(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 527 361**

(51) Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/4425 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2009 E 09783138 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2340042**

(54) Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

17.09.2008 EP 08380270

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2015

(73) Titular/es:

TRASLATIONAL CANCER DRUGS PHARMA, S.L. (100.0%)
Los Molinos, 4, 2º izquierda
47001 Valladolid, ES

(72) Inventor/es:

RAMÍREZ DE MOLINA, ANA;
GARCÍA OROZ, LOURDES y
LACAL SANJUÁN, JUAN CARLOS

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 527 361 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

Métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la terapéutica y, más en particular, al campo de la terapéutica contra el cáncer usando composiciones que contienen varios compuestos terapéuticos que muestran actividad mejorada respecto a los compuestos usados individualmente.

Antecedentes de la invención

La colina quinasa es la primera enzima de la ruta de Kennedy o la ruta de síntesis de la fosfatidilcolina (PC). Actúa fosforilando la colina a fosforilcolina (PCho) usando adenosina 5'-trifosfato (ATP) como grupo donante de fosfato. Los genes Ras forman una familia de los denominados oncogenes que se han estudiado ampliamente puesto que están activados en el 25-30% de todos los tumores humanos y en algunos de ellos en el 90%. Las proteínas Ras tienen un papel importante en la transmisión de señales intracelulares debido a su implicación en la regulación de la proliferación celular, diferenciación terminal y senescencia. La transformación mediada por los diferentes oncogenes, entre los cuales sobresalen los oncogenes ras, induce niveles altos de actividad colina quinasa, produciendo un aumento anormal en los niveles intracelulares de su producto, PCho. Descubrimientos complementarios apoyan el papel de la ChoK en la generación de tumores humanos. Por ejemplo, técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) han mostrado la presencia de niveles altos de PCho en varios tejidos tumorales humanos incluyendo tumores de mama, próstata, cerebro y ovario con respecto a los tejidos normales. Es bien sabido que ras es uno de los oncogenes más profundamente estudiados en la carcinogénesis humana y se ha mostrado que la inhibición de la ChoK es una estrategia antitumoral nueva y eficaz en células transformadas por oncogenes. Estas primeras observaciones se extrapolaron después in vivo en ratones desnudos.

En vista de estos datos, el diseño de compuestos que afectan directamente a la actividad colina quinasa o la enzima activada por la fosforilcolina de forma individual o combinada permitiría el desarrollo de terapias antitumorales eficaces.

En este sentido, la investigación sobre los inhibidores de ChoK ha identificado hemicolinio-3 (HC-3) como un agente bloqueante relativamente potente y selectivo (Cuadrado A., et al., 1993, Oncogene 8: 2959-2968, Jiménez B., et al., 1995, J. Cell Biochem. 57:141-149; Hernández-Alcoceba, R. et al., 1997, Oncogene, 15:2289-2301). Este homólogo de colina con una estructura bifenilo se ha usado para diseñar nuevos fármacos antitumorales. Sin embargo, debido al hecho de que HC-3 es un potente agente paralizador de la respiración, no es un buen candidato para su uso en la práctica clínica. Se han sintetizado algunos derivados basados en la estructura de HC-3 que tienen mejorada la actividad inhibidora de ChoK y los efectos tóxicos reducidos introduciendo modificaciones estructurales en este compuesto.

También se ha encontrado que compuestos simétricos biscuaternizados derivados de piridinio inhiben la producción de PCho en células enteras (documento WO98/05664). Sin embargo, estos derivados tienen niveles de toxicidad altos que limitan su aplicación terapéutica extendida.

La resistencia a la quimioterapia ('farmacorresistencia') es un problema fundamental que limita la eficacia de muchas quimioterapias usadas actualmente en el tratamiento contra el cáncer. La farmacorresistencia se puede dar debido a varios mecanismos, tal como aumento en la inactivación del fármaco, descenso en la acumulación del fámaco, salida del fármaco de las células cancerosas, aumento en la reparación del daño inducido por la quimioterapia, activación de vías pro-supervivencia e inactivación vías de muerte celular (Hersey P. et al., 2008, Adv Exp Med Biol. 2008; 615:105-26). La farmacorresistencia puede ser intrínseca a las células tumorales antes del inicio de un tratamiento antitumoral. Además, se pueden activar mecanismos específicos de farmacorresistencia después de la exposición de las células tumorales a un tratamiento particular. La identificación de esas entidades moleculares responsables de la resistencia intrínseca o adquirida, puede proporcionar información valiosa sobre las dianas moleculares potenciales que pueden ser útiles para superar esta resistencia. Por lo tanto, diseñar estrategias cuyo fin es interferir con los componentes moleculares que confieren farmacorresistencia para un tratamiento específico de tumor definido constituye un paso importante hacia el aumento de la eficacia de los tratamientos contra el cáncer.

Mori et al (Cancer Res., 2007, 67:11284-11290) han descrito que el uso combinado de un inhibidor de ChoK (ARNip específico de colina quinasa) y 5-fluorouracilo produce un efecto lo más probablemente aditivo en la reducción de proliferación/viabilidad celular de células de cáncer de mama. Sin embargo, este tratamiento se basa en el uso de un ARNip que no se transporta a las células diana in vivo de una manera eficaz. Además el ARNip diseñado para este fin reconoce tanto las especies ChoKα como ChoKβ (Mori et al Cancer Res., 2007, 67:11284-11290) pero sólo ChoKα y no ChoKβ es una diana molecular en oncología (solicitud de patente internacional WO2006108905), poniendo en duda el potencial uso terapéutico de esta estrategia.

Se han descrito composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes que inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína colina quinasa alfa, junto con cualquier otro principio activo que no inhibe la función de la proteína quinasa alfa (documento EP1889920A).

Sin embargo, existe una gran necesidad de desarrollar compuestos que proporcionan una gran actividad inhibidora de la enzima ChoK con el fin de permitir su uso para el tratamiento de tumores, mientras que al mismo tiempo reducen considerablemente su toxicidad frente a compuestos del estado de la técnica.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende, de forma separada o junta, un primer componente que comprende uno más inhibidores de colina quinasa específicos para la isoforma alfa de colina quinasa y un segundo componente seleccionado de uno o más de inhibidores de ceramidasa ácida y uno más agentes quimioterapéuticos, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante de ADN, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, un inhibidor de topoisomerasa II, cetuximab, gefitinib e imatinib.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una composición según la invención con un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable y a los usos de la misma en medicina y, en particular, para el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, también se divulga el uso de un inhibidor de ceramidasa ácida, un agente qumioterapéutico o un ligando para un receptor de muerte para aumentar la sensibilidad de una célula tumoral a un inhibidor de colina quinasa.

En aún otro aspecto, también se divulga un método para la identificación de pacientes de cáncer resistentes a la terapia con inhibidores de ChoK que comprende determinar los niveles de ceramidasa ácida en una muestra de dicho paciente en donde el paciente se identifica como que es resistente a inhibidores de ChoK cuando los niveles de ceramidasa ácida en dicha muestra son mayores que en una muestra de referencia.

En otro aspecto, también se divulga un método para seleccionar una terapia personalizada para un paciente que padece cáncer que comprende determinar los niveles de ceramidasa ácida en una muestra de dicho paciente en donde si los niveles de expresión de ceramidasa ácida en dicha muestra son mayores que en la muestra de referencia, el paciente es candidato para ser tratado con una combinación de un inhibidor de ChoK y un inhibidor de ceramidasa ácida.

En aún otro aspecto, también se divulga un método para la identificación de compuestos capaces de aumentar el efecto terapéutico de un inhibidor de ChoK para el tratamiento del cáncer que comprende los pasos de

(i) poner en contacto una célula tumoral que muestra resistencia a inhibidores de ChoK con un compuesto candidato y
(ii) determinar en dicha célula los niveles de ceramidasa ácida

en donde si los niveles de ceramidasa ácida en la célula después de haber sido tratada con un compuesto candidato son menores que antes del tratamiento, entonces el compuesto candidato se considera que es capaz de aumentar el efecto de los inhibidores de ChoK para el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Respuesta al tratamiento con MN58b en cultivos primarios de tumores de pacientes con NSCLC.

Figura 2. Validación de los resultados del análisis de micromatrices mediante RT-qPCR.

Figura 3. Modelo propuesto para un mecanismo de resistencia a inhibición de ChoK en NSCLC.

Figura 4. Niveles de ASAH1 y ChoK en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón humano determinados mediante RT-qPCR.

Figura 5. Expresión del gen ASAH1 determinada mediante RT-qPCR y expresión de proteína ceramidasa ácida determinada mediante análisis de inmunotransferencia en células H460 resistentes a inhibidores de ChoK.

Figura 6. Efecto sinérgico de la terapia secuencial combinada de cisplatino/inhibidores de ChoK.

Figura 7. Terapia combinada de cisplatino/inhibidores de ChoK en xenoinjertos de NSCLC. (A) MN58b/cisplatino (significancia estadística; MN58b p=0,09; cisplatino p=0,3; secuencial p=0,017; concomitante p=0,016), (B) Terapia combinada en xenoinjertos de NSCLC (significancia estadística, RSM-932A (932A) p=0,157; cisplatino (DPP)

p=0,0441; tratamiento secuencial de DPP y TCd-171 (SEC) p=0,03); (C) Seguiemiento de peso como medida de la toxicidad de los ratones control y tratados con inhibidores de ChoK (2 mg/kg), cisplatino (1 mg/kg) y el grupo de terapia combinada; (D) Actividad antitumoral similar de cisplatino solo que la de la terapia combinbada produce un aumento significativo en toxicidad.

Figura 8. Sensibilidad de células tumorales al inhibidor de colina quinasa RSM-932A (ChoKI) (A) o TRAIL (B) en las líneas celulares indicadas.

Figura 9. Cooperación del tratamiento combinado de ChoKI y TRAIL.

Figura 10. Efecto sinérgico de la terapia combinada de MN58b y TRAIL en células de cáncer de colon.

Figura 11. Efecto sinérgico de la terapia combinada de MN58b y TRAIL en células de cáncer de colon determinada por análisis de citometría de flujo.

Figura 12. La inhibición de ChoK aumenta la expresión de DR5.

Figura 13. Producción de ceramidas después de terapia combinada ChoKI/TRAIL.

Figura 14. Terapia combinada ChoKI/TRAIL en xenoinjetos de colon.

Figura 15. Efecto sinérgico de la terapia combinada de inhibidores de ChoK y 5-FU en células de cáncer de colon.

Figura 16. Efecto sinérgico de la terapia combinada de inhibidores de ChoK y 5-FU en células de cáncer de colon determinado por citometría de flujo.

Figura 17. Terapia combinada de ChoKI/5-FU en xenoinjertos de colon.

Descripción detallada de la invención

Combinaciones de inhibidores de ChoK e inhibidores de ceramidasa ácida (primera composición de la invención)

Los autores de la presente invención han identificado la existencia de tumores primarios humanos resistentes a inhibidores de colina quinasa (ChoK) (Figura 1). En particular, el ejemplo 1 de la presente invención describe que diferentes cultivos primarios derivados de tejidos de cáncer de pulmón no microcítico humano muestran una sensibilidad diferencial hacia MN58b, un conocido inhibidor de ChoK (Figura 1). De forma sorprendente, se ha mostrado que esta resistencia está causada por un aumento en los niveles de expresión de ceramidasa ácida, como se ha mostrado en los ejemplos 2 y 3 de la presente invención (Figura 2). La función de ChoK es fosforilar Cho para generar fosfocolina (Pcho), un precursor del componente principal de la membrana plasmática, fosfatidilcolina (PC) (Lacal JC., IDrugs. 2001; 4:419-26). Sin embargo, las membranas y por lo tanto la PC se requieren absolutamente para la proliferación celular. De esta manera, sin querer estar unido a ninguna teoría, se cree que las células tumorales responden a la inhibición de ChoK mediante la activación de una vía alternativa para generar PCho a través de la degradación de esfingomielina (SM) (Figura 3). Sin embargo, la ruptura de SM lleva no sólo a la producción de PCho sino también a ceramidas pro-apoptóticas, haciendo que las células tumorales se comprometan en muerte celular apoptótica. De forma interesante, en el presente documento se ha identificado que aquellas células resistentes a la inhibición de ChoK muestran niveles aumentados de ceramidasa ácida, una enzima que fomenta la conversión de ceramidas pro-apoptóticas a esfingosina-1P pro-mitogénica (Figura 3). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de ceramidasa ácida podría inhibir el fomento de muerte celular mediada por la inhibición de ChoK disminuyendo los niveles intracelulares de ceramidas. Por tanto, la señal proapoptótica desencadenada por la inhibición de ChoK en células tumorales se inactiva mediante la sobreexpresión de ceramidasa ácida. Además, las ceramidas generadas se podrían convertir en esfingosina-1P promitogénica (Figura 3).

Este descubrimiento abre la posibilidad para terapias contra el cáncer mejoradas aumentando la sensibilidad a los inhibidores de ChoK mediante la administración simultánea de inhibidores de ceramidasa ácida. De hecho, el ejemplo 4 de la presente solicitud muestra que el tratamiento de células tumorales derivadas de NSCLC con el inhibidor de la ceramidasa ácida NOE produce un aumento en la sensibilidad a los inhibidores de ChoK. Además, el uso combinado del inhibidor de ChoK MN58b o RSM-932A y el inhibidor de ceramidasa ácida D-NMAPPD produce un efecto antitumoral mejorado cuando se compara con el uso de los inhibidores de manera aislada o cuando se comprara con el uso combinado de un inhibidor de ChoK y un inhibidor específico para ceramidasa alcalina (véase el ejemplo 4). De esta manera, la administración combinada de inhibidores de ceramidasa ácida e inhibidores de ChoK permitiría el uso de dosis menores de los últimos compuestos, produciendo así menos efectos secundarios no deseados.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona una composición (de aquí en adelante la primera composición de la invención) que comprende, de forma separada o juntos, un primer componente que comprende

uno o más inhibidores de colina quinasa específicos para la isoforma alfa de colina quinasa y un segundo componente que comprende uno o más inhibidores de ceramidasa ácida.

El término “composición” se refiere a uno o más compuestos en varias combinaciones según formas de realización alternativas de esta invención. Preferiblemente, la composición comprende al menos un inhibidor de ceramidasa ácida y al menos un inhibidor de ChoK específico para la isoforma alfa de colina quinasa.

La colina quinasa, como se usa en el presente documento, se refiere a una enzima que cataliza la fosforilación de colina en presencia de ATP para producir fosforilcolina (PCho) (EC 2.7.1.32). Las colinas quinasas de ejemplo que se pueden inhibir según la presente invención incluyen colina quinasa alfa (como se define en los números de acceso de UniProt P35790, O54804 y Q01134 para las proteínas humana, de ratón y rata, respectivamente).

Ceramidasa ácida (actividad N-acilesfingosina desacilasa, EC 3.5.1.23), como se usa en el presente documento, es la hidrolasa de lípidos responsable de la degradación de ceramida en esfingosina y ácidos grasos libres en los lisosomas. Las células contienen al menos tres tipos de ceramidasas que se clasifican, según su pH óptimo para la actividad y localización (Li CM. et al., Genomics, 1999, 62:223-31), como ceramidasa ácida (ASAH1, NM_177924.3 o Q13510), ceramidasa neutra (ASAH2, NM_019893 o Q9NR71) y ceramidasa alcalina (ASAH3, NM_133492, Q8TDN7 o Q5QJU3). También se ha descrito un segundo polipéptido de ceramidasa ácida (conocido como similar a ceramidasa ácida o ASAHL) (el número de acceso de UniProt es Q02083). Los inhibidores para su uso en la presente invención son los que inhiben al menos la ceramidasa ácida y/o la proteína similar a ceramidasa ácida, ya que ninguna de las otras dos ceramidasas muestra un aumento significativo en la expresión en células resistente a inhibidores de ChoK.

La actividad ceramidasa ácida se expresa de forma anómala en varios cánceres humanos. Esta enzima puede ser útil como una nueva diana en cáncer, y podría estar implicada en resistencia al tratamiento antioncogénico (Seelan RS., Genes Chromosomes Cancer. 2000, 29:137-46; Liu X., Front Biosci. 2008; 13:2293-8 y Morales A., Oncogene. 2007, 26:905-16).

Inhibidores de colina quinasa

Inhibidores de colina quinasa, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto capaz de producir un descenso en la actividad ChoK, incluyendo esos compuestos que previenen la expresión del gen ChoK, produciendo niveles de ARNm o proteína ChoK reducidos así como a compuestos que inhiben la ChoK produciendo un descenso en la actividad de la enzima.

Los inhibidores de colina quinasa son espefícos para colina quinasa alfa.

Los compuestos que producen niveles reducidos de ARNm de ChoK se pueden identificar usando ensayos estándar para determinar los niveles de expresión de ARNm tal como RT-PCR, análisis de protección de ARN, transferencia Northern, hibridación in situ, tecnología de micromatrices y similares.

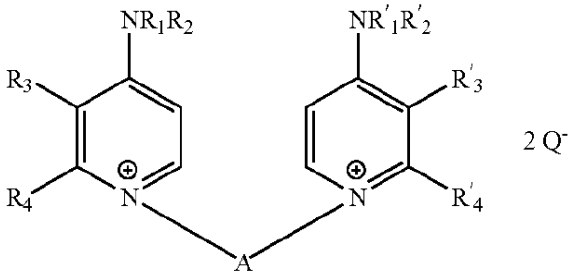
Los compuestos que producen niveles reducidos de proteína ChoK se pueden identificar usando ensayos estándar para determinar los niveles de expresión de proteína tal como inmunotransferencia o transferencia Western, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (enzimoinmunoensayo competitivo), DAS-ELISA (ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas el uso de biochips o micromatrices de proteínas que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas.

La determinación de la capacidad inhibidora sobre la actividad biológica de la colina quinasa se detecta usando ensayos estándar para medir la actividad de colina quinasa tal como los métodos basados en la detección de la fosforilación de colina marcada con [^{14}C] por ATP en presencia de colina quinasa recombinante purificada o una fracción enriquecida en colina quinasa seguido por detección de la colina fosforilada usando técnicas analíticas estándar (por ejemplo, TLC) como se describe en el documento EP1710236.

