 30%/hexanos) indicó el fin de la reacción. La mezcla se filtró y se realizó una cromatografía flash (MeOH 5%/cloruro de metileno, gel de sílice) para proporcionar 2,44g (79%) de aminoalcohol 4. $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 7,34-7,32(d, 2H), 7,12-7,09(d, 2H), 5,45-5,38(d, 1H), 4,88-4,82(m, 1H), 4,25-4,19(m, 1H), 3,91-3,80(m, 2H), 3,26-3,23(d, 1H), 2,61-2,56(t, 2H), 1,63-1,54(m, 2H), 1,49(s, 9H), 1,35-1,26(m, 4H), 0,91-0,86(t, 3H).

5

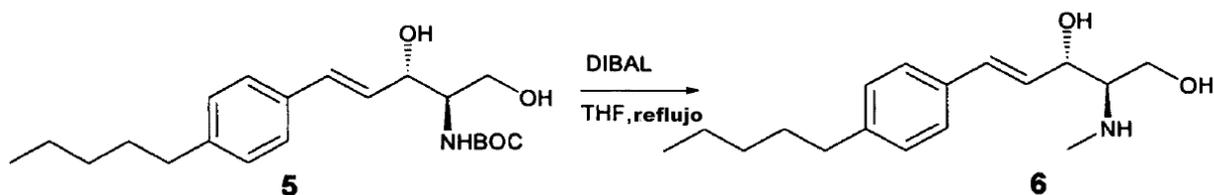


Al alquino 4 (2,44g, 0,00646 moles) en 125 mL de Et_2O seco a 0°C bajo una atmósfera de N_2 , se añadió Rojo-Al (9,85 mL de 65% en peso en tolueno, 0,03232 moles) gota a gota. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente tras la adición y se agitó durante 36 horas. El TLC (Acetato de etilo 40%/hexanos) indicó el fin de la reacción. La reacción se enfrió a 0°C y se finalizó lentamente con disolución NaOH 15%. Esta mezcla se agitó vigorosamente hasta que ambas capas se aclararon (45 min). Las capas se separaron y se extrajo la capa acuosa con cloroformo (3X). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaOH 15%, agua y salmuera. La cromatografía flash (gradiente de MeOH 5% /cloruro de metileno para MeOH/cloruro de metileno 20% + NH_4OH 1%, gel de sílice) produjo 1,76 g (72%) del alqueno trans 5.

10

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 7,31-7,29(d, 2H), 7,15-7,12(d, 2H), 6,70-6,65(d, 1H, $J=16\text{Hz}$), 6,26-6,18(dd, 1H, $J=16\text{Hz}$), 5,35-5,32(d, 1H), 4,55-4,49(m, 1H), 4,03-3,96(m, 1H), 3,80-3,68(m, 2H), 2,83-2,79(d, 1H), 2,61-2,56(t, 2H), 1,65-1,55(m, 2H), 1,44(s, 9H), 1,34-1,25(m, 4H), 0,91-0,86(t, 3H).

15

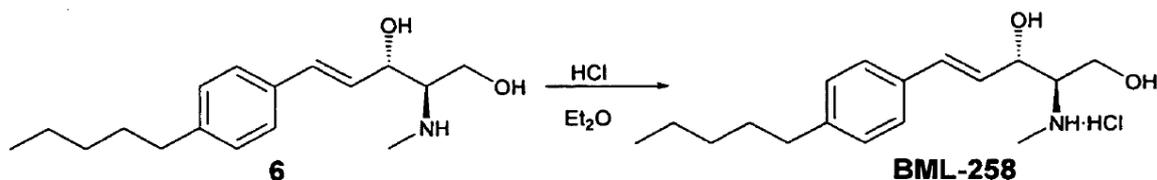


Al BOC-alqueno 5 (0,350g, 0,00092 moles) en 20 mL de THF seco bajo una atmósfera de N_2 , se añadió cuidadosamente DIBAL (9,22 mL de 1M en THF, 0,00922 moles) a temperatura ambiente. Después de la adición, la reacción se llevó a reflujo. Después de 24 horas de reflujo, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadió una disolución DIBAL adicional de 5,0 mL (0,00500 moles). El reflujo se reanudó durante otras 24 horas. La reacción se enfrió a 0°C y se finalizó cuidadosamente con agua (0,60 mL), NaOH 15% (0,60 mL) y, otra vez, agua (1,50 mL). Se añadió THF (50 mL) y la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 minutos. Después se añadió Na_2SO_4 (2g) y celita (2 g) y se continuó la agitación durante 30 minutos mientras se calentaba a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y la torta filtrante se extrajo con abundante THF. La cromatografía flash (gradiente de MeOH 2%/cloruro de metileno para MeOH 10%/cloruro de metileno + NH_4OH 0,75%) produjo 0,187g (73%) de amina 6. $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 7,31-7,29(d, 2H), 7,15-7,12(d, 2H), 6,68-6,63(d, 1H, $J=16\text{Hz}$), 6,22-6,14(dd, 1H, $J=16\text{Hz}$), 4,51-4,47(m, 1H), 3,80-3,74(m, 3H), 2,61-2,56(t, 2H), 2,50(s, 3H), 2,40-2,10(general, 2H), 1,65-1,55(m, 2H), 1,34-1,25(m, 4H), 0,91-0,86(t, 3H). HRMS(MH⁺): Calc. - 278,2120, Encontrado - 278,2119.

20

25

30



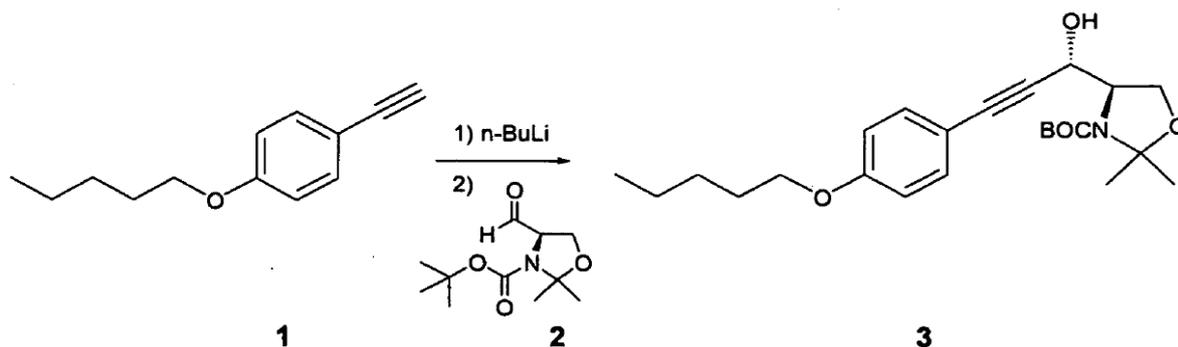
A la amina 6 (0,335 g, 0,00121 moles) en 15 mL de Et_2O a 0°C , se añadió 3,0 mL de HCl/ Et_2O 1 M. Inmediatamente se formó un precipitado blanco. Después de agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, el precipitado se filtró y se lavó con Et_2O para proporcionar 0,325 g (89%) de BML-258. $^1\text{H NMR}(\text{DMSO})$: 8,75-8,50(bd, 2H), 7,38-7,34(d, 2H), 7,19-7,15(d, 2H), 6,65-6,60(d, 1H, $J=16\text{ MHz}$), 6,30-6,22(dd, 1H, $J=16\text{Hz}$), 5,84-5,82(m, 1H), 5,30-

35

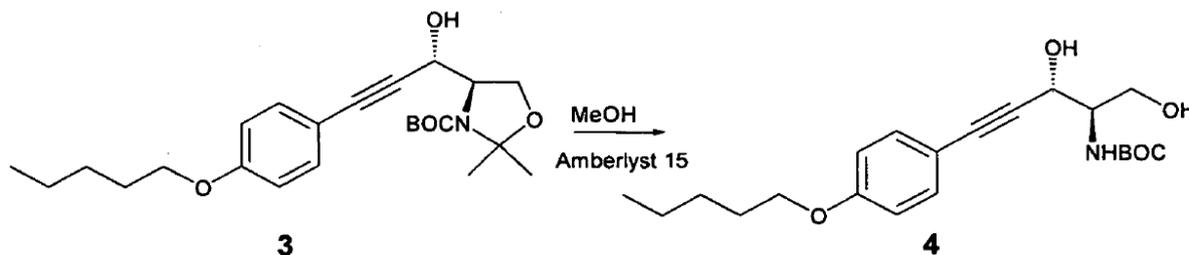
5,25(m, 1H), 4,60-4,54(m, 1H), 3,76-3,72(m, 2H), 3,18-3,10(m, 1H), 2,64(s, 3H), 2,56-2,50(t, 2H), 1,60-1,50(m, 2H), 1,34-1,23(m, 4H), 0,90-0,85(t, 3H).

SK1-I, (2R,3S,4E)-N-metil-5-(4'-pentilfenil)-2-aminopent-4-eno-1,3-diol (BML-258), se sintetizó por BIOMOL Internacional (Plymouth Meeting, PA) como se describe en el Ejemplo 1. Esfingosina y N,N-dimetilesfingosina se obtuvieron a partir de BIOMOL. [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol) se adquirió de Perkin Elmer (Boston, MA). Boc-D-FMK (BOC), Z-VAD-FMK (ZVAD) y etopósido se adquirieron en EMD Biosciences (San Diego, CA). El kit de marcado de final de corte de dUTP terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL, de sus siglas en inglés) para citometría de flujo era de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). El kit TUNEL para inmunohistoquímica era de Roche Applied Science (Indianapolis, IN). El kit de tinción de FITC-4 marcado con anexina V/yoduro de propidio para apoptosis era de BD Biosciences (San José, CA).

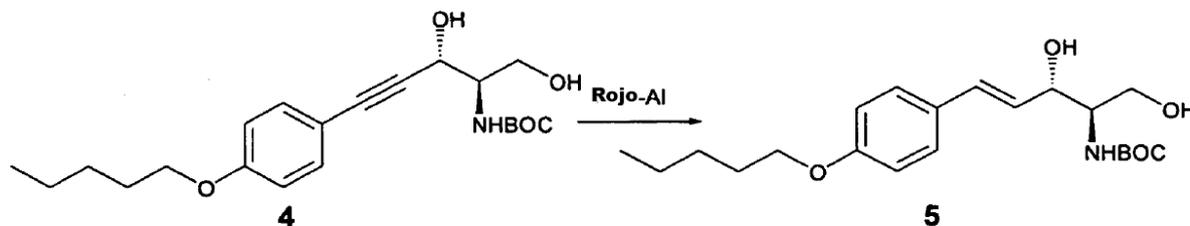
Ejemplo 2. Procedimiento general para la síntesis de SK1-I a partir de alquinos



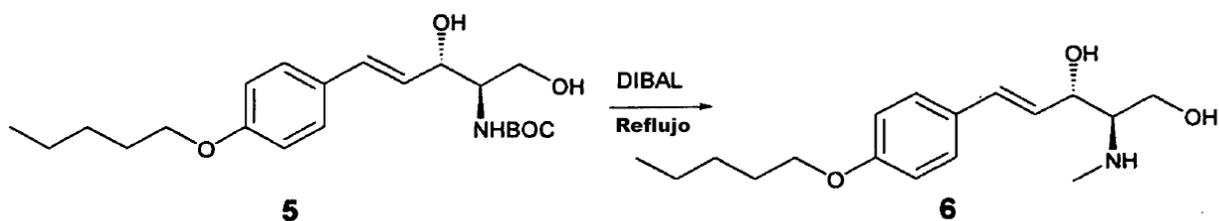
Al alquino 1, (1,2 eq) en THF seco a -20°C se añadió n-BuLi (1,1 eq de 1,6M hexanos) gota a gota. La reacción se agitó a -20°C durante 2 horas. El aldehído, 2, (1 eq., disuelto en THF seco), se añadió gota a gota. La reacción se colocó en un congelador a -20°C durante la noche. Después de aproximadamente 18 horas, la reacción se diluyó con dietil éter y se lavó con agua y salmuera. La cromatografía en columna flash produjo una mezcla de productos eritro y treo. El compuesto eritro puro, 3, se aisló mediante HPLC.



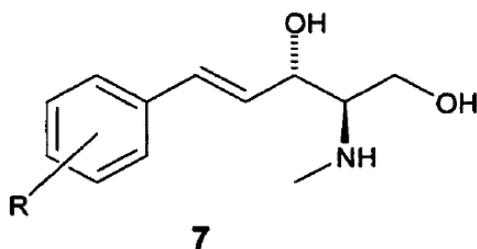
La oxazolidina eritro resultante, 3, se agitó con resina Amberlyst 15 en metanol durante la noche para eliminar el grupo protector acetónido. La cromatografía en columna flash produjo el aminodiol protegido Boc, 4.



Al alquino aminodiol, 4, (1 eq.) en dietiléter a 0°C se añadió Rojo-Al (5 eq. de 65% en peso en tolueno) gota a gota. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. Después de aproximadamente 18 horas de reacción, la mezcla se enfrió a 0°C y se finalizó con NaOH 15% (5 eq). La cromatografía en columna flash produjo el alquenilaminodiol 5.



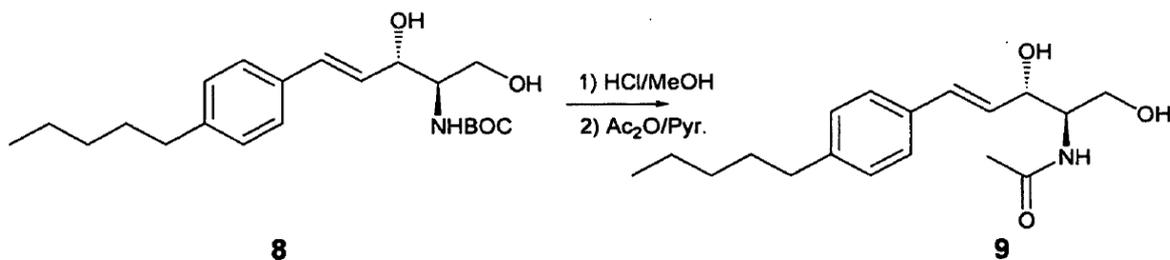
- 5 Al alquenilaminodiol, 5, (1 eq) en THF seco a 0°C se añadió DIBAL (10 eq. de THF/1M) gota a gota. Después de la adición, la reacción se calentó gradualmente a temperatura ambiente y después se sometió a reflujo durante la noche. Después de 24 horas de reacción, la mezcla se enfrió a 0°C y se finalizó sucesivamente con agua (4 eq), NaOH 15% (4 eq) y agua (10 eq). La cromatografía en columna flash produjo el compuesto diana, 6.



