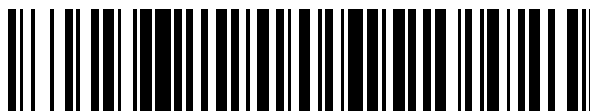


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 250**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2010 PCT/EP2010/067491**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11058175**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2010 E 10776734 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2502069**

54 Título: **Compuestos que inhiben la señalización de CD95 para el tratamiento del cáncer pancreático**

30 Prioridad:

16.11.2009 EP 09176099

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2019

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARTIN-VILALBA, ANA;
HERHAUS, PETER;
SANCHO-MARTINEZ, IGNACIO;
KLEBER, SUSANNE y
WELSCH, THILO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 728 250 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

Compuestos que inhiben la señalización de CD95 para el tratamiento del cáncer pancreático

La presente divulgación se refiere a compuestos que inhiben la señalización de CD95 en células de cáncer pancreático. Adicionalmente, la presente divulgación contempla medicamentos que comprenden tal compuesto para la prevención y/o el tratamiento del cáncer pancreático, así como el uso de tal compuesto para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer pancreático, la prevención de la migración de células cancerosas y/o prevención y/o tratamiento de una reacción inflamatoria. La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para la identificación de un compuesto que inhibe la señalización de CD95, así como a un procedimiento para la fabricación de un medicamento que comprende las etapas del procedimiento para la identificación de un compuesto que inhibe la señalización de CD95 y la etapa adicional de la formulación del compuesto inhibidor como medicamento.

CD95 (sinónimos: FasR, Apo-1) es un receptor en la superficie de células de mamíferos, que se sabe que tiene la capacidad de inducir apoptosis al unirse a la forma trimérica de su ligando cognado, CD95L (Krammer, PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795. Adicionalmente, se encontró que el sistema CD95/CD95L era usado por células malignas para aumentar su capacidad invasora y metastásica. En esta ruta, la activación de CD95 aumenta la invasión al activar la ruta de PI3K, lo que lleva a un aumento de la expresión de las metaloproteinasas (Kleber, S., Et al., (2008). Yes y PI3K se unen a CD95 para señalar la invasión de glioblastoma. *Cancer Cell* 13, 235-248). Trauzold et al. (2005), *FASEB J* 19 (6): 620 divulga anticuerpos anti-CD95L neutralizantes.

En un modelo de glioma, se encontró que las consecuencias de la activación de CD95 dependían de la estadificación del tumor: la activación de CD95 causaba apoptosis solamente en células tumorales de grado bajo (grado I y II de la OMS), mientras que las células de grado alto (grado IV) los tumores fueron resistentes a la apoptosis. Además, en células de grado alto la migración y la invasión se activaron mediante la activación de CD95 (Kleber, S., Et al., (2008). Yes y PI3K se unen a CD95 para señalar la invasión del glioblastoma *Cancer Cell* 13, 235-248). El documento WO 2008/080623 enseña el tratamiento del glioblastoma multiforme de grado alto mediante la prevención o la interrupción de la unión de CD95 a su ligando, CD95L.

El cáncer pancreático tiene una incidencia de aproximadamente 10 a 13 casos por 100.000 sujetos y año; de estos, el 95 % son adenocarcinoma pancreático. Este cáncer está asociado con un pronóstico muy desfavorable, que se debe principalmente al hecho de que los pacientes usualmente tienen períodos iniciales muy largos sin síntomas. Como consecuencia, solo el 7 % de los casos de cáncer pancreático se diagnostican mientras el cáncer todavía está confinado al sitio primario (etapa localizada), mientras que más del 50 % se diagnostica solo después de que el cáncer ya haya hecho metástasis (etapa distante). Las tasas de supervivencia relativas correspondientes a 5 años son del 22 % para la etapa localizada y menos del 2 % para la etapa distante, respectivamente.

Para los pacientes con cáncer pancreático no elegibles para la resección quirúrgica con intención curativa, no se dispone de ningún tratamiento curativo. Se han diseñado regímenes de quimioterapia que utilizan Gemcitabina, pero debido a la alta resistencia de las células de cáncer pancreático a la quimioterapia, se utilizan principalmente como una medida paliativa para mejorar la calidad de vida de los pacientes. El impacto de diversos regímenes de quimioterapia y/o radioterapia en la supervivencia está en el intervalo de meses, por lo que el pronóstico no mejora significativamente con tales tratamientos (Pawlik, T.M., et al., (2008). Evaluating the impact of a single-day multidisciplinary clinic on the management of pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 15, 2081-2088.). Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de terapias mejoradas para el cáncer pancreático y de nuevos compuestos que puedan resultar útiles en el tratamiento de este cáncer.

La presente invención, ahora, se refiere a un compuesto que inhibe la señalización de CD95 en una célula de cáncer pancreático para usar en la prevención de la formación de metástasis por células de cáncer pancreático y/o para tratar el cáncer pancreático de acuerdo con la reivindicación 1.

El término "señalización de CD95" como se usa en esta memoria descriptiva, preferiblemente, se refiere a la transmisión de al menos una señal moduladora de la actividad de un componente de la ruta de señalización de CD95 a otra en células de cáncer pancreático. Debe entenderse que la señalización de CD95 como se usa en este documento se relaciona específicamente con la transmisión de señales moduladoras de actividad que se transmiten a través de CD95 y se transmiten a través de la interacción de CD95 con Sck (nombre alternativo: SHC2, Proteína transformante que contiene el dominio de homología-2 de Src) en una célula de cáncer pancreático. Los componentes preferidos de la ruta de señalización de CD95 se describen en otra parte de este documento. Preferiblemente, la señal de modulación de la actividad es una señal de activación. Debe entenderse, sin embargo, que la inactivación de uno de los componentes de una ruta de señalización también puede conducir a una activación de esta ruta de señalización en su conjunto, por lo que la señal de modulación de la actividad transmitida también puede ser una señal inhibidora. Los modos mediante los cuales se transmiten señales moduladoras de actividad comprenden, por ejemplo, interacción proteína-proteína, inducción de isomerización, procesamiento proteolítico, translocación intracelular y/o transferencia de al menos una fracción de Ubiquitina. Preferiblemente, la transmisión de una señal moduladora de actividad comprende la transferencia de al menos un grupo de molécula pequeña, como, por ejemplo, un grupo sulfato, uno fosfato, uno acilo, uno metilo o uno prenilo. En las células tumorales

pancreáticas, la cascada corriente arriba de eventos moleculares después de la estimulación con CD95 es activada por la proteína adaptadora no catalítica Sck. La estimulación de CD95 conduce a un aumento de la fosforilación de la tirosina Sck y la activación de PI3K y ERK, lo que conduce a un aumento de la migración.

Un "componente de señalización de la ruta de señalización de CD95" (componente de señalización de CD95) en el contexto de la presente divulgación, preferiblemente, es una molécula química involucrada en la generación y/o transmisión intra o extracelular de una señal activadora transmitida a través o generada por CD95 y transmitida a través de SHC como se describe aquí anteriormente en una célula de cáncer pancreático. Preferiblemente, dicho componente de señalización de CD95 es una proteína. Más preferiblemente, dicho componente de señalización de CD95 se selecciona del grupo que consiste en Ligando CD95 Seq ID NO:1, Genbank Acc No: NP_000630.1 GI:4557329), CD95 (Seq ID NO:2, Genbank Acc No: AAH12479.1 GI:15214692), la SFK (quinasas de la familia Src) (tirosina quinasa linfoide B, Seq ID NO: 3, Genbank Acc No: NP_001706.2 GI:33469982; isoforma A homóloga del oncógeno viral de sarcoma de Yamaguchi (v-yes-1), Seq ID NO: 4, Genbank Acc No: NP_002341.1 GI:4505055; Yamaguchi sarcoma viral (v-yes-1) isoforma B homóloga del oncógeno viral de sarcoma de Yamaguchi (v-yes-1), Seq ID No: 5, Genbank Acc No: NP_001104567.1 GI: 162287326; isoforma p61HCK de células quinasas hemopoyéticas, Seq ID NO:6, Genbank Acc No: NP_002101.2 GI:30795229; proto-oncogén tirosina-proteína quinasa SRC, Seq ID NO: 7, Genbank Acc No: NP_938033.1 GI:38202217; proto-oncogén tirosina-proteína quinasa FGR, Seq ID NO: 8, Genbank Acc No: NP_001036212.1 GI:112382244; precursor de la proteína tirosina quinasa específica de linfocitos, Seq ID NO: 9, Genbank Acc No: NP_001036236.1 GI:112789548; proto-oncogén tirosina-proteína quinasa fyn, Seq ID NO: 10, Genbank Acc No: NP_694593.1 GI:23510364; y homólogo 1 del oncógeno viral yes-1 homolog 1, Seq ID NO: 11, Genbank Acc No: NP_005424.1 GI:4885661), Grb2 (proteína-2 de Unión del Receptor del Factor de Crecimiento) (proteína-2 de unión del receptor del factor de crecimiento isoforma 1, Seq ID NO: 12, Genbank Acc No: NP_002077.1 GI:4504111; proteína-2 de unión del receptor del factor de crecimiento isoforma 2, Seq ID NO: 13, Genbank Acc No: NP_987102.1 GI:45359859), SOS (*Son of Sevenless*) (homólogo 1 de *Son of Sevenless*, Seq ID NO: 14, Genbank Acc No: NP_005624.2 GI:15529996), y las pequeñas proteínas de unión a GTP de la familia Ras (v-Ha-ras Isoforma 1 homóloga del oncógeno viral del sarcoma de rata Harvey, Seq ID NO: 15, Genbank Acc No: NP_001123914.1 GI:194363762; v-Ha-ras Isoforma 2 homóloga del oncogén viral del sarcoma de rata Harvey, Seq ID NO: 16, Genbank Acc No: NP_789765.1 GI:34222246; precursor de la isoforma b de la proteína c-K-ras2, Seq ID NO: 17, Genbank Acc No: NP_004976.2 GI:15718761; precursor de la isoforma a de la proteína c-K-ras2, Seq ID NO: 18, Genbank Acc No: NP_203524.1 GI:15718763; precursor homólogo de oncogenes viral de neuroblastoma RAS (v-ras), Seq ID NO:19, Genbank Acc No: NP_002515.1 GI:4505451). Más preferiblemente, dicho componente de señalización de CD95 es Sck (proteína 2 transformante de SHC (que contiene dominio de homología 2 de Src) , Seq ID NO: 20, Genbank Acc No: NP_036567.2 CI:169790811).

El término "compuesto" se refiere a una molécula química, es decir, cualquier sustancia orgánica o inorgánica. La molécula orgánica puede pertenecer a cualquier clase química conocida de moléculas. Preferiblemente, las moléculas orgánicas son lípidos, ácidos grasos, purinas, pirimidinas, alcaloides, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, aminos biogénicas, isoprenoides o esteroides.