Los compuestos que son específicos para colina quinasa alfa (ChoKα) se pueden identificar detectando un descenso en los niveles de ARNm de ChoKα usando sondas específicas para ChoKα y que no hibridan en condiciones rigurosas con otras isoformas de ChoK (por ejemplo, ChoKβ) o detectando un descenso en los niveles de proteína ChoKα usando anticuerpos específicos para ChoKα y que no se unene a otras isoformas de ChoK (por ejemplo, ChoKβ). Los reactivos adecuados para la deteminación específica del ARNm de ChoKα y la proteína ChoKα se han descrito en detalle en el documento WO2006108905.

Los inhibidores ejemplares de colina quinasa que se pueden usar en la primera composición de la presente invención se describen en la tabla 1 de I a XVIII.

Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
I	Compuestos como se describen en la solicitud de patente de EE UU US20070185170 que tienen la fórmula general



en donde

Q^- representa la base conjugada de un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente adecuado;

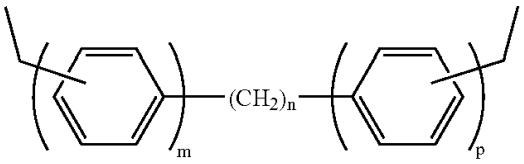
R_1 y R'_1, representan, independientemente entre sí, un radical arilo opcionalmente sustituido por halógeno, trifluorometilo, hidroxilo, alquilo de C_{1-6}, amino o alcoxilo;

R_2 y R'_2, representan, independientemente entre sí, un radical arilo opcionalmente sustituido por halógeno, trifluorometilo, hidroxilo, alquilo de C_{1-6}, amino o alcoxilo;

R_3 y R'_3, representan, independientemente entre sí, bien un radical seleccionado del grupo formado por H, halógeno, trifluorometilo, hidroxilo, amino, alcoxilo y alquilo de C_{1-6} opcionalmente sustituido por trifluorometilo, hidroxilo, amino o alcoxilo, o junto con R_4 y R'_4, respectivamente, e independientemente entre sí, un radical -CH=CH-CH=CH- opcionalmente substituido por halógeno, trifluorometilo, hidroxilo, alquilo de C_{1-6}, amino o alcoxilo;

R_4 and R'_4, representan, independientemente entre sí, un radical seleccionado del grupo formado por H y alquilo de C_{1-6} opcionalmente sustituido por halógeno, trifluorometilo, hidroxilo, amino o alcoxilo, o junto con R_3 y R'_3 respectivamente, e independientemente entre sí, un radical -CH=CH-CH=CH- opcionalmente sustituido por halógeno, trifluorometilo, hidroxilo, alquilo de C_{1-6}, amino o alcoxilo;

A representa un grupo espaciador que comprende cualquier estructura orgánica divalente que actúa como un enlace de unión entre los dos grupos de piridinio presentes en la estructura definida mediante la fórmula I y, en particular, moléculas divalentes que tienen una estructura seleccionada del grupo de:



donde m, n y p representan números enteros que pueden tener los siguientes valores: m=0, 1; n=0, 1-10; p=0, 1; con la condición de que m, n y p no tengan el valor de cero al mismo tiempo.

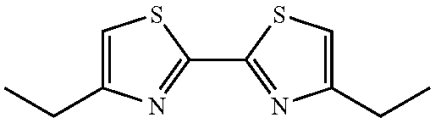
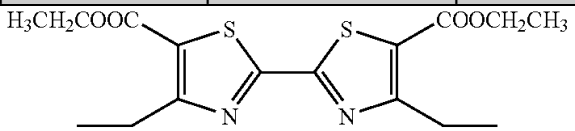
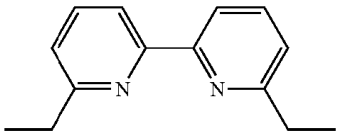
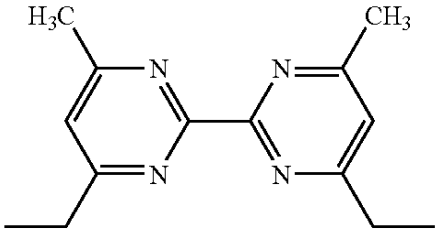


Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención





y



Los compuestos preferidos en este grupo incluyen aquellos en donde los sustituyentes NR_1R_2, R_3, R_4 y A son como sigue:

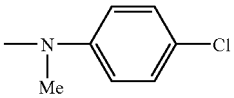
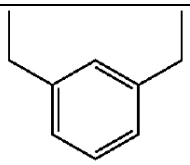
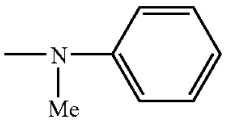
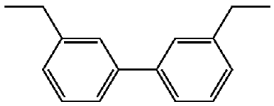
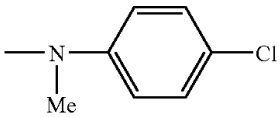
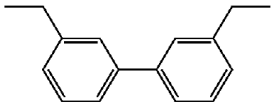
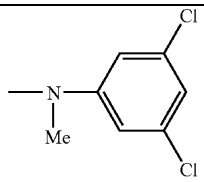
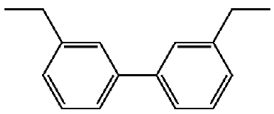
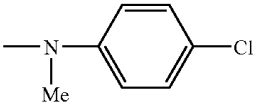
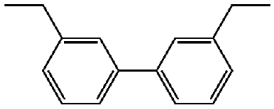
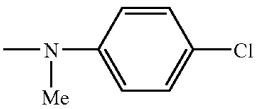
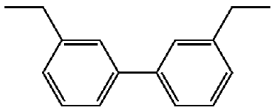
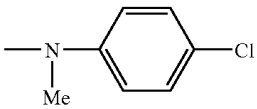
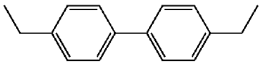
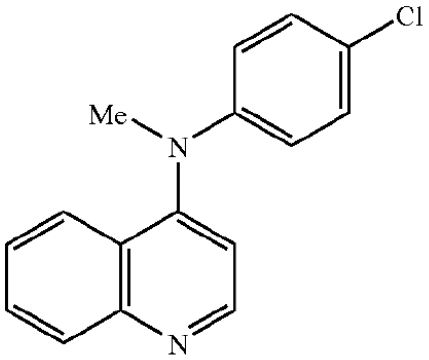
Compuesto	R_3, R_4	NR_1R_2	A
1	H, H		
2	H, H		
3	H, H		
4	H, H		
5	—(CH=CH)$_2$—		
6	—C^5H=C^6H— C^7Cl=C^8H—		
7 RSM932-A	—(CH=CH)$_2$—		

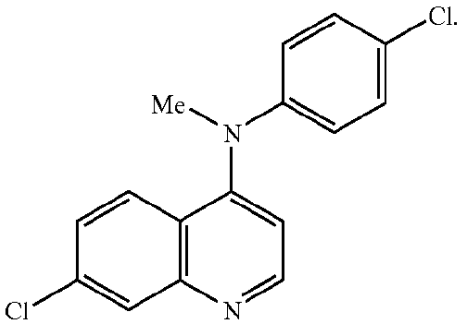
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención

8	—C⁵H=C⁶H— C⁷Cl=C⁸H—	—N(Me)—C6H4—Cl	C6H4—C6H4
9	—(CH=CH)₂—	—N(Me)—C6H4—Cl	C6H4—(CH2)2—C6H4
10	—C⁵H=C⁶H— C⁷Cl=C⁸H—	—N(Me)—C6H4—Cl	C6H4—(CH2)2—C6H4

Los compuestos preferidos en este grupo incluyen 4-(4-cloro-N-metilanilino)quinolina y 7-cloro-4-(4-cloro-N-metilamino)quinolina que tienen las estructuras

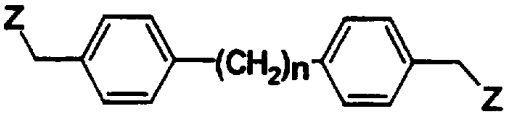


y

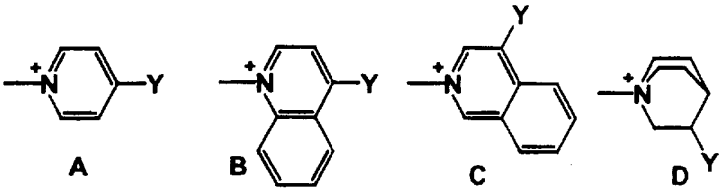


respectivamente.

II Compuestos como se describen en la solicitud internacional de patente WO9805644 que tienen la fórmula estructural general



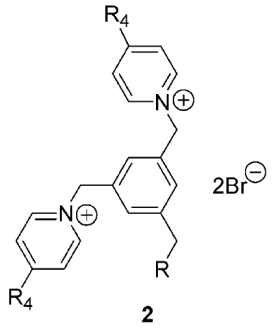
en donde
n es 0, 1, 2 o 3
Z es cualquier grupo estructural seleccionado del grupo de



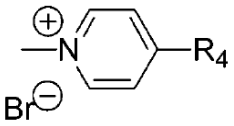
en donde Y se selecciona del grupo de -H, $-CH_3$, $-CH_2-OH$, $-CO-CH_3$, -CN, $-NH_2$, $-N(CH_3)_2$, pirrolidina, piperidina, perhidroazepina, -OH, $-O-CO-C_{15}H_{31}$, etc.

Los inhibidores de ChoK preferidos que tienen la fórmula definida anteriormente son los compuestos 1 a 6 descritos por Conejo-García et al (J.Med.Chem., 2003, 46:3754-3757) que tienen las siguientes estructuras

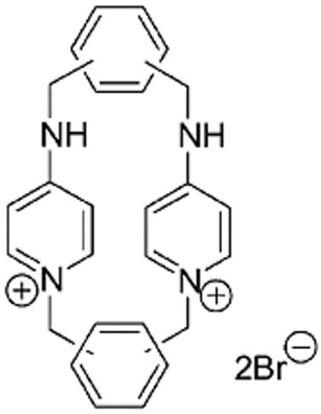
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención



en donde R es H o

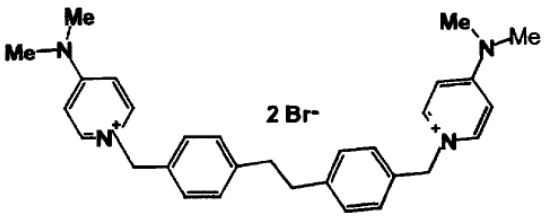


y

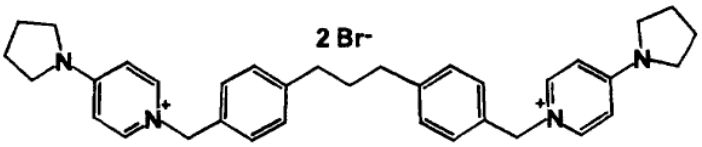


Compuesto	Isómero
3	*p,p*
4	*m,m*
5	*p,m*
6	*m,p*

Los compuestos que están en la fórmula general anterior se seleccionan del grupo de GRQF-JCR795b, GRQF-MN94b y GRQF-MN58b que tienen las estructuras



GRQF-JCR795b



GRQF-MN94b

y

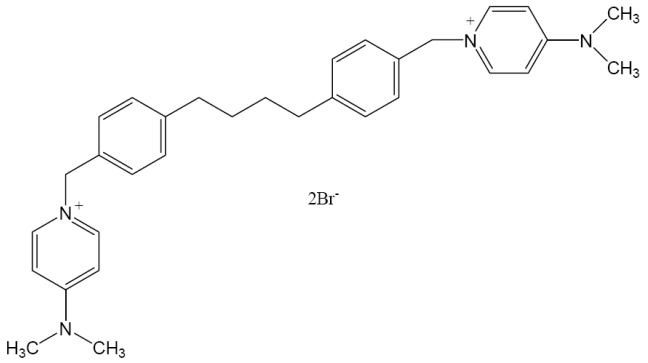
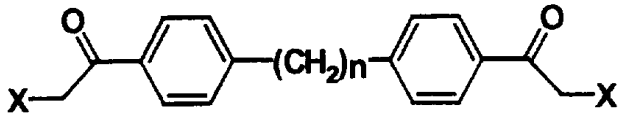
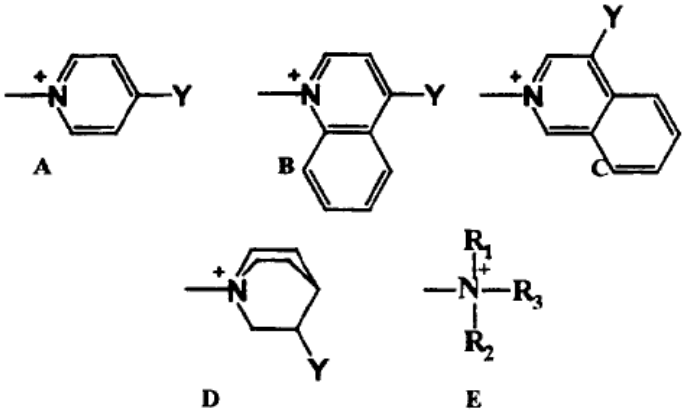
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
	 **GRQF-MN58b**
III	Compuestos como se describen en la solicitud internacional de patente WO9805644 que tienen la fórmula estructural general  en donde n es 0, 1, 2, 3, etc. X es un elemento estructural seleccionado del grupo de A, B, C, D y E como sigue  en donde Y se selecciona de -H, $-CH_3$, $-CH_2-OH$, $-CO-CH_3$, -CN, $-NH_2$, $-N(CH_3)_2$, pirrolidina, piperidina, perhidroazepino, -OH, $-O-CO-C_{15}H_{31}$ y en donde R_1, R_2 and R_3 son grupos alquilo tal como -Me y -Et y similares aunque en algunos casos, los R_2 y R_3 pueden ser grupos más complejos tal como $-CH_2-CH(OMe)_2$ y $-CH_2-CH(OEt)_2$. Los compuestos preferidos que tienen la estructura general anterior son GRQF-FK3 y GRQF-FK21 que tienen las siguientes estructuras:

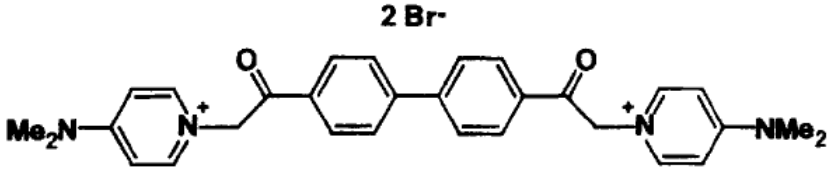
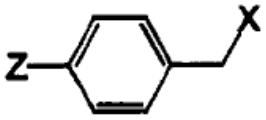
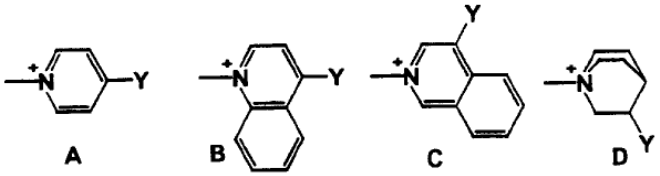
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
	 GRQF-FK3 GRQF-FK21
IV	Compuestos como se describen en la solicitud internacional de patente WO9805644 que tienen la fórmula estructural general  en donde X es un grupo seleccionado del grupo de A, B, C y D como sigue  en donde Y es un sustituyente tal como -H, -CH3, $-CH_2OH$, -CN, -NH2, $-N(CH_3)_2$, pirrolodinilo, piperidinilo, perhidroazepino, -OH, $-O-CO-C_{15}H_{31}$ y similares en donde Z es un grupo alquilo (-Me, -Et, etc.), arilo, fenilo, o grupos donantes de electrones tal como –OMe, $-NH_2$, $-NMe_2$, etc. Los compuestos preferidos que tienen la estructura general anterior son GRQF-MN98b y GRQF-MN164b que tienen las siguientes estructuras:

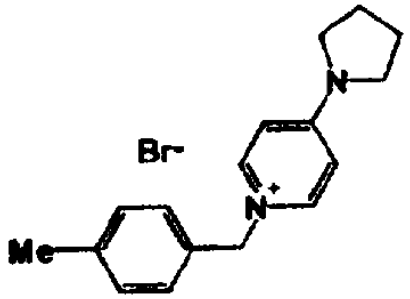
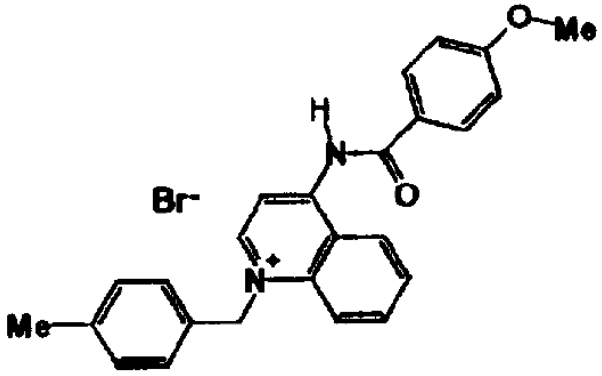
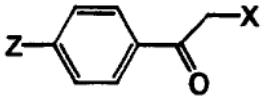
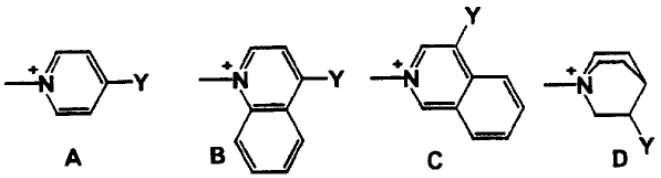
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
	 GRQF-MN98b  GRQF-MN164b
V	Compuestos como se describen en la solicitud internacional de patente WO9805644 que tienen la fórmula estructural general  en donde X es un grupo seleccionado del grupo de A, B, C y D como sigue  en donde Y es un sustituyente tal como -H, $-CH_3$, $-CH_2OH$, $-CO-CH_3$, -CN, $-NH_2$, $-N(CH_3)_2$ en donde Z es un grupo alquilo (-Me, -Et, etc.), arilo (fenilo y similares), o grupos donantes de electrones tal como -OMe, $-NH_2$, $-NMe_2$, etc. Los compuestos preferidos que tienen la estructura mencionada anteriormente son GRQF-FK29 y GRQF-FK33 que tienen las siguientes estructuras