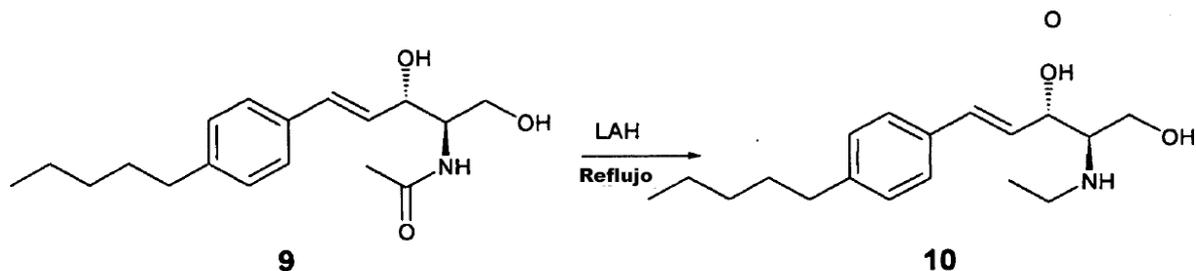
Los análogos de la estructura general, 7, se preparan empleando el alquino sustituido de manera apropiada siguiendo el procedimiento general. R = 3,4-dimetoxi; 4-fenil; 3-pentil.

Síntesis de SK1-I y análogos con varios grupos N-alquilo

- 10 Se sintetizó el análogo SK1-I protegido con BOC sustituido de manera apropiada empleando el procedimiento general indicado previamente.



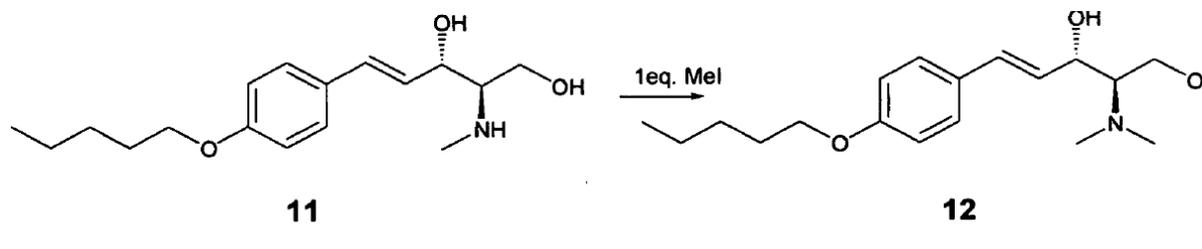
- 15 Al SKI-1 protegido con BOC, 8, (1 eq) se burbujeó en metanol a 0°C gas cloruro de hidrógeno hasta que la mezcla se saturó. La reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que el TLC indicó la finalización de la reacción. La disolución resultante se evaporó hasta desecación y se disolvió en piridina seca. Se añadió anhídrido acético (1 eq.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que se completó mediante TLC. La cromatografía flash produjo el derivado monoacetilo, 9.



- 20 A N-acetil-SKI-1, 9, (1 eq) en THF seco a 0°C se añadió Hidruro de Litio y Aluminio (4 eq. de THF/1M). Después de la adición, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y después de sometió a reflujo durante la noche. La mezcla se enfrió después a 0°C y se finalizó con agua (4 eq), NaOH 15% (4 eq) y agua (10 eq)

sucesivamente. La cromatografía en columna flash produjo la alquilamina diana, 10.

Síntesis de análogos SK1-I Di-N-alquilo



5 Al SK1-I, 11, (1 eq) en THF seco a temperatura ambiente se añadió yoduro de metilo (1 eq). La reacción se agitó hasta que el TLC indicó el fin de la reacción. La cromatografía en columna flash produjo el compuesto deseado, 12.

Ejemplo 3. Efecto de SK1-1 en el glioblastoma

Materiales y métodos

10 Cultivo celular. Las células de glioblastoma U373-MG y LN229 humanas (ATCC, Manassas, VA) se cultivaron en DMEM (Medio Eagle Dulbecco modificado, de sus siglas en inglés) enriquecido con FCS 5%. Las células GBM6 de glioblastoma no estabilizadas humanas primarias fueron proporcionadas amablemente por el Dr. David James y se pasaron como tumores en ratones y se subcultivaron durante 1 semana después del aislamiento a partir de tumores en un medio que contiene FCS 2% para prevenir el crecimiento de fibroblastos de roedores contaminantes, y después se cultivaron en FCS 5% como se describe (Yacoub et al., *Mol Cancer Ther* 7:314-329, 2008). Las células LN229 se transfectoron con plásmido H2B-EGFP y se aislaron colonias estables después de la selección con 1 mg/ml de G418. Las células LN229-H2B-EGFP se pasaron como tumores como se describe anteriormente.

20 Tumores de xenoinjertos. Se adquirieron ratones macho adultos NCI nu/nu de NCI (Frederick, MD). Todos los estudios animales se realizaron en el Centro de Cuidado de Investigación Animal en la Escuela de Medicina VCU de acuerdo con las normas institucionales. Las células LN229 (1×10^6) se inyectaron en los costados (4 sitios por ratón). Los tumores palpables aparecieron en aproximadamente una semana. Cinco días después, cuando los tumores alcanzaron los 3-4 mm de diámetro, los ratones se separaron aleatoriamente en 2 grupos y se inyectaron i.p con suero salino o SK1-I (10 mg/kg) cada dos días. Las mediciones de los tumores se realizaron con calibradores, y el volumen del tumor se calculó empleando la fórmula: $(\pi \times [\text{longitud en milímetros}] \times [\text{anchura en milímetros}]^2)/6$. Al final del experimento, los animales se sacrificaron y se recogieron los tumores, se fijaron en formalina y se embebieron en parafina, o se congelaron en nitrógeno líquido.

25 Tumores de xenoinjertos LN229 intracraneales. Se anestesiaron ratones hembra adultos NCI nu/nu y las células LN229-H2B-EGFP ($2,5 \times 10^4$ en 1 μl de PBS) se implantaron estereotácticamente en la región del putamen (1 mm anterior y 2,5 mm lateral al Bregma a la profundidad de 3,5 mm a un ritmo de 0,1 $\mu\text{l}/\text{min}$). Los ratones se monitorearon para su recuperación hasta que se despertaron completamente. 20 días después de la implantación, los ratones se inyectaron i.p. con SK1-I (20 mg/kg en PBS) cada dos días. Los ratones se observaron diariamente después de la implantación del tumor y se sometieron a alcanzar un estado agonizante.

Los detalles acerca de la infección de las células con adenovirus recombinantes, ensayos de proliferación celular y muerte celular, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, y microscopía confocal, se presentan en la información de a continuación.

Resultados

35 SK1-I inhibe de manera potente el crecimiento y la supervivencia de células de glioblastoma humano

40 Estudios previos demostraron que S1P y SphK1, la quinasa que lo produce, juegan papeles críticos en el crecimiento y la supervivencia de células de glioblastoma (Van Brocklyn et al., *J Neuropathol Exp Neurol* 64:695-705, 2005; Van Brocklyn et al., *Cancer Lett* 181:195-204, 2002; y Radeff-Huang et al. *J Biol Chem* 282:863-870, 2007). En consonancia, la expresión a la baja de SphK1 disminuye el crecimiento tanto de las células U373, que expresan PTEN mutado, como de las células LN229 que expresan PTEN de tipo salvaje, en un medio libre de suero, así como en presencia de suero, lo que mejora enormemente su crecimiento (Fig.1A). La expresión de SphK1 en estas células se redujo drásticamente mediante ARNsi dirigida a una secuencia específica de ARNm SphK1, como se detectó mediante Western blotting con un anticuerpo anti-SphK1 policlonal (Fig. 1A). La mayor sensibilidad de las células U373 a la regulación a la baja de SphK1 podría ser debido a la expresión y actividad enzimática mucho más bajas de SphK1 en comparación con las células LN229 (Fig. 1B).

El primer inhibidor específico de SphK1, SK1-I, se describió recientemente (Paugh et al., *Blood* 283:3365-3375, 2008). SK1-I inhibe el crecimiento tanto de las células U373 como de las células LN229 de una manera dependiente

de la dosis (Fig. 1C). Se observó un efecto inhibitorio significativo a 3 μ M. SK1-I a 10 μ M inhibió fuertemente el crecimiento de las células U373 y LN229 cultivadas en ausencia de suero (Fig. 1C). SK1-I era menos eficaz cuando las células se cultivaron en presencia de suero, que contiene múltiples factores de crecimiento y SP1. Sin embargo, incluso en presencia de suero, dentro de 2-4 días, había intensas reducciones en el número de células después del tratamiento con 10 μ M de SK1-I (Fig. 1C).

SK1-I inhibe la migración y la invasión de células de glioblastoma

Como S1P y SphK1 habían demostrado regular la migración e invasión de células de glioblastoma (Lepley et al. *Cancer Res* 65:3788-3795, 2005; Young et al, *Exp Cell Res* 313:1615-1627, 2007; Van Brocklyn et al. *Cancer Lett* 199:53-60, 2003; y Malchinkhuu et al. *Oncogene* 24:6676-6688, 2005), y SphK1 regula la dinámica citoesquelética de actina (Kusner et al. *J Biol Chem* 282:23147-23162, 2007) y la formación de lamelipodios (Maceyka et al. *Mol Cell Biol* 28:5687-5697, 2008), era de interés investigar si la inhibición de SphK1 mediante SK1-I se correlaciona con los cambios en la reorganización del citoesqueleto de actina. Se distribuyó F-actina a lo largo de células U373 sin estimular, como se reveló mediante tinción con faloidina conjugada con Alexa488 (Fig. 8A). En respuesta a PMA el citoesqueleto de actina se sometió a una fuerte reorganización, y se condensó más F-actina en el borde frontal dentro de las estructuras denominadas lamelipodios (Fig. 8A).

De acuerdo con un estudio previo con macrófagos humanos (Kusner et al., *J Biol Chem* 282:23147-23162, 2007), la regulación a la baja de SphK1 reduce notablemente el número de lamelipodios ricos en actina producidos por el tratamiento con PMA (Fig. 8A, 8C). De manera similar, la inhibición de SphK1 con SK1-I reduce drásticamente la reorganización de F-actina estimulada por PMA en el borde frontal y en la reorganización de F-actina y la formación de lamelipodios, e induce el desmontaje de lamelipodios (Fig. 8B, 8D).

Estos resultados apoyan la idea de que se requiere la actividad de SphK1 para la dinámica del filamento de actina (Kusner et al. *J Biol Chem* 282:23147-23162, 2007). Por otra parte, a continuación se examinó el efecto de SK1-I en la migración e invasión de células del glioma. SK1-I redujo la motilidad dirigida (quimiotaxis) de las células U373 hacia el suero o hacia EGF en ensayos de cámara de Boyden (Fig. 9A). De manera similar, la quimiotaxis de células LN229, que muestra tasas mucho mayores de migración basal y estimulada hacia el suero y EGF que las células U373, también se inhibe significativamente por SK1-I (Fig. 2A). SK1-I inhibe también de manera drástica la quimiotaxis de células LN229 hacia el ácido lisofosfatídico (LPA), otro lípidofosfolípido transmitido en el suero que ha demostrado ser un potente quimio-atrayente para determinadas líneas celulares de glioblastoma, incluyendo a las células LN229 (Malchinkhuu et al., *Oncogene* 24:6676-6688, 2005) (Fig. 2A). El LPA, suero y EGF estimulan también *in vitro* la invasión de células LN229 (Fig. 2B), determinado por su capacidad para invadir la base de la matriz de membrana Matrigel, la cual se atenúa mucho también por SK1-I (Fig. 2B).

SK1-I reduce la fosforilación basal y estimulada de Akt

La proliferación de células de glioblastoma inducidas por S1P se suprime enormemente mediante la inhibición de las rutas ERK1/2 y PI3K/Akt (Van Brocklyn et al *Cancer Lett* 189:195-204, 2002). Por tanto, era de interés examinar los efectos del SK1-I en estas rutas de señalización. Se utilizaron anticuerpos fosfo-específicos para examinar la fosforilación de Akt en Thr308 en el bucle de activación y el C-terminal de Ser473, que se requieren para la activación completa (Haas-Kogan et al. *Curr. Biol* 8:1195-1198, 1998). Conforme con su expresión de PTEN de tipo salvaje, las células LN229 tienen una menor fosforilación de Akt, la cual era rápidamente incrementada por suero, LPA, y EGF, hasta una menor extensión (Fig. 2C). SK1-I reduce la activación de Akt inducida por los tres estímulos. El tratamiento con SK1-I durante sólo 20 minutos suprime notablemente la fosforilación de Akt tanto para Thr308 como para Ser473 (Fig. 2C). SK1-I reduce también la activación de p70S6K (Thr389), corriente abajo del Akt diana. En un marcado contraste, aunque el suero, LPA y EGF estimulan ERK1/2, en estos ensayos a corto plazo, SK1-I no tuvo un efecto significativo estimulado por fosforilación de ERK1/2 en Thr202/Tyr204 (Fig. 2C). Por otra parte, aunque Akt es activa sobre las células U373, como muchos gliomas humanos expresan una forma mutante no funcional de PTEN que no inhibe la ruta PI3K/Akt (Haas-Kogan et al. *Curr Biol* 8:1195-1198, 1998), SK1-I reduce su fosforilación Akt basal en Thr308 y Ser473 (Fig. 9B). Se observó un efecto inhibitorio significativo dentro de los 20 minutos (Fig. 9B), que duró por lo menos 24 horas (datos no mostrados). Como se esperaba, el suero y EGF mejoraron la fosforilación de Akt, mientras que SK1-I la redujo (Fig. 9B). El efecto inhibitorio de SK1-I sobre la fosforilación de Akt no era debido a su degradación ya que no había reducciones significativas en los niveles totales de Akt después del tratamiento con SK1-I. Sin embargo, SK1-I no reduce la activación de ERK 1/2 inducido por EGF y por el suero ni en células U373 (Fig. 9B) ni en células LN229 (Fig. 2C).

Para probar que los efectos de SK1-I eran debidos a su capacidad para inhibir SphK1, se llevaron a cabo experimentos añadidos de S1P. De acuerdo con la reducción en los niveles de S1P por SK1-I (Fig. 3A), la inhibición de la fosforilación de Akt inducido por EGF por SK1-I se revirtió mediante la adición de S1P (Fig. 2D). Se había demostrado que EGF induce PI3K/Akt mediante la fosforilación de la proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2) asociada al aglutinante 1 (Gab1) (Mattoon et al. *BMC Biol* 2:24-35, 2004). Sin embargo, SK1-I no afectó a la fosforilación de tirosina inducida por EGF de EGFR o de Gab1 (Fig. 2D), indicando que SK1-I no interfiere directamente con la activación de EGFR. Por tanto, el inhibidor de SphK1, SK1-I, inhibe específicamente la fosforilación y la activación de Akt en células GBM de una manera dependiente de S1P.