El término "compuesto que inhibe la señalización de CD95" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que, cuando se pone en contacto con una célula de cáncer pancreático, provoca un cambio en la expresión de al menos un gen que codifica un componente de señalización de CD95 (gen de señalización de CD95) y/o en la actividad y/o estabilidad de al menos uno de los productos génicos de dicho gen de señalización de CD95. Dicho cambio es en tal medida que dicha célula de cáncer pancreático se diferencia de forma mensurable de una célula de control que no se pone en contacto con dicho compuesto. Los parámetros que pueden determinarse para detectar la inhibición de la señalización de CD95 incluyen la proliferación celular, la migración celular, la producción de metaloproteinasas por parte de la célula, la formación de metástasis y la invasividad del tumor. La actividad de un producto génico de un gen de señalización de CD95 es su capacidad para contribuir a la transmisión de señales moduladoras de actividad en la señalización de CD95 como se describe anteriormente en este documento. La estabilidad de un producto génico de un gen de señalización de CD95 es su grado de resistencia a la pérdida de actividad o a la desintegración. La estabilidad de un producto genético puede medirse determinando el tiempo requerido hasta que el número de moléculas o la actividad de dichas moléculas haya disminuido a una cierta fracción del valor inicial, por ejemplo 0,5, 0,2 o 0,1. Por ejemplo, el tiempo requerido para reducir la cantidad o la actividad de una población dada de moléculas a 0,5 es el período de vida media; por lo tanto, un período de vida media más largo indica una mayor estabilidad. Los procedimientos para determinar un cambio en la actividad o la estabilidad de un producto génico dependerán de la naturaleza de dicho producto genético; tales procedimientos pueden comprender, por ejemplo, determinar la cantidad de un ácido polinucleico mediante procedimientos de hibridación o PCR bien conocidos por los expertos en la técnica, o medir la actividad enzimática específica en, por ejemplo, un ensayo de quinasa como se describe aquí a continuación (véase, por ejemplo, el Ejemplo 5).

Preferiblemente, el compuesto que inhibe la señalización de CD95 interfiere negativamente con, es decir, inhibe, la función de al menos uno de dichos genes de señalización de CD95 o sus productos genéticos, lo que significa que, preferiblemente, disminuye la expresión de dicho al menos un gen o disminuye la actividad y/o estabilidad de al menos uno de los productos de dicho al menos un gen. Sin embargo, dado que el aumento de la expresión o activación de un solo componente de señalización de CD95 puede llevar a la inhibición general de la señalización de CD95 como se detalla en esta memoria descriptiva más arriba, el compuesto que inhibe la señalización de CD95

también puede activar la función de al menos uno de dichos genes de señalización de CD95 o sus productos genéticos.

5 Debe entenderse que modular la función de un gen o sus productos genéticos se refiere a modulaciones estadísticamente significativas de la función, es decir, puede referirse a cambios modestos en la función de un gen o sus productos genéticos, lo que significa un cambio en la cantidad, actividad, o vida media del 10 % o más, 20 % o más, 30 % o más, 40 % o más, o 50 % o más. Además, en el caso de la inhibición de la señalización de CD95, la inhibición de la función de uno de los genes que codifica un componente que media la señalización de CD95 hasta un grado que lleva a una fracción de al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 % de las células que tienen señalización de CD95 no funcional es apropiada. El experto en la técnica puede determinar si la modulación es estadísticamente significativa sin más dilación, preferiblemente aplicando estadísticas estándar tales como, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Confianza preferida los intervalos son al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %. Los valores de p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

15 Se contempla mediante la presente divulgación que los compuestos adecuados pueden obtenerse preferiblemente seleccionando bibliotecas químicas artificiales obtenidas, por ejemplo, mediante metodologías de química combinatoria o mediante la selección de bibliotecas de compuestos naturales obtenidas, por ejemplo, fraccionando extractos de organismos biológicos tales como arqueas, bacterias, hongos, plantas, o animales. Los compuestos adecuados también pueden generarse mediante procedimientos de selección *in silico* basados, por ejemplo, en metodologías de modelado molecular.

Preferiblemente, los compuestos que modulan la función de un gen de señalización de CD95 se identifican usando ensayos tales como ensayos de migración o determinando la inducción de la fosforilación de objetivos corriente abajo, tales como ERK o AKT. Más preferiblemente, dichas tecnologías se utilizan en sistemas de cribado de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Liu et al. (2004), Am. J. Pharmacogenomics 4 (4), 263 - 276).

25 Preferiblemente, los compuestos que inhiben la señalización de CD95 se seleccionan de una lista que consiste en agentes de interferencia de ARN (ARNi), ribozimas, enzimas de ADN, anticuerpos inhibidores y aptámeros. Los procedimientos para obtener tales compuestos son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo Bhindi et al (2007), Am. J. Path. 171, 1079-1088, y el resto de esta memoria descriptiva).

30 "Interferencia de ARN" se refiere al silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia de un gen diana seleccionado. Los agentes de ARNi en el contexto de la presente invención, preferiblemente, reducen la expresión de un gen de señalización de CD95 por degradación del ARN transcrito a partir de dicho gen de señalización de CD95 (ARN diana) o por inhibición de la traducción de dicho ARN diana. Los ARN diana son preferiblemente ARNm que codifican componentes de señalización de CD95, sin embargo, cualquier tipo de ARN está incluido en los procedimientos de ARNi de la invención. Debe entenderse que el silenciamiento como se usa en este documento no significa necesariamente la abolición completa de la expresión génica en todos los casos. El ARNi, preferiblemente, reduce la expresión génica en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % en comparación con el nivel de expresión en una referencia sin ARNi.

40 El ARNi requiere en la célula la presencia de ARNbc que son homólogos en secuencia a los ARN diana. El término "ARNbc" se refiere a ARN que tiene una estructura dúplex que comprende dos cadenas de ácido nucleico complementarias y antiparalelas. Las cadenas de ARN que forman el ARNbc pueden tener el mismo o un número diferente de nucleótidos, por lo que una de las cadenas de ARNbc puede ser el ARN DIANA. Sin embargo, también se contempla en la presente invención que el ARNbc se forma entre dos tramos de secuencia en la misma molécula de ARN.

45 El ARNi se puede usar para inhibir específicamente la expresión de los genes de señalización de CD95 de la presente invención *in vivo*. Por consiguiente, puede usarse para metodologías terapéuticas para tratar cánceres pancreáticos que están acompañados con una expresión alterada de al menos uno de los genes de señalización de CD95 de la presente invención. Para tales metodologías terapéuticas, pueden introducirse constructos de expresión para ARNip en células diana del huésped que sufren la expresión del gen de señalización de CD95 alterado. En consecuencia, ARNip puede combinarse eficientemente con otras metodologías de terapia.

Los procedimientos relacionados con el uso de ARNi para silenciar genes en animales, incluidos los mamíferos, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hammond et al. (2001), Nature Rev. Genet. 2, 110-119; Bernstein et al. (2001), Nature 409, 363-366; WO 9932619; y Elbashir et al. (2001), Nature 411: 494-498).

55 Como se usa en el presente documento, el término "agente de ARNi", preferiblemente, se refiere a un agente de ARNip o un agente de miARN como se especifica en este documento. El agente de ARNi de la presente invención tiene una longitud y complementariedad suficientes para interactuar de manera estable con el ARN diana, es decir, comprende al menos 15, al menos 17, al menos 19, al menos 21, al menos 22 nucleótidos complementarios al ARN diana. Por "interacción estable" se entiende la interacción del agente de ARNi o sus productos producidos por la

célula con un ARN diana, por ejemplo, formando enlaces de hidrógeno con nucleótidos complementarios en el ARN diana bajo condiciones fisiológicas.

No todos los nucleótidos de un agente de ARNi exhiben necesariamente pares de bases de Watson-Crick completos en la interacción con el ARN diana; Las dos cadenas de ARN pueden ser sustancialmente complementarias.

5 Preferiblemente, la complementariedad entre el agente de ARNi y la diana de ARN es del 100 %, pero puede ser menor si se desea, preferiblemente del 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Por ejemplo, 19 bases de las 21 bases pueden estar emparejadas. En algunos casos, cuando se desea una distinción entre varias variantes alélicas, puede requerirse una complementariedad del 100 % con el gen de señalización de CD95 para discernir efectivamente la secuencia diana de la otra secuencia alélica. Al seleccionar entre objetivos alélicos, la
10 elección de la longitud también es un factor importante porque es el otro factor involucrado en el porcentaje complementario y la capacidad de diferenciar entre diferencias alélicas.

El término "agente de ARNip" como se entiende en este documento abarca: a) un ARNbc que consiste en al menos 15, al menos 17, al menos 19, al menos 21 nucleótidos consecutivos emparejados en bases, es decir, que forman enlaces de hidrógeno con un nucleótido complementario. b) una pequeña molécula de ARN interferente (ARNip) o
15 una molécula que comprende una molécula de ARNip. El ARNip es una molécula de ARN de cadena simple con una longitud, preferiblemente mayor o igual a 15 nucleótidos y, preferiblemente, una longitud de 15 a 49 nucleótidos, más preferiblemente de 17 a 30 nucleótidos, y lo más preferiblemente de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30 nucleótidos. c) un ácido polinucleico que codifica a) o b), en el que, preferiblemente, dicho ácido polinucleico está unido operativamente a una secuencia de control de expresión. Por lo tanto, la función del agente de ARNip
20 para inhibir la expresión del gen de señalización de CD95 puede ser modulada por dicha secuencia de control de expresión. Las secuencias de control de expresión preferidas son aquellas que pueden ser reguladas por estímulos exógenos, por ejemplo el operador tet, cuya actividad puede ser regulada por tetraciclina, o promotores inducibles por calor. Alternativamente o además, se pueden usar una o más secuencias de control de la expresión que permiten la expresión específica del tejido del agente de ARNip.

25 Sin embargo, la presente invención también contempla que el agente de ARNi es un agente de miARN. Un "agente de miARN" como se entiende aquí abarca: a) un pri-microARN, es decir, un ARNm que comprende al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70 nucleótidos emparejados en base a una secuencia complementaria en la misma molécula de ARNm ("madre"), es decir, como un ARNbc, separada por un tramo de nucleótidos emparejados sin bases ("bucle"), b) un pre-microARN, es decir, una molécula de ARNbc que comprende
30 un tramo de al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25 nucleótidos de pares de bases formados por nucleótidos de la misma molécula de ARN (madre), separados por un bucle. c) un microARN (miARN), es decir, un ARNbc que comprende al menos 15, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 21 nucleótidos en dos cadenas de ARN separadas. d) un ácido polinucleico que codifica a) o b), en el que, preferiblemente, dicho ácido polinucleico está unido operativamente a una secuencia de control de
35 expresión como se especifica anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "ribozima" se refiere a una molécula de ARN que se hibrida específicamente a una molécula de ARN diana y que cataliza la hidrólisis de uno o más enlaces fosfodiéster en dicha molécula de ARN diana, lo que provoca que el ARN diana se degrade por enzimas celulares. Las secuencias de ARN que muestran propiedades catalíticas adecuadas, como la ribozima de cabeza de martillo, la ribozima de horquilla o la RNasa P son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Doherty and Doudna (2001), Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 30, 457 - 475). La especificidad de secuencia y, por lo tanto, la especificidad de ARN diana se logra mediante la unión específica de la ribozima al ARN diana por medio del emparejamiento de bases de Watson-Crick de cadenas de ARN antiparalelo complementarias. Los procedimientos para generar ribozimas dirigidas contra secuencias de ARN de interés son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Citti and Rainaldi
40 (2005), Curr. Gene Ther. 5(1), 11 - 24).