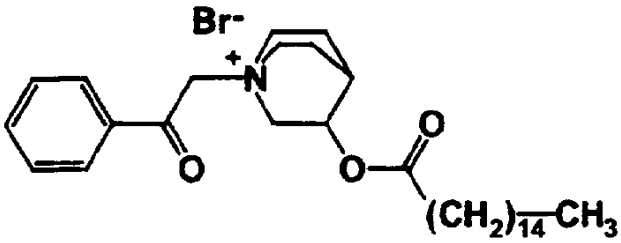
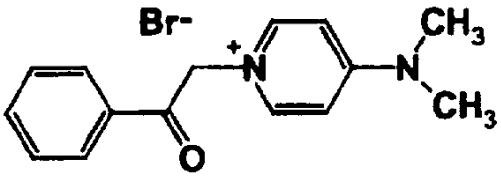
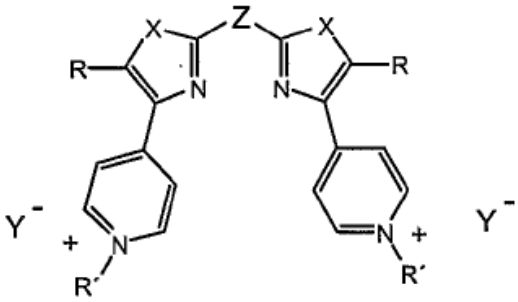
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
	 GRQF-FK29  GRQF-FK33
VI	Compuestos descritos en la solicitud internacional de patente WO2004016622 que tienen la fórmula estructural general  en donde X es oxígeno o azufre, Z es un enlace sencillo, 1,2-etilideno, isopropilideno, *p,p'*-bifenilo, p-fenilo, m-fenilo, 2,6-piridileno, *p,p'*-oxidifenilo o *p,p'*-hexafluoroisopropilidendifenilo; R es H, alquilo, alquildieno, alquinos, arilo, halógeno, alcohol, tiol, éter, tioéter, sulfóxidos, sulfonas, aminas primarias o sustituidas, nitro, aldehídos, cetonas, nitrilo, ácidos carboxílicos sus derivados y sulfatos, metanosulfonato, clorhidrato, fosfato, nitrato, acetato, proprionato, butirato, platmita, oxalato, malonato, maleato, malato, fumarato, citrato, benzoato, R' es H o alquilo Y es H o sulfato, metanosulfonato, clorhidrato, fosfato, nitrato, acetato, propionato, butirato, palmitato, oxalato, malonato, maleato, malato, fumarato, citrato o benzoato. En una forma de realización preferida, los compuestos que tienen la estructura definida anteriormente se seleccionan del grupo de 2,2-bis[(5-metil-4-(4-piridil)-2-oxazolil)]propano, 2,2-bis[(5-trifluorometil-4-(4-piridil)-2-oxazolil)]propano, 4,4'-bis[(5-trifluorometil-4-(1-metil-4-piridinio)-2-oxazolil)]bifenilo, 4,4'-bis[(5-pentafluoroetil-4-(1-metil-4-piridinio)-2-oxazolil)]bifenilo, 4,4'-bis[(5-trifluorometil-4-(1-metil-4-piridinio)-2-oxazolil)]hexafluoroisopropilidendifenilo, 2,2-bis[(5-trifluorometil-4-(4-piridil)-2-tiazolil)] propano y 4,4'-bis[(5-trifluorometil-4-(1-metil-4-piridinio)-2-tiazolil)]-1,1'-oxibisbenceno.

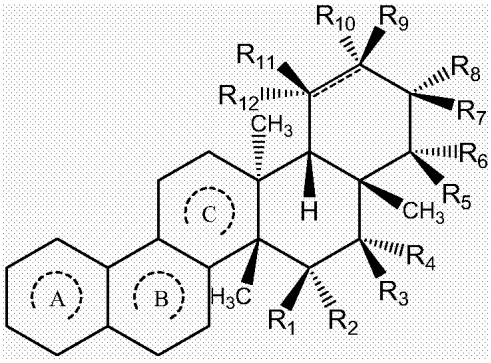
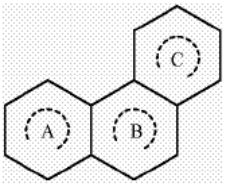
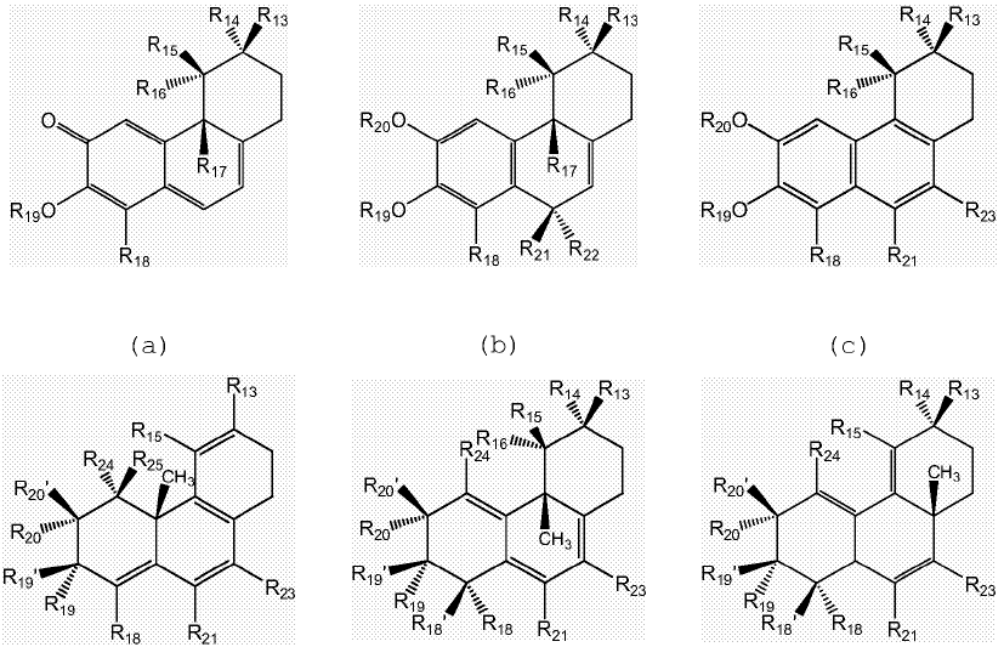
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
VII	Hemicolio-3 descrito en Cuadrado et al (Oncogene, 1993, 8:2959-2968) y Jiménez et al. (J.Cell Biochem., 57:141-149) y Hernández-Alcoceba, et al. (Oncogene, 1997, 15:2289-2301).
VIII	Un compuesto como se define en la solicitud internacional de patente WO2007077203 que tiene una estructura general de la fórmula  en donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11} y R_{12} son independientemente hidrógeno; hidroxilo; halógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; un grupo amino N(R')(R''), donde R' y R'' son independientemente hidrogeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}; un grupo OCOR, donde R es $(CH_2)_2$-COOH o $(CH_2)_2CO_2CH_2CH_3$; o cada par puede formar un grupo (C=O) junto con el carbono al que están unidos; R_9 y R_{10} son independientemente hidrógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10}; un grupo COR''' (donde R''' es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; alquilo de C_1-C_{12}; o amino $N(R^{IV})(R^{V})$, donde R^{IV} y R^{V} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo carbinol $(CH2)_n$-OH (donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10); o juntos forman un grupo metileno; el enlace ═══ significa un doble enlace o un enlace sencillo; y donde la estructura tricíclica  se selecciona de las siguientes estructuras

Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención



en donde

R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{21}, R_{22} y R_{23} son independientemente hidrógeno; hidroxilo; halógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10}, sustituido o no sustituido; un grupo amino N (R^{VI})(R^{VII}), donde R^{VI} y R^{VII} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}; un grupo $OCOR^{VIII}$, donde R^{VIII} es $(CH_2)_2COOH$ o $(CH_2)_2CO_2CH_2CH_3$; o cada par puede formar un grupo (C=O) junto con el carbono al que están unidos;

R_{17} es hidrógeno o metilo;

R_{18} y R_{18}' son independientemente hidrógeno; hidroxilo; halógeno; alquilo de C_1-C_{12}; arilo de C_6-C_{10}; COR^{IX} (donde R^{IX} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C1-C12; amino N(R^X)(R^{XI}), donde RX y RX1 son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}; o alcoxilo de C_1-C_{12}); o trifluorometilo;

R_{19}, R_{19}', R_{20} y R_{20}' son independientemente hidrógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; un grupo COR^{XII} (donde R^{XII} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; o amino N(R^{XIII})(R^{XIV}), donde R^{XIII} y R^{XIV} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo [alquilo (C_1-C_{12})-O-alquilo (C_1-C_{12})-]$_n$ (donde n está comprendido entre 1 y 3); trifluorometilo; o cada par 19-19' o 20-20' puede formar un grupo C=O junto con el carbono al que están unidos;

R_{24} y R_{25} son independientemente hidrógeno, hidroxilo o halógeno;

Los compuestos preferidos que están en la estructura anterior se seleccionan del grupo compuesto de:

- 3,9-dihidroxi-4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-7,8,8a,11,12,12a,12b,13,14,14a-decahidro-6bH, 9H-picen-2,10-diona;
- Éster 9-hidroxi-4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-2,10-dioxo-2,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13, 14,14a-tetradecahidro-picen-3-ílico del ácido acético;
- Éster 9-hidroxi-4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-2,10-dioxo-2,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14,14a-tetradecahidropicen-3-ílico del ácido propiónico;
- Éster 9-hidroxi-4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-2,10-dioxo-2,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14,14a-tetradecahidro-picen-3-ílico del ácido dodecanoico;
- Éster 9-hidroxi-4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-2,10-dioxo-

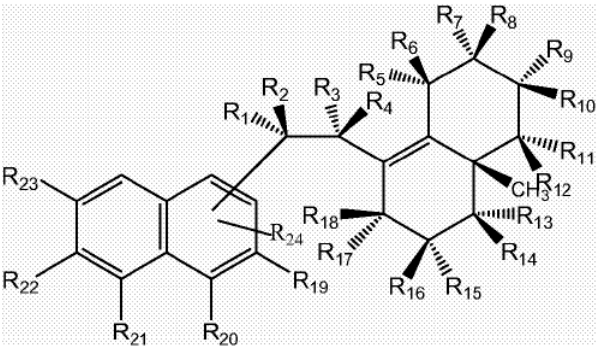
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
	2,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14,14a-tetradecahidropicen-3-ílico del ácido dimetil-carbámico; - Éster 9-hidroxi-4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-2,10-dioxo-2,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13, 14,14a-tetradecahidro-picen-3-ílico del ácido nicotínico; - Éster 4-bromo-(9-hidroxi-6b,8a,11,12b,14a-hexametil-2,10-dioxo-2,6b,7,8,8a,9,10,11,12, 12a,12b,13,14,14a-tetradecahidropicen-3-ílico) del ácido benzoico; - 14-Bromo-3,7,9-trihidroxi-4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-7,8,8a,11,12,12a,12b,13,14,14a-decahidro-6bH,9H-picen-2,10-diona; - Éster 12-bromo-9-hidroxi-6b,8a,11,12b,14a-hexametil-2,10-dioxo-2,6b,7,8,8a,9,10,11,12, 12ar 12br 13, 14, 14a-tetradecahidropicen-3-ílico del ácido dimetil-carbámico; - Éster 4-bromo-(12-bromo-9-hidroxi-6b,8a,11,12b,14a-hexametil-2,10-dioxo-2,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14,14a-tetradecahidro-picen-3-ílico) del ácido benzoico; - 12-bromo-3,9-dihidroxi-6b,8a,11,12b,14a-hexametil-7,8,8a,11,12,12a,12b,13,14,14a-decahidro-6bHr 9H-picen-2,10-diona; - 3,9,10-trihidroxi-6b,8a,11,12b,14a-hexametil-7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14,14a-dodecahidro-6b*H*-picen-2-ona; - Éster mono-(10-hidroxi-2,4ar 6ar 9, 12b,14ahexametil-3,11-dioxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a, 11,12b,13,14,14a,14b-tetradecahidropicen-4-ílico) del ácido succínico; - Éster etílico éster 10-hidroxi-2,4a,6a,9,12b,14a-hexametil-3,11-dioxo-1,2,3, 4,4a,5,6,6a,11,12b,13,14,14a,14b-tetradecahidropicen-4-ílico del ácido succínico.
IX	Un compuesto como se define en la solicitud internacional de patente WO2007077203 que tiene la estructura general de la fórmula  en donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{17}, R_{18}, R_{19} y R_{20} son independientemente hidrógeno; hidroxilo; halógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; un grupo amino $N(R^{XV})$ (R^{XVI}), donde R^{XV} y R^{XVI} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}; o cada par puede formar un grupo carboxilo (C=O) junto con el carbono al que están unidos; R_7 y R_8 son independientemente hidrógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10}; un grupo COR^{XVII} (donde R^{XVII} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; O-alquilo C_1-C_{12}; o amino $N(R^{XVIII})(R^{XIX})$, donde R^{XVIII} y R^{XIX} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo carbinol $(CH_2)_n$-OH (donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10); o juntos formar un grupo metileno, R_{21} y R_{24} son independientemente alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; un grupo COR^{XX} (donde R^{XX} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; o amino $N(R^{XXI})(R^{XXII})$, donde R^{XXI} y R^{XXII} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo [alquilo (C_1-C_{12})-O-alquilo (C_1-C_{12a})-]$_n$ (donde n está comprendido entre 1 y 3); o trifluorometilo; R_{22} y R_{23} son: - hidrógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; un grupo COR^{XXIII} (donde R^{XXIII} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de

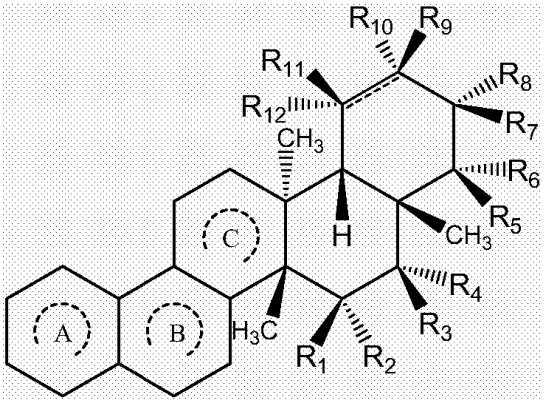
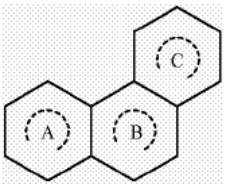
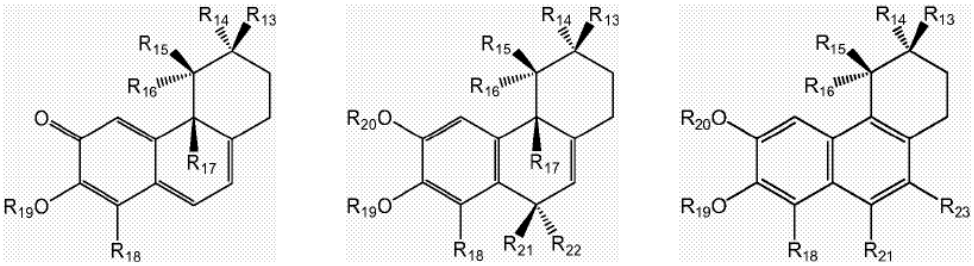
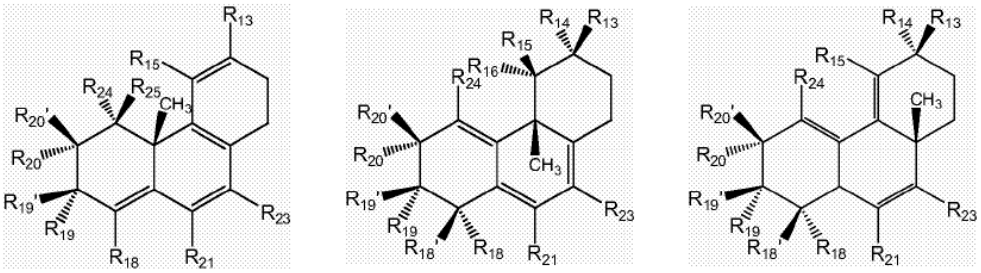
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
	C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; o amino $N(R^{XXIV})(R^{XXV})$, donde R^{XXIV} y R^{XXV} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo [alquilo (C_1-C_{12})-O-alquilo (C_1-C_{12a})-]$_n$ (donde n está comprendido entre 1 y 3); o trifluorometilo cuando R_{24} está en la posición para con respecto a R_{20}; o - OR_{22}' y OR_{23}' respectivamente, donde R_{22}' y R_{23}' son independientemente hidrógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; un grupo COR^{XXVI} (donde R^{XXVI} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; o amino $N(R^{XXVII})(R^{XVIII})$), en donde R^{XXVII} y R^{XVIII} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo [alquilo (C_1-C_{12})-O-alquilo (C_1-C_{12a})-]$_n$ (donde n está comprendido entre 1 y 3); o trifluorometilo cuando R_{24} está en la posición meta con respecto a R_{20}. Los compuestos preferidos que están dentro de la estructura anterior se seleccionan del grupo de: - 14-bromo-3-hidroxi-4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-7,8,8a,11,12,12a,12b,13,14,14a-decahidro-6bH,9H-picen-2,10-diona; - Éster 4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-2,10-dioxo-2,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14, 14a-tetradecahidropicen-3-ílico del ácido acético; - Éster 4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-2,10-dioxo-2,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14, 14a-tetradecahidropicen-3-ílico del ácido nicotínico; - 3,10-dihidroxi-4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14,14a-dodecahidro-6bHpicen-2-ona; - 3-hidroxi-4,6b,8a,11,12b,14a-hexametil-7,8,8a,12a,12b,13,14,14a-octahidro-6bH,9H-picen-2,10-diona
X	Un compuesto como se define en la solicitud internacional de patente WO2007077203 que tiene una estructura general de la fórmula:  en donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11} y R_{12} son independientemente hidrógeno; hidroxilo; halógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; un grupo amino N(R')(R''), donde R' y R'' son independientemente hidrogeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}; un grupo OCOR, donde R es $(CH_2)_2$-COOH o $(CH_2)_2CO_2CH_2CH_3$; o cada par puede formar un grupo (C=O) junto con el carbono al que están unidos; R_9 y R_{10} son independientemente hidrógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10}; un grupo COR''' (donde R''' es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; O-alquilo C_1-C_{12}; o amino $N(R^{IV})(R^{V})$, donde R^{IV} y R^{V} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo carbinol $(CH2)_n$-OH (donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10); o juntos forman un grupo metileno; el enlace ═══ ------ significa un doble enlace o un enlace sencillo; y donde la estructura tricíclica

Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención



se selecciona de las siguientes estructuras:





en donde

R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{21}, R_{22} y R_{23} son independientemente hidrógeno; hidroxilo; halógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10}, sustituido o no sustituido; un grupo amino N (R^{VI})(R^{VII}), donde R^{VI} y R^{VII} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}; un grupo $OCOR^{VIII}$, donde R^{VIII} es $(CH_2)_2COOH$ o $(CH2)_2CO_2CH_2CH_3$; o cada par puede formar un grupo (C=O) junto con el carbono al que están unidos;

R_{17} es hidrógeno o metilo;

R_{18} y R_{18}' son independientemente hidrógeno; hidroxilo; halógeno; alquilo de C_1-C_{12}; arilo deC_6-C_{10}; COR^{IX} (donde R^{IX} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12}; amino N(R^X)(R^{XI}), donde RX y RXI son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}; o alcoxilo de C_1-C_{12}); o trifluorometilo;

R_{19}, R_{19}', R_{20} y R_{20}' son independientemente hidrógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; un grupo COR^{XII} (donde R^{XII} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; o amino N(R^{XIII})(R^{XIV}), donde R^{XIII} y R^{XIV} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo [alquilo (C_1-C_{12})-O-alquilo (C_1-C_{12a})-]$_n$ (donde n está comprendido entre 1 y 3); trifluorometilo; o cada par 19-19' o 20-20' puede formar un grupo C=O junto con el carbono al que están unidos;

R_{24} y R_{25} son independientemente hidrógeno, hidroxilo o halógeno;

Los compuestos preferidos que están en la estructura anterior se seleccionan del grupo de:

- Éster metílico del ácido 7,10,11-trihidroxi-2,4a,6a,9,12b,14a-hexametil-8-oxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,8,12b,13,14,14a,14b-tetradecahidro-picen-2-carboxílico;
- Éster metílico del ácido 9-formil-10,11-dihidroxi-2,4a,6a,12b,14a-pentametil-8-oxo-

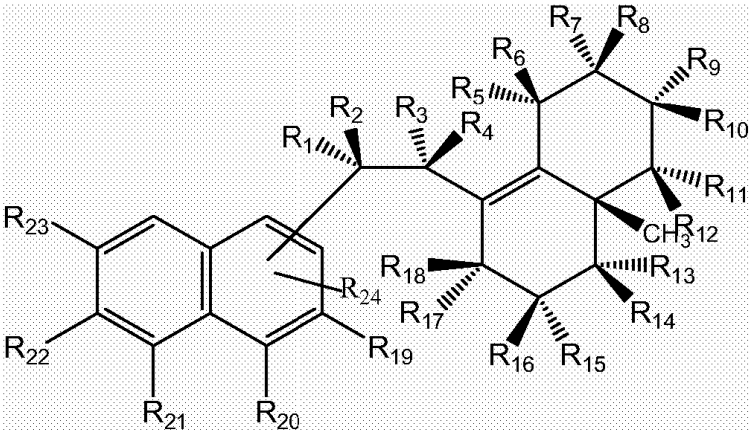
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
	1,2,3,4,4a,5,6,6a,8,12b,13,14,14a,14b-tetradecahidro-picen-2-carboxílico; - Éster metílico del ácido 11-hidroxi-10-(2-metoxi-etoximetoxi)-2,4a,6a,9,12b,14a-hexametil-8-oxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,8,12b,13, 14,14a,14b-tetradecahidro-picen-2-carboxílico.
XI	Un compuesto como se define en la solicitud internacional de patente WO2007077203 que tiene la estructura general de la fórmula:  R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{17}, R_{18}, R_{19} y R_{20} son independientemente hidrógeno; hidroxilo; halógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; un grupo amino $N(R^{XV})(R^{XVI})$, donde R^{XV} y R^{XVI} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}; o cada par puede formar un grupo carboxilo (C=O) junto con el carbono al que están unidos; R_7 y R_8 son independientemente hidrógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10}; un grupo COR^{XVII} (donde R^{XVII} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; O-alquilo C_1-C_{12}; o amino $N(R^{XVIII})(R^{XIX})$, donde R^{XVIII} y R^{XIX} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C^1-C^{12}); un grupo carbinol $(CH_2)_n$-OH (donde n es un número entero comprendido entre 1 y 10); o juntos formar un grupo metileno, R_{21} y R_{24} son independientemente alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; un grupo COR^{XX} (donde R^{XX} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; o amino $N(R^{XXI})(R^{XXII})$, donde R^{XXI} y R^{XXII} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo [alquilo (C_1-C_{12})-O-alquilo (C_1-C_{12a})-]$_n$ (donde n está comprendido entre 1 y 3); o trifluorometilo; R_{22} y R_{23} son: - hidrógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; un grupo COR^{XXIII} (donde R^{XXIII} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C^6-C^{10} sustituido o no sustituido; o amino $N(R^{XXIV})(R^{XXV})$, donde R^{XXIV} y R^{XXV} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo [alquilo (C_1-C_{12})-O-alquilo (C_1-C_{12a})-]$_n$ (donde n está comprendido entre 1 y 3); o trifluorometilo cuando R_{24} está en la posición para con respecto a R_{20}; o - OR_{22}' y OR_{23}' respectivamente, donde R_{22}' y R_{23}' son independientemente hidrógeno; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; un grupo COR^{XXVI} (donde R^{XXVI} es hidrógeno; hidroxilo; alquilo de C_1-C_{12} sustituido o no sustituido; arilo de C_6-C_{10} sustituido o no sustituido; o amino $N(R^{XXVII})(R^{XVIII})$), en donde R^{XXVII} y R^{XVIII} son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo de C_1-C_{12}); un grupo [alquilo (C_1-C_{12})-O-alquilo (C_1-C_{12a})-]$_n$ (donde n está comprendido entre 1 y 3); o trifluorometilo cuando R_{24} está en la posición *meta* con respecto a R_{20}. Los compuestos preferidos que están dentro de la estructura general anterior se seleccionan del grupo de: - 10,11-dihidroxi-2,4a,6a,9,14a-pentametil-1,4,4a,5,6,6a,13,14,14a,14b-decahidro-2H-picen-3-ona; - 10,11-dihidroxi-2,4a,6a,9,14a-pentametil-4a,5,6,6a,13,14,14a,14b-octahidro-4H-

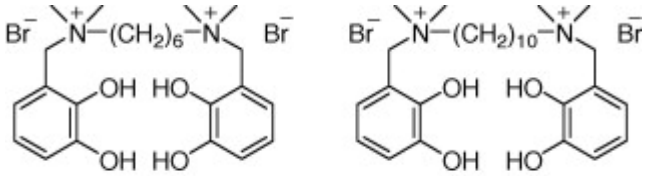
Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
	picen-3-ona.
XII	Análogos de ATP incluyendo análogos de ATP no hidrolizables tal como AMP-PCH$_2$P, adenilil imidodifosfato (AMP-PNP), AMP-PSP y AMP donde el oxígeno que une el segundo y tercer fosfatos de los análogos de ATP se cambia por CH$_2$, S (tal como ATPγS, ATPβ y ATPαS) y NH, respectivamente así como sustratos suicidas tal como 5'-(p-fluorosulfonil benzoil)adenosina (FSBA), *N*^{6}-Dietil-beta,gamma-dibromometilen-ATP, 2-metiltio-ATP (APM), α,β-metilen-ATP, β,γ-metilen-ATP, di-adenosina pentafosfato (Ap5A), 1,N^6-etenoadenosine trifosfato, adenosina 1-óxido trifosfato, 2',3'-O-(benzoil-4-benzoil)-ATP (B-ZATP), la familia de los análogos de ATP descrita en el documento US2004204420, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil)-ATP (TNP-ATP), 1-N^6(metoxi)ATP, 7-N^6-(pirolidino)ATP, 2-N^6 (etoxi) ATP, 8-N^6 (ciclopentil) ATP, 3-N^6(acetil) ATP, 9-N^6(ciclopentiloxi)ATP, 4-N^6 (i-propoxi) ATP, 10-N^6-(Piperidino) ATP, 5-N^6- (bencil) ATP, 11-N^6-(ciclohexil) ATP y similares.
XIII	Inhibidores del transportador de colina tal como análogos de N-n-alquilnicotinio, hemicolinios HC-3, decametonio, suxametonio, D-tubocurarina, tetrametilamonio, tetraetilamonio, hexametonio, análogos N-alquilo (N-etil colina, N-metil colina), mono-, di- y trietil colina, metyoduro de N-hidroxietil pirrolidinio (pirrolcolina), y DL-alfa-metil colina descrita por Barker, L.A. y Mittag, T.W. (J Pharmacol Exp Ther. 1975; 192: 86-94), ion dimetil-n-pentil (2-hidroxietil) amonio, decametonio, análogos de hexametonio y decametonio sustituidos con bis-catecol descritos por Cai et al (Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, 15: 7042-7047) que tienen la estructura  **1** **2**
XIV	Anticuerpos inhibidores capaces de unirse específicamente a e inhibir la actividad de la colina quinasa y, en particular, anticuerpos monoclonales que reconocen el dominio catalítico o el dominio de dimerización de ChoKα y por lo tanto inhiben la actividad ChoKα. En una forma de realización preferida, los anticuerpos inhibidores son anticuerpos monoclonales como se definen en el documento WO2007138143. En una forma de realización aún más preferida, los anticuerpos inhibidores son los anticuerpos AD3, AD8 y AD11 como se definen en el documento WO2007138143.
XV	Compuestos capaces de fomentar un aumento en la actividad y/o expresión de colina quinasa beta (ChoKβ) o una variante funcionalmente equivalente de la misma como se describe en la solicitud de patente internacional en tramitación junto a la presente PCT/IB2009/052936. ChoKβ fomenta un descenso en el crecimiento de tumores producido por la sobreexpresión de ChoKα y por tanto, ChoKβ así como composiciones que fomentan un aumento en la actividad y/o expresión de ChoKβ también se pueden usar como inhibidores de ChoKα en las composiciones de la presente invención. En una forma de realización preferida, el compuesto capaz de aumentar la expresión de ChoKβ es un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una ChoKβ o una variante funcional de la misma. El polinucleótido es de origen humano y se define mediante SEQ ID NO: 1 (GenEMBL AB029886). En otra forma de realización preferida, el compuesto capaz de aumentar la expresión de ChoKβ es el polipéptido ChoKβ definido por SEQ ID NO: 2 (acceso UniProt Q9Y259) o una variante funcionalmente equivalente del mismo. El término "variantes de ChoKβ", como se usa en el presente documento, se entiende como un polipéptido que muestra sustancialmente las mismas propiedades de ChoKβ en términos de (i) su capacidad para prevenir el aumento en PCho producido por un aumento en la actividad ChoKα; (ii) su capacidad para prevenir la transformación oncogénica de células producida por un aumento en la expresión de ChoKα o (iii) su capacidad de fomentar un aumento en la actividad de la fosfatidiletanolamina metil transferasa (PEMT). Los métodos para la identificación de variantes de ChoK que tienen las propiedades descritas en el presente documento se describen en la solicitud de patente española en tramitación junto a esta P200802007. Las variantes de ChoKβ adecuadas para su uso como inhibidores de ChoKα en las composiciones de la presente invención preferiblemente tienen una identidad de secuencia con dichas citoquinas ChoKβ de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%,

Tabla 1: Inhibidores de colina quinasa adecuados para su uso en las composiciones de la invención	
	al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad entre las variantes y ChoKβ se determina usando algoritmos de ordenador y métodos que son muy conocidos para los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S., *et al.,* NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 21 5: 403-410 (1990)].
XVI	Inhibidores de fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT o EC 2.1.1.17). El tratamiento de células con inhibidores de ChoKα produce un aumento en la expresión de PEMT (solicitud de patente española en tramitación junto a esta P200802007). Además, la sobreexpresión de ChoKβ en células también produce un aumento en la expresión de PEMT (solicitud de patente española en tramitación junto a esta P200802007) lo que sugiere que la activación de PEMT podría ser la vía usada por ChoKβ para compensar el descenso en los niveles de fosfatidilcolina en respuesta a la inhibición de ChoKα. Los inhibidores de PEMT adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen 3-deazaadenosina (DZA) (Vance et al., 1986, Biochem.Biophys.Acta, 875: 501-509), 3-deazaaristeromicina (Smith y Ledoux, Biochim Biophys Acta. 1990, 1047: 290-3), bezafibrato y ácido clofíbrico (Nishimaki-Mogami T et al., Biochim. Biophys. Acta, 1996, 1304:11-20).
XVII	Un oligonucleótido antisentido específico para la secuencia de la colina quinasa
XVIII	Una ribozima o enzima de ADN específica para la secuencia de la colina quinasa
XIX	Un ARN interferente específico para la secuencia de la colina quinasa.

Inhibidores de ceramidasa ácida

Inhibidores de ceramidasa ácida, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto capaz de producir un descenso en la actividad ceramidasa ácida, incluyendo esos compuestos que previenen la expresión del gen de ceramidasa ácida, lo que produce niveles reducidos del ARNm o proteína de ceramidasa ácida así como compuestos que se unen al sitio activo de ceramidasa ácida produciendo un descenso en la actividad de la enzima.

La expresión “inhibidores de ceramidasa ácida”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto capaz de producir un descenso en la actividad de ceramidasa ácida, incluyendo esos compuestos que previenen la expresión del gen de ceramidasa ácida, produciendo niveles reducidos del ARNm o proteína de la ceramidasa ácida así como compuestos que se unen al sitio activo de la ceramidasa ácida produciendo un descenso en la actividad de la enzima.

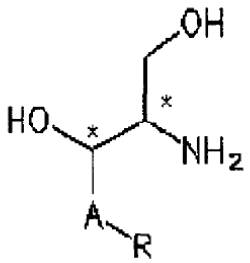
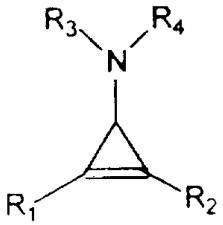
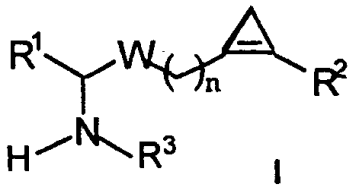
Los compuestos que producen niveles reducidos del ARNm de ceramidasa ácida se pueden identificar usando ensayos estándar para determinar los niveles de expresión de ARNm tal como RT-PCR, análisis de protección de ARN, tranferencia Northern, hibridación in situ, tecnología de micromatrices y similares.

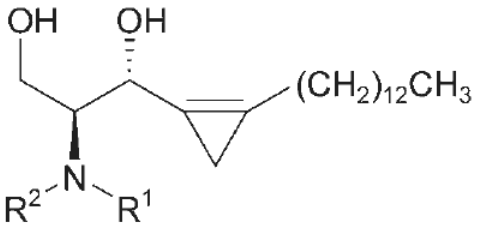
Los compuestos que producen niveles reducidos de proteína ceramidasa ácida se pueden identificar usando ensayos estándar para determinar los niveles de expresión de proteína tal como inmunotransferencia o tranferencia Western, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (enzimoinmunoensayo competitivo), DAS-ELISA (ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas el uso de biochip o micromatrices de proteínas que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas.

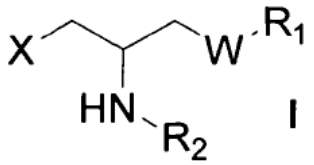
Los inhibidores de la ceramidasa ácida que producen un descenso en la actividad enzimática se pueden identificar usando ensayos estándar para medir la actividad de ceramidasa ácida usando ceramidasa ácida purificada o fracciones enriquecidas en ceramidasa ácida y un sustrato de la misma. Por ejemplo, el método descrito en el documento ES2233204 que se basa en la inhibición de la hidrólisis de N-(12-(4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazolo)dodecil) esfingosina (Cer-C12-NBD).