Debido a que la regulación a la baja de SphK1, no sólo disminuye S1P, sino que también incrementa los niveles de ceramida (Maceyka et al. *J Biol Chem* 280:37118-37129, 2005; Pchejetski et al. *Cancer Res* 65:11667-11675, 2005; Taha et al. *FASEB J* 20:482-484, 2006; Berdyshev et al. *Cell Signal* 18:1779-1792, 2006), era de interés investigar los efectos de inhibición de SphK1 con SK1-I sobre estos metabolitos de esfingolípidos que habían presentado tener efectos opuestos sobre el crecimiento celular y la apoptosis (Cuvillier et al. *Nature* 381:800-803, 1996; y Hannun et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150, 2008). Había una reducción significativa en los niveles de S1P dentro de los 20 minutos después de la adición de SK1-I (Fig. 3A), la cual se correlaciona con la rápida inhibición de la fosforilación de Akt. Por otra parte, dentro de 1 hora después de la adición de SK1-I, los niveles de S1P disminuyeron drásticamente en un 70%, que se acompañó por un incremento de los niveles de esfingosina sin mayores cambios en los niveles de ceramida (Fig. 3A). Sin embargo, después de 24 horas de tratamiento con SK1-I, los niveles de ceramida incrementaron notablemente, particularmente la ceramida C16 pro-apoptótica. A diferencia de safingol (L-treo-dihidroesfingosina) (Coward et al. *Autophagy* 5:184-193, 2009), un inhibidor de SphK, sólo menos del 1% de SK1-I se convirtió en el metabolito tri-N-metil después de 24 horas (Fig. 3A) y no se detectaron otros metabolitos. Por otra parte, al contrario que su estructura análoga, el fármaco inmunosupresor FTY720, SK1-I no se fosforila fácilmente, descartando acciones potenciales a través de los receptores S1P.

La inhibición de la quinasa N-terminal c-Jun atenúa la muerte celular inducida por SK1-I

De acuerdo con muchos estudios previos que muestran que la regulación a la baja de la elevación de SphK1 y ceramida se asocian con un incremento de la apoptosis (revisado en (Hannun et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150, 2008; Cuvillier, O. *Expert Opin Ther Targets* 12:1009-1020, 2008; y Shida et al. *Curr Drug Targets* 9:662-673, 2008), el tratamiento con SK1-I induce la apoptosis de células LN229 como demostró el incremento de la separación de PARP (Fig. 10A), un sustrato para la proteólisis mediada por caspasas durante la apoptosis, incrementó los núcleos fragmentados y condensados (Fig. 10B), e incrementó las interrupciones de la hebra de ADN detectadas por la tinción TUNEL (Fig. 10C). Por otra parte, SK1-I suprime notablemente la supervivencia a largo plazo de las células LN229 en ensayos clonogénicos (Fig. 10D).

Los metabolitos de esfingolípidos, S1P frente a esfingosina y ceramida, normalmente tienen efectos opuestos sobre Akt y las rutas de la quinasa c-Jun NH2-terminal (JNK) relacionada con el estrés (Cuvillier et al. *Nature* 381:800-803, 1996; y Hannun et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150, 2008). Junto con la inactivación de la ruta de Akt citoprotectora, la exposición de las células LN229 a SK1-I se acompañó por el retraso de la activación de JNK (Fig. 10B), sin afectar al p38 MAPK (datos no mostrados). El incremento de la fosforilación de JNK después de la adición de SK1-I se acompañó por la mejora de la fosforilación de sus sustratos, los factores de transcripción c-Jun (Ser63/73) y ATF-2 (Thr71) (Fig. 3B).

La vía ERK1/2 y la señalización de Akt frente a la señalización de JNK representa un mecanismo homeostático clave que en muchas células regula el equilibrio entre la supervivencia celular y los procesos de muerte celular (Xia et al. *Science* 270:1326-1231, 1995). Por tanto, a continuación se examinaron los efectos de una variedad de agentes que perturban estas rutas de señalización sobre la letalidad mediada por SK1-I. La inhibición de MEK1/2, PI3K, y p38 mediante U0126, LY294002, SB202190, respectivamente, mejoró la letalidad de SK1-I, mientras que la inhibición de JNK por SP600125 atenuó notablemente los efectos de SK1-I tanto en células U373 como en células LN229 (Fig. 3C y datos no mostrados). Como se esperaba, SP600125 bloqueó eficazmente la activación de JNK, como se demostró mediante la inhibición de la fosforilación de c-Jun y ATF-2 (Fig. 3B). Incluso a 1 μ M, una concentración que se considera que inhibe específicamente el JNK sin tener efectos específicos sobre otras quinasas, SP600125 invierte notablemente la letalidad inducida por SK1-I (Fig. 3C). Se examinó además la importancia de la ruta JNK empleando un inhibidor peptídico de JNK específico. El inhibidor peptídico de JNK bloquea el dominio de activación de JNK y previene la fosforilación de c-Jun. Este péptido invierte también significativamente los efectos citotóxicos de SK1-I (Fig. 3D), mientras que el control peptídico era ineficaz. De manera similar, la expresión de MEK1 negativo dominante también mejora la muerte de células LN229 inducida por SK1-I, si bien el Akt negativo dominante no lo hizo (Fig. 3D). Por otra parte, la expresión de Akt o MEK1 activada constitutivamente, o la expresión de Bcl-xL, suprime la muerte celular inducida por SK1-I (Fig. 3D).

Efecto de SK1-I sobre el glioblastoma no estabilizado primario

Se ampliaron las observaciones con SK1-I para células de glioblastoma GBM6 humanas no estabilizadas primarias. Las células del glioblastoma GBM6 han demostrado producir tumores invasivos, difusos en los cerebros de ratones (Giannini et al. *Neuro-oncol* 7:164-176, 2005; y Yacoub et al. *Cancer Biol Ther* 7:917-933, 2008). GBM6 expresa p53 mutante, PTEN de tipo salvaje, y EGFRvIII, una forma mutante de EGFR activada constitutivamente (Yacoub et al. *Cancer Biol Ther* 7:917-933, 2008; y Yacoub et al. *Cancer Biol Ther* 3:739-751, 2004). De manera similar para las células LN229 y U373, el crecimiento de las células GBM6 se redujo enormemente por SK1-I (Fig. 4A). En ausencia de suero había un efecto dependiente de la dosis de SK1-I y se observó una inhibición significativa del crecimiento a una concentración por debajo de 1 μ M (Fig. 4A). Por otra parte, como con las líneas celulares del glioblastoma, 10 μ M de SK1-I redujo notablemente el crecimiento de GBM6 en presencia de suero (Fig. 4B). SK1-I suprimió también la invasión de GBM6 inducida por suero y por EGF (Fig. 4C). Similar a los efectos de líneas celulares de glioblastoma estabilizadas, SK1-I redujo brevemente la fosforilación de Akt basal, la del suero y la estimulada por EGF después del tratamiento, sin afectar a los niveles de pERK1/2 (Fig. 4D).

SK1-I reduce el crecimiento tumoral en ratones

Alentados por estos descubrimientos, se examinó el efecto de SK1-I sobre el crecimiento de tumores subcutáneos de células LN229, que son bastante invasivas y crecen fenotípicamente de manera similar a gliomas invasivos *in situ* (Nakamizo et al. *Cancer Res* 65:3307-3318, 2005). Los tumores se presentan como masas palpables aproximadamente una semana después de la inyección subcutánea de un millón de células en el lateral de un ratón (Fig. 5A). Cinco días después, cuando es posible determinar el tamaño del tumor de forma fiable (3-4 mm de diámetro), los animales se aleatorizaron y se les inyectó SK1-I intraperitonealmente cada dos días a una dosis de 10 mg/kg. Los tumores en los ratones control mostraron incrementos significativos en el volumen a partir del día 27, y un crecimiento acelerado después. El análisis estadístico (factor único ANOVA) reveló tumores significativamente más pequeños en el grupo de tratamiento SK1-I (Fig. 5A). Después de 43 días, los animales se sacrificaron a consecuencia de la carga tumoral en los ratones control. Los tumores se extirparon, pesaron, y examinaron histológicamente. Además del volumen del tumor y del tamaño (Fig. 5A, 5C), el tratamiento con SK1-I redujo el peso del tumor en casi 4 veces (Fig. 5B) y disminuyó la vascularización de los tumores, como se muestra mediante tinción con hematoxilina y eosina (Fig. 6). Se observaron reducciones similares en la densidad de los vasos sanguíneos mediante tinción con anticuerpos para el marcador celular endotelial CD31 específico de ratón (Fig. 6). En consonancia, la inmunohistoquímica para VEGF reveló también que la expresión elevada de este factor angiogénico en los tumores tratados con el vehículo se reducía enormemente en los ratones tratados con SK1-I (Fig. 6). La alteración de la cito-arquitectura del tumor por SK1-I se acompañó por un incremento en el número de células tumorales apoptóticas positivas a TUNEL (Fig. 6). En consonancia con la atenuación de la fosforilación de Akt en las células GBM por SK1-I, la inmunotinción para Akt fosforilado en los tumores se disminuyó notablemente mediante el tratamiento con SK1-I (Fig. 6).

SK1-I mejora la supervivencia de los ratones con tumores ortotópicos de LN229

Era de interés examinar también si SK1-I era eficaz en el modelo ortotópico más relevante clínicamente de células LN229 implantadas de manera intracraneal. Sobre la base de los análisis de tasas de crecimiento de ensayo, se inició el tratamiento intraperitoneal con SK1-I en el día 20 después de la implantación intracraneal de las células LN229 marcadas con GFP cuando los tumores se pudieron estabilizar y cabría esperar que los ratones fueran asintomáticos. Los animales en el grupo tratado con el vehículo comenzaron a mostrar síntomas de carga tumoral en el día 40 y se sacrificaron cuando alcanzaron un estado moribundo entre el día 43 y el 49 (Fig. 7C). Ninguno de los ratones tratados con SK1-I mostraron ninguno de los síntomas en este punto y las administraciones de SK1-I se detuvieron después (Fig. 7C). El día 48, T2W MRI reveló la presencia de un gran tumor en el hemisferio derecho de los ratones tratados con el vehículo (Fig. 7A) mientras que los tumores no eran evidentes en los ratones tratados con SK1-I (Fig. 7A). El aumento de gadolinio reveló un tumor pequeño en el cerebro de este ratón tratado con SK1-I en el sitio de la inyección (Fig. 7B). Por otra parte, la visualización de las células LN229 marcadas con GFP en las secciones del tumor intracraneal mostró significativamente menos células invasoras y áreas evidentes de necrosis en la mitad de los tumores en los animales tratados con SK1-I en comparación con los animales tratados con el vehículo (Fig. 7D). El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de xenoinjertos de glioblastoma intracraneal mostró un beneficio significativo en la supervivencia por la administración de SK1-I en comparación con los animales control con el vehículo (Fig. 7C), indicando que SK1-I era notablemente eficaz en el cerebro incluso cuando se administraba intraperitonealmente.

40 Discusión

Las terapias disponibles actualmente sólo mejoran ligeramente el pronóstico de los pacientes con GBM y se necesita con urgencia de nuevas dianas terapéuticas. Las pruebas acumuladas sugieren que SphK1 es una atractiva nueva diana. Los niveles de proteína y de señales de SphK1 están reguladas al alza en GBM (Van Brocklyn et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:695-705, 2005) y en los tejidos de astrocitomas en comparación con el cerebro normal adyacente (Li et al. *Clin Cancer Res* 14:6996-7003, 2008). Los pacientes cuyos tumores estaban en más de la tercera parte con respecto a la expresión de SphK1 sobrevivieron una media de 102 días, mientras que los que estaban dentro de menos de dos terceras partes sobrevivieron una media de 357 días (Van Brocklyn et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:695-705, 2005). La expresión alta de SphK1 demostró ser un indicador de un mal pronóstico para los pacientes con astrocitoma (Li et al. *Clin Cancer Res* 14:6996-7003, 2008).

Dirigiendo SphK1 con SK1-I se demostró la supresión de la proliferación de varias líneas celulares de glioblastoma humano, incluyendo las células U373, LN229, U87, y U118, así como de las células GBM6 no estabilizadas. SK1-I también induce potencialmente la apoptosis y la invasión inhibida de estas células. Similar a los efectos de SK1-I, la regulación a la baja de la expresión de SphK1 ha demostrado reducir el crecimiento, la supervivencia, la migración, y la invasión celular del glioblastoma (Van Brocklyn et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:695-705, 2005). SK1-I era eficaz en GBM que era mutante para PTEN o p53 o que tienen una forma activada constitutivamente de EGFR. Esto es particularmente importante ya que más del 80% de los GBMs muestran una fuerte activación a Akt, muchos debidos a la pérdida o a la mutación de PTEN. La activación de EGFR es también un evento patogénico crítico, en el que se observan habitualmente con amplificaciones, mutaciones, o reorganizaciones (Wen et al. *N Eng J Med* 359:492-507, 2008). SK1-I mostró también una actividad *in vivo* antitumoral significativa, induciendo la apoptosis de células tumorales de GBM y reduciendo la vascularización del tumor.