El término "ADNzima" se refiere a una molécula de ADN monocatenaria que tiene la misma unión y propiedades catalíticas que una ribozima; sin embargo, dicha ADNzima comprende desoxirribonucleótidos en lugar de ribonucleótidos. Los procedimientos para generar ADNzimas, como la selección *in vitro*, son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Achenbach et al. (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5(4), 321 - 336).

50 Sin embargo, la presente invención también contempla que la ribozima o ADNzima comprende nucleótidos modificados o compuestos que modifican la estabilidad, especificidad o propiedades catalíticas de dichas ribozimas o ADNzimas. Debe entenderse que "catalizar" como se usa en este documento no significa necesariamente la promoción de más de un evento de hidrólisis por molécula de ribozima o ADNzima.

El término "anticuerpo", como se usa en esta memoria descriptiva, se refiere a una molécula del subgrupo de proteínas gamma globulina, que también se conoce como inmunoglobulinas (Ig). Los anticuerpos pueden ser, preferiblemente, de cualquier subtipo, es decir, IgA, IgD, IgE, IgM o, más preferiblemente, IgG. Los anticuerpos contra polipéptidos codificados por los genes de señalización de CD95 de la presente divulgación pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos usando un polipéptido purificado o un fragmento adecuado derivado de ellos como un antígeno. Un fragmento que es adecuado como antígeno puede identificarse mediante
60 algoritmos de determinación de antigenicidad bien conocidos en la técnica. Tales fragmentos pueden obtenerse

- mediante digestión proteolítica a partir de polipéptidos codificados por genes de señalización de CD95 o pueden ser péptidos sintéticos. Preferiblemente, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo humano o humanizado o primatizado, quimerizado o fragmento del mismo. También están comprendidos como anticuerpos de la presente divulgación un anticuerpo biespecífico o trispecífico, un anticuerpo sintético, un fragmento de anticuerpo, tal como fragmentos Fab, Fv o scFv, etc., o un derivado modificado químicamente de cualquiera de estos. Un anticuerpo de la presente divulgación preferiblemente se une específicamente (es decir, no reacciona de forma cruzada con otros polipéptidos o péptidos) a uno de los polipéptidos de la divulgación. La unión específica puede probarse mediante diversas técnicas bien conocidas.
- Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden obtenerse usando procedimientos que se describen, por ejemplo, en Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante las técnicas originalmente descritas en Köhler and Milstein, Nature 256 (1975), 495, and Galfré, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3, que comprenden la fusión de células de mieloma de roedor u otro ratón en células de bazo derivadas de mamíferos inmunizados.
- El término "anticuerpo inhibidor" se refiere a un anticuerpo que inhibe la actividad de un polipéptido codificado por un gen de señalización de CD95 al que se hace referencia de acuerdo con la presente divulgación. Dicha inhibición está causada preferiblemente por la unión del anticuerpo inhibidor a un centro activo o a un sitio de interacción de un polipéptido de la divulgación, causando una inhibición de la señalización de CD95 en la célula tratada con dicho anticuerpo inhibidor. El experto en la técnica conoce medios y procedimientos para obtener anticuerpos inhibidores de proteínas específicas, como por ejemplo el procedimiento propuesto por Rosen and Koshland (1988), Anal. Biochem. 170 (1), 31 - 37. Debe entenderse que inhibir como se usa en este documento no significa necesariamente la eliminación completa de la actividad en todos los casos. Los anticuerpos inhibidores, preferiblemente, reducen la señalización de CD95 en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, o al menos un 50 % en comparación con una referencia.
- En el contexto de la presente divulgación, un "aptámero" es un ácido oligonucleico o un péptido que se une específicamente a un polipéptido codificado por uno de los genes de señalización de CD95 de la presente divulgación y que modifica la actividad y/o estabilidad de dicho polipéptido codificado por uno de los genes de señalización de CD95. Los aptámeros peptídicos, preferiblemente, son péptidos que comprenden de 8 a 80 aminoácidos, más preferiblemente de 10 a 50 aminoácidos, y más preferiblemente de 15 a 30 aminoácidos. Pueden por ejemplo ser aislado de bibliotecas de expresión de péptidos aleatorizados en un sistema huésped adecuado como levadura de panadería (véase, por ejemplo, Klenez et al. (2002), Cell. Mol. Life Sci. 59, 1993 - 1998). Los aptámeros peptídicos, preferiblemente, se usan como péptidos libres; los aptámeros peptídicos de esta divulgación también incluyen aptámeros peptídicos modificados químicamente, por ejemplo, aptámeros peptídicos que contienen aminoácidos modificados o aptámeros peptídicos que están, por ejemplo, biotinilados, o están acoplados a fluoróforos, tales como la fluorescina, o Cy 3, están restringidos conformacionalmente, por ejemplo mediante puentes de disulfuro o mediante grapado (Walensky 2004, Science 305 (5689): 1466-1470), o están enlazados a péptidos de penetración celular o dominios de transducción de proteínas (Snyder 2004, Pharm Res 21 (3): 389-393). Tales modificaciones pueden mejorar las propiedades biológicas de los aptámeros peptídicos, por ejemplo, la penetración celular, la unión, la estabilidad, o pueden usarse como marcadores de detección. Los aptámeros peptídicos de la presente divulgación pueden fabricarse de forma recombinante o pueden sintetizarse químicamente. Los aptámeros peptídicos pueden comprender aminoácidos adicionales que pueden servir como un marcador para la purificación o detección. Además, los aptámeros peptídicos de la presente divulgación pueden estar comprendidos por un polipéptido de fusión, en el que la pareja de fusión puede, por ejemplo, servir como un "armazón", fijando el aptámero peptídico en una conformación definida. La variante o los aptámeros peptídicos modificados, preferiblemente, retienen la actividad biológica de los aptámeros peptídicos, es decir, son capaces de unirse específicamente a un polipéptido codificado por uno de los genes de señalización de CD95 de la presente divulgación. Estas propiedades se pueden probar mediante los ensayos descritos en los Ejemplos adjuntos a continuación.
- Un aptámero de ARN o ADN es una molécula de ARN o ADN que es capaz de unirse específicamente a la superficie tridimensional de un polipéptido e inhibir la función de dicho polipéptido. Se pueden obtener aptámeros de ARN o ADN, por ejemplo, por selección *in vitro*, por ejemplo evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX). Los procedimientos relacionados con el desarrollo y uso de los aptámeros de ARN y ADN son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ulrich (2006), Handb. Exp. Pharmacol. 173, 305 - 326 y Ulrich (2005), Med. Chem. 1 (2), 199 - 208).
- También se abarcan como compuestos que inhiben la señalización de CD95 en la presente invención las proteínas de fusión que comprenden al menos un primer dominio que comprende un dominio de unión a ligando de CD95 fusionado a un segundo dominio heterólogo que comprende al menos una porción de un dominio de inmunoglobulina constante. La proteína de fusión puede ser una proteína monomérica o una proteína multimérica, por ejemplo una proteína dimérica, trimérica o tetramérica. Los multímeros pueden consistir únicamente en moléculas de proteínas de fusión como se describió anteriormente, es decir, ser homodímeros, homotrímeros, homotetrámeros o similares. Sin embargo, la presente invención también contempla que los multímeros pueden comprender otras proteínas también. La multimerización se puede facilitar a través de la región de inmunoglobulina

constante de la proteína de fusión. Sin embargo, la proteína de fusión también puede comprender dominios adicionales que median la multimerización, por ejemplo un dominio de trimerización de tenascina. En una realización preferida, el primer y el segundo dominio se solapan con al menos un aminoácido en la región de fusión.

5 "Cáncer" en el contexto de la presente invención se refiere a una enfermedad de un animal, preferiblemente el hombre, caracterizada por un crecimiento descontrolado por un grupo de células corporales ("células cancerosas"). Este crecimiento descontrolado puede ir acompañado de la intrusión y la destrucción del tejido circundante y, posiblemente, la propagación de las células cancerosas a otras ubicaciones del cuerpo. El término "cáncer pancreático" se refiere a un cáncer en el que las células que forman el cáncer forman parte o se originan en el páncreas de un mamífero, preferiblemente un ser humano. Más preferiblemente, el cáncer pancreático es un adenocarcinoma de origen pancreático.

10 Ventajosamente, se ha encontrado en el contexto de la presente invención que la inhibición de la señalización de CD95 en células de cáncer pancreático conduce a una disminución en el potencial migratorio, y por lo tanto, metastásico de dichas células de cáncer pancreático. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención son muy adecuados para la prevención de la invasión tisular y la formación de metástasis por células de cáncer pancreático.

15 Las definiciones hechas anteriormente se aplican *mutatis mutandis* a lo siguiente:

Además, la presente divulgación también se refiere a un medicamento que comprende un compuesto como se especifica anteriormente para la prevención y/o tratamiento del cáncer pancreático.

20 El término "medicamento" como se usa en este documento comprende los compuestos de la presente invención y opcionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de la presente invención se pueden formular como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales aceptables comprenden acetato, metiléster, HCl, sulfato, cloruro y similares. Los medicamentos, preferiblemente, se administran por vía tópica o sistémica. Las vías de administración adecuadas utilizadas convencionalmente para la administración de fármacos son la administración intratumoral, peritumoral, oral, intravenosa o parenteral, así como la inhalación. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y el modo de acción del compuesto, los medicamentos también pueden administrarse por otras vías. Por ejemplo, los compuestos polinucleotídicos pueden administrarse en una metodología de terapia génica utilizando vectores virales, virus o liposomas.

25 Además, los compuestos pueden administrarse en combinación con otros fármacos en un medicamento común o como medicamentos separados en los que dichos medicamentos separados pueden proporcionarse en forma de un kit de partes.

30 Los compuestos se administran, preferiblemente, en formas de dosificación convencionales preparadas combinando los fármacos con vehículos farmacéuticos estándar de acuerdo con procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de ingrediente activo con el que se va a combinar, la ruta de administración y otras variables bien conocidas.

35 El (los) vehículo(s) debe(n) ser aceptable(s) en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de la misma. El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido, un gel o un líquido. Ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Ejemplos de vehículos líquidos son solución salina tamponada con fosfato, jarabe, aceite tal como aceite de cacahuete y aceite de oliva, agua, emulsiones, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles y similares. De manera similar, el vehículo o diluyente puede incluir material de retardo de tiempo bien conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera. Dichos vehículos adecuados comprenden los mencionados anteriormente y otros bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

40 El (los) diluyente (s) se selecciona(n) para no afectar la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, el medicamento o formulación también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

50 Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a una cantidad de los compuestos a usar en un medicamento de la presente invención que previene, mejora o trata los síntomas que acompañan a una enfermedad o condición a la que se hace referencia en esta memoria descriptiva. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población) y LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación, LD50/ED50.