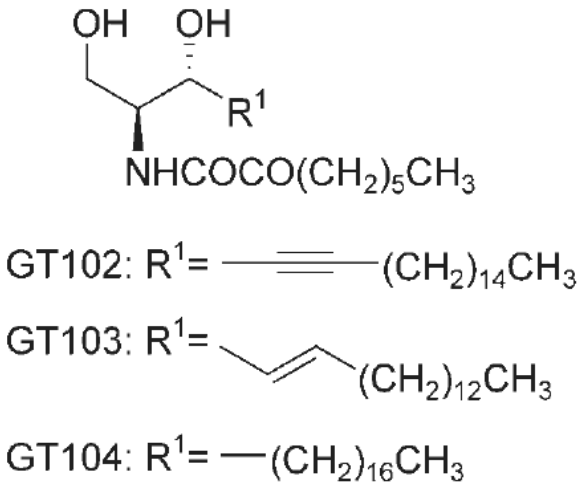
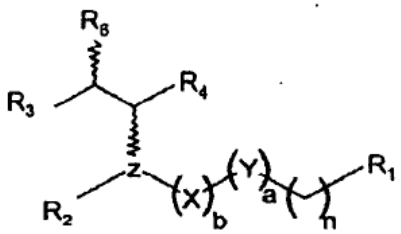
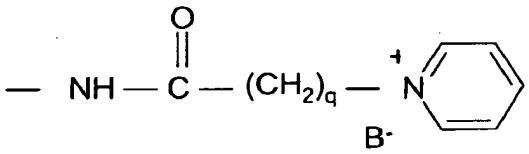
Se muestran inhibidores de ceramidasa ácida o inhibidores de similar a ceramidasa ácida ejemplares no limitantes que se pueden usar en la primera composición de la invención bajo los puntos I a XIII de la tabla II

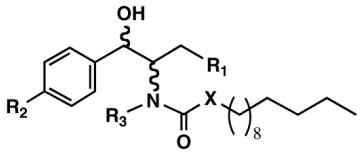
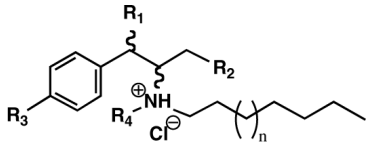
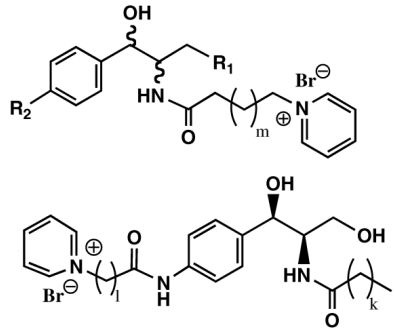
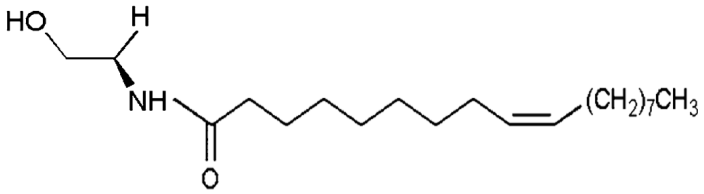
Inhibidores de ceramidasa ácida adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención	
I	Bases esfingoides como se describen en el documento EP1287815 que tienen la siguiente fórmula estructural general

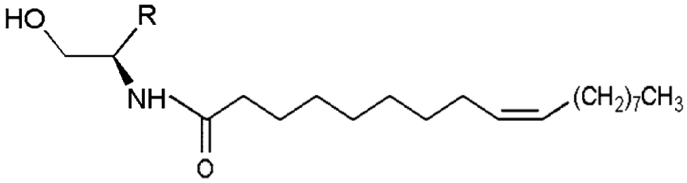
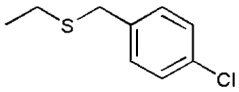
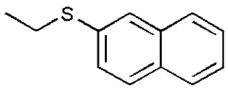
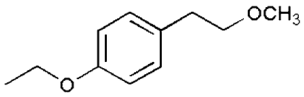
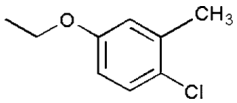
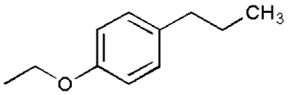
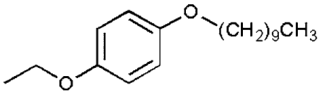
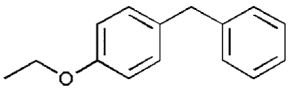
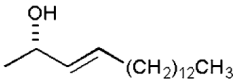
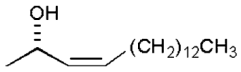
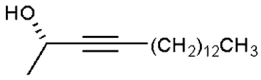
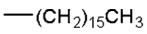
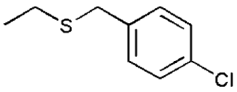
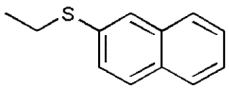
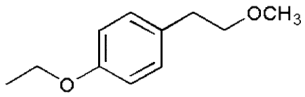
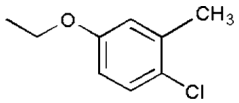
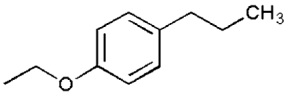
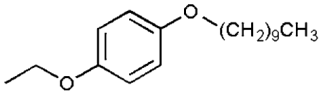
Inhibidores de ceramidasa ácida adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención	
	 en donde A es CH_2-CH_2-(R), CH=CH-(R) o C(H)OH-CH_2-(R) o -CH=CH-CHOH-(R) y R es un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 10 a 22 átomos de carbono que pueden contener opcionalmente uno o más dobles enlaces y/o puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos hidroxilo. R es preferiblemente un grupo alquilo de cadena lineal que tiene de 12 a 18 átomos de carbono, más preferiblemente un grupo alquilo de cadena lineal que tiene 13 átomos de carbono. Ambos carbonos asimétricos pueden tener la configuración D o L.
II	Variantes de ciclopropenilaminas como se describen en el documento ES2143403 que tienen la fórmula estructural general  en donde R_1 y R_2 pueden ser el mismo o diferente y corresponden a grupos alquilo o fenilalquilo lineales o ramificados de 1 a 18 átomos de carbono que tienen de 0 a varias insaturaciones y sustituyentes (X) al final del grupo en donde X es -OH, -OR en donde R es alquilo o metiloxialquilo de C_1-C_5 lineal o ramificado, -CO_2H, -CO2R en donde R es como se ha definido previamente, -CON$(R)_2$ en donde R es como se ha definido previamente y halógeno (F, Cl, Br, I) y R_3 y R_4 son alquilo, alquenilo, arilo, que pueden ser el mismo o diferente o pueden formar parte de un anillo aromático o un anillo tipo ftalamida. En una forma de realización preferida, el compuesto que está dentro de la fórmula general anterior adecuado para su uso en la presente invención es N-(1-pentil-2-butil-3-ciclopro-fenil)ftalamida
III	Derivados de ciclopropenilesfingosina como se describen en el documento ES2233204 que tienen la fórmula estructural general  I en donde n es un número entero que puede representar cualquier valor W es -CH_2-, -CH(OH)-, -C(=O)-, -C(=NOH)-, -C(=N-H_2)-, -C(=S)-, -CH(SH)- R^1 se selecciona del grupo de:

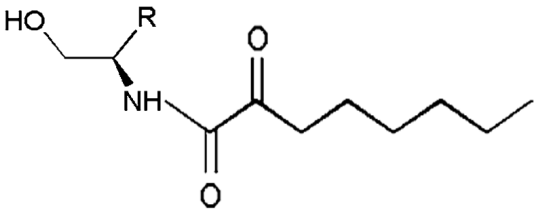
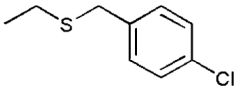
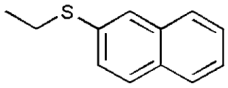
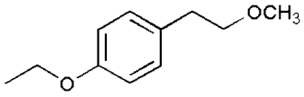
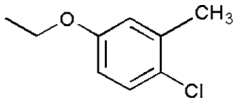
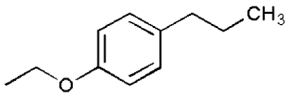
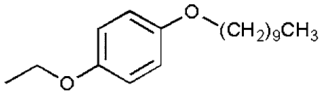
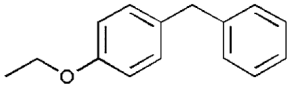
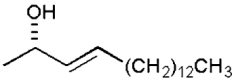
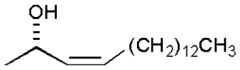
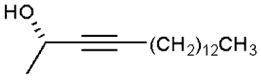
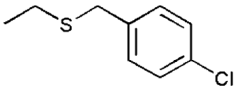
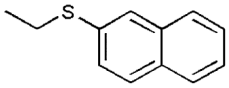
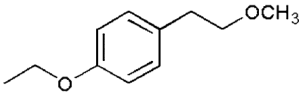
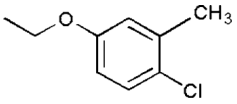
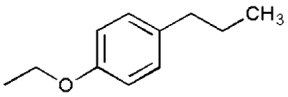
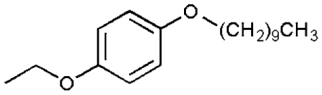
Inhibidores de ceramidasa ácida adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención	
	(a) H (b) un residuo $-CH_3$, $-CH_2OH$, $-CH_2SH$, $-CH_2-NH_2$, $-CH_2N_3$, $-CH_2-NH-OH$, -CH=N-OH, $-CH=N-NH_2$, -C(=O)H, -C(=O)CH3, -C(=O)CF3, $-C(=O)NH_2$, $-SCH_3$, $-OCH_3$, $-CH_2O-P(=O)(OH)_2$ o $-CH_2CH_2-P(=O)$ y (c) un -(CH2)nR4, -C(OH)R4, -C(=O)R4, -C(SH)R4, -C(=S)R4, -C(=N)R4 o -C(NH)R4 en donde n es 0 o 1, R^4 es alquilo, alquenilo, alquinilo lineal o ramificado, un arilo que contiene o no heteroátomos y que contiene sustituyentes en cualquier posición o un heterociclo que puede estar sustituido en una o más posiciones R^2 se selecciona del grupo de: (a) H (b) un alquilo, alquenilo, alquinilo lineal o ramificado, un arilo que contiene o no heteroátomos y que contiene sustituyentes en cualquier posición o un heterociclo que puede estar sustituido en una o más posiciones R^3 se selecciona del grupo de (a) H (b) un alquilo, alquenilo, alquinilo lineal o ramificado, un arilo que contiene o no heteroátomos y que contiene sustituyentes en cualquier posición o un heterociclo que puede estar sustituido en una o más posiciones (c) un $-(C=X)-Y-R_5$ o un $-(C=X)-R_5$ en donde X es O, S, N, Y es O, S, -NH o -CHOH y R_5 es H o un alquilo, alquenilo, alquinilo lineal o ramificado, un arilo que contiene o no heteroátomos y que contiene sustituyentes en cualquier posición o un heterociclo que puede estar sustituido en una o más posiciones. Los compuestos preferidos que tienen la estructura general anterior son los compuestos GT54, GT45, GT76, GT77, GT85, GT99 y GT98 como se definen en Bedia et al. (ChemBioChem., 2007, 8:642-648) correspondientes a  GT54: $R^1=CH_3$; $R^2=CO(CH_2)_6CH_3$ GT45: $R^1=H$; $R^2=COO(CH_2)_7CH_3$ GT76: $R^1=H$; $R^2=CONH(CH_2)_7CH_3$ GT77: $R^1=H$; $R^2=CSNH(CH_2)_7CH_3$ GT85: $R^1=H$; $R^2=COCOCH_2CH_3$ GT99: $R^1=H$; $R^2=COCO(CH_2)_5CH_3$ GT98: $R^1=H$; $R^2=COCOC_6H_5$ y los compuestos GT11, GT1, GT2, GT3, GT4, GT5, GT6 y GT7 descritos por Bedia et al (Org. Biomol.Chem., 2005, 3:3707-3712) que tienen las siguientes estructuras

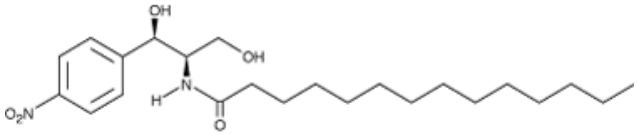
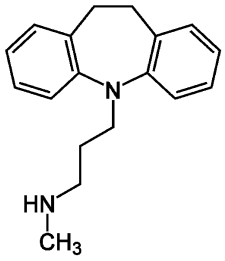
Inhibidores de ceramidasa ácida adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención	
	GT11: R^1=H, R^2=$CO(CH_2)_6CH_3$ **1:** R^1=CH_3, R^2=$CO(CH_2)_6CH_3$ **2:** R^1=H, R^2=$COO(CH_2)_7CH_3$ **3:** R^1=H, R^2=$CONH(CH_2)_7CH_3$ **4:** R^1=H, R^2=$CSNH(CH_2)_7CH_3$ **5:** R^1=H, R^2=$COCOCH_2CH_3$ **6:** R^1=H, R^2=$COCO(CH_2)_5CH_3$ **7:** R^1=H, R^2=$COCOC_6H_5$
IV	Un compuesto como se describe en el documento ES2273560 que tiene la siguiente fórmula general  en donde W es -O-, -S-, -S(=O), -S(=O)$_2$- X se selecciona de (a) OH (b) un -OP(=O)-(OR^3)2 donde R^3 puede ser el mismo o diferente y corresponde a H, CH_3 o CH_2CH_3. (c) un -CH_2P(=O)-(OR^3)$_2$ en donde R^3 puede ser el mismo o diferente y corresponde a H, CH_3 o CH_2CH_3. R^1 es un alquilo, alquenilo, alquinilo lineal o ramificado, un arilo que contiene o no heteroátomos y que contiene sustituyentes en cualquier posición o un heterociclo que puede estar sustituido en una o más posiciones R^2 se selecciona del grupo de (a) H (b) un alquilo, alquenilo, alquinilo lineal o ramificado, un arilo que contiene o no heteroátomos y que contiene sustituyentes en cualquier posición o un heterociclo que puede estar sustituido en una o más posiciones y (c) un -(C=X)-Y-R_5 o un -(C=X)$_n$-R_5 en donde n es 0 o 1, X es O, S, N; Y es O, S, -NH o -CHOH o -CHZ en donde Z es un halógeno y R_5 es H o un alquilo, alquenilo, alquinilo lineal o ramificado, un arilo que contiene o no heteroátomos y que contiene sustituyentes en cualquier posición o un heterociclo que puede estar sustituido en una o más posiciones. Los compuestos preferidos que tienen la estructura general anterior son los compuestos GT102, GT103 y GT104 descritos por Bedia et al. (ChemBioChem., 2007, 8:642-648) correspondientes a:

Inhibidores de ceramidasa ácida adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención	
	
V	Un compuesto como se define en el documento WO2007136635 que tiene la siguiente fórmula estructural general  en donde R_1 es H, OH, SH, NH_2, Cl, Br, I, COOH, $CONH_2$, $NH(C{=}NH)NH_2$, NHR_2, $N(R_2)_2$, $^+N(R_2)_3$, o N-heterociclo que tiene 5 a 6 átomos en el anillo; R_2 es H o alquilo de C_1-C_6; R_3 es fenilo, opcionalmente sustituido con uno o más R_5; heterociclo monocíclico de cinco miembros; heterociclo monocíclico de seis miembros; heterociclo bicíclico de cinco y cinco miembros; heterociclo bicíclico de seis y seis miembros; heterociclo bicíclico de cinco y seis miembros; heterociclo tricíclico de cinco, cinco y cinco miembros; heterociclo tricíclico de seis, seis y seis miembros; heterociclo tricíclico de cinco, cinco y seis miembros; heterociclo tricíclico de cinco, seis y seis miembros; heterociclo tricíclico de seis, cinco y seis miembros; heterociclo tricíclico de cinco, seis y cinco miembros; estando cada uno de los anteriores opcionalmente sustituido con uno o más R_5, en donde R_5 es alquilo de C_1-C_6, F, Cl, Br, I, NHR_2, NO_2, o una amida de fórmula  en donde R_2 es como se ha definido anteriormente R_4 es H, alquilo de C_1-C_6, CH_2OH, SH, NH_2, CH_2Cl, CH_2Br, CH_2I, COOH, $CONH_2$; R6 es H u OH; X es CH_2, CH-alquilo C_1-C_6, CO, o CS;

Inhibidores de ceramidasa ácida adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención	
	Y es CH_2, CO, NH, O, o C(OH); Z es N o ^+NH; A es 0 o 1; B es 0 o 1; n es un número entero de 2 a 22; q es un número entero de 2 a 18; y B^- es un contraanión farmacéuticamente aceptable Los compuestos preferidos que están en la fórmula general anterior incluyen las variantes B13 y (1S,2R)-N-miristoilamino-fenilpropanol-1 (D-e-MAPP) descritas por Bielawska et al (Bioorg. Med. Chem., 2008, 16:1032-1034) y Szulc et al (Bioorg. Med. Chem., 2008, 16:1015-1031) que tienen las estructuras  A: **LCL11**-(1S, 2R): X = CH_2, $R_{1,2}$ = H, R_3 = CH_3 **LCL12**-(1R ,2S): X = CH_2, $R_{1,2}$ = H, R_3 = CH_3 **LCL13**-(1S, 2S): X = CH_2, $R_{1,2}$ = H, R_3 = CH_3 **LCL14**-(1R, 2R): X = CH_2, $R_{1,2}$ = H, R_3 = CH_3 B: **LCL15**-(1R, 2R): X = NH, R_1 = OH,R_2 = NO_2,R_3 = H **LCL16**-(1S, 2R): X = NH, $R_{1,2,3}$ = H **LCL17**-(1R, 2S): X = NH, $R_{1,2,3}$ = H, **LCL81**-(1S, 2S): X = NH, R_1 = O H,R_2 = NO_2,R_3 =H  C: **LCL18**-(1S, 2S): $R_{1,2}$ = OH , $R_{3,4}$ = H, n = 8 **LCL204**-(1R, 2R): $R_{1,2}$ = OH, R_3 = NO_2, R_4 = H, n = 8 **LCL284**-(1S, 2R): R_1 = OH, $R_{2,3,4}$ = H, n = 8 **LCL286**-(1S): $R_{1,3,4}$ = H, R_2 = OH, n = 8 **LCL289**-(1R, 2S): R_1 = OH, $R_{2,3,4}$ = H, n = 8 **LCL343**-(1S, 2S): $R_{1,2}$ = OH, R_3 = NO_2, R_4 = H, n = 8 **LCL346**-(1R, 2R): R_1 = OH, $R_{2,3,4}$ = H, n = 8 **LCL347**-(2R): $R_{1,3,4}$ = H, R_2 = OH, n = 8 **LCL378**-(1S, 2R): R_1 = OH, $R_{2,3,4}$ = H, n = 6 **LCL381**-(1S, 2R): R_1 = OH, $R_{2,3}$ = H_2, R_4 = CH_3, n = 8 **LCL385**-(1R, 2R): $R_{1,2}$ = OH, $R_{3,4}$ = H, n = 8 **LCL397**- (1S, 2R): $R_{1,3,4}$ = H, R_2 = OH, n = 10  D: **LCL82**-(1R, 2R): l = 5, k = 12 **LCL85**-(1R, 2R): R_1 = H, R_2 = NO_2, m = 13 **LCL120**-(1S, 2R): $R_{1,2}$ = H,m = 13 **LCL420**-(1R, 2S): $R_{1,2}$ = H, m = 13
VI	N-oleoiletanolamina (NOE) descrita por Sugita et al (Biochim.Biphys.Acta, 1975, 398:125-131) que tiene la siguiente estructura  y variantes de la misma descritas por Grijalvo et al., (Chem.Phys.Lipids, 2006, 144:69-84) que tienen la siguiente estructura general