Los mecanismos por los cuales la inhibición de SphK1 por SK1-I reduce tan profundamente la proliferación y la supervivencia de GBM *in vitro* e inhibe el crecimiento *in vivo* del tumor se está comenzando a revelarse ahora. El SK1-I suprime rápidamente la fosforilación de Akt y a sus dianas p70S6K y GSK3 β , y por tanto, interfiere con la señalización a través de la ruta Akt, que se activa frecuentemente en gliomagenesis (Wen et al. *N Eng J Med* 359:492-507, 2008). Esta inhibición por SK1-I no es debido a un efecto directo sobre Akt, ya que no inhibió la actividad de Akt en un ensayo de quinasa *in vitro* (Paugh et al. *Blood* 112:1382-1391, 2008). Está aceptado también que el SP1 producido por la activación de SphK1 se libera desde las células y estimula sus receptores que se unen a la activación de Akt. De hecho, la reducción de los niveles de S1P por SK1-I es rápida y podría contribuir a disminuir la fosforilación de Akt. Los efectos de SK1-I pueden no estar mediados solamente por la reducción de “señalización al revés” por S1P sino sólo por la reducción de S1P intracelular. Estos resultados son compatibles con los informes previos demostrando que SphK1 y S1P intracelular son críticos para la activación y la proliferación celular de Akt independientemente de los receptores S1P (Radeff-Huang et al. *J Biol Chem* 282:863-870, 2007; y Oliviera et al. *J Biol Chem* 278:46452-46460, 2003). Por otra parte, en las células de glioblastoma 1321N1, la síntesis de ADN y la expresión de ciclina D se aumentó de una manera dependiente de SphK1 y Akt independientemente de los receptores S1P (Radeff-Huang et al. *J Biol Chem* 282:863-870, 2007). En consonancia, la sobre-expresión de SphK1 promueve la supervivencia y el crecimiento celular incluso en células carentes de S1PRs funcionales (Olivier et al., *ibid.*). De manera similar, la sobre-expresión de SphK1 es un acontecimiento oncogénico independiente del receptor S1P en la progresión de la eritroleucemia ya que implica la activación de Akt (Le Scolan et al. *Blood* 106:1808-1816, 2005). En consonancia con los resultados previos en las células de leucemia (Paugh et al. *Blood* 112:1382-1391, 2008), SK1-I no sólo inhibe la producción de S1P en las células del glioma, sino que también incrementa los niveles de su precursor pro-apoptótico ceramida que ha demostrado causar la inhibición del crecimiento y la apoptosis mediante inhibición de Akt (Hannun et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150, 2008). Por tanto, la inhibición bifásica de Akt probablemente se debe a un rápido descenso de S1P intracelular y después a un incremento sostenido de ceramida. Por otra parte, un estudio reciente en las células de glioma demostró que la inhibición de los niveles de ceramida regula fuertemente al alza la ruta Akt mediante la inhibición de la conversión de ceramida a esfingolípidos complejos debido a la reducción de ER hacia el tráfico de ceramida del aparato de Golgi (Giussani et al. *J Biol Chem* 284:5088-5096, 2009). Debido a que la ceramida inhibe a su vez a Akt, esto compromete a un ciclo vicioso que amplifica el efecto apoptótico de SK1-I. La activación de JNK también puede deberse a la inhibición de Akt tras el tratamiento de SK1-I, como la interesante posibilidad que plantean varios estudios de la capacidad de Akt para inhibir la señalización de JNK debido a la fosforilación de dianas específicas en esta ruta (Kim et al. *Mol Cell Biol* 21:893-901, 2001; y Barthwal et al. *J Biol Chem* 278:3897-3902, 2003).

La regulación a la baja de SphK1, similar a SK1-I, causa una marcada elevación de los niveles de ceramida (Maceyka et al. *J Biol Chem* 280:37118-37129, 2005; Pchejetski et al. *Cancer Res* 65:11667-11675, 2005; Taha et al. *FASEB J* 20:482-484, 2006; Berdyshev et al. *Cell Signals* 18:1779-1792, 2006). En consonancia con la mayor expresión de SphK1 en GBM, los niveles de ceramida son menores en los gliomas humanos en comparación con el tejido cerebral circundante, y están inversamente relacionadas con la progresión del tumor y con una supervivencia del paciente corta (Riboni et al. *Glia* 39:105-113, 2002). Por tanto, las acciones de SphK1 podrían relacionarse a su papel en la regulación de los niveles de ceramida.

La existencia de vías de supervivencia redundantes sugiere que dirigirse a una única vía de desregulación podrían no ser suficiente para eliminar los tumores. De hecho, se ha sugerido que la terapia de GBM eficaz puede requerir combinaciones de inhibidores que se dirigen a múltiples vías de señalización (Stommel et al. *Science* 318:287-290, 2007). El descubrimiento de la presente invención de que inhibiendo el SphK1 con SK1-I mejora además la letalidad celular del glioblastoma inducida por inhibidores de otras vías de señalización importantes que están desreguladas frecuentemente en GBM, tiene implicaciones en el diseño de protocolos que combinan inhibidores de SphK1 junto con agentes anticancerosos o terapias experimentales convencionales.

Materiales y métodos suplementarios

Reactivos. Se obtuvo S1P de BIOMOL (Plymouth Meeting, PA). El suero y el medio eran de Biofluids (Rockville, MD). El EGF era de Life Technologies (Gaithersburg, MD). Los anticuerpos anti-fosfo Akt (Ser473 y Thr308), anti-Akt, anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-fosfo-ATF2 (Thr71), anti-fosfo-JNK (Thr183/Tyr185) eran de Cell Signaling (Beverly, MA), y anti-ERK2, anti-fosfo-c-Jun (Ser63/73) y los anticuerpos de la cadena pesada de anticlatrina (CHC) eran de Santa Cruz (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos SphK1 policlonales de conejo se describieron previamente (Hait et al. *J Biol Chem* 280:29462-29469, 2005). Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP, de sus siglas en inglés) y marcados fluorescentemente eran de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA) y Molecular Probes (Eugene, OR), respectivamente. El control y los siARNs específicos de SphK1 (Hait et al., *ibid.*) se obtuvieron de Qiagen (Valencia, CA). El reactivo de proliferación celular WST-1 y el kit TUNEL para inmunohistoquímica eran de Roche Applied Science (Indianápolis, IN). El SK1-I, ((2R,3S,4E)-N-metil-5-(4'-pentilfenil)-2-aminopent-4-eno-1,3-diol, BML-258), se sintetizó como la sal HCl por BIOMOL Internacional (ahora Enzo Life Sciences International, Plymouth Meeting PA). El SP600125 y SB202190 eran de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), el inhibidor 1 peptídico JNK y el control peptídico negativo eran de EMD Biosciences (San Diego, CA), y LY294002 y U0126 eran de Cell Signaling Technology.

Regulación a la baja de SphK1. Las células U373-MG y LN229 se transfectaron con ARNsi control o ARNsi frente a SphK1 100 nM (secuencia diana: GGGCAAGCCTTGAGCTC), empleando reactivo Dharmafect 1 (Dharmacon,

Chicago, IL) como se describe (Paugh et al. *FASEB J* 22:455-465, 2008).

Actividad de SphK1. La actividad de SphK1 se determinó exactamente como se describe (Hait et al. *J Biol Chem* 280:29462-29469, 2005).

5 Western blotting. Las células se reunieron en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, NaF 50 mM, Na₄P₂O₇ 30 mM, 2-glicerofosfato 20 mM, Na₃VO₄ 1mM, EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, SDS 0,5% y cóctel inhibidor de proteasa (dilución 1:200) y una sonda sometida a ultrasonidos. Se dispusieron cantidades iguales de proteína determinadas con ácido bicinónico (Pierce, Rockford, IL) mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los blots se bloquearon con leche seca no grasa 5% en suero salino tamponado con Tris que contiene Triton X-100 0,1% (TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente, y después se incubaron con anticuerpos primarios (1:3.000 en BSA 1%) durante la noche, seguido de los anticuerpos secundarios conjugados a HRP adecuados (1:40.000 en BSA 1%). Los inmunocomplejos se visualizaron mediante quimioluminiscencia mejorada (Pierce).

15 Inmunohistoquímica. Las secciones de parafina se desparafinaron, rehidrataron, e incubaron con proteinasa K antes de la permeabilización, y después se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las secciones congeladas se secaron, fijaron en formalina, y se tiñeron con anticuerpos frente a CD-31 de ratón (BD Pharmingen, San José, CA), o con anticuerpos de conejo frente a fosfo-Akt (Ser473) (Cell Signaling) seguido de inmunohistoquímica con anticuerpos secundarios específicos de especies conjugadas con Alexa 488. Las criosecciones se secaron al aire, se permeabilizaron con Triton X-100 0,5%, y se tiñeron con un kit de marcaje TUNEL de fluoresceína (Roche Applied Sciences, Indianápolis, IN) seguido por contratinción con Hoechst. Las tinciones se tiñeron también con anticuerpo purificado con afinidad por VEGF anti-humano de cabra (R&D), visualizado con el kit de tinción aminobencidina-peroxidasa de rábano picante anti-cabra (R&D) y se contratiñeron con hematoxilina.

25 Inmunocitoquímica y microscopía confocal. Las células se cultivaron sobre placas de vidrio de 15 mm para cubrir tratadas con 3-aminopropil-trietoxisilano en placas de 24 pocillos. Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se bloquearon en tampón TBST que contienen BSA 1%. Después del lavado, las células se incubaron en el mismo tampón que contiene faloidina conjugada con Alexa durante 30 minutos, seguido de 15 minutos de incubación en 10 µg/ml de Hoechst 33342. Para los ensayos de TUNEL, las células fijadas se permeabilizaron con TX-100 0,5% durante 30 minutos, se lavaron e incubaron en tampón TdT enriquecido con CoCl₂ 250 µM, 20 unidades de TdT (NEB, Ipswich, MA) y fluoresceína-12-dUTP 1 nM (Roche) durante 1 hora a 37°C. Los cubreobjetos se lavaron con TBST, se lavaron con agua, se secaron al aire y se montaron sobre portaobjetos de vidrio con polímero Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI). Se recogieron imágenes en un microscopio confocal LSM 510 láser (Zeiss, Thornwood, NY) con un objetivo 100X de inmersión en aceite.

35 Ensayos de proliferación celular y muerte celular. Las células se incubaron en 10.000 células/pocillo en placas de 48 pocillos y se les dejó unirse durante 24 horas. La proliferación celular en los tiempos indicados con WST-1 y la absorbancia se midieron en un lector de placa a 450 nm con una eliminación de fondo a 630 nm. La muerte celular se detectó mediante ensayos de exclusión azul tripán en el que el porcentaje de las células que incorporan el tinte azul se determinó empleando un microscopio óptico y un hemocitómetro como se describe (Yacoub et al. *Mol Cancer Ther* 7:314-329, 2008). La muerte celular apoptótica se midió mediante tinción del núcleo celular con tinte Hoechst bisbencimida y las células apoptóticas se identificaron por las regiones nucleares condensadas, fragmentadas como se describe previamente (Sankala et al. *Cancer Res* 67:10466-10474, 2007). Se contaron un mínimo de 300 células.

45 Ensayo de formación de colonias. Las células se incubaron a una densidad de 1000 células/pocillo en una placa de 12 pocillos en DMEM que contienen suero 5%. Después de 8 horas, se añadió SK1-I y 2 horas después, se cambió el medio. Después de 10 días, las células se fijaron en paraformaldehído 4% y se tiñeron con cristal violeta (0,05%). Después se contaron las colonias mayores de 0,5 mm de diámetro.

Infección de células con adenovirus recombinantes. Las células se incubaron a 3 x 10³ por cm² y se infectaron después de 24 horas (a una multiplicidad de infección 50) con un vector vacío control de virus (CMV) o adenovirus que expresan Akt activa constitutivamente (ca), Akt negativa dominante (dn), caMEK1, dnMEK1, o Bcl-xL (Vector Biolabs, Filadelfia, PA).

50 Ensayo de invasión y quimiotaxis. Se llevaron a cabo ensayos de invasión en cámara de Boyden esencialmente como se describe (Shida et al. *Cancer Res* 68:6569-6577, 2008).

55 Análisis de espectrometría de masas. Se extrajeron los lípidos y se cuantificaron por cromatografía líquida, espectroscopía de masas en tándem y por ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS) las bases de esfingoides fosforiladas y sin fosforilar, las especies de cadena de acilo de ceramida individuales, así como SK1-I y sus metabolitos, como se describe previamente (Merrill et al. *Methods* 36:207-224, 2005).

Análisis estadísticos. Los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados coherentes. Para cada experimento, los datos a partir de muestras por triplicado se expresaron como medias ± S.D. Las estadísticas se realizaron mediante el factor único ANOVA, y p < 0,05 se consideró significativo. El estimador de Kaplan-Meier se

empleó para generar las curvas de supervivencia y para estimar los valores de supervivencia medios. Se compararon las diferencias entre las curvas de supervivencia empleando un ensayo de log-rank.

A la luz de la descripción detallada y de los ejemplos anteriores, no deberá sugerirse a los expertos habituales en la técnica las muchas variaciones obvias.

- 5 Se apreciará por los expertos en la técnica que cualquier disposición que se calcule para alcanzar el mismo propósito se puede sustituir para los aspectos específicos mostrados.

La discusión de las referencias en la presente memoria se destina simplemente a resumir las afirmaciones hechas por los autores y no se realiza ninguna reivindicación que constituya una referencia a la técnica anterior. Los solicitantes se reservan el derecho de cambiar la exactitud y la relevancia de las referencias citadas.

10 **Listado de secuencias**

<110> SPIEGEL, SARAH
ZIPKIN, ROBERT E.
ADAMS, JEFFREY K.

- 15 <120> INHIBIDORES DE ESFINGOSINA TIPO I Y MÉTODOS PARA PREPARAR Y EMPLEAR LOS MISMOS

<130> ENZ-91 (CIP) (PCT)

- 20 <140> 12/584,131
<141> 2009-08-31

<160> 1

- 25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 19
<212> DNA

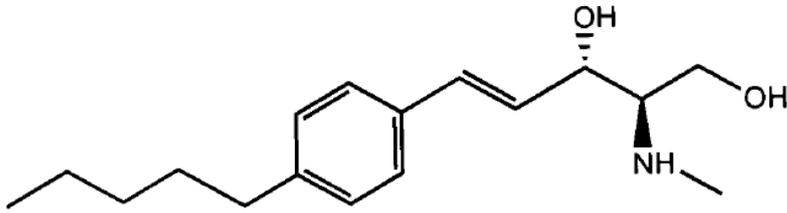
- 30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

- 35 <400> 1
gggcaaggcc ttgcagctc

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende el compuesto



- 5 para el uso en el tratamiento de un tumor del sistema nervioso central, en donde el tumor es un glioblastoma.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el tumor es un glioblastoma multiforme.