El régimen de dosificación será determinado por el médico a cargo y otros factores clínicos; preferiblemente de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. Como es bien sabido en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, entre ellos, el tamaño del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que son administrados simultáneamente. El progreso puede ser monitorizado por evaluaciones periódicas. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 1000 µg; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. Generalmente, el régimen como una administración regular del medicamento debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg unidades por día. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. El progreso puede ser monitorizado por evaluaciones periódicas. Sin embargo, dependiendo del sujeto y el modo de administración, la cantidad de administración de sustancias puede variar en un amplio intervalo para proporcionar desde aproximadamente 0,01 mg por kg de masa corporal hasta aproximadamente 10 mg por kg de masa corporal.

Los medicamentos y formulaciones a los que se hace referencia en el presente documento se administran al menos una vez con el fin de tratar o mejorar o prevenir una enfermedad o condición citada en esta memoria descriptiva. Sin embargo, dichos medicamentos pueden administrarse más de una vez, por ejemplo, de una a cuatro veces al día hasta un número no limitado de días.

Los medicamentos específicos se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo al que se hace referencia en el presente documento anteriormente en mezcla o asociado de otro modo con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Para hacer esos medicamentos específicos, los compuestos activos generalmente se mezclarán con un vehículo o el diluyente, o se encerrarán o encapsularán en una cápsula, bolsita, sello, papel u otros recipientes o vehículos adecuados. Las formulaciones resultantes deben adoptarse para el modo de administración, es decir, en forma de comprimidos, cápsulas, supositorios, soluciones, suspensiones o similares. Las recomendaciones de dosificación se indicarán en las instrucciones de los prescriptores o usuarios para anticipar los ajustes de dosis según el receptor considerado.

El término "tratamiento" se refiere a la mejora de la enfermedad (cáncer pancreático) referida en el presente documento o de los síntomas acompañados en la misma con un grado significativo. Dicho tratamiento, como se usa en el presente documento, también incluye una restauración completa de la salud con respecto a las enfermedades referidas en el presente documento. Debe entenderse que el tratamiento como se usa de acuerdo con la presente invención puede no ser efectivo en todos los sujetos que se van a tratar. Sin embargo, el término requerirá que una parte estadísticamente significativa de los sujetos que padecen una enfermedad mencionada en el presente documento pueda tratarse con éxito. El experto en la técnica puede determinar si una parte es estadísticamente significativa sin más dilación, utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. Los valores de p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferiblemente, el tratamiento debe ser efectivo para al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de una cohorte o población determinada.

El término "prevención" se refiere a la retención de la salud con respecto a la enfermedad (cáncer pancreático) o los síntomas a los que se hace referencia en este documento durante un cierto período de tiempo en un sujeto. Se entenderá que dicho período de tiempo depende de la cantidad del compuesto de fármaco que se ha administrado y de los factores individuales del sujeto. Debe entenderse que la prevención puede no ser efectiva en todos los sujetos tratados con el compuesto de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos de una cohorte o población se prevenga efectivamente de padecer una enfermedad o los síntomas mencionados en este documento. Preferiblemente, se contempla una cohorte o población de sujetos en este contexto que normalmente, es decir, sin medidas preventivas de acuerdo con la presente invención, desarrollaría una enfermedad o síntomas como se menciona en este documento. El experto en la técnica puede determinar si una parte es estadísticamente significativa sin más dilación, utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas discutidas anteriormente. Preferiblemente, la prevención debe ser efectiva para al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de una cohorte o población determinada.

El término "migración de células cancerosas", como se usa en el presente documento, se relaciona con el movimiento activo de células cancerosas desde el sitio del tumor primario a lugares en otras partes del cuerpo, preferiblemente desde el sitio del tumor primario hacia un vaso sanguíneo o linfático y/o fuera de un vaso sanguíneo o linfático en tejido normal. La migración de células cancerosas se facilita, por ejemplo mediante movimientos mesenquimales o ameboides.

El término "reacción inflamatoria", como se usa en el presente documento, se relaciona con los cambios en el microentorno elaborados por células normales y/o células cancerosas en un tejido que comprende células cancerosas pancreáticas, dichos cambios facilitan la migración de las células cancerosas y/o la invasión del tejido circundante por células cancerosas. Tales cambios en el microentorno pueden comprender, por ejemplo, la

producción de selectinas, la liberación de quimiocinas y/o proteasas o similares. Adicionalmente, dichos cambios en el microentorno también pueden comprender un aumento en la permeabilidad y/o perfusión de los vasos sanguíneos. Preferiblemente, la reacción inflamatoria es la reacción inflamatoria asociada con el cáncer pancreático.

Además, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento *in vitro* para la identificación de un compuesto que inhibe la señalización de CD95, que comprende las etapas de a) poner en contacto una célula que comprende una ruta de señalización de CD95 funcional con un agente candidato, b) determinar el efecto sobre al menos un parámetro seleccionado de la proliferación celular, la migración celular y la diferenciación, y c) comparar dichos efectos determinados en la etapa b) con los efectos observados en ausencia del agente. Debe entenderse que el procedimiento de la presente divulgación puede conducir a la identificación de inhibidores candidatos de la señalización de CD95, que no siempre tienen que ser inhibidores específicos en el sentido de que inhiban solo un compuesto de señalización de CD95; por ejemplo, se pueden encontrar inhibidores generales del metabolismo celular. Se sabe en la técnica cómo identificar inhibidores específicos de una lista de compuestos candidatos; preferiblemente, los inhibidores específicos se identifican comparando la modificación, preferiblemente la fosforilación, el estado de los productos génicos de señalización de CD95 entre las células en contacto con un compuesto candidato y las células que no se pusieron en contacto con dicho compuesto y las células que se pusieron en contacto con un derivado del compuesto candidato conocido por estar inactivo, véase por ejemplo, la Fig. 5A. Más preferiblemente, se determina el estado de fosforilación de Sck y/o una quinasa Akt seleccionada de la lista que consiste en quinasa AKT1 (Seq ID NO 21, Genbank Acc No: NP_001014432.1 GI: 62241015), quinasa AKT2 (Seq ID NO 21, Genbank Acc No: NP_001014432.1 GI:62241015), quinasa AKT2 (Seq ID NO:22, Genbank Acc No: NP_001617.1 GI:4502023), isoforma 1 de quinasa AKT3 (Seq ID NO:23, Genbank Acc No: NP_005456.1 GI:4885549), e isoforma 2 de quinasa AKT3 (Seq ID NO: 24, Genbank Acc No: NP_859029.1 GI:32307163). Más preferiblemente, se determina si el compuesto evita la unión de Sck a CD95 (por ejemplo, el ejemplo 5). La reducción de la unión puede ser causada por un compuesto que impide que las dos proteínas interactúen o por un compuesto que hace que la cantidad total de Sck en la célula disminuya. Adicionalmente, el procedimiento de la presente divulgación se puede realizar *in vivo*, por ejemplo en un modelo animal no humano de cáncer pancreático (ejemplo 7) o *in vitro* utilizando células de cáncer pancreático cultivadas (ejemplo 6, Fig. 6). Además, la determinación de la unión específica entre Sck y CD95 se puede determinar en un sistema libre de células, utilizando extractos celulares que comprenden Sck y CD95.

Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva, el término "poner en contacto" se refiere a acercar un compuesto candidato a una célula de manera que el compuesto pueda interactuar con la célula y/o estar unido por al menos un receptor en la superficie de la célula y/o o ser sometido a endocitosis y/o pinocitosis por la célula y/o ingresar a la célula por otra ruta. Preferiblemente, la puesta en contacto se realiza disolviendo o dispersando una cantidad apropiada del compuesto en un disolvente adecuado y mezclando la solución o dispersión obtenida de este modo con el sustrato de cultivo que comprende las células. También se contempla en esta memoria descriptiva que la solución o dispersión que comprende el compuesto candidato puede comprender otras sustancias, como por ejemplo agentes de transfección (por ejemplo, lípidos catiónicos, polímeros catiónicos o fosfato de calcio).

El término "célula que comprende una ruta de señalización de CD95 funcional", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que comprende las proteínas comprendidas en la ruta de señalización de CD95 en células de cáncer pancreático como se especifica anteriormente, por ejemplo CD95, SFK, SHC, Grb2, SOS y Ras. Preferiblemente, dicha célula es una célula de cáncer pancreático.

El término "compuesto candidato" se refiere preferiblemente a un compuesto que se sospecha inhibe la señalización de CD95 en células de cáncer pancreático. Preferiblemente, dicho compuesto candidato es un compuesto sospechoso de inhibir la señalización por CD95, SFK, SHC, Grb2, SOS o Ras en células de cáncer pancreático. El experto en la técnica sabe cómo adaptar el procedimiento para la identificación de un compuesto que inhibe la señalización de CD95 de la presente invención para seleccionar bibliotecas de compuestos químicos o naturales para los compuestos candidatos. Preferiblemente, se utilizan sistemas de alto rendimiento altamente automatizados para realizar tal selección. Más preferiblemente, dicho compuesto candidato es un agente de ARNi, una ribozima, una enzima de ADN, un anticuerpo inhibidor o un aptámero que inhibe al menos uno de los componentes de señalización de CD95 como se detalla en esta memoria descriptiva más arriba.

En otra realización preferida, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para la fabricación de un medicamento que comprende las etapas del procedimiento para la identificación de un compuesto que inhibe la señalización de CD95 y la etapa adicional de formular el compuesto inhibidor como un medicamento como se especifica aquí anteriormente.

Los siguientes ejemplos simplemente ilustrarán la invención. No se deben interpretar, en absoluto, para limitar el alcance de la invención.

Leyendas de las figuras

Fig. 1: CD95 desencadena la ruta PI3K en células de adenocarcinoma pancreático

Las líneas celulares pancreáticas Colo357, PANC1 y la línea celular primaria PanD3 se incubaron con las concentraciones indicadas de CD95L-T4, estaurosporina (St., 1 μ M) y Gemcitabina o se dejaron sin tratar (Co). Después de 24 h, la fragmentación del ADN se analizó mediante FACS (paneles superiores).

Fig. 2: CD95 desencadena la ruta PI3K en células de adenocarcinoma pancreático

5 La fosforilación de AKT y ERK se muestra en las células PanD3, PANC1 y Colo357 tras el tratamiento con diferentes concentraciones de CD95L-T4 en los puntos temporales indicados. P: fosforilado; T: total.