Inhibidores de ceramidasa ácida adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención	
	 en donde R se selecciona del grupo de **1**; R = $CH_2SCH_2CH_3$ **2**; R = $CH_2S(CH_2)_4CH_3$ **3**; R = $CH_2S(CH_2)_9CH_3$ **4**; R = $CH_2S(CH_2)_{15}CH_3$ **5**; R =  **6**; R =  **7**; R =  **8**; R =  **9**; R =  **10**; R =  **11**; R =  **12**; R =  **13**; R =  **14**; R =  **15**; R =  **16**; R = $CH_2SCH_2CH_3$ **17**; R = $CH_2S(CH_2)_4CH_3$ **18**; R = $CH_2S(CH_2)_9CH_3$ **19**; R = $CH_2S(CH_2)_{15}CH_3$ **20**; R =  **21**; R =  **22**; R =  **23**; R =  **24**; R =  **25**; R = 
VII	2-oxooctanamidas descritas por Grijalvo et al., (Chem.Phys.Lipids, 2006, 144:69-84) que tienen la estructura general

Inhibidores de ceramidasa ácida adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención	
	 en donde R se selecciona del grupo de **1**; R = $CH_2SCH_2CH_3$ **2**; R = $CH_2S(CH_2)_4CH_3$ **3**; R = $CH_2S(CH_2)_9CH_3$ **4**; R = $CH_2S(CH_2)_{15}CH_3$ **5**; R =  **6**; R =  **7**; R =  **8**; R =  **9**; R =  **10**; R =  **11**; R =  **12**; R =  **13**; R =  **14**; R =  **15**; R = $—(CH_2)_{15}CH_3$ **16**; R = $CH_2SCH_2CH_3$ **17**; R = $CH_2S(CH_2)_4CH_3$ **18**; R = $CH_2S(CH_2)_9CH_3$ **19**; R = $CH_2S(CH_2)_{15}CH_3$ **20**; R =  **21**; R =  **22**; R =  **23**; R =  **24**; R =  **25**; R = 
VIII	(1R,2R)-N-miristoilamino-4'-nitro-fenilpropandiol-1,3 (B13) (D-NMAPPD) descrito por Selzner et al (Cancer Res., 2001, 61:1233-1240) que tiene la estructura

Inhibidores de ceramidasa ácida adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención	
	 y análogos del mismo
IX	Desipramina que tiene la estructura 
X	Anticuerpos inhibidores capaces de unirse e inhibir específicamente la actividad de ceramidasa ácida o la similar a ceramidasa ácida,
XI	Un oligonucleótido antisentido específico para la secuencia de ceramidasa ácida o la similar a ceramidasa ácida
XII	Una ribozima o una enzima de ADN enzima específica para la secuencia de la ceramidasa ácida o la similar a ceramidasa ácida
XIII	Un ARN de interferencia específico para la secuencia de la ceramidasa ácida o la similar a ceramidasa ácida tal como los descritos en Morales et al (Oncogene, 2007, 26:905-916) (SEQ ID NO:5), usados para sensibilizar células de hepatoma a un tratamiento con daunorubicina o en el documento WO2007136635 (SEQ ID NO:6), usado para la sensibilización de líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello al tratamiento de terapia génica con FasL

Anticuerpos inhibidores específicos de ceramidasa ácida o colina quinasa

Los anticuerpos contra un epítopo situado en la ceramidasa ácida o la isoforma alfa de colina quinasa pueden bloquear la función de estas proteínas de forma eficaz y, por lo tanto, se pueden usar como inhibidores en las composiciones de la presente invención. “Anticuerpo inhibidor” como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que son capaces de inhibir al menos parcialmente las actividades biológicas de la actividad ceramidasa ácida o isoforma alfa de colina quinasa.

La determinación de la capacidad inhibidora sobre la actividad biológica de ceramidasa ácida se detecta usando ensayos estándar para medir la actividad de la ceramidasa ácida usando ceramidasa ácida purificada o fracciones enriquecidas en ceramidasa ácida tal como los métodos basados en la capacidad del anticuerpo de inhibir la hidrólisis de N-(12-(4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazolo)dodecil) esfingosina (Cer-C12-NBD) como se describe por ejemplo en el documento ES2233204.

La determinación de la capacidad inhibidora sobre la actividad biológica de colina quinasa se detecta usando ensayos estándar para medir la actividad de colina quinasa tal como los métodos basados en la detección de la fosforilación de colina marcada con [^{14}C] mediante ATP en presencia de colina quinasa recombinante purificada o una fracción enriquecida en colina quinasa seguido por detección de la colina fosforilada usando técnicas analíticas estándar (por ejemplo TLC) como se describe en el documento EP1710236.

Los anticuerpos o fragmentos inhibidores específicos para la isoforma alfa de colina quinasa o ceramidasa ácida pueden estar fácilmente disponibles, o se pueden producir fácilmente usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, usando inmunógenos derivados de, por ejemplo, ceramidasa ácida o isoforma alfa de colina quinasa es posible obtener antisueros anti-proteína/anti-péptido o anticuerpos monoclonales usando protocolos estándar (Véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual ed. por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Se puede inmunizar un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo con una forma inmunogénica del péptido (por ejemplo, ceramidasa ácida o isoforma alfa de colina quinasa o un fragmento antigénico de las mismas, que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos). Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una

proteína o péptido, incluyen conjugación a soportes u otros métodos, son bien conocidos en la técnica. Se puede administrar una parte inmunogénica de un polipéptido en presencia de un adyuvante. Se puede seguir el progreso de la inmunización mediante detección de los títulos del anticuerpo en plasma o suero. Se pueden usar ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. En una forma de realización preferida, los anticuerpos que forman parte de las composiciones de la invención son inmunoespecíficos para determinantes antigénicos de ceramidasa ácida o isoforma alfa de colina quinasa (o una variante al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, o el 98% idéntica a ellas). En cierta forma de realización, los anticuerpos inmunoespecíficos objeto sustancialmente no dan reacción cruzada con ceramidasa ácida o proteína relacionada con colina quinasa que no es de vertebrados (tal como levadura). Mediante "sustancialmente no da reacción cruzada", se quiere decir que el anticuerpo tiene una afinidad de unión por una proteína no homóloga que es al menos un orden de magnitud, más preferiblemente al menos 2 órdenes de magnitud, e incluso más preferiblemente al menos 3 órdenes de magnitud menor que la afinidad de unión del anticuerpo por la ceramidasa ácida o la colina quinasa.

Por tanto, el anticuerpo de la invención es capaz de unirse a un epítopo de isoforma alfa de colina quinasa o de ceramidasa ácida; típicamente, se requieren al menos 6, 8, 10 o 12 aminoácidos contiguos para formar un epítopo, sin embargo, los epítopos que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo, al menos 15, 25 o 50 aminoácidos. El término "anticuerpo de la invención" incluye, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab y Fv de cadena sencilla (scFV) de los mismos, anticuerpos biespecíficos, heteroconjugados, anticuerpos humanos y humanizados. Tales anticuerpos se pueden producir de varias maneras, incluyendo cultivos de hibridoma, expresión recombinante en cultivos de bacterias o células de mamíferos, y expresión recombinante en animales transgénicos. También se pueden producir los anticuerpos seleccionando una secuencia de una biblioteca de secuencias expresada en sistemas de presentación tal como fago filamentoso, bacteriano, levadura o ribosoma. Hay abundantes consejos en la bibliografía para seleccionar una metodología de producción particular, por ejemplo, Chadd y Chamow, Curr. Opin. Biotechnol., 12: 188-194 (2001). La elección de la metodología de producción depende de varios factores incluyendo la estructura deseada del anticuerpo, la importancia de las fracciones glucídicas en los anticuerpos, la facilidad de cultivo y purificación, y el coste. Se pueden generar muchas estructuras diferentes de anticuerpos usando tecnología estándar de expresión, incluyendo anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, tal como fragmentos Fab y Fv, así como anticuerpos quiméricos que comprenden componentes de diferentes especies. Se pueden generar fragmentos de anticuerpo de tamaño pequeño, tal como los fragmentos Fab y Fv, que no tienen funciones efectoras y actividad farmacocinética limitada en un sistema de expresión bacteriana. Los fragmentos Fv de cadena sencilla muestran baja inmunogenicidad y se depuran rápidamente de la sangre.

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos policlonales. Tales anticuerpos policlonales se pueden producir en un mamífero, tal como un mamífero no humano, por ejemplo después de una o más inyecciones de un agente inmunizante, y preferiblemente, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero mediante una serie de inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir isoforma alfa de colina quinasa o ceramidasa ácida o fragmentos de las mismas o una proteína de fusión de las mismas o una célula que expresa bien colina quinasa bien ceramidasa ácida. Tales proteínas, fragmentos o preparaciones se introducen en el mamífero no humano en presencia de un adyuvante apropiado. Otra forma de administración de un inmunógeno es como una proteína transmembrana en la superficie de una célula (métodos descritos en, por ejemplo, Spiller et al. J. Immunol. Methods, 224: 51-60 (1999)). Estas células pueden ser células que expresan el antígeno de forma natural o en las que se puede obtener esta expresión después de transfectar la célula con una construcción de ADN que contiene entre otras secuencias de ADN las que codifican el antígeno, las necesarias para su expresión suficiente en la célula. Este planteamiento es posible no sólo cuando la membrana de la célula es el sitio natural en el que se expresa el antígeno incluso el antígeno una vez sintetizado en la célula se dirige a esta localización mediante un péptido señal que se añade a la secuencia codificante del antígeno. Si el suero contiene anticuerpos policlonales contra epítopos no deseados, los anticuerpos policlonales se pueden purificar mediante cromatografía inmunoafinidad.

De forma alternativa, dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante hibridomas, en donde se inmuniza un ratón, hámster, u otro animal huésped apropiado, con un agente inmunizante para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante, por ejemplo Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). El agente inmunizante incluirá típicamente una isoforma alfa de colina quinasa, ceramidasa ácida o un receptor o un fragmento de las mismas o una proteína de fusión de las mismas y opcionalmente un soporte o una preparación cruda de proteína que se ha enriquecido para una isoforma alfa de colina quinasa o ceramidasa ácida o una célula que expresa cualquiera de dichas proteínas. Tales proteínas, fragmentos o preparaciones se introducen en el mamífero no humano en presencia de un adyuvante apropiado. Otra forma de administración de un inmunógeno es como una proteína transmembrana en la superficie de una célula (métodos descritos en, por ejemplo, Spiller et al. J. Immunol. Methods, 224: 51-60 (1999)). Estas células pueden ser cualquiera que exprese el antígeno de forma natural en su membrana celular o en las que se puede obtener esta expresión después de transfectar la célula con una construcción de ADN que contiene entre otras secuencias de ADN las que codifican el antígeno, las necesarias para su expresión suficiente en la célula. Este planteamiento es posible no sólo cuando la membrana de la célula es el sitio natural en el que se expresa el antígeno incluso el antígeno una vez sintetizado en la célula se dirige a esta

localización mediante un péptido señal que se añade a la secuencia codificante del antígeno. De forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Generalmente, se usan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos, o se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano. Los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para producir una célula de hibridoma. En general, las líneas celulares inmortalizadas son células de mieloma de origen de rata, ratón, bovino o humano. Las células de hibridoma se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de células no fusionadas inmortalizadas. Los clones se aíslan usando el método de la dilución limitante y el medio de cultivo (sobrenadante) en el que se cultivan las células de hibridoma se puede ensayar para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la isoforma alfa de ChoK mediante técnicas convencionales, tal como mediante citometría de flujo o mediante inmunoprecipitación o mediante otro ensayo de unión *in vitro*, tal como RIA o ELISA. Los clones también se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos mediante un clon de células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) o mediante técnicas inmunofluorescentes tal como microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico, o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tal como, por ejemplo proteína A-Sepharosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer mediante métodos de ADN recombinante, tal como los descritos en el documento US 4.816.567. Se puede aislar ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención a partir de células de hibridoma específicas de receptor de la isoforma alfa de colina quinasa o ceramidasa ácida y secuenciar usando procedimientos convencionales, por ejemplo usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos. Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede insertar en un vector de expresión, que se transfecta después en células huésped tal como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera murinas por las secuencias homólogas humanas, o uniendo covalentemente a la secuencias codificantes de la inmunoglobulina todo o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina. El polipéptido no inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

Otro método de generar anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpos, que reaccionan contra una molécula diana es cribar bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulinas, o partes de las mismas, expresadas en bacterias, levaduras, fagos filamentosos, ribosomas o subunidades ribosómicas y otros sistemas de presentación. Estos métodos normalmente usan bibliotecas grandes de secuencias de anticuerpos o secuencias de fragmentos de anticuerpos obtenidas de diversas fuentes tal como donantes sanos o pacientes o animales sanos o no. Estas secuencias se clonan y se expresan en un sistema apropiado y se seleccionan por su afinidad de unión para el antígeno. Se han descrito diversos planteamientos para seleccionar anticuerpos o fragmentos con las propiedades deseadas por ejemplo, neutralizantes, agonistas, etc. (Fernández, Curr. Op. Biotech., 15: 364-373 (2004); Schmidt, Eur. J. Biochem., 268: 1730-1738 (2001)). En una forma de realización, también se pueden producir los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos característicos de hibridomas de la invención por medios recombinantes extrayendo ARN mensajero, construyendo una genoteca de ADNc, y seleccionando clones que codifican segmentos de la molécula de anticuerpo.

Los anticuerpos también pueden ser manipulados para cambiar sus usos clínicos. Numerosos planteanientos hacen uso de las técnicas de biología molecular y genéticas tal como el buen conocimiento de la genética y la estructura de las inmunoglobulinas para construir diferentes modificaciones de la molécula de inmunoglobulina con el propósito de mejorar sus propiedades para uso clínico u otros. Algunas de ellas tienden a reducir la inmunogenicidad de la molécula en las especies en que se deben usar y la molécula resultante tiene una secuencia más homóloga con esta especie. Se han usado varios métodos para obtener Acm de origen humano evitando procedimientos éticamente inadmisibles en seres humanos sanos. En otros planteamientos, se reducen el peso molecular y tamaño por ejemplo para mejorar la distribución de la molécula en tumores sólidos. Otras posibilidades son conjugación en una molécula de dominios de unión para más de una molécula diana (anticuerpo biespecífico o también triespecífico, etc.) o la conjugación de un anticuerpo o un fragmento con otra molécula con la función deseada por ejemplo un agente tóxico, una hormona, un factor de crecimiento, un agente inmunomodulador (inmunosupresor o inmunoestimulador), un inhibidor del crecimiento celular, etc. En general todas las moléculas resultantes retienen casi un dominio variable de un anticuerpo que da las características de gran especificidad y afinidad de la unión antígeno-anticuerpo. Algunas de estas construcciones son:

- Anticuerpos quiméricos:
  Estos se refieren a anticuerpos construidos con regiones variables de un anticuerpo de alguna especie (normalmente un mamífero en que se ha generado el Acm) y regiones constantes de otra especie (en la que se va a usar el anticuerpo quimérico). El objetivo de tal construcción es obtener un anticuerpo con el Acm original pero menos inmunogénico y mejor tolerado en el sujeto a ser tratado, con semivida en suero mejorada y que puede ser reconocido por mecanismos inmunológicos efectores es decir, complemento, receptor Fc de célula citotóxicas u otros receptores específicos para inmunoglobulinas que muestran especificidad de especie.
- Anticuerpos humanizados:
  Mediante "anticuerpo humanizado" se quiere decir un anticuerpo derivado de un anticuerpo no humano, típicamente un anticuerpo murino, que retiene las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo parental, pero que es menos inmunogénico en humanos. Esto se puede alcanzar mediante varios métodos, incluyendo (a) injertar los dominios variables no humanos enteros en las regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos; (b) injertar sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) no humanas en las regiones marco y constantes humanas con o sin retención de los residuos marco críticos; y (c) trasplantar los dominios variables no humanos enteros, pero "cubriéndolos" con una sección similar a humana cambiando los residuos de la superficie. Se han descrito en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia como residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de la región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente residuos de la región marco (FR) se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar al hacer los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la inmunogenicidad reteniendo la especificidad y afinidad para el antígeno. Según el método denominado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente la biblioteca entera de secuencias de dominios variables humanos conocidos. La secuencia humana más próxima a la del roedor se acepta entonces como la región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Suns et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol, 196:901 (1987)). Otro método usa una región marco particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).
  Es además importante que los anticuerpos se humanicen reteniendo la alta afinidad por el antígeno y las otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, según un método preferido, se preparan los anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados usando modelos tridimensionales de secuencias parentales y humanizadas.
- Anticuerpos primatizados:
  Un paso posterior en este planteamiento de hacer un anticuerpo más similar a los humanos son los denominados anticuerpos primatizados, es decir, un anticuerpo recombinante que se ha manipulado para contener los dominios variables pesado y ligero del anticuerpo de un mono (u otro primate), en particular, un anticuerpo de mono macaco cangrejero, y que contiene secuencias del dominio constante humano, preferiblemente el dominio constante de la inmunoglobulina gamma 1 o gamma 4 humana (o la variante PE). La preparación de tales anticuerpos se describe en Newman et al., Biotechnology, 10: 1458-1460 (1992); los documentos US 5.658.570 y US 6.113.898. Se ha descrito que estos anticuerpos muestran un alto grado de homología con anticuerpos humanos, es decir, el 85-98%, muestran funciones efectoras humanas, tienen inmunogenicidad reducida, y pueden mostrar gran afinidad por antígenos humanos. Otros medios muy eficaces para generar anticuerpos recombinantes se divulga en Newman et al., Biotechnology, 10: 1455-1460 (1992).
- Anticuerpos humanos:
  Mediante "anticuerpo humano" se quiere decir un anticuerpo que contiene las cadenas ligera y pesada así como regiones constantes completamente humanas, producido por uno de los métodos estándar conocidos.
  Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la deleción homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (PH) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal produce una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de una serie de genes de inmunoglobulinas de línea germinal humanos en tales ratones mutantes en la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la inmunización. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Mad. Acad. Sci. USA, 90:255 1 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993).
  De forma alternativa, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro*, a partir de repertorios de

genes de dominios variables (V) de inmunoglobulinas de donantes. Según esta técnica, se clonan los genes de los dominios V de anticuerpos en la misma fase de lectura en un gen principal o menor de una proteína de la envuelta de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos funcionales de anticuerpos en la superficie de la partícula del fago. Puesto que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen selección del gen que codifica el anticuerpo que muestran esas propiedades. De esta manera, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos se puede realizar en varios formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993).