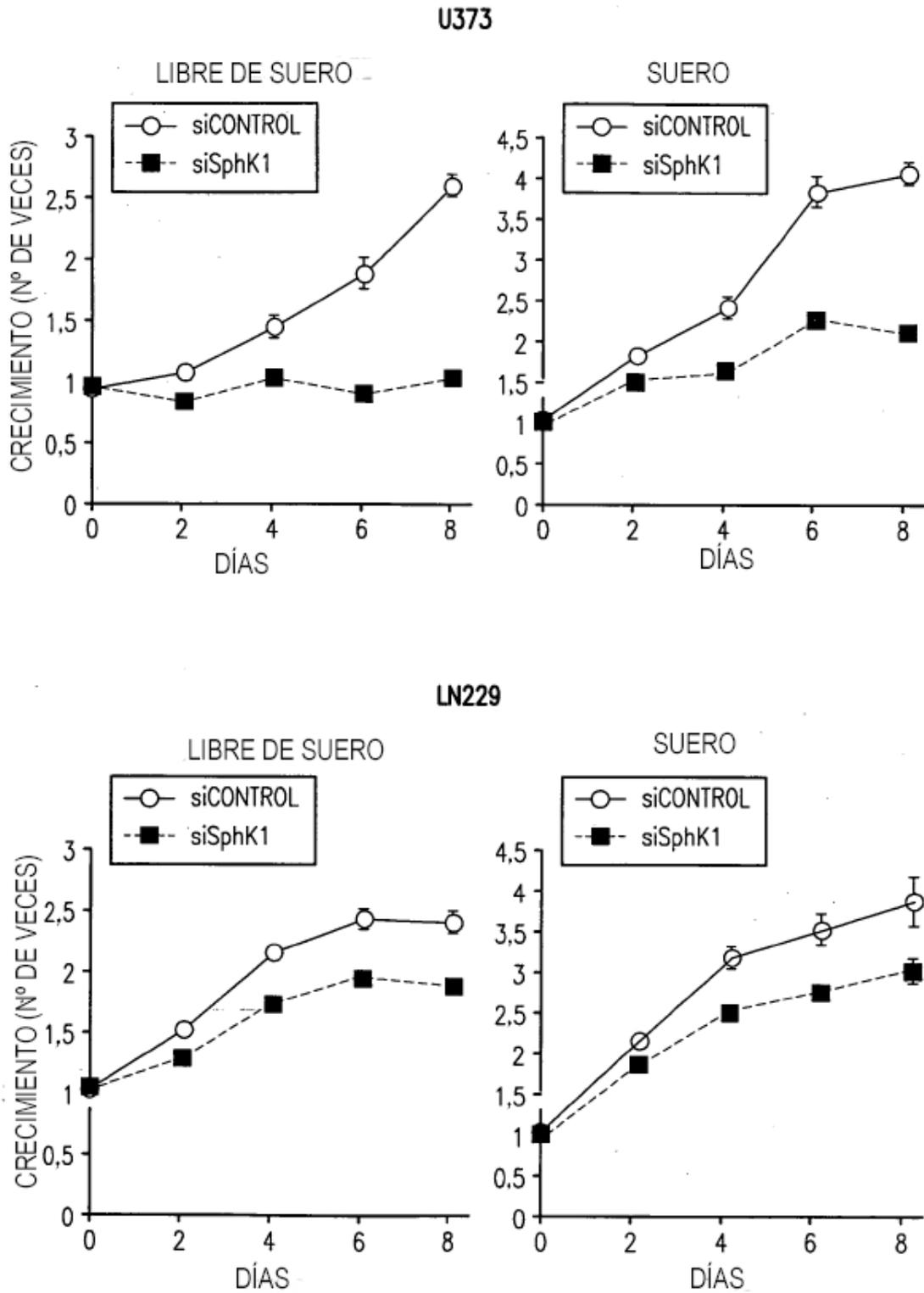


FIG. 1A

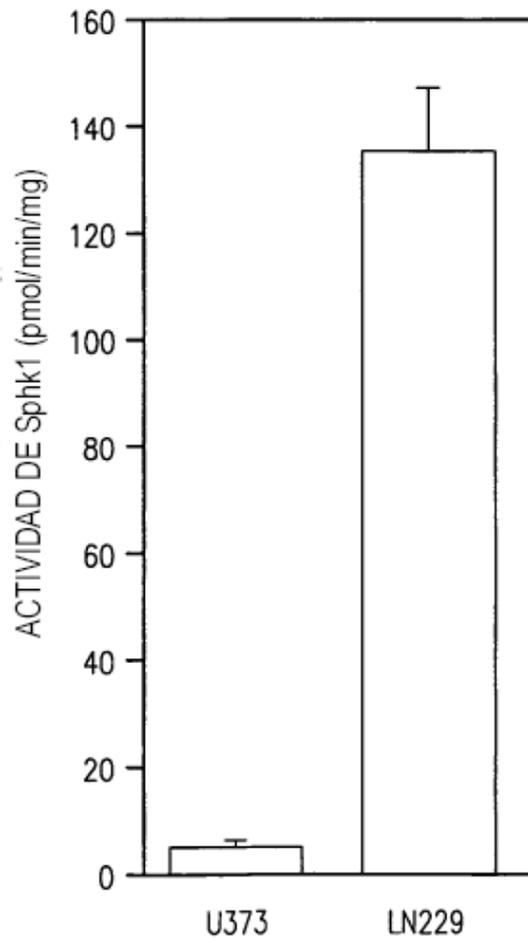
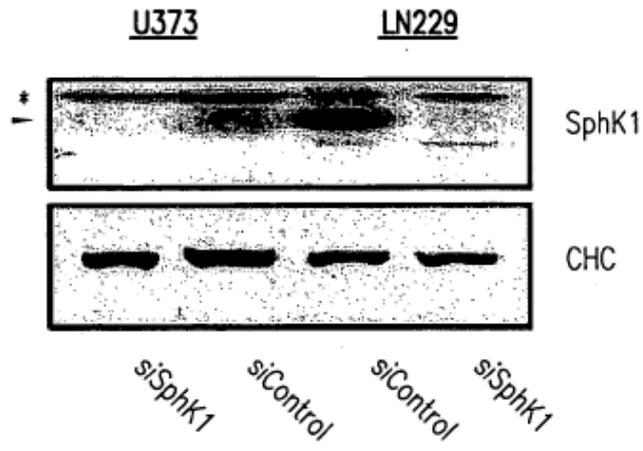