Fig. 3: CD95 desencadena la invasión y el aumento de la traducción en células de adenocarcinoma pancreático de una manera independiente de FADD

10 **A)** El efecto de los inhibidores de PI3K y MEK (LY2940092 y PD98059 respectivamente) sobre la fosforilación de AKT y ERK inducida por CD95 se muestra en PANC1 y Colo357. La inhibición de PI3K potencia la fosforilación de ERK. P: fosforilado; T: total.

Fig. 4: CD95 desencadena la invasión y el aumento de la traducción en células de adenocarcinoma pancreático de una manera independiente de FADD

15 La fosforilación de AKT y ERK se muestra en las células PANC1 después del tratamiento con CD95L-T4 en los puntos de tiempo indicados en condiciones de reducción de la expresión de FADD. P: fosforilado; T: total.

Fig. 5: CD95 forma un complejo de proteínas con la molécula adaptadora Sck

20 **A)** Unión de matrices de dominios SH2 de Transsignal de CD95 endógeno de Colo357, PANC1 y PanD3 a SH2 de Sck. **B)** La inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina se muestra en PANC1 y Colo357. La fosforilación de la tirosina Sck aumentó con la estimulación de CD95. **C)** La co-inmunoprecipitación de CD95 y Sck se muestra en PANC1 y Colo357. Se observa un mayor reclutamiento de Sck después de 15 min de estimulación. P: fosforilado; T: total; *: banda específica.

Fig. 6: La reducción de la expresión de Sck suprime la señalización corriente abajo de CD95

25 **A)** ARNip de Sck bloqueó la fosforilación inducida por CD95 de AKT (paneles de la izquierda) y ERK (paneles de la derecha). **B)** La reducción de la expresión de Sck suprime la migración inducida por CD95-PI3K. **C)** Se muestra la eficiencia de reducción de la expresión de Sck evaluada por RT-PCR cuantitativa. Los resultados se expresan como media \pm S.D., ** P <0,05

Fig. 7: Neutralizar CD95L *in vivo* conduce a la reducción del volumen del tumor y la formación de metástasis

30 **a** y **c)** análisis de la intensidad de la bioluminiscencia mediante la medición de los recuentos totales de fotones del tumor primario (**a**) y el área de metástasis hepática (**c**). **b)** Porcentaje de metástasis en los diferentes grupos de tratamiento.

Ejemplos

Ejemplo 1

35 Se estudió si los roles novedosos de CD95 que conducen a la activación de rutas no apoptóticas, tal como el PI3K, se limitan al Sistema Nervioso Central y las células inmunitarias. Con el fin de abordar esa hipótesis y ampliar el conocimiento sobre la activación de rutas no apoptóticas por CD95, el sistema se estudió en células tumorales pancreáticas. En primer lugar, se caracterizaron diferentes líneas celulares, PANC1 y Colo357, así como la línea celular PanD3, como la línea madre, con respecto a su sensibilidad apoptótica. Las células PanD3 se aislaron de una biopsia de tumor de un paciente y se cultivaron bajo condiciones de células madre. De hecho, las células PanD3 muestran características típicas de células madre, tal como la capacidad para formar esferas, la expresión de marcadores de células madre pancreáticas tales como CD24, CD44 y ESA, y además una capacidad general para formar tumores *in vivo*. Como se muestra en la Figura 24, las células PANC1 y PanD3 son generalmente resistentes a la apoptosis inducida por el sistema CD95 incluso a altas concentraciones del ligando según se mide por el análisis de fragmentación del ADN y las mediciones de FACS. Por otro lado, las células Colo357 mostraron una alta sensibilidad a CD95L incluso a concentraciones muy bajas (Fig. 1).

Ejemplo 2

50 Se ha sabido que las bajas concentraciones de CD95L son suficientes para estimular eficientemente las rutas no apoptóticas corriente abajo de CD95, siendo esas rutas inhibidas por concentraciones más altas. Para evaluar la activación de las rutas no apoptóticas descritas previamente, el efecto de la estimulación con CD95 se caracterizó además por inmunoelectrotransferencia western. La estimulación con CD95 activa de manera eficiente las rutas no apoptóticas corriente abajo tal como PI3K y ERK, sin embargo, se pueden observar varias diferencias dentro de los

diferentes sistemas celulares utilizados en este estudio. CD95L activa fuertemente ambas rutas, PI3K y ERK en PanD3 y PANC1, mientras que la activación de PI3K en células Colo357 fue bastante sutil (Fig. 2).

Ejemplo 3

5 Interesado por la activación del sistema dual mostrada por algunas de las líneas celulares pancreáticas, se decidió investigar la posible interferencia entre ambas rutas comparando la respuesta de Colo357 y PANC1 a diferentes inhibidores conocidos de ERK y PI3K. En este sentido, la inhibición de PI3K pareció liberar un circuito de retroalimentación negativa que conecta las rutas de PI3K y ERK. Por lo tanto, tras la inhibición de PI3K, la fosforilación de ERK aumentó en ambas líneas celulares. (Fig. 3).

Ejemplo 4

10 A continuación, se realizaron experimentos de reducción de la expresión de FADD para excluir cualquier participación en la activación de ERK de la molécula adaptadora FADD, la primera molécula reclutada para CD95 en la cascada molecular de eventos que conducen a la formación de DISC y, finalmente, a la apoptosis. En línea con los resultados anteriores, la maquinaria apoptótica no parece ser necesaria para la activación de PI3K y ERK, ya que la reducción de la expresión de FADD no inhibió la activación de esas rutas. (Fig. 4).

Ejemplo 5

15 Posteriormente, se caracterizó el mecanismo molecular mediante el cual CD95 fue capaz de activar tanto PI3K como ERK. Con este fin, las proteínas adaptadoras potenciales se examinaron para utilizar matrices SH2 y lisados celulares estimulados con el protocolo establecido previamente. Como se muestra, CD95 se une fuertemente al dominio SH2 de Sck (Fig. 5A). Sck posee múltiples residuos de tirosina capaces de ser fosforilados, por lo que los experimentos de inmunoprecipitación se realizaron utilizando un anticuerpo específico de fosfotirosina y, subsecuentemente sondeando los inmunoprecipitados con un anticuerpo contra Sck. Tras la estimulación con CD95, Sck mostró un aumento de la fosforilación de los residuos de tirosina (Fig. 5B). Además, la inmunoprecipitación de CD95 mostró la unión de Sck al complejo CD95, definiendo así una nueva molécula involucrada en la formación de PAC en células pancreáticas (Fig. 5C).

Ejemplo 6

25 A pesar de que los experimentos de co-inmunoprecipitación demostraron la asociación física de Sck a CD95 y una fosforilación adicional de la tirosina de esta proteína adaptadora, se preguntó sobre el papel real de Sck en la transducción de señales. Para investigar un posible papel funcional, se decidió realizar experimentos de reducción de la expresión y evaluar la fosforilación del objetivo corriente abajo de PI3K, AKT. La reducción de la expresión de Sck eliminó completamente la fosforilación de AKT inducida por CD95L (Fig. 6A y C), lo que coloca a Sck corriente arriba de AKT en la cascada de señalización de eventos. Además, Sck KD bloqueó de manera eficiente la migración de células pancreáticas inducida por CD95L (Figura 6B y C).

Ejemplo 7: experimentos *in vivo*:

35 Inyección ortotópica en el páncreas: todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales del centro alemán de investigación del cáncer y fueron aprobados por el Regierungspräsidium Karlsruhe.

40 Se usaron ratones C57B16A hembras de ocho a diez semanas de edad para la implantación ortotópica de una línea celular pancreática de ratón, Panc02, infectada de forma estable con un vector lentiviral que contiene luciferasa. En resumen, se inyectaron 10⁴ células Panc02 en la cabeza pancreática. 3 y 7 días después del trasplante, los ratones fueron inyectados i.v. con 50 µg de una proteína CD95-Fc neutralizante. Los tumores se dejaron crecer durante 14 días.

45 Imágenes de bioluminiscencia: el día 14, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) con luciferina (150 µg/g de peso corporal) y se colocaron en el sistema de imágenes *in vivo* (IVIS100; Xenogen). Para probar si los ratones desarrollaron también metástasis en el hígado y el pulmón, se sacrificaron 5 minutos después de la administración de luciferina. Se prepararon el pulmón y el hígado.

Las señales de bioluminiscencia se monitorizaron a intervalos de 10 s después de la administración de luciferina durante 5 minutos. La intensidad de la señal se cuantificó como la suma de todos los recuentos de fotones detectados dentro de la región de interés después de la sustracción de la luminiscencia de fondo medida.

Resultados: el bloqueo del sistema CD95 *in vivo* reduce el volumen del tumor y la formación de metástasis

50 Para investigar el papel de CD95/CD95L *in vivo*, se utilizó un modelo ortotópico de ratón de carcinoma de páncreas. 3 y 7 días después del trasplante, los ratones se trataron con una proteína Fc neutralizante de CD95L. El tamaño del tumor y la formación de metástasis se monitorizaron mediante una técnica de imagen de bioluminiscencia.

5 El tamaño del tumor fue menor en ratones tratados con proteína CD95-Fc en comparación con los animales tratados con NaCl (Fig. 1a). El impacto de la proteína CD95-Fc en la metástasis hepática fue aún mayor. Solo el 16 % de los animales en el grupo tratado con la proteína CD95-Fc mostró metástasis hepáticas, que también fue de menor tamaño en comparación con el grupo tratado con NaCl, donde el 70 % de los animales desarrollaron metástasis hepáticas (Fig. 1b y 1c).

En conjunto, estos datos *in vivo* subrayan la importancia del sistema CD95/CD95L en la formación de tumores y la metástasis en el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC).

Ejemplo 8: cultivo celular

10 • PanD3 como célula madre

Medio Neurobasal A	500 ml
B27 Suplemento	10 ml
L-Glutamina	5 ml
Heparina	500 µl de 2 mg/ml de reserva (2µg/ml)
bFGF	20 µl of 0,5 µg/µl de reserva (20 ng/ml)
EGF	20 µl of 0,5 µg/µl de reserve (20 ng/ml)

• PANC1 Línea celular pancreática

DMEM

F12 suplemento	50 %
FCS	10 %

15 • Colo357Línea celular pancreática

RPMI 1640

FCS	10 %
-----	------

Ejemplo 9: Experimentos de reducción de la expresión

20 Los experimentos de reducción de la expresión se realizaron mediante transfección transitoria con Lipofectamine 2000™ (Invitrogen Life Technologies) siguiendo el manual de instrucciones. Los experimentos de migración se realizaron utilizando ARNip validados por ON-TARGETplus SMARTpool contra Sck o FADD (Sck, Dharmacon/ThermoFisher, L-031192-00; FADD, Dharmacon/ThermoFisher, L-003800-00), y un grupo no direccionado de ARNip como un control negativo para excluir los efectos fuera del objetivo (Dharmacon/ThermoFisher, D-001810-10-05). Después de la transfección transitoria con las diferentes células de
 25 ARNip, se cultivaron durante 72 h antes de tratarlas con CD95LT4 (20 ng/ml), la migración se analizó 36 h después del tratamiento con un ensayo de migración bidimensional. La eficiencia de reducción de la expresión se controló mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Ejemplo 10: SDS PAGE

Determinación de la concentración de proteínas

30 La extracción de proteínas se realizó como se describió anteriormente. La concentración de proteína se determinó utilizando el ensayo de proteína BCA comparando con las concentraciones estandarizadas de albúmina de suero bovino (BSA).