Los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante células B activadas *in vitro* o ratones SCID con su sistema inmune reconstituido con células humanas.

Una vez obtenido un anticuerpo humano, se pueden aislar sus secuencias de ADN codificantes, clonar e introducir en un sistema de expresión adecuado es decir una línea celular preferiblemente de un mamífero que posteriormente expresa y libera en el medio de cultivo a partir del cual se puede aislar el anticuerpo.

- Fragmentos de anticuerpo:

Un fragmento de anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo tal como, por ejemplo Fab, F(ab')2, Fab', y scFv. Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos pero más recientemente estos fragmentos se pueden producir directamente mediante células huésped recombinantes. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) que además puede ser monoespecífico o biespecífico.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')2 que tiene dos sitios de unión al antígeno y todavía es capaz de entrecruzar al antígeno.

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera, en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio de la cadena pesada CHI incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de la bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite a scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv ver Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, N.Y., pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) unido a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Usando un enlazador que es demasiado pequeño para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

Los fragmentos funcionales de anticuerpos que se unen a la isoforma alfa de ChoK incluidos en la presente invención retienen al menos una función de unión y/o función de modulación del anticuerpo de longitud completa del que derivan. Los fragmentos funcionales preferidos retienen una función de unión a antígeno del anticuerpo de longitud completa correspondiente (por ejemplo, la capacidad de unirse a una isoforma alfa de ChoK de mamífero). Los fragmentos funcionales particularmente preferidos retienen la capacidad de inhibir una o más de las funciones características de una isoforma alfa de ChoK de mamífero, tal como una actividad de unión, una actividad de señalización, y/o estimulación de una respuesta celular. Por ejemplo, en una forma de realización, un fragmento funcional puede inhibir la interacción de la isoforma alfa de ChoK con uno o más de sus ligandos y/o puede inhibir una o más de las funciones mediadas por el receptor.

- Anticuerpos biespecíficos:

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes del marcador de superficie de la célula B. Otros de tales anticuerpos se pueden unir a un primer marcador de

célula B y unirse además a un segundo marcador de superficie de célula B. De forma alternativa, se puede combinar un brazo de unión anti-marcador de célula B con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula de receptor de célula T (por ejemplo CD2 o CD3), o receptores Fc para IgG (FCyR), tal como FcyRI (CD64), FcyRII (CD32) y FcyRIII (CD16) de modo que se enfocan los mecanismos de defensa celular en la célula B. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos a la célula B. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a un marcador de célula B y un brazo que se une la agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón α, alcaloides de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o un hapteno con un isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de cadena completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab)2).

Los métodos para los anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad al azar de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se hace mediante pasos de cromatografía de afinidad, es bastante laboriosa, y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se divulgan en el documento WO 93/08829, y en Traunecker et al., EMBO J, 10:3655-3659 (1991).

Según un planteamiento diferente, se fusionan los dominios variables de los anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) a secuencias del dominio constante de las inmunoglobulinas. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente al menos en una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se quiere, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en formas de realización cuando se usan razones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos en la construcción proporciona los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en razones iguales produce rendimientos altos o cuando las razones no son particularmente significativas.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o “heteroconjugados”. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas. Los anticuerpos heteroconjugados se pueden hacer usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la técnica, y se divulgan en el documento US 4.676.980, junto con un número de técnicas de entrecruzamiento.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando unión química.

ARN de interferencia (ARNi) específico para ceramidasa ácida o colina quinasa

En otra forma de realización, los inhibidores de ceramidasa ácida o isoforma alfa de colina quinasa que forman parte de las composiciones de la invención son ARNi que son capaces de disminuir la expresión de la ceramidasa ácida y/o isoforma alfa de colina quinasa o cualquier gen componente necesario para la función de la ceramidasa ácida y/o isoforma alfa de colina quinasa. ARNi es un proceso de represión génica postraduccional específico de secuencia que se puede producir en células eucariotas. En general, este proceso implica la degradación de un ARNm de una secuencia particular inducida por un ARN bicatenario (ARNbc) que es homólogo a esa secuencia. Por ejemplo, la expresión de un ARNbc largo correspondiente a la secuencia de un ARNm particular monocatenario (ARNm mc) hará lábil ese mensajero, “interfiriendo” por lo tanto con la expresión del gen correspondiente. De acuerdo con esto, se puede reprimir cualquier gen seleccionado introduciendo un ARNbc que corresponde a todo o a una parte sustancial del ARNm para ese gen. Parece que cuando se expresa un ARNbc largo, inicialmente es procesado por una ribonucleasa III a oligonucleótidos ARNbc más cortos de tan poco como 21 o 22 pares de bases de longitud. De acuerdo con esto, se puede realizar ARNi mediante introducción o expresión de ARNbc homólogos relativamente cortos. En efecto, el uso de ARNbc homólogos relativamente cortos puede tener ciertas ventajas como se discute más adelante.

Los oligonucleótidos bicatenarios usados para efectuar ARNi son preferiblemente de menos de 30 pares de bases de longitud y, más preferiblemente, comprenden alrededor de 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18 o 17 pares de bases de ácido ribonucleico. Opcionalmente los oligonucleótidos de ARNbc de la invención pueden incluir extremos 3’ cohesivos. Los extremos 3’ cohesivos de 2 nucleótidos ejemplares pueden estar compuestos de residuos de ribonucleótidos de cualquier tipo y pueden estar incluso compuestos de residuos de 2’-desoxitimidina, lo que baja el coste de la síntesis de ARN y puede aumentar la resistencia a nucleasa de los ARNip en el medio de cultivo celular y en las células transfectadas (véase Elbashir et al., Nature 411: 494-8, 2001). También se pueden utilizar ARNbc

mayores de 50, 75, 100 o incluso 500 pares de bases o más en ciertas formas de realización de la invención. Las concentraciones ejemplares de ARNbc para efectuar ARNi son de alrededor de 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1,0 nM, 1,5 nM, 25 nM o 100 nM, aunque se pueden usar otras concentraciones dependiendo de la naturaleza de las células tratadas, el gen diana y otros factores fácilmente discernibles para el experto en la materia. Los ARNbc ejemplares se pueden sintetizar de forma química o producir in vitro o in vivo usando vectores de expresión adecuados. Los ARN sintéticos ejemplares incluyen ARN de 21 nucleótidos sintetizados de forma química usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo fosforamiditas y timidina fosforamidita de Expedite RNA (Proligo, Alemania)). Los oligonucleótidos sintéticos están preferiblemente desprotegidos y purificados por gel usando métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Elbashir et al., Genes Dev. 15: 188-200, 2001). Los ARN más largos se pueden transcribir de promotores, tal como el promotor de la ARN polimerasa de T7, conocidos en la técnica. Un único ARN diana, colocado en ambas orientaciones después de un promotor in vitro, transcribirá ambas hebras de la diana para crear un oligonucleótido ARNbc de la secuencia diana deseada. Cualquiera de las especies de ARN anteriores se diseñará para incluir una parte de secuencia de ácido nucleico representada en un ácido nucleico diana, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico que hibrida, en condiciones rigurosas y/o fisiológicas, con el polinucleótido que codifica la ceramidasa ácida humana o la isoforma alfa de ChoK humana.

La secuencia específica usada en el diseño de los oligonucleótidos puede ser cualquier secuencia contigua de nucleótidos contenidos dentro del mensajero génico expresado de la diana. Se pueden usar programas y algoritmos, conocidos en la técnica, para seleccionar las secuencias diana apropiadas. Además, se pueden seleccionar secuencias óptimas utilizando programas diseñados para predecir la estructura secundaria de una secuencia de ácido nucleico monocatenario especificada y permitir la selección de aquellas secuencias que probablemente se darán en regiones monocatenarias expuestas de un ARNm plegado. Se pueden encontrar métodos y composiciones para diseñar oligonucleótidos apropiados, por ejemplo, en la patente de EE UU No. 6.251.588, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. Generalmente se piensa en el ARN mensajero (ARNm) como una molécula lineal que contiene la información para dirigir la síntesis de proteínas en la secuencia de ribonucleótidos, sin embargo estudios han revelado que existen un número de estructuras secundarias y terciarias en la mayoría de los ARNm. Los elementos de estructura secundaria en el ARN están formados en gran parte por interacciones de tipo Watson-Crick entre diferentes regiones de la misma molécula de ARN. Los elementos importantes de estructura secundaria incluyen regiones intramoleculares bicatenarias, bucles en horquilla, protuberancias en ARN bicatenario y bucles internos. Los elementos de estructura terciaria se forman cuando los elementos de estructura secundaria se ponen en contacto entre sí o con regiones monocatenarias para producir una estructura tridimensional más compleja. Algunos investigadores han medido las energías de unión de un gran número de estructuras dúplex de ARN y han derivado un serie de reglas que se pueden usar para predecir la estructura secundaria del ARN (ver, por ejemplo, Jaeger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7706, 1989; y Turner et al., Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17: 167, 1988). Las reglas son útiles para la identificación de elementos estructurales de ARN y, en particular, para identificar regiones de ARN monocatenario que pueden representar segmentos preferidos del ARNm como dianas para el silenciamiento por tecnologías ARNi, ribozimas o antisentido. De acuerdo con esto, se pueden identificar segmentos preferidos del ARNm diana para diseñar los oligonucleótidos de ARNbc que median ARNi así como diseñar las composiciones apropiadas de ribozimas y ribozimas de cabeza de martillo de la invención.

Se han usado varios tipos diferentes de moléculas de forma eficaz en la tecnología ARNi. Los ARN de interferencia pequeños (ARNip), algunas veces conocidos como ARN de interferencia cortos o ARN silenciadores, son una clase de moléculas de ARN bicatenario de 20-25 nucleótidos de longitud que desempeñan varios papeles en biología. Más señaladamente, el ARNip está implicado en la vía de interferencia de ARN (ARNi) donde el ARNip interfiere con la expresión de un gen específico. Además de su papel en vía de ARNi, los ARNip también actúan en vías relacionadas con ARNi, por ejemplo, como un mecanismo antivírico o para dar forma a la estructura de la cromatina de un genoma. Se ha mostrado que los ARNip sintéticos son capaces de inducir ARNi en células de mamífero. Este descubrimiento llevó a un aumento en el uso de ARNip/ARNi para investigación biomédica y desarrollo de fármacos.

Los microARN (miARN) son una clase relacionada de ARN pequeños reguladores de genes, típicamente de 21-23 nucleótidos de longitud. Típicamente difieren de los ARNip porque se procesan de precursores de ARN monocatenario y se muestran sólo parcialmente complementarios a los ARNm diana. Los estudios iniciales indicaban que los miARN regulan la expresión génica de forma postranscripcional a nivel de inhibición de la traducción en los cuerpos P del citoplasma. Sin embargo, los miARN también pueden dirigir el corte de ARNm similar a los ARNip. Este es el caso con frecuencia en plantas donde los sitios diana típicamente son muy complementarios al miARN. Mientras que los sitios diana en los ARNm de plantas se pueden encontrar en la 5'UTR, marcos abiertos de lectura y 3'UTR, en animales, la diana principal es la 3'UTR. Los miARN se transcriben primero como parte de un microARN primario (pri-miARN). Este es procesado luego por Drosha con ayuda de Pasha/DGCR8 (=complejo microprocesador) a pre-miARN. El pre-miARN de aproximadamente 75 nucleótidos es exportado entonces al citoplasma por la exportina-5, donde es después cortado en moléculas similares a ARNip de 21-23 nucleótidos por Dicer. En algunos casos, se pueden encontrar múltiples miARN en el pri-miARN.

El ARN horquillado corto (ARNhc) es aún otro tipo de ARN que se puede usar para efectuar la ARNi. Es una secuencia de ARN que hace un giro en horquilla apretado que se puede usar para silenciar la expresión génica. El ARNhc es transcrito por la ARN polimerasa III.

Actualmente, los ARN de interferencia pequeños (ARNip) y los ARNs horquillados cortos (ARNhc) se usan extensamente para silenciar varios genes para silenciar funciones llevadas a cabo por los genes. Se hace más fácil utilizar ARNi para silenciar genes específicos, debido al desarrollo de bibliotecas de construcciones de ARNhc y ARNip silenciadores de genes ya hechas usando varias fuentes. Por ejemplo, RNAi Codex, que consiste en una base de datos de información relacionada con ARNhc y un sitio web asociado, se ha desarrollado como un portal para recursos de ARNhc públicamente disponibles y que es accesible en http://codex.cshl.org. RNAi Codex actualmente tiene datos de la biblioteca de ARNhc Hannon-Elledge y permite el uso de nombres de genes cómodos para biólogos para acceder a la información sobre construcciones ARNhc que pueden silenciar un gen de interés. Está diseñado para tener anotaciones hechas por los usuarios y publicaciones para cada construcción, cómo y cuándo tales datos estén disponibles. Olson et al. (Nucleic Acids Res. 34 (número de la base de datos): D153-D157, 2006, incorporado por referencia) han proporcionado descripciones detalladas sobre características de RNAi Codex, y han explicado el uso de esta herramienta. Toda esta información se puede usar ayudar a diseñar varios ARNip o ARNhc dirigidos a ceramidasa ácida, isoforma alfa de colina quinasa u otras proteínas de interés.

Ribozimas específicas de ceramidasa ácida o colina quinasa

También se pueden usar moléculas de ribozimas diseñadas para cortar de forma catalítica transcritos de un ARNm diana para prevenir la traducción de los ARNm de la ceramidasa ácida y/o la isoforma alfa de colina quinasa. De acuerdo con esto, en otra forma de realización, las composiciones de la invención comprenden ribozimas específicamente dirigidas a los ARNm de la ceramidasa ácida y/o isoforma alfa de colina quinasa. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN. (Para una revisión, véase, Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994). El mecanismo de acción de la ribozima implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a un ARN diana complementario, seguido por un suceso de corte endonucleolítico. La composición de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias a un ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (ver, por ejemplo, la patente de EE UU No. 5.093.246, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad).

Mientras que se pueden usar ribozimas que cortan ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de sitio para destruir ARNm diana, se prefiere el uso de ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo cortan los ARNm en localizaciones dictadas por las regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm diana. Preferiblemente, el ARNm diana tiene la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo es bien conocida en la técnica y se describe más completamente en Haseloff y Gerlach, Nature 334: 585-591, 1988; y véase la solicitud de PCT No. WO89/05852, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. Las secuencias de la ribozima de cabeza de martillo se pueden embeber en un ARN estable tal como un ARN de transferencia (ARNt) para aumentar la eficacia de corte in vivo (Perriman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6175-79, 1995; de Feyter, y Gaudron, Methods in Molecular Biology, Vol. 74, Capítulo 43, "Expressing Ribozymes in Plants", Editado por Turner, P. C, Humana Press Inc., Totowa, N.J.). En particular, la expresión de ribozimas de fusión con ARNt mediada por ARN polimerasa III es bien conocida en la técnica (véase, Kawasaki et al., Nature 393: 284-9, 1998; Kuwabara et al., Nature Biotechnol. 16: 961-5, 1998; y Kuwabara et al., Mol. Cell. 2: 617-27, 1998; Koseki et al., J Virol 73: 1868-77, 1999; Kuwabara et al., Proc Natl Acad Sci USA 96: 1886-91, 1999; Tanabe et al., Nature 406: 473-4, 2000). Típicamente hay un número de sitios de corte potenciales de ribozimas de cabeza de martillo en una secuencia de ADNc diana. Preferiblemente la ribozima se manipula de modo que el sitio de reconocimiento de corte esté situado cerca del extremo 5' del ARNm diana - para aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos no funcionales de ARNm. Además, el uso de cualquier sitio de reconocimiento de corte situado en la secuencia diana que codifica diferentes partes de los dominios de aminoácidos C-terminales de, por ejemplo, formas cortas y largas de la diana permitiría dirigirse selectivamente a una u otra forma de la diana, y de esta manera, tener un efecto selectivo sobre una forma del producto génico diana.

Las ribozimas dirigidas a genes necesariamente contienen una región de hibridación complementaria a dos regiones, cada una de al menos 5 y preferiblemente cada una de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de longitud de un ARNm diana, tal como un ARNm de una secuencia representada en los genes de ceramidasa ácida o de colina quinasa. Además, las ribozimas poseen actividad endonucleasa muy específica, que corta autocatalíticamente el ARNm diana codificante. La presente invención se extiende a ribozimas que hibridan con un ARNm codificante que codifica un gen diana tal como un gen candidato a diana de un fármaco, hibridando por lo tanto con el ARNm codificante y cortándolo, de modo que ya no es capaz de ser traducido para sintetizar un producto polipeptídico funcional.