FIG. 1B

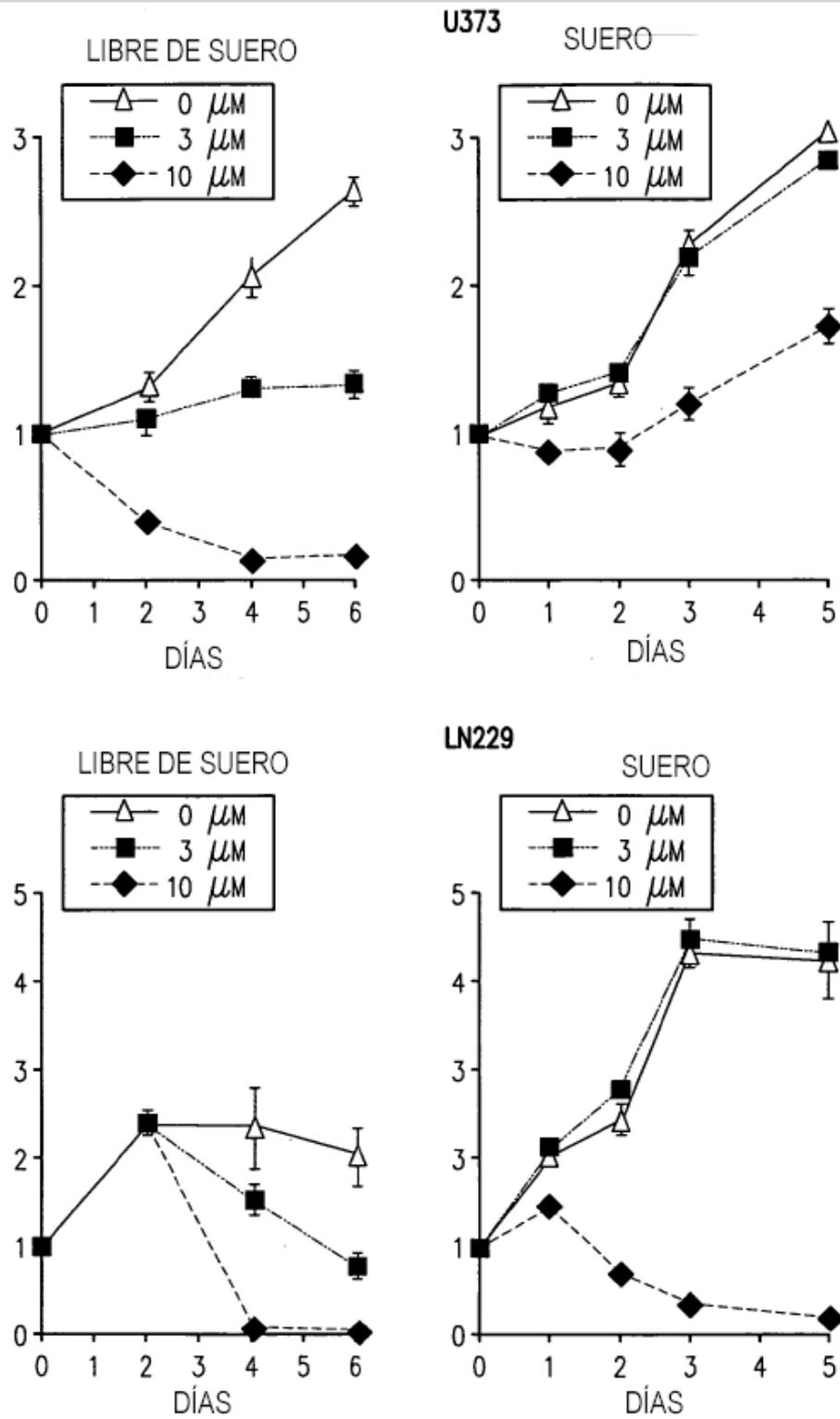


FIG. 1C

LN229

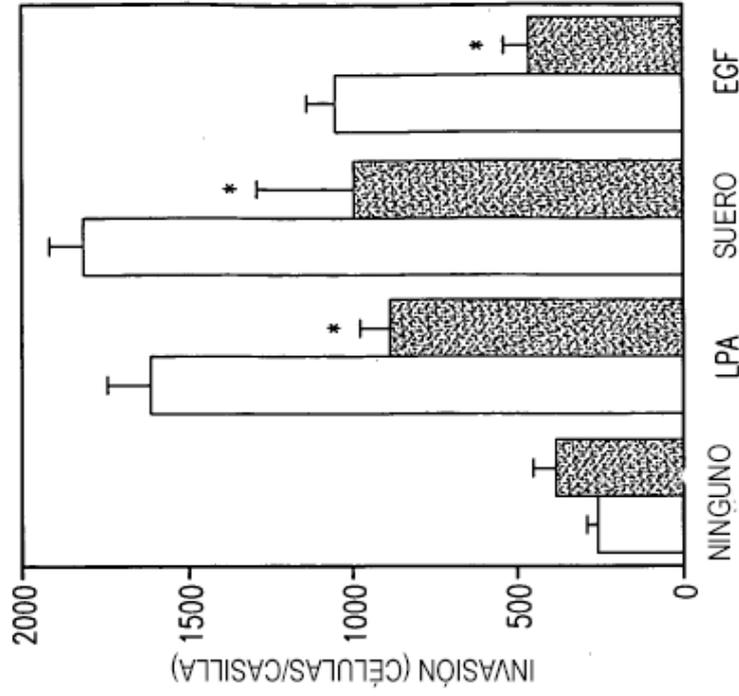


FIG. 2B

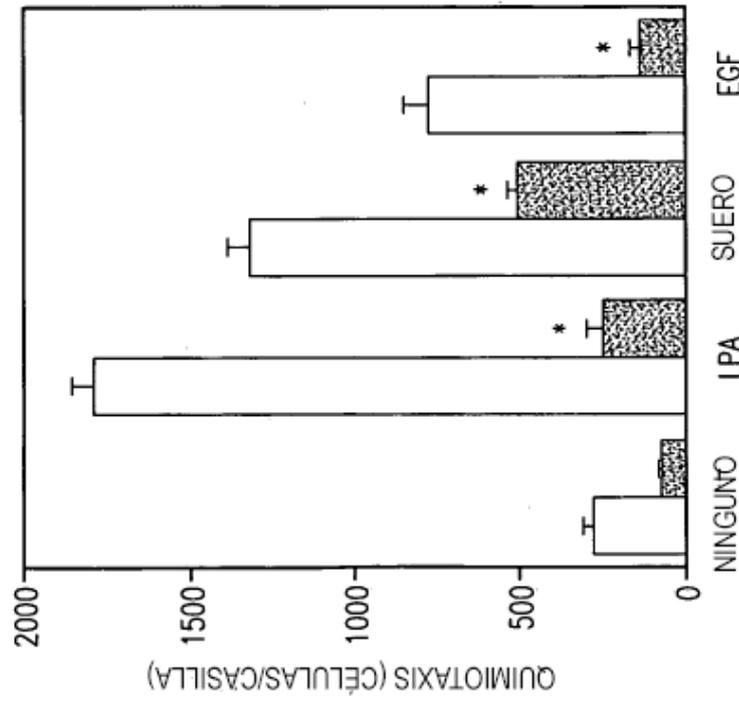


FIG. 2A

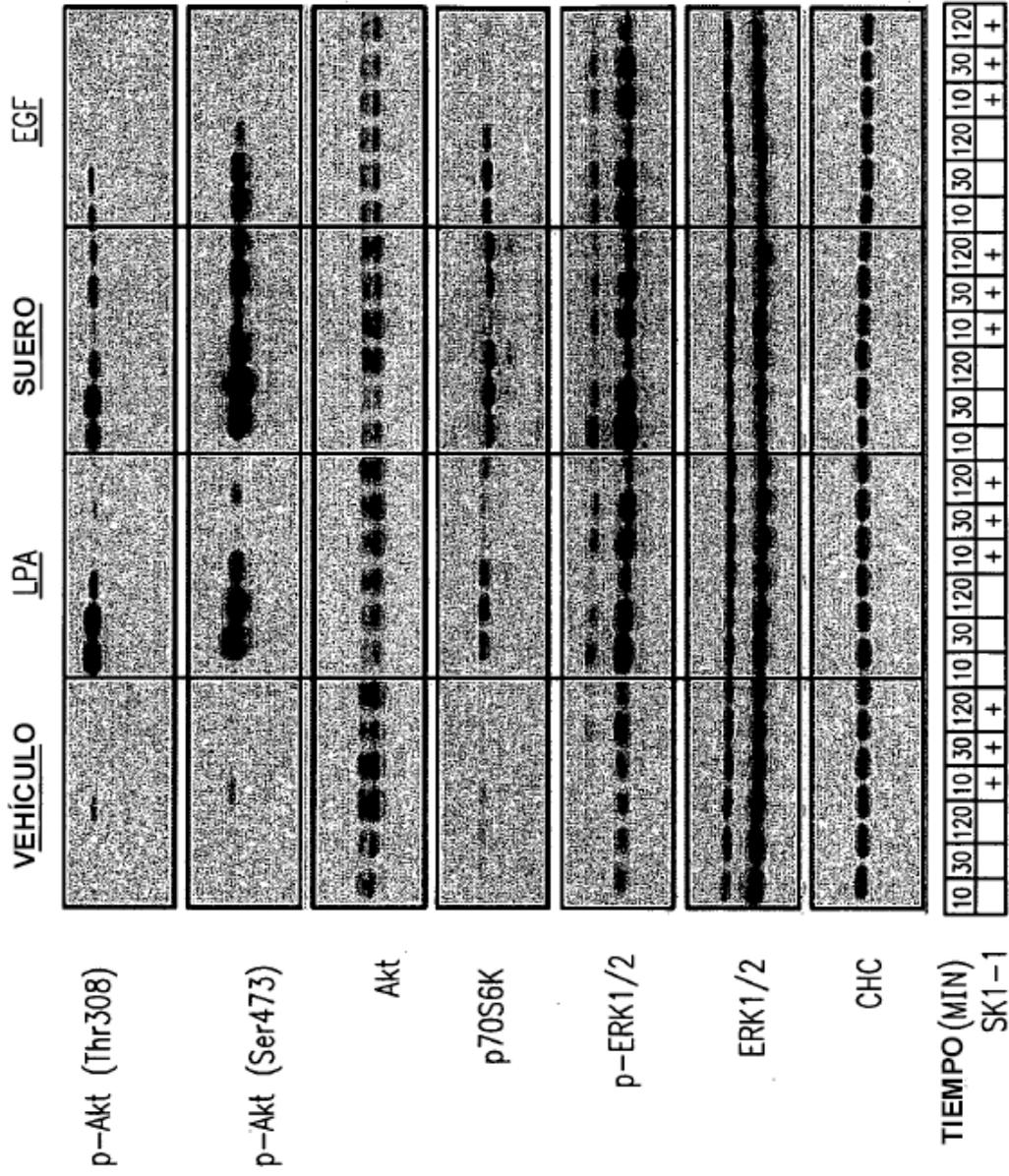


FIG. 2C

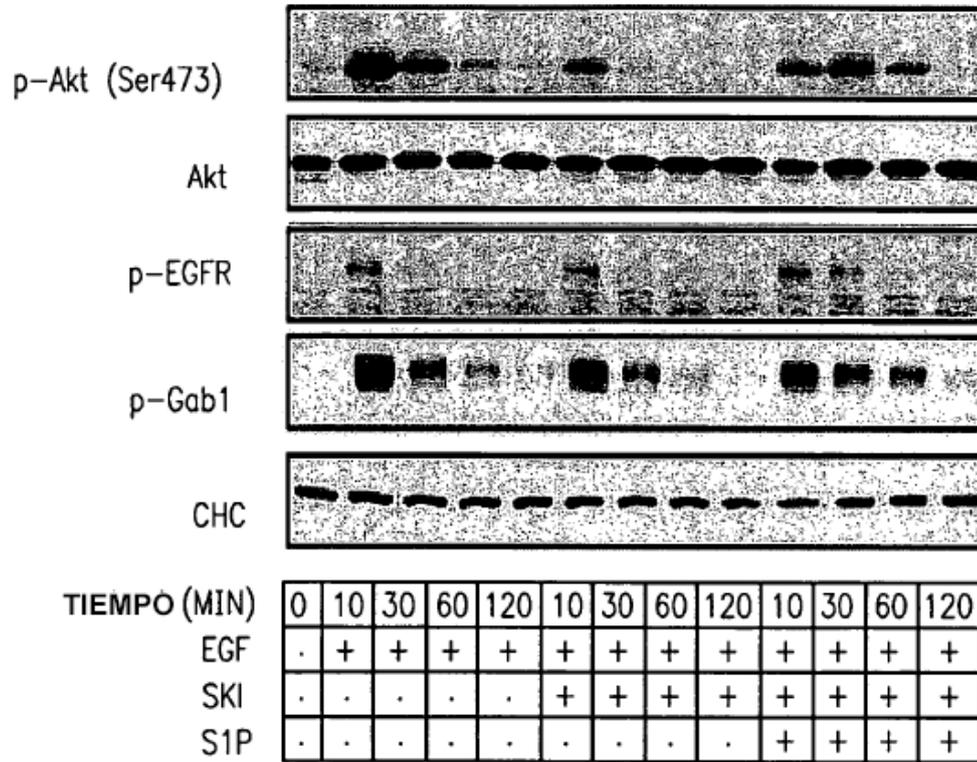


FIG. 2D

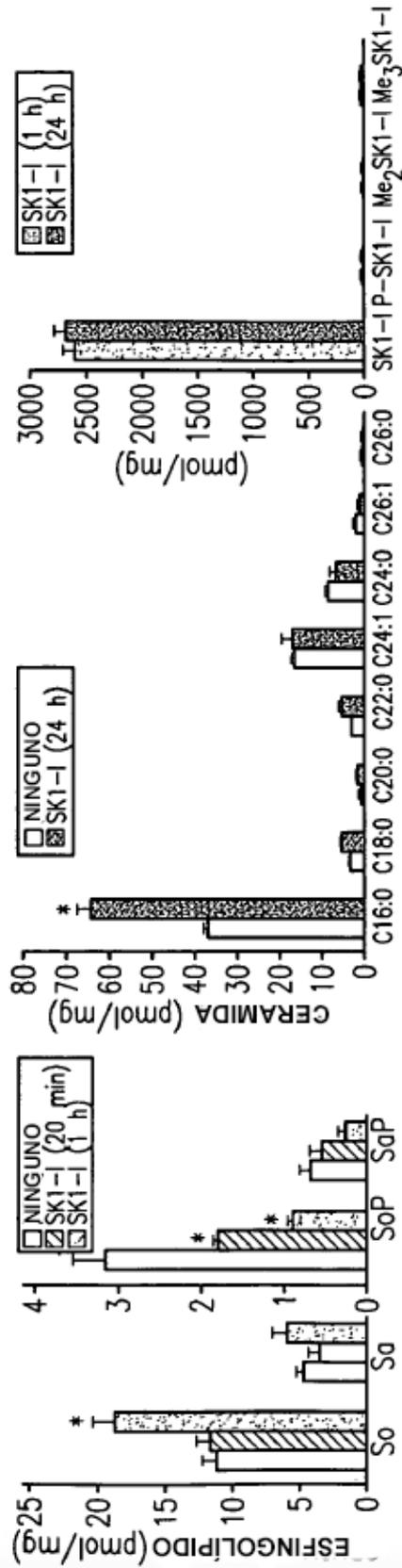


FIG. 3A

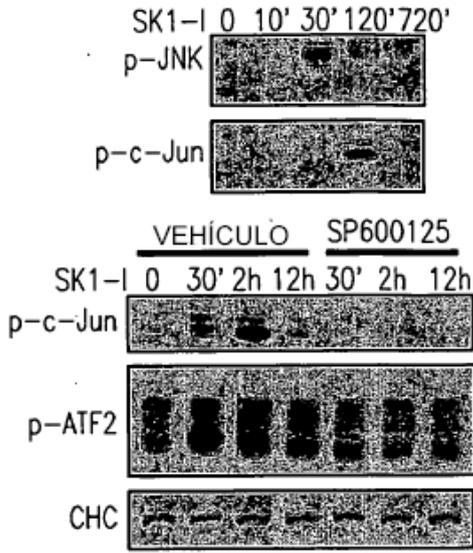


FIG. 3B

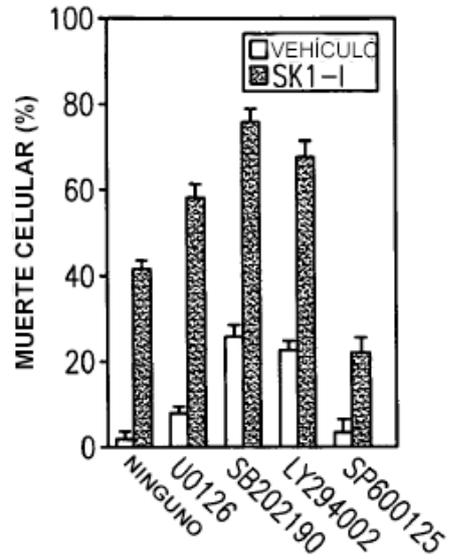


FIG. 3C

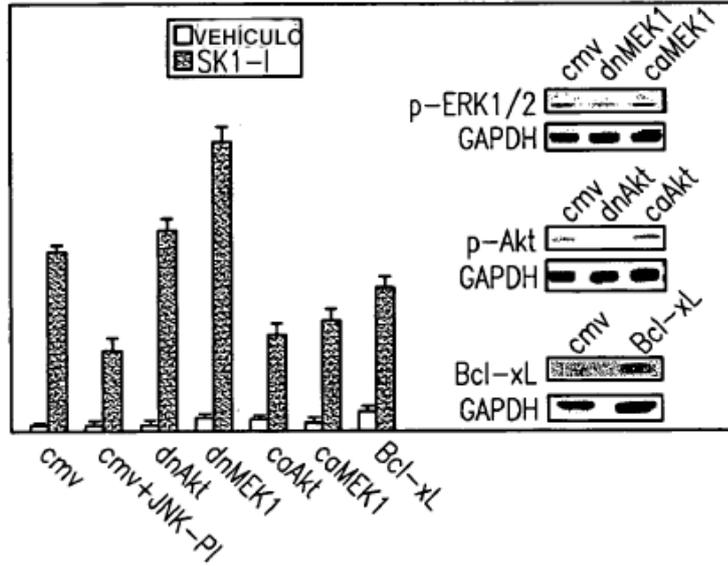


FIG. 3D