SDS-PAGE

Se separaron cantidades iguales de proteína de los tejidos (20-50 µg dependiendo del anticuerpo utilizado para la detección) en el tampón de muestra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 10-15 %. Después de la preparación, se inició la polimerización de los geles mediante la adición de una solución de N,N,N,N-tetrametiletilendiamina (TEMED) y persulfato de amonio (APS). El gel de corrida fundido se cubrió con agua destilada y se dejó polimerizar durante 30 minutos. Luego, el agua se eliminó con papel de filtro y el gel de apilamiento se moldeó de la misma manera. Posteriormente, las muestras de proteínas se cargaron y la electroforesis se realizó a 100 V durante 30 a 60 minutos.

Ejemplo 11: Inmunoelctrotransferencia Western

Las proteínas se transfirieron desde geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa mediante inmunoelctrotransferencia. El gel y la membrana se colocaron entre hojas de papel absorbente y se sumergieron en tampón de transferencia en un tanque de electroforesis. La inmunoelctrotransferencia se realizó a 60 mA durante 1 a 2 horas a 4 °C. Tras la transferencia, los sitios de unión no específicos en la membrana de nitrocelulosa se bloquearon mediante incubación con leche desnatada en polvo al 5 % en PBS-Tween durante 1 hora. Después del lavado, las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo primario (usualmente diluido en PBS-Tween que contiene un 5 % de leche desnatada en polvo) en un agitador. Después de un lavado a fondo, la unión del anticuerpo se visualizó a través de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP), con los cuales se incubaron las membranas durante 1 hora. La señal de HRP se detectó mediante incubación con solución de ECL y exposición consecutiva a películas de rayos X Amersham Hyperfilm. La extracción de proteínas y la inmunoelctrotransferencia se realizaron como se describió anteriormente. Las membranas se sondaron con los siguientes anticuerpos: AKT fosforilado (P-Ser473-AKT, 1:1000, señalización celular # 9271), AKT total (T-AKT, 1:1000, señalización celular # 9272), FADD (Ab monoclonal de ratón anti-FADD, clon 1F7, 1:1000, Millipore # 05-486), ERK fosforilada (P-ERK, 1:1000, Santa Cruz Biotechnologies # sc-7383), ERK total (T-ERK, 1:1000, Santa Cruz Biotechnologies # sc-154), Sck (Sck, 1:1000, Santa Cruz Biotechnologies # sc-33807) y antifosfotirosina, clon 4G10 (pY, 1:1000, Upstate/Millipore 05-321).

Depuración por transferencia

Para la eliminación de complejos de anticuerpos de las membranas de nitrocelulosa, las membranas se sometieron a tres lavados con glicina 1 M, pH 1,8. Después de un lavado a fondo con PBS-Tween, y el bloqueo de sitios de unión no específicos, se resondaron las membranas como se describió anteriormente.

Ejemplo 12: Inmunoprecipitación

Al menos 1×10^7 células se trataron con 20 ng/ml de CD95L-T4 durante el tiempo indicado a 37 °C o se dejaron sin tratar, se lavaron dos veces en PBS más inhibidores de fosfatasa (NaF, Na₃N, pNPP, NaPPi, β-glicerolfosfato, 10 mM cada uno y orovanadato 1 mM), y posteriormente se sometieron a lisis en tampón A [(Tris/HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, cóctel inhibidor de proteasa (Roche), Triton X-100 al 1 % (Serva, Heidelberg, Alemania), 10 % de glicerol e inhibidores de la fosfatasa (NaF, Na₃N, pNPP, NaPPi, β-glicerolfosfato, 10 mM de cada uno y ortovanadato de 1 mM)]. La concentración de proteína se determinó utilizando el kit de BCA (Pierce). Se usaron 500 µg de proteína como entrada y la proteína deseada se inmunoprecipitó durante la noche con los respectivos anticuerpos, 40 µl de proteína-A-Sefarosa y los controles de isotipo correspondientes. Las perlas se lavaron 5 veces con 20 volúmenes de tampón de lisis. Las inmunoprecipitadas se mezclaron con 40 µl de tampón 2x Laemmli y se analizó en SDS-PAGE al 10 %. Subsecuentemente, los geles que se vieron a transferir como se describe en la sección de Inmunoelctrotransferencia Western.

Ejemplo 13: Detección de apoptosis (ensayo de Nicoletti)

Para cuantificar la fragmentación del ADN, las células desprendidas con tripsina/EDTA (Gibco) se centrifugaron a 200 x g y se fijaron con etanol al 70 % a -20 °C durante 1 h. Las células fijas se tiñeron con solución de yoduro de propidio (50 µg/ml; citrato de sodio al 0,0025 % y Triton-X-100 al 0,0025 %) durante 1 hora o toda la noche a 4 °C y se analizaron mediante FACS.

Ejemplo 14: Matriz SH2

La matriz de dominios SH2 de Transsignal (Panomics) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la hibridación de lisados de células enteras, las células se recogieron como se describe anteriormente. Los lisados se incubaron luego con 5 µg de anticuerpo anti-Apol y posteriormente se hibridaron con la membrana de la matriz SH2. Después del lavado, la matriz se incubó con estreptavidina-HRP y se desarrolló.

Ejemplo 15: Migración de células pancreáticas

La migración de células pancreáticas se evaluó *in vitro* en un ensayo de migración de dos cámaras. Los insertos Transwell [tamaño de poro de 8 µm (BD # 353097)] se recubrieron con colágeno. Se colocaron 1×10^5 células en

300 μ l de medio en la cámara superior. Las células se dejaron sin tratar o se trataron con CD95L-T4 20 ng/ml en la cámara superior. El número de células migradas se contó 36 horas después del tratamiento.

Ejemplo 16: Análisis estadístico:

- 5 El análisis estadístico de la migración y los datos de expresión del ARNm se realizó utilizando la prueba no paramétrica t de Student para comparar las diferencias entre los grupos de tratamiento y los controles. Los intervalos de confianza se determinaron al 95 %, y los valores de * P <0,05, ** valor de P <0,01 *** el valor de P <0,005 se consideró estadísticamente significativo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que inhibe la señalización de CD95 transmitida a través de la interacción de CD95 con Sck (proteína transformante que contiene el dominio de Homología-2 de Src) en una célula de cáncer pancreático,
- 5 a) en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en un agente de ARNi, una ribozima y una ADNzima y en el que dicho compuesto inhibe Sck; o
- b) en el que el compuesto es una proteína de fusión que comprende (i) al menos un primer dominio que comprende un dominio de unión al ligando CD95 (CD95L) de CD95 fusionado a (ii) un segundo dominio heterólogo que comprende al menos una porción de un dominio de inmunoglobulina constante
- 10 para su uso en la prevención de la formación de metástasis por células de cáncer pancreático y/o para tratar el cáncer pancreático.
2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es dicha proteína de fusión que comprende (i) al menos un primer dominio que comprende un dominio de unión a ligando CD95 (CD95L) de CD95 fusionado a (ii) un segundo dominio heterólogo que comprende al menos una porción de un dominio de inmunoglobulina constante.
- 15 3. El compuesto para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína de fusión es una proteína de fusión que comprende (i) al menos un primer dominio que comprende un dominio de unión al ligando CD95 (CD95L) de CD95 fusionado a (ii) un segundo dominio heterólogo que comprende al menos una porción de un dominio de inmunoglobulina constante en el que hay al menos un solapamiento de aminoácidos entre el primer dominio y el segundo dominio en la región de fusión.
- 20 4. Uso de un compuesto como de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento para la prevención de la formación de metástasis por células de cáncer pancreático.
5. Un procedimiento *in vitro* para la identificación de un compuesto adecuado para el tratamiento del cáncer pancreático, que comprende las etapas de
- 25 a) poner en contacto una célula que comprende una ruta de señalización de CD95 funcional con un compuesto candidato,
- b) determinar el efecto en al menos un parámetro seleccionado de la fosforilación de Sck, la unión de Sck a CD95 y la fosforilación de Akt, y
- 30 c) comparar dichos efectos determinados en la etapa b) con los efectos observados en ausencia del compuesto candidato,
- en el que en la etapa b) se determina la unión de Sck a CD95.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que una unión reducida de Sck a CD95 indica que el compuesto es adecuado para el tratamiento del cáncer pancreático.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que la célula es una célula de cáncer pancreático.
- 35 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el agente candidato es un agente sospechoso de inhibir CD95, ligando CD95, SFK, Sck, Grb2, SOS o Ras.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el agente se selecciona de un grupo que consiste en un agente de ARNi, una ribozima, una ADNzima, un anticuerpo inhibidor y un aptámero.