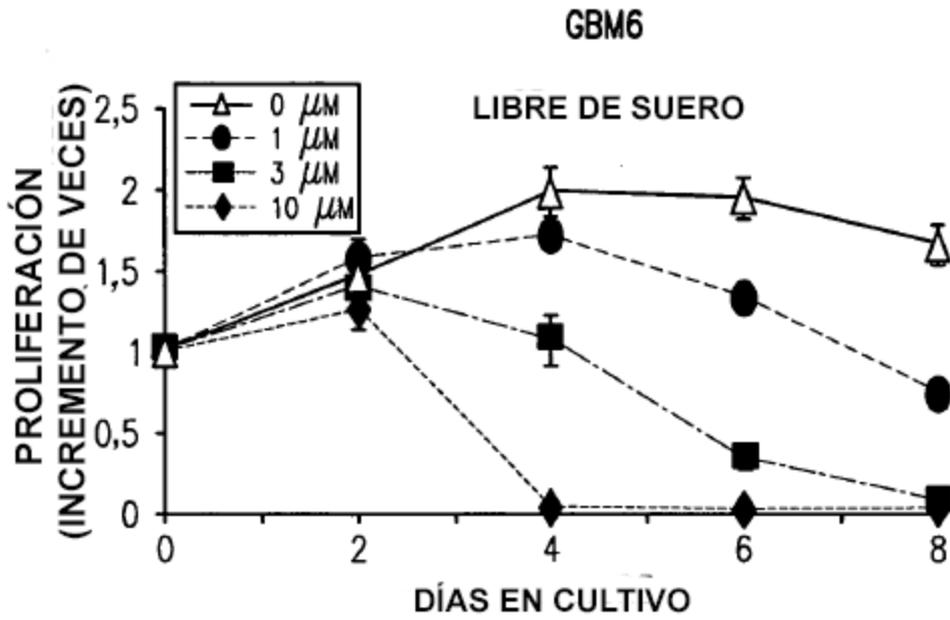


FIG. 4A

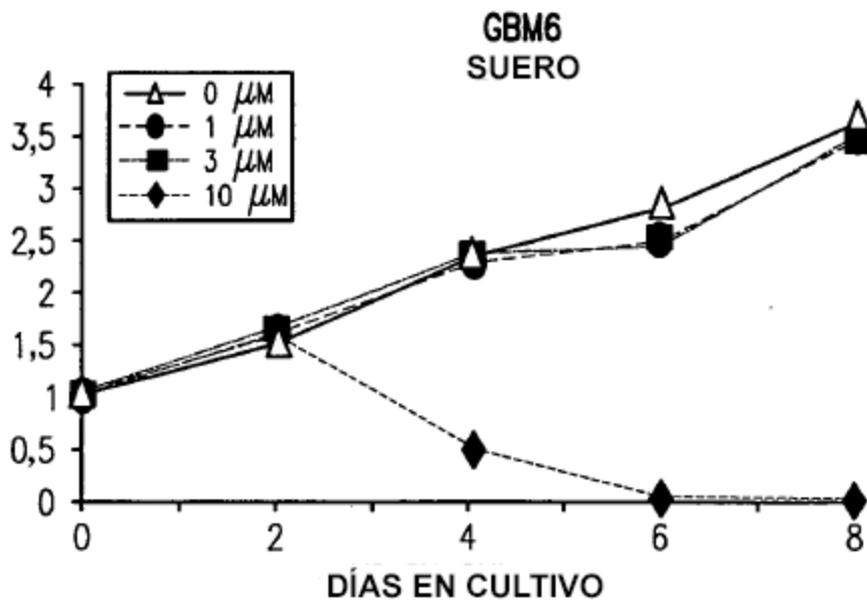


FIG. 4B

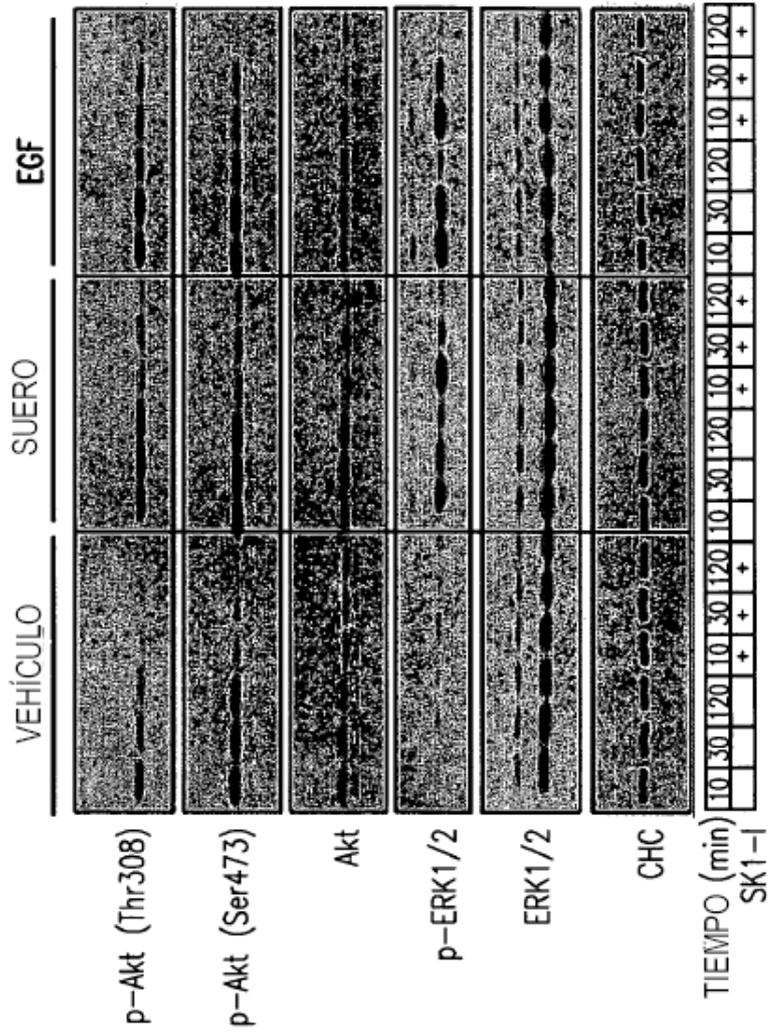


FIG. 4D

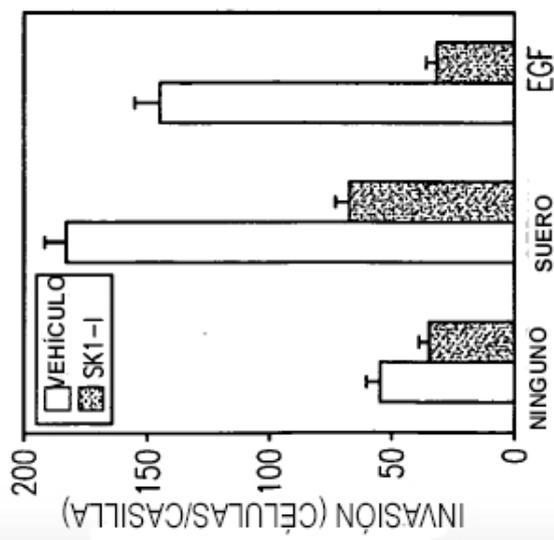


FIG. 4C

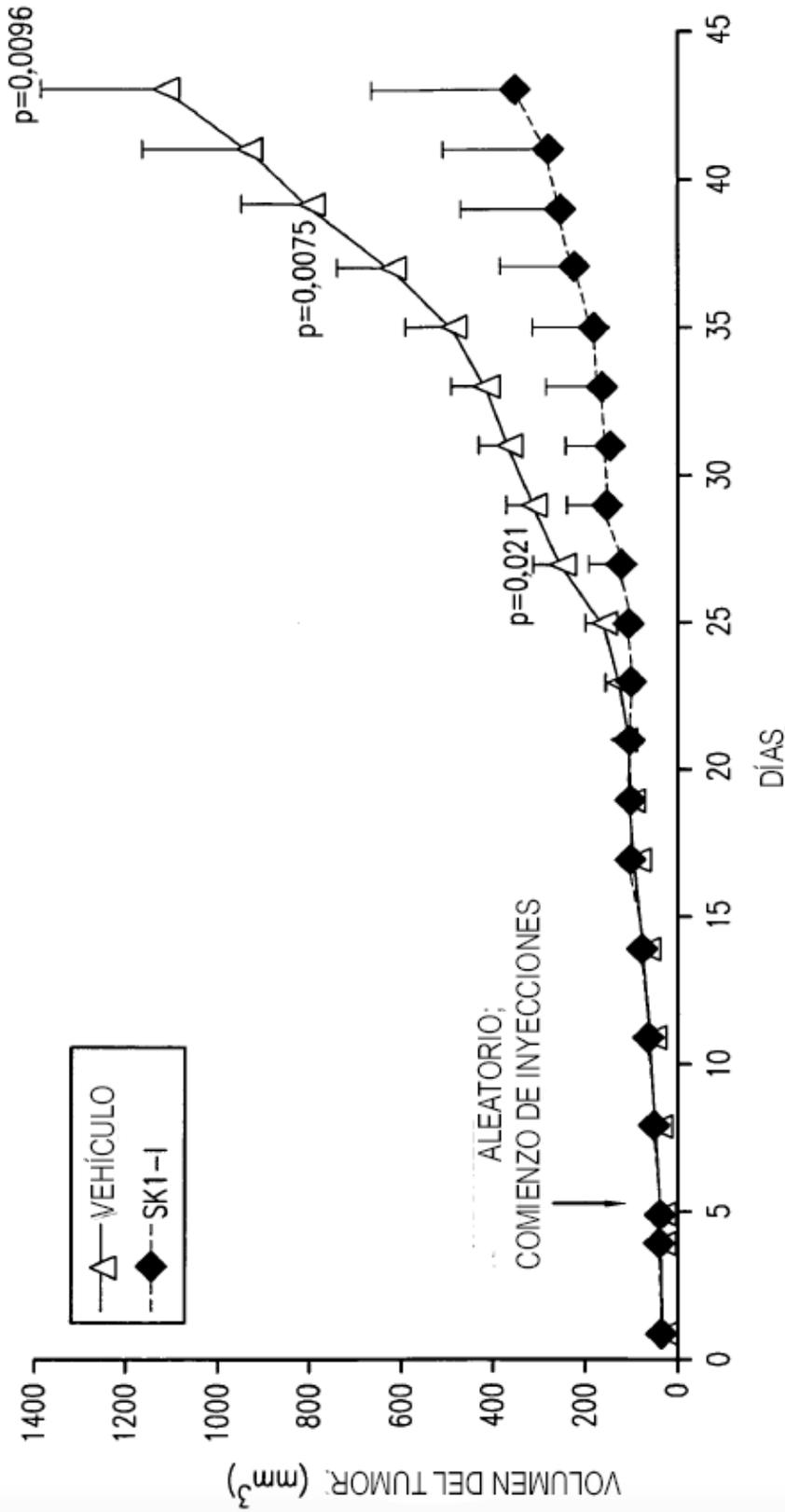


FIG. 5A

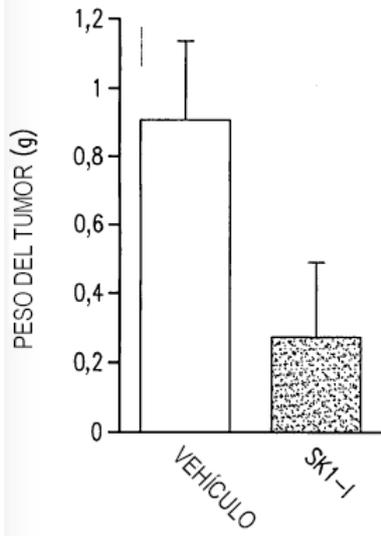


FIG. 5B

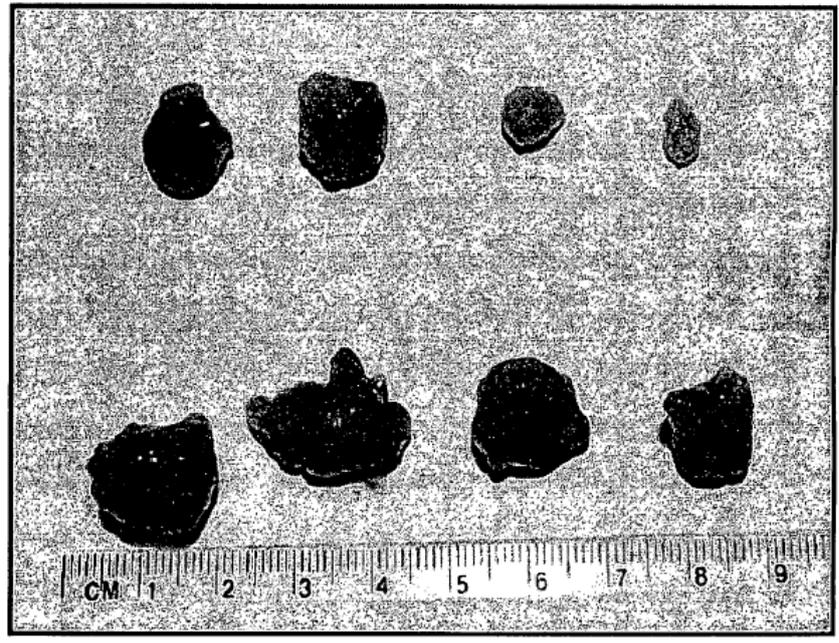


FIG. 5C

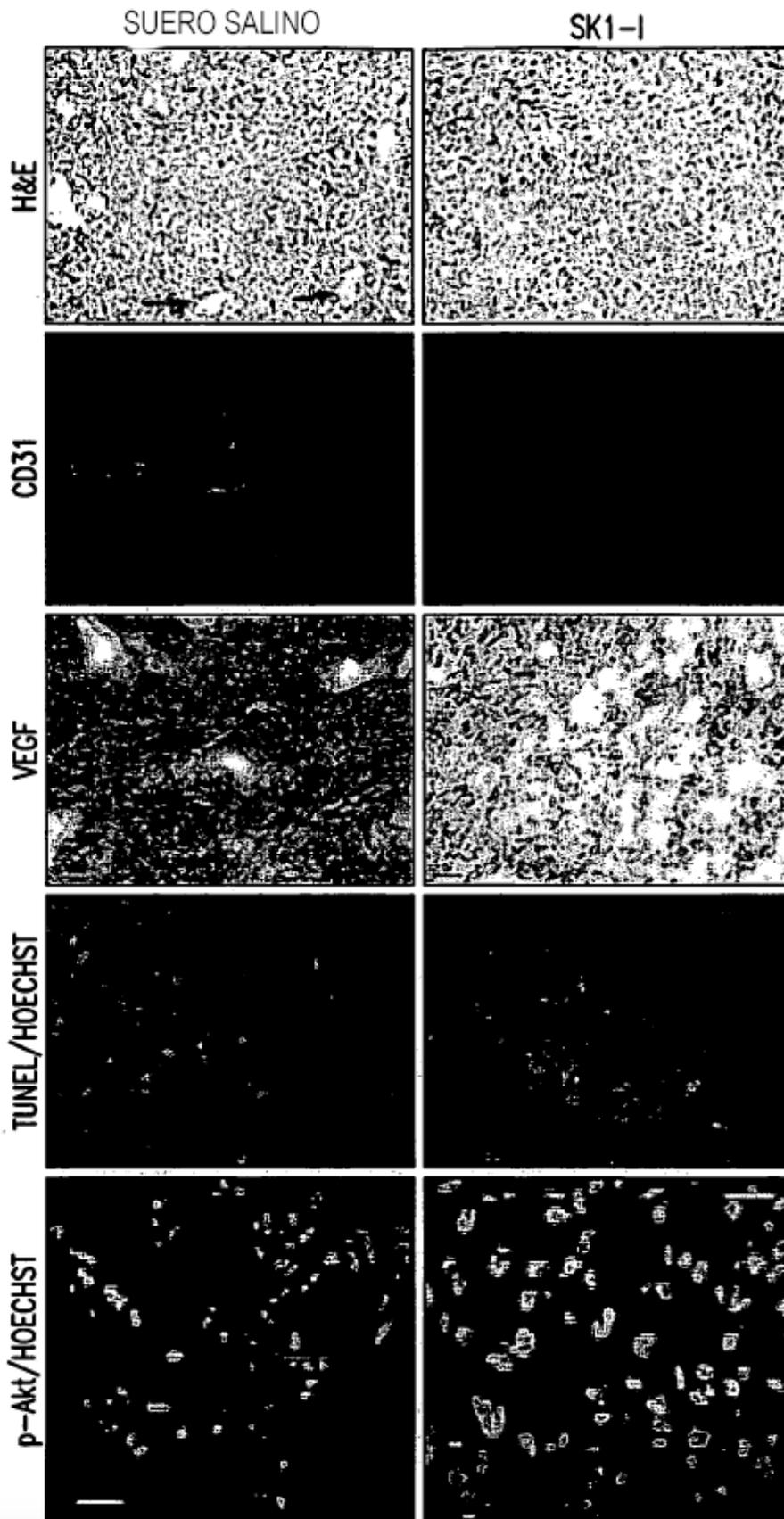


FIG. 6

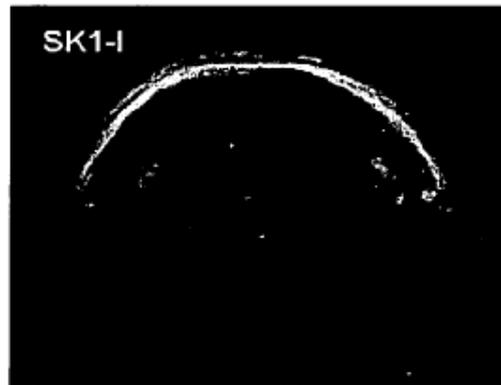
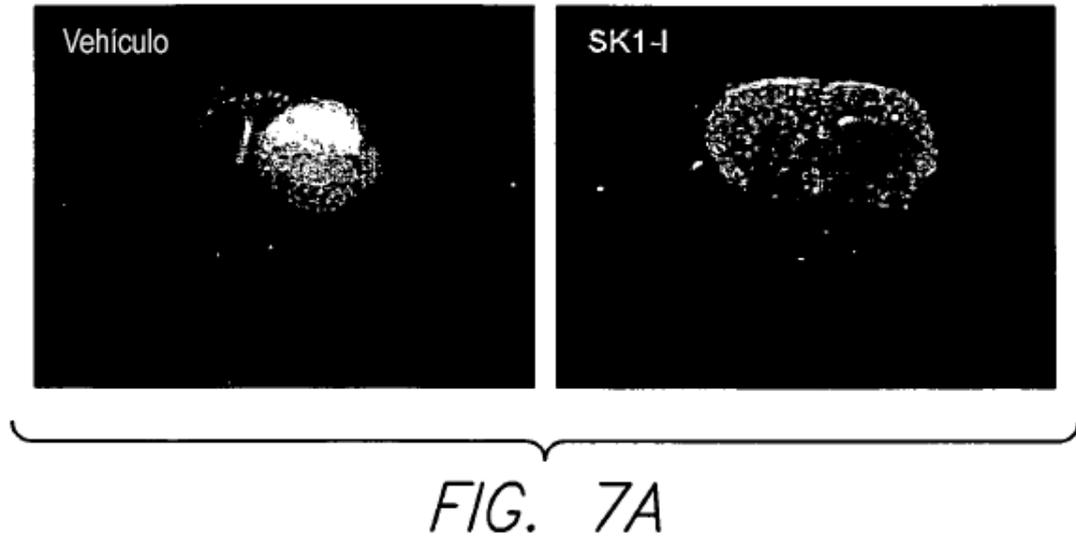


FIG. 7B

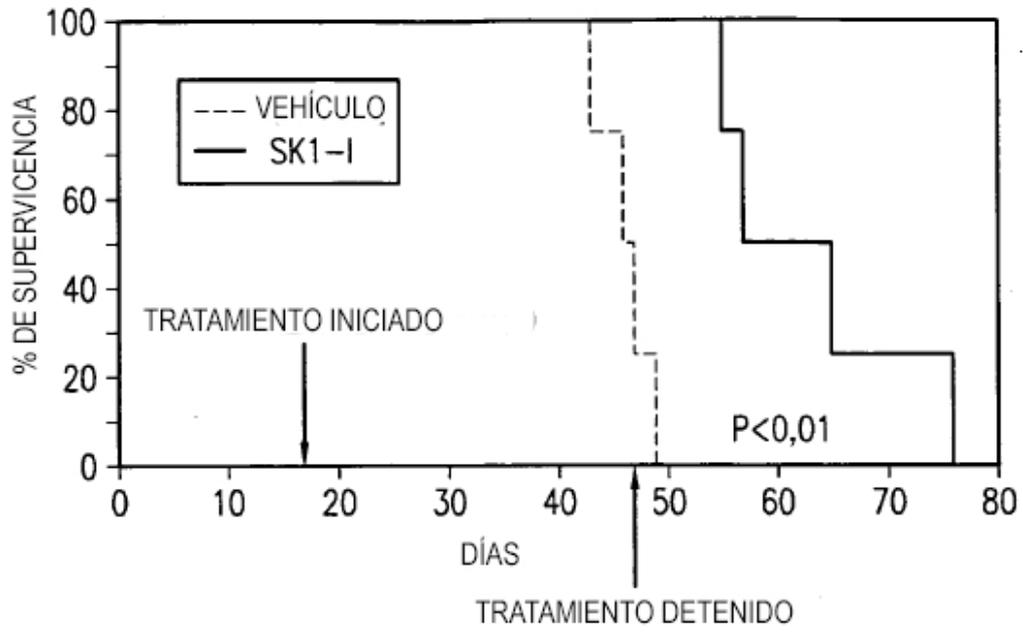
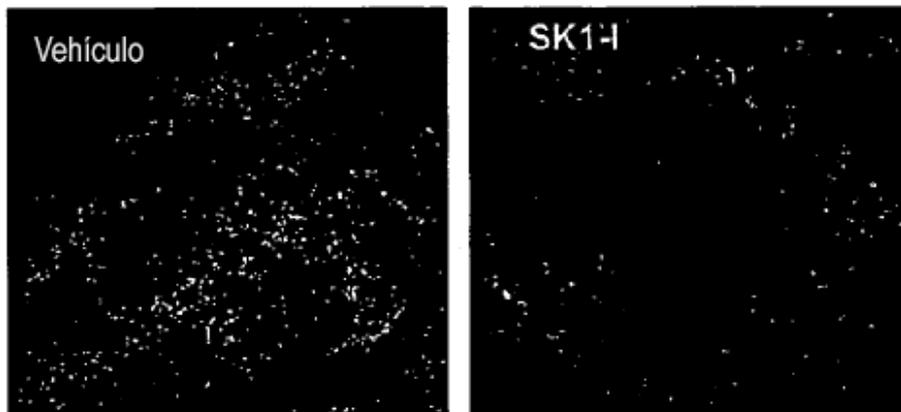


FIG. 7C

FIG. 7D



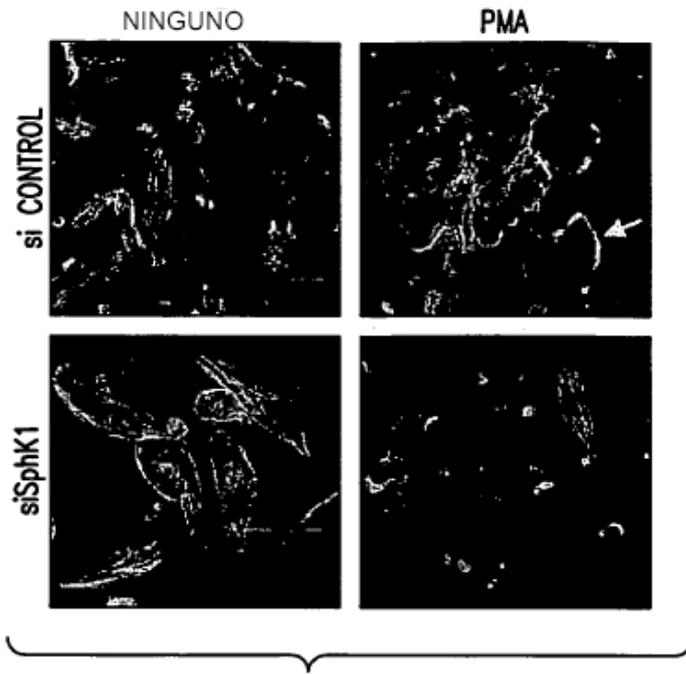
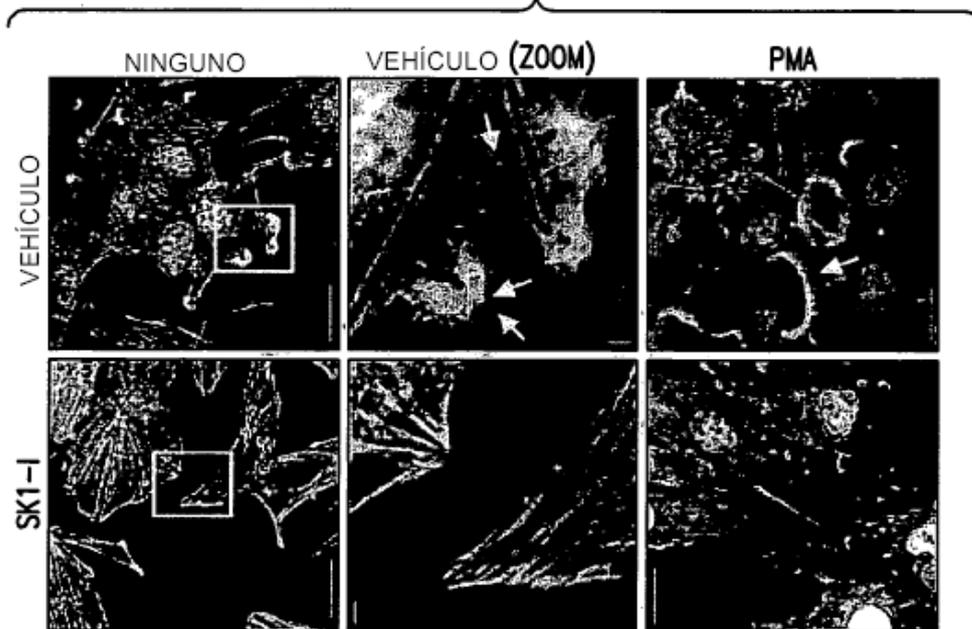


FIG. 8A

FIG. 8B



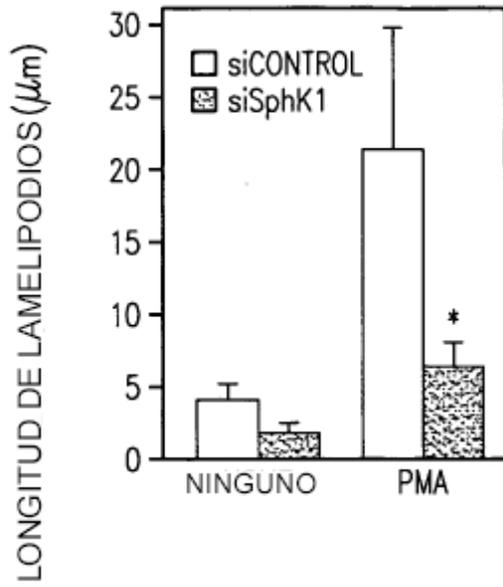


FIG. 8C

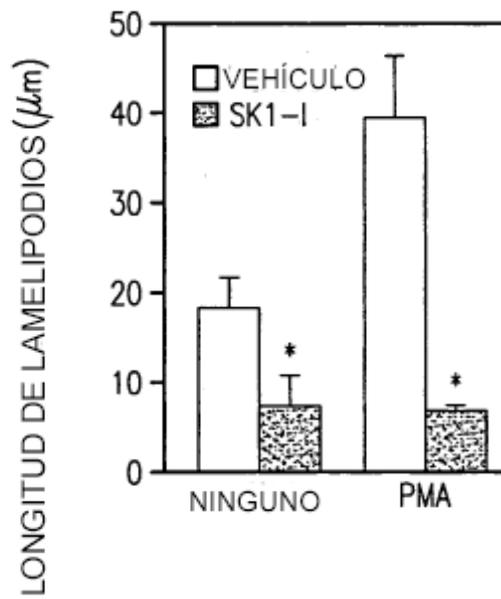


FIG. 8D

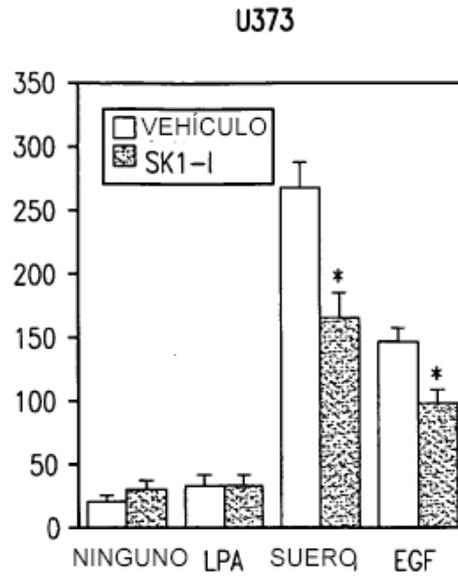


FIG. 9A

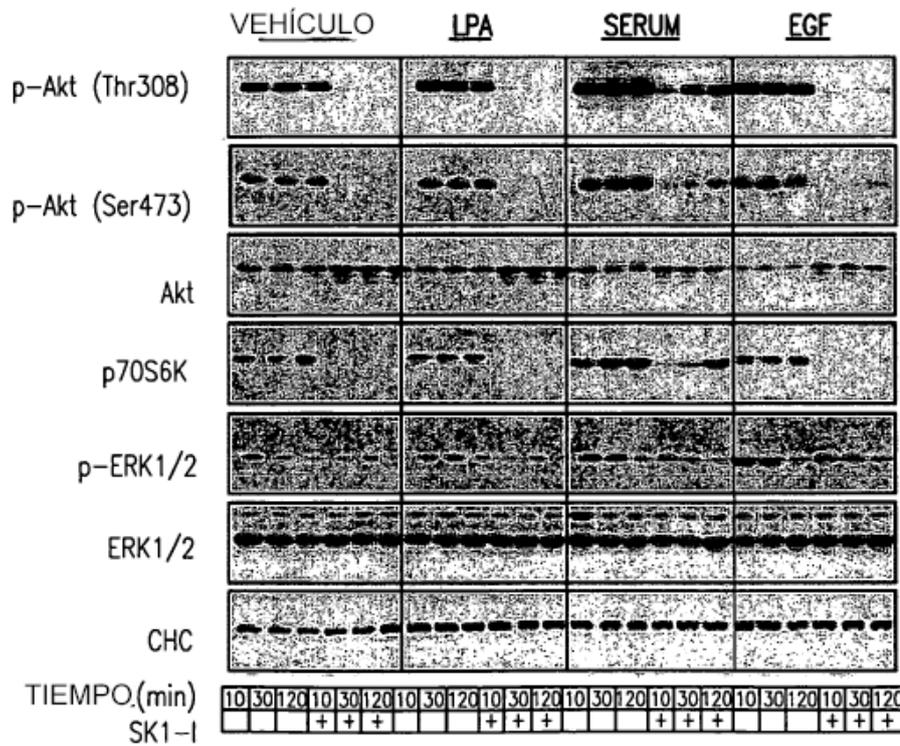


FIG. 9B

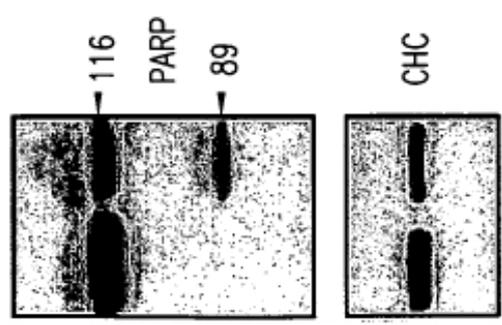
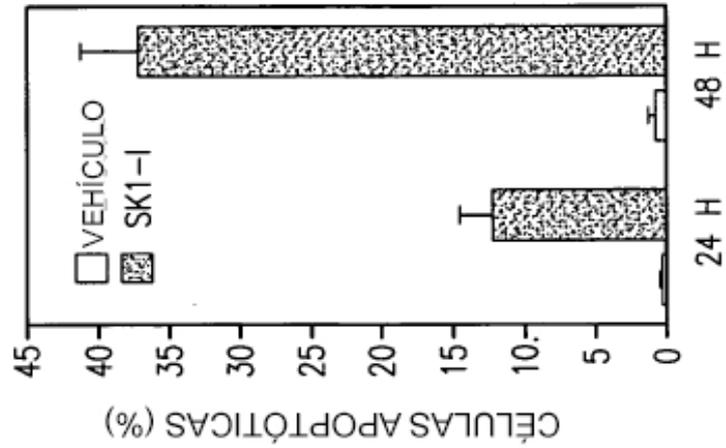
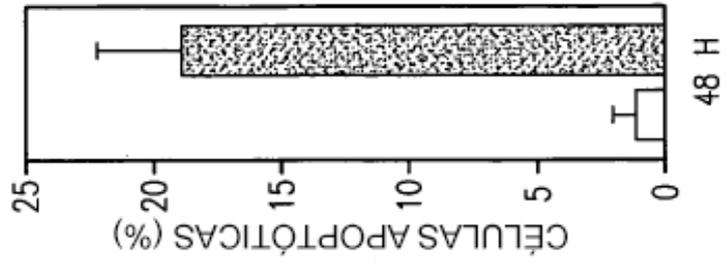
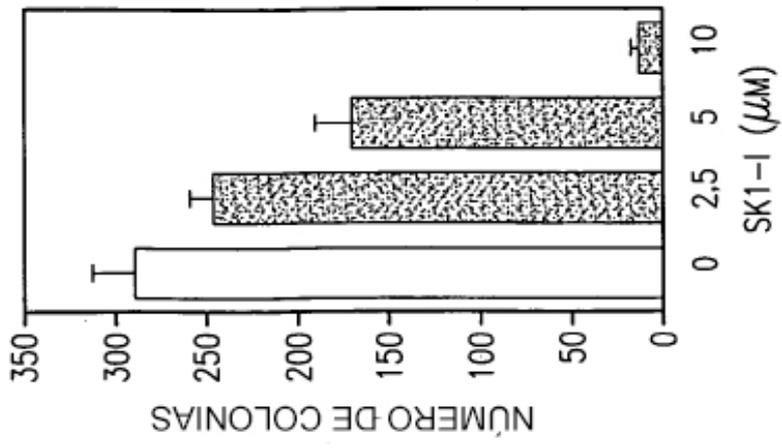


FIG. 10A

FIG. 10D

FIG. 10C

FIG. 10B