40

Fig. 1

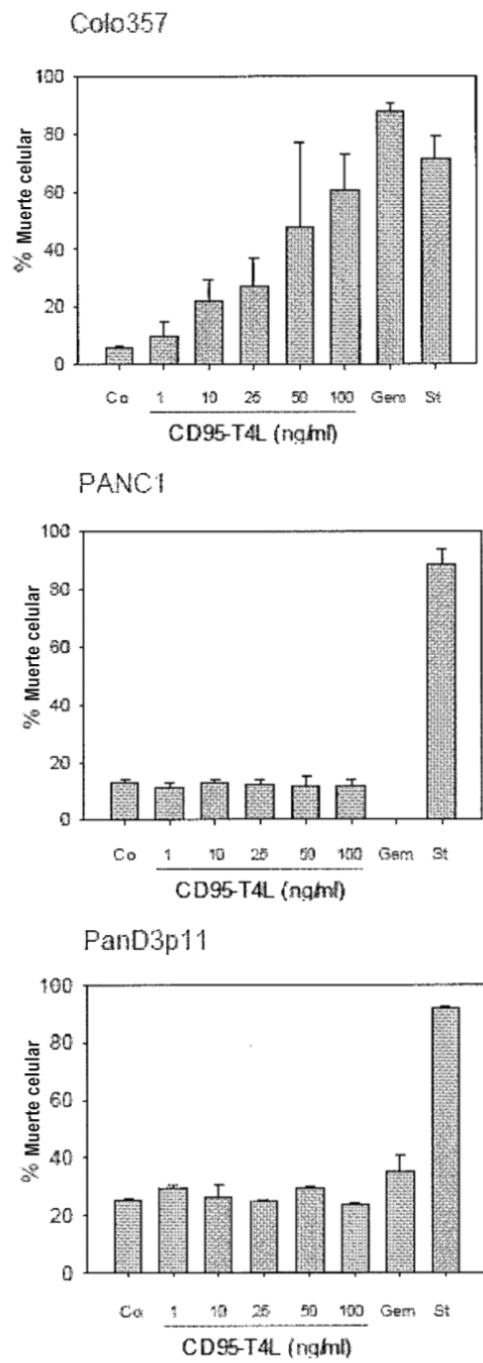


Fig. 2

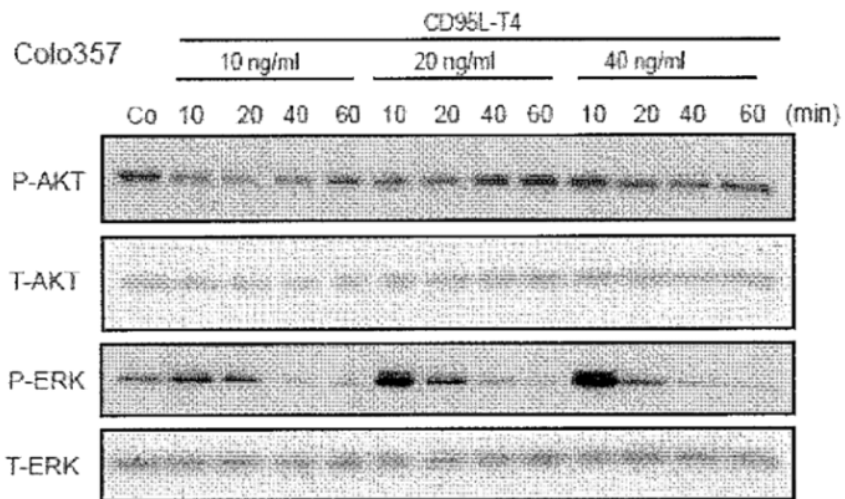
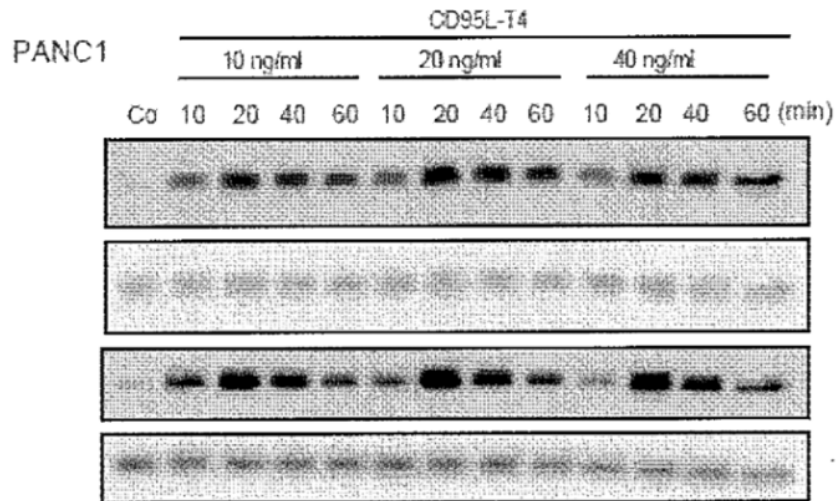
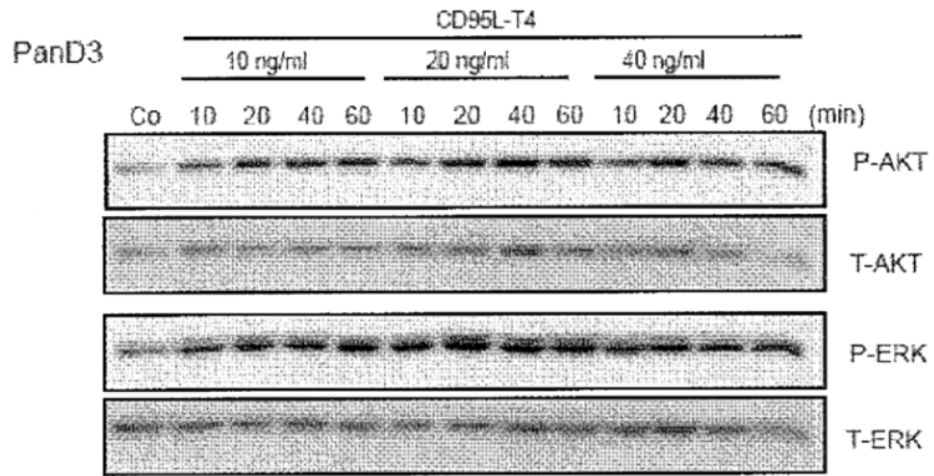
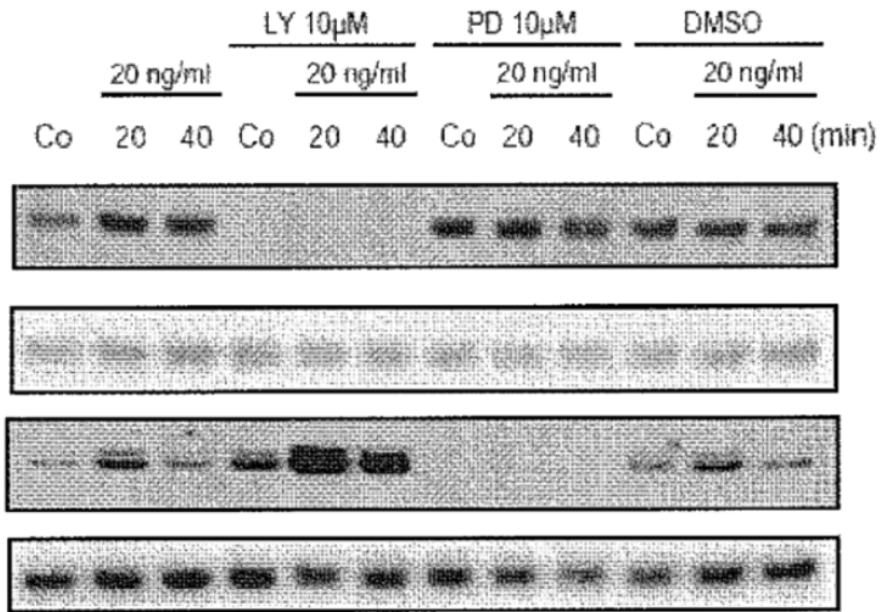


Fig. 3

Colo357



PANC1

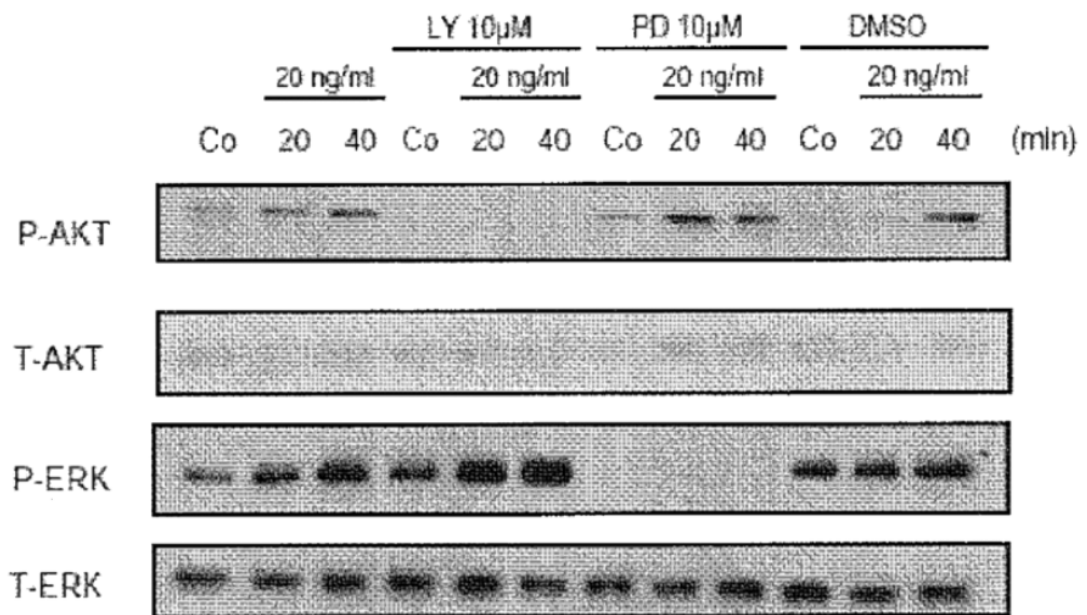


Fig. 4

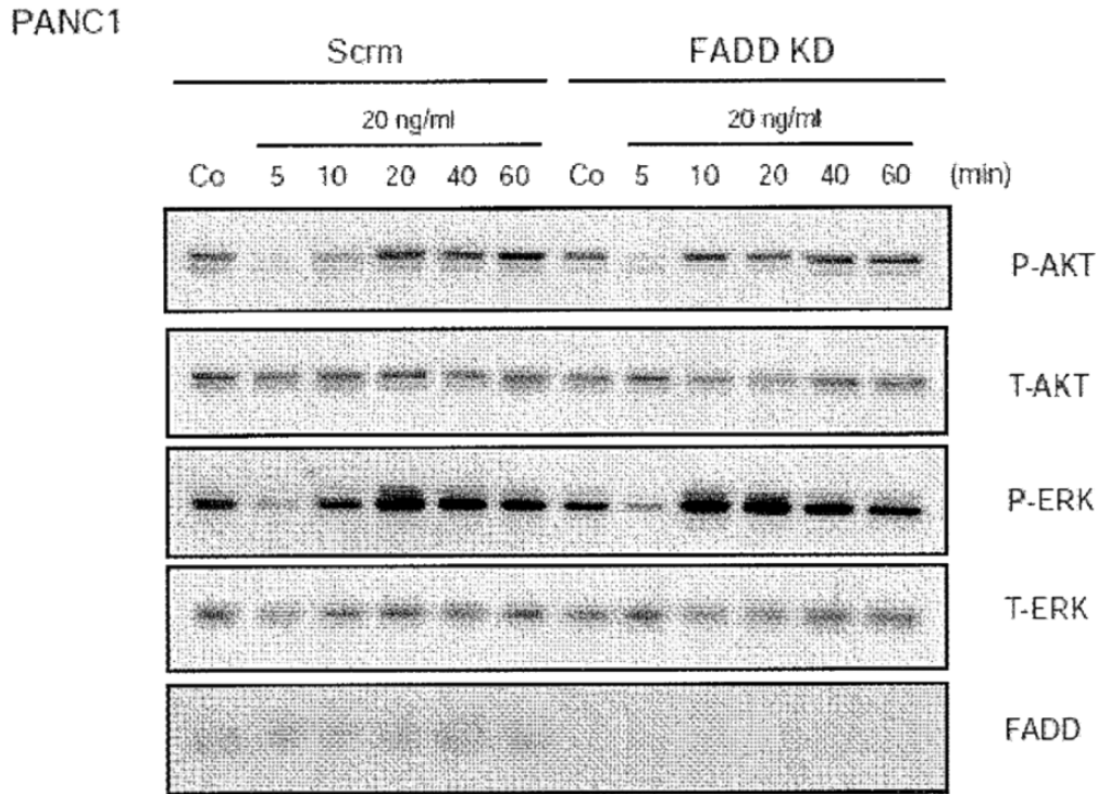
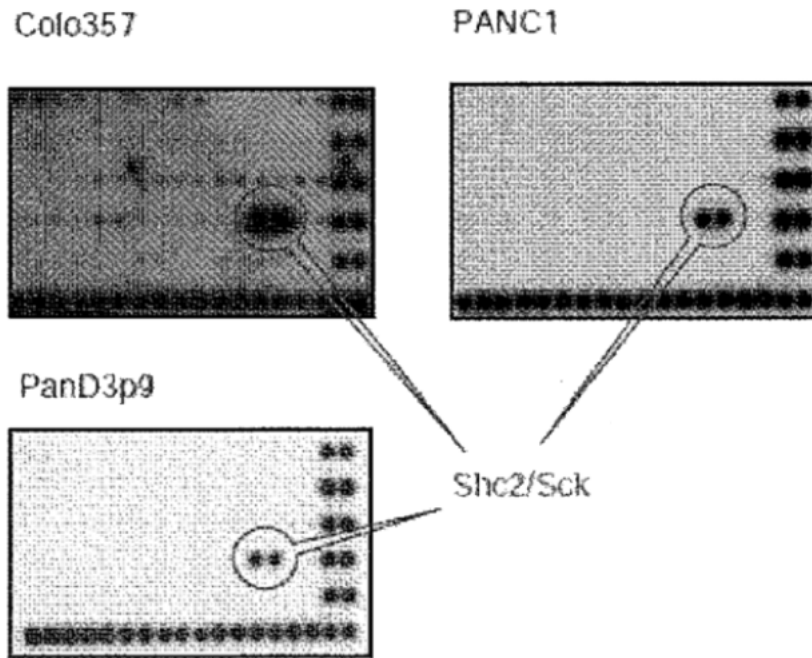


Fig. 5

A)



B)

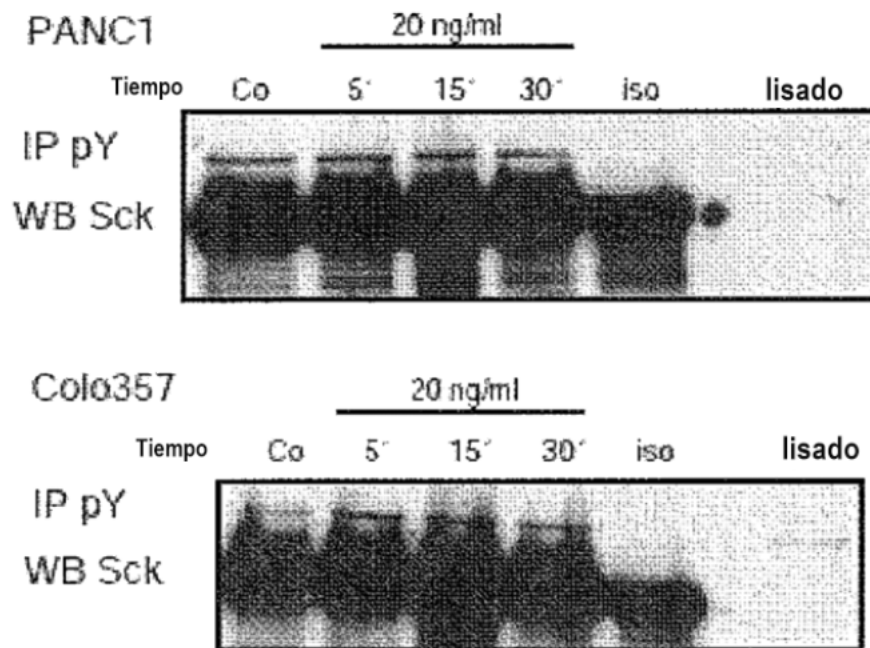


Fig. 5C)

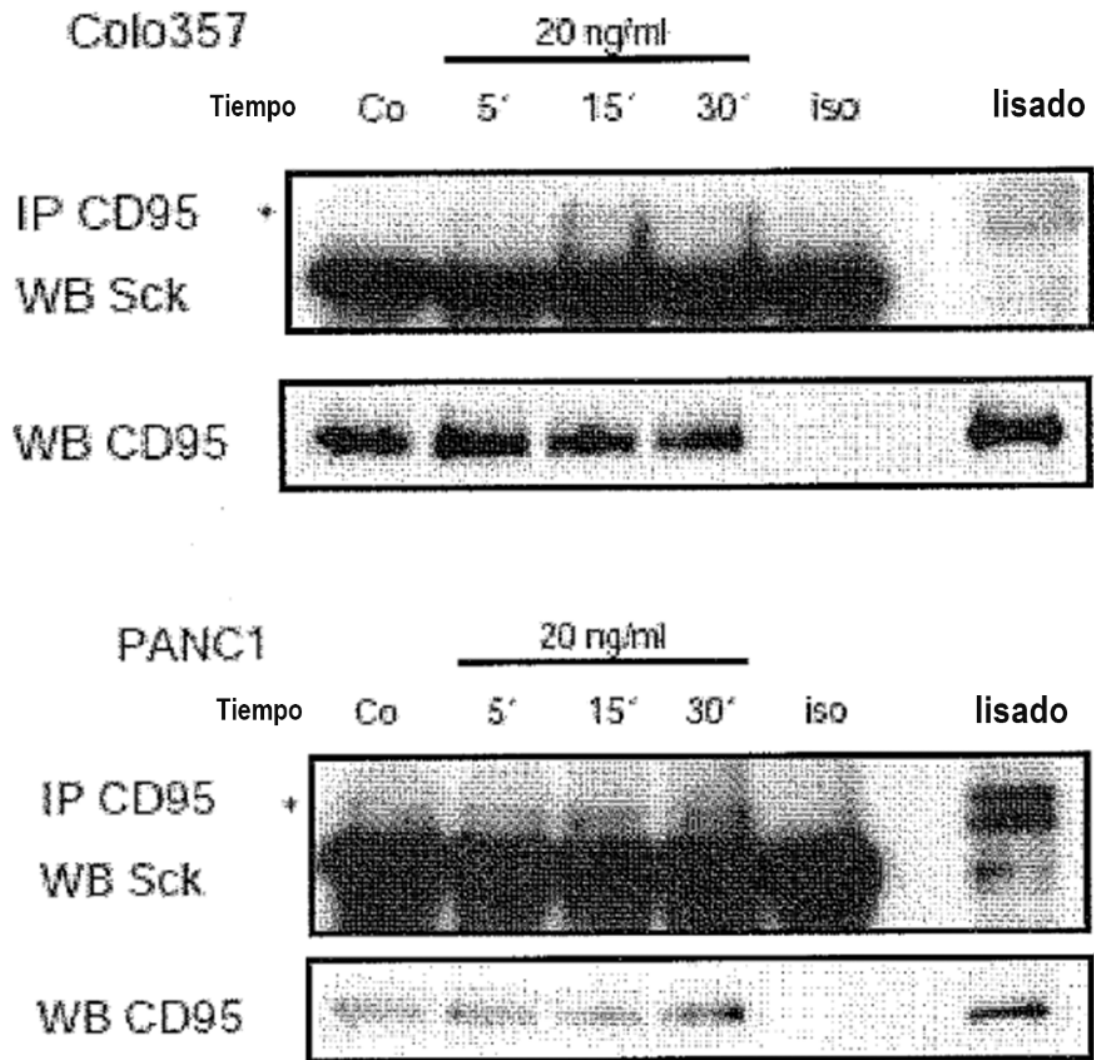


Fig. 6

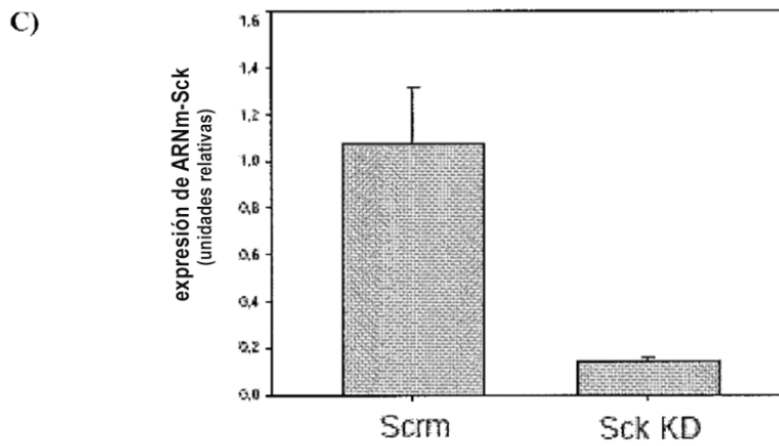
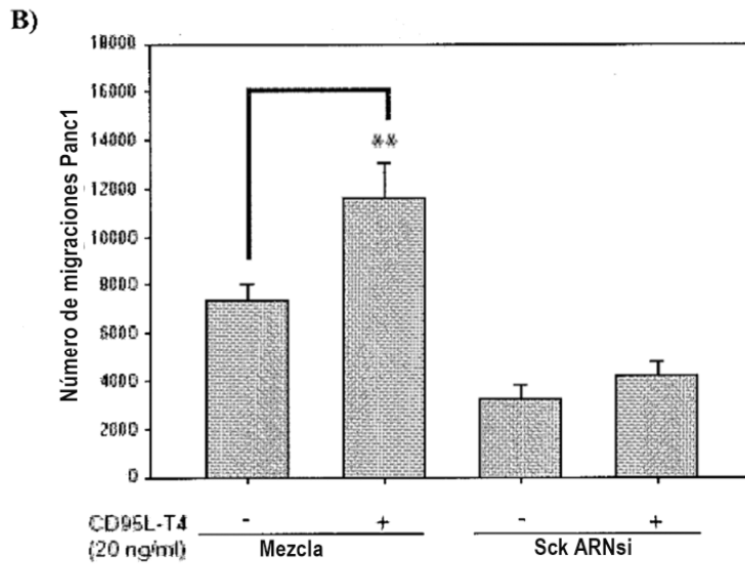
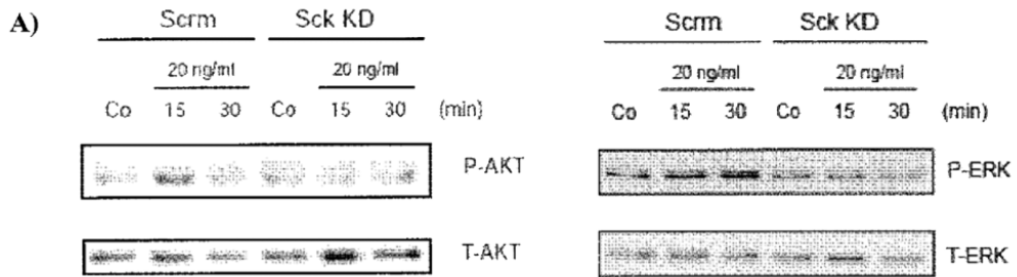


Fig. 7