Las ribozimas usadas en las composiciones de la presente invención también incluyen ARN endorribonucleasa (de aquí en adelante "ribozimas de tipo Cech") tal como la que se da de forma natural en Tetrahymena thermophila (conocida como la IVS, o ARN L-19 IVS) y que ha sido descrita extensamente por Thomas Cech y colaboradores (Zaug et al., Science 224:574-578, 1984; Zaug et al., Science 231: 470-475, 1986; Zaug et al., Nature 324: 429-433, 1986; solicitud internacional de patente publicada No. WO88/04300 de University Patents Inc.; Been, et al., Cell 47: 207-216, 1986). Las ribozimas de tipo Cech tienen un sitio activo de ocho pares de bases que hibrida con una

secuencia de ARN diana donde después tiene lugar el corte del ARN diana. La invención abarca esas ribozimas de tipo Cech que tienen como diana secuencias de sitio activo de ocho pares de bases que están presenten en un gen o secuencia de ácido nucleico diana.

Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo para mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y se deben administrar a células que expresan el gen diana in vivo. Un método preferido de administración implica usar una construcción de ADN que "codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte de pol III o pol II, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, contrariamente a otras moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular menor para su eficacia.

En ciertas formas de realización, se puede diseñar una ribozima identificando primero una parte de una secuencia suficiente para producir una disminución eficaz mediante ARNi. La misma parte de la secuencia se puede incorporar después en una ribozima. En este aspecto de la invención, las partes de la ribozima o ARNi que se dirigen a los genes son sustancialmente la misma secuencia de al menos 5 y preferiblemente 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más nucleótidos contiguos de un ácido nucleico diana, tal como el ácido nucleico de cualquiera de las secuencias de ceramidasa ácida o colina quinasa humanas. En una cadena larga de ARN diana, un número significativo de sitios diana no es accesible a la ribozima porque están escondidos dentro de las estructuras secundaria o terciaria (Birikh et al., Eur J Biochem 245: 1-16, 1997). Para salvar el problema de la accesibilidad del ARN diana, típicamente se usan predicciones de estructura secundaria generadas por ordenador para identificar las dianas que más probablemente serán monocatenarias o tendrán una configuración "abierta" (véase Jaeger et al., Methods Enzymol 183: 281-306, 1989). Otros planteamientos utilizan un planteamiento sistemático para predecir la estructura secundaria que implica evaluar un gran número de moléculas de oligonucleótidos candidatos a hibridar (véase Milner et al., Nat Biotechnol 15: 537-41, 1997; y Patzel y Sczakiel, Nat Biotechnol 16: 64-8, 1998). Adicionalmente, la patente de EE UU No. 6.251.588, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia, describe métodos para evaluar secuencias de oligonucleótidos sonda para predecir el potencial para hibridar a una secuencia diana de ácido nucleico. El método de la invención proporciona el uso de tales métodos para seleccionar segmentos preferidos de una secuencia de ARNm diana que se predice que sean monocatenarios y, además, para la utilización oportunística de la misma o una secuencia de ARNm diana sustancialmente idéntica, que comprende preferiblemente alrededor de 10-20 nucleótidos consecutivos del ARNm diana, en el diseño tanto de oligonucleótidos de ARNi como de ribozimas de la invención.

Ácidos nucleicos antisentido específicos de ceramidasa ácida y colina quinasa

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de ácidos nucleicos "antisentido" aislados para inhibir la expresión, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción de ácidos nucleicos de ceramidasa ácida y/o isorforma alfa de colina quinasa. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir a la diana potencial del fármaco mediante complementariedad de bases convencional, o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren a la gama de métodos generalmente empleados en la técnica, e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

Una construcción antisentido de la presente invención se puede administrar, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica un polipéptido ChoK o un polipéptido ceramidasa ácida. De forma alternativa, la construcción antisentido es una sonda de oligonucleótidos, que se genera ex vivo y que, cuando se introduce en la célula produce inhibición de la expresión hibridando con el ARNm y/o secuencias genómicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables in vivo. Moléculas de ácidos nucleicos ejemplares para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidato, fosfotioato y metilfosfonato (véase también las patentes de EE UU Nos. 5.176.996; 5.264.564; y 5.256.775). Además, se han revisado los planteamientos generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, por Van der Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988; y Stein et al., Cancer Res 48: 2659-2668, 1988.

Respecto al ADN antisentido, son preferidas las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivadas del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Los planteamientos antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (de ADN o ARN) que son complementarios al ARNm que codifica el polipéptido diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm y prevendrán la traducción. La complementariedad absoluta, aunque preferida, no se requiere. En el caso de ácidos nucleicos antisentido bicatenarios, se puede ensayar así una cadena sencilla del ADN bicatenario, o se puede ensayar la formación de tricatenarios. La capacidad de hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico que hibrida, más errores de emparejamiento con un ARN puede contener y todavía formar un dúplex estable (o tríplex, como puede ser el caso). El experto en la

materia puede determinar un grado tolerable de errores de emparejamiento mediante el uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deberían funcionar de la forma más eficaz para inhibir la traducción. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de los ARNm también son eficaces para inhibir la traducción de los ARNm (Wagner, Nature 372: 333, 1994). Por lo tanto, se podrían usar oligonucleótidos complementarios a las regiones 5' o 3' no traducidas, no codificantes de un gen en un planteamiento antisentido para inhibir la traducción de ese ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deberían incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos antisentido complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces pero también se podrían usar según la invención. Estén diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud, y tener preferiblemente menos de aproximadamente 100 y más preferiblemente menos de aproximadamente 50, 25, 17 o 10 nucleótidos de longitud.

Se prefiere que se realicen primero estudios in vitro para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distingan entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que esos estudios comparen los niveles del ARN o proteína diana con el de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere que el oligonucleótido control sea aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido de prueba y que la secuencia del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación específica a la secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. El oligonucleótido se puede modificar en la fracción de la base, la fracción del azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos tal como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987; Publicación de PCT No. WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, publicación de PCT No. WO89/10134), agentes de corte desencadenado por hibridación (ver, por ejemplo, Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988) agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de entrecruzamiento desencadenado por hibridación, un agente transportador, agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos una fracción de base modificada que se selecciona del grupo que incluye pero no está limitado a 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxitietil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina.

El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos una fracción de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no está limitado a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto semejante a péptido neutro. Tales moléculas se denominan oligómeros de ácido peptido nucleico (APN) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996, y en Eglom et al., Nature 365: 566, 1993. Una ventaja de los oligómeros APN es su capacidad para unirse al ADN complementario esencialmente de forma independiente de la fuerza iónica del medio debido al esqueleto neutro del ADN. En aún otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un esqueleto de fosfato modificado seleccionado del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo, y un formacetal o análogo de los mismos.

En todavía una forma de realización, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido alfa-anomérico. Un oligonucleótido alfa-anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los que, al contrario de la orientación antiparalela habitual, las hebras corren paralelas entre sí (Gautier et al., Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641, 1987). El oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleotido (Inoue et al., Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148, 1987) o un análogo quimérico ARN-ADN (Inoue et al., FEBS Lett. 215: 327-330, 1987).

Mientras que se pueden usar oligonucleótidos antisentido complementarios a la región codificante de la secuencia diana de ARNm, también se pueden usar los complementarios a la región transcrita no traducida.

En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNm endógenos. Por lo tanto un planteamiento preferido usa una construcción de ADN recombinante en la que se coloca el oligonucleótido antisentido bajo el control de un promotor fuerte de pol III o pol II. El uso de tal construcción para transfectar células diana producirá la transcripción de cantidades suficientes de ARN monocatenarios que formarán pares de bases complementarias con los transcritos endógenos potenciales dianas de fármacos y por tanto prevendrán la traducción. Por ejemplo, se puede introducir un vector de modo que sea captado por una célula y dirija la transcripción de un ARN antisentido. Tal vector puede permanecer episomal o integrarse en el cromosoma, mientras se pueda transcribir para producir el ARN antisentido deseado. Tales vectores se pueden construir mediante métodos de tecnología de ADN recombinante estándar en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, víricos u otros conocidos en la técnica, usados para la replicación y expresión en células de mamífero. La expresión de las secuencias que codifican el ARN antisentido puede ser mediante cualquier promotor conocido en la técnica que actúe en células de mamífero, preferiblemente células humanas. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen pero no están limitados a: promotor de la región temprana del SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290: 304-310, 1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma Rous (Yamamoto et al., Cell 22: 787-797, 1980), el promotor de la timidina quinasa de herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445, 1981), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneina (Brinster et al, Nature 296: 39-42, 1982), etc. Se puede usar cualquier tipo de plásmido, cósmido, YAC o vector vírico para preparar la construcción de ADN recombinante, que se puede introducir directamente en el sitio del tejido.

De forma alternativa, se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en las células diana en el cuerpo (véase en general, Helene, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84, 1991; Helene et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 660: 27-36, 1992; y Maher, Bioassays 14(12): 807-15, 1992).

Las moléculas de ácidos nucleicos que se van a usar en la formación de hélices triples para la inhibición de la transcripción son preferiblemente monocatenarias y compuestas de desoxirribonucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos debe fomentar la formación de hélices triples a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requiere que estén presentes tramos bastante grandes de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Las secuencias de nucleótidos pueden estar basadas en pirimidinas, que producirá tripletes TAT y CGC a través de las tres hebras asociadas de la hélice triple resultante. Las moléculas ricas en pirimidina proporcionan complementariedad de bases a una región rica en purinas de una cadena sencilla del dúplex en una orientación paralela a dicha hebra. Además, se pueden elegir moléculas de ácido nucleico que sean ricas en purinas, por ejemplo, que contengan un tramo de residuos de G. Estas moléculas formarán una hélice triple con un ADN bicatenario que es rico en pares GC, en la que la mayoría de los residuos de purina están localizados en una cadena sencilla del dúplex diana, produciendo tripletes CGC a través de las tres hebras en el tríplex.

De forma alternativa, se pueden aumentar las secuencias diana potenciales que se pueden seleccionar para la formación de hélices triples, creando una molécula de ácido nucleico llamada "horquillada". Las moléculas horquilladas se sintetizan en un forma alternante 5'-3',3'-5', de modo que forman pares de bases primero con una hebra de un dúplex y luego con la otra, eliminando la necesidad de que esté presente un tramo bastante grande de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex.

En ciertas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido son morfolinos antisentido. Los morfolinos son moléculas sintéticas que son el producto de un rediseño de una estructura natural de ácido nucleico. Normalmente de 25 bases de longitud, se unen a secuencias complementarias de ARN mediante emparejamiento de bases estándar de ácidos nucleicos. Estructuralmente, la diferencia entre los morfolinos y el ADN es que aunque que los morfolinos tienen bases de ácidos nucleico estándar, esas bases se unen a anillos de morfolina en lugar de anillos de desoxirribosa, y se unen mediante grupos de fosforodiamidato en lugar de fosfatos. El cambio de fosfatos aniónicos por los grupos fosforodiamidato neutros elimina la ionización en el intervalo de pH fisiológico normal, de modo que los morfolinos en células u organismos son moléculas no cargadas. Los morfolinos no son oligos quiméricos; el esqueleto entero de un morfolino está hecho de estas subunidades modificadas. Los morfolinos se usan de forma más común como oligos monocatenarios, aunque se pueden usar heterodúplex de una hebra de morfolino y una hebra de ADN complementario en combinación con reactivos catiónicos de administración citosólica.

A diferencia de muchos tipos estructurales de antisentido (por ejemplo fosforotioatos), los morfolinos no degradan sus moléculas diana de ARN. En cambio, los morfolinos actúan mediante "bloqueo estérico", uniéndose a una secuencia diana en un ARN y simplemente poniéndose en el camino de moléculas que podrían interaccionar de otro modo con el ARN. Los oligos de morfolinos se usan con frecuencia para investigar el papel de un transcrito específico de ARNm en un embrión, tal como huevos, o embriones de pez cebra, rana africana con garras

(Xenopus), pollo, y erizo de mar, produciendo embriones “morphant”. Con sistemas de administración citosólica adecuados, los morfolinos son eficaces en cultivo celular.

Unidos a la región 5’ no traducida de un ARN mensajero (ARNm), los morfolinos pueden interferir con la progresión del complejo de iniciación ribosómico de la caperuza en 5’ hasta el codón de iniciación. Esto previene la traducción de la región codificante del transcrito diana (llamado “silenciar” la expresión génica). Los morfolinos proporcionan un medio conveniente para silenciar la expresión de la proteína y aprender como esa disminución cambia las células u organismos. Algunos morfolinos silencian la expresión de forma tan eficaz que después de la degradación de las proteínas preexistentes las proteínas diana se vuelven indetectables por inmunotransferencia.

Los morfolinos también pueden interferir con los pasos de procesamiento del preARNm, normalmente previniendo que los complejos RNPnp que dirigen el ayuste se unan a sus dianas en los límites de los intrones en una hélice de preARN. Prevenir la unión de U1 (en el lado del donante) o U2/U5 (en la fracción polipirimidina y sitio aceptor) puede producir ayuste modificado, llevando normalmente a la exclusión de exones del ARNm maduro. El dirigirse a algunas dianas de ayuste produce la inclusión de intrones, mientras que la activación de sitios de ayuste crípticos puede llevar a inclusiones o exclusiones parciales. También se pueden bloquear las dianas de RNPnp U11/U12. La modificación del ayuste se puede ensayar de forma conveniente mediante transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y se ve como un desplazamiento en la banda después de la electroforesis en gel de los productos de la RT-PCR.

Los morfolinos también se han usado para bloquear la actividad de miARN, actividad de ribozimas, silenciadores de ayuste de intrones y potenciadores de ayuste. Se han inhibido las funciones de las RNPnp U2 y U12 con morfolinos. Los morfolinos dirigidos a secuencias de ARNm “resbaladizas” dentro de las regiones codificantes de proteínas pueden inducir cambios en el marco de lectura de la traducción. Las actividades de los morfolinos contra esta variedad de dianas sugieren que se pueden usar los morfolinos como una herramienta de propósito general para bloquear interacciones de proteínas o ácidos nucleicos con ARNm.

Enzimas de ADN específicas de ceramidasa ácida o colina quinasa

Un aspecto más de la invención se refiere a composiciones donde el inhibidor de la ceramidasa ácida y/o el inhibidor de la isoforma alfa de colina quinasa es/son enzimas de ADN. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecanísticas tanto de las tecnologías de antisentido como de las de ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana de ácido nucleico particular, parecido al oligonucleótido antisentido, sin embargo parecido a la ribozima son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

Actualmente hay dos tipos básicos de enzimas de ADN, y ambas fueron identificadas por Santoro y Joyce (véase, por ejemplo, la patente de EE UU No. 6.110.462). La enzima de ADN 10-23 comprende una estructura en bucle que conecta dos brazos. Los dos brazos proporcionan especificidad reconociendo una secuencia diana de ácido nucleico particular mientras que la estructura en bucle proporciona la función catalítica en condiciones fisiológicas.

Brevemente, para diseñar una enzima de ADN ideal que reconozca y corte específicamente un ácido nucleico diana, el experto en la materia debe identificar primero la secuencia diana única. Esto se puede hacer usando el mismo planteamiento que se ha descrito para los oligonucleótidos antisentido. Preferiblemente, la secuencia única o sustancialmente es una rica en G/C de aproximadamente 18 a 22 nucleótidos. El alto contenido en G/C ayuda a asegurar una interacción más fuerte entre la enzima de ADN y la secuencia diana.

Cuando se sintetiza la enzima de ADN, la secuencia de reconocimiento antisentido específica que dirigirá la enzima al mensajero se divide de modo que comprenda los dos brazos de la enzima de ADN, y el bucle de la enzima de ADN se sitúa entre los dos brazos específicos.

Se pueden encontrar métodos para hacer y administrar enzimas de ADN, por ejemplo en la patente de EE UU No. 6.110.462. De forma similar, los métodos de administración de ribozimas de ADN in vitro o in vivo incluyen los métodos de administración de las ribozimas de ARN, como se ha explicado en detalle anteriormente. Además, el experto en la materia reconocerá que, como el nucleótido antisentido, las enzimas de ADN se pueden modificar opcionalmente para mejorar la estabilidad y mejorar la resistencia a degradación.

Se pueden preparar ARN y ADN antisentido, ribozimas, ARNi y moléculas de hélice triple de la invención mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ADN y ARN. Estos incluyen métodos para sintetizar de forma química oligodesoxirribinucleótidos y oligorribinucleótidos bien conocidas en la técnica tal como por ejemplo síntesis química de fosforamidita en fase sólida. De forma alternativa, las moléculas de ARN se pueden generar mediante transcripción in vitro e in vivo de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN antisentido. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tal como los promotores de la polimerasa de T7 o SP6. De forma alternativa, las construcciones de ADNc antisentido que sintetizan el ARN antisentido de forma constitutiva o inducible, dependiendo del promotor usado, se pueden introducir establemente en líneas celulares. Además, se pueden introducir varias modificaciones bien conocidas en las moléculas de ácido nucleico como medio para

aumentar la estabilidad intracelular y semivida. Las posibles modificaciones incluyen pero no están limitadas a la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o al uso de enlaces fosforotioato o 2'-O-metil más que fosfodiesterasa en el esqueleto del oligodesoxirribinucleótido.

Las combinaciones preferidas de inhibidores de la isoforma alfa de ChoK e inhibidores de ceramidasa ácida incluyen MN58b (estructura proporcionada en la ínea II en la tabla 1) y NOE (estructura proporcionada en la línea 6, tabla 2), RSM-932A (estructura proporcionada en la línea I en la tabla 1) y NOE, MN58b y D-NMAPPD (estructura proporcionada en la línea VIII en la tabla 2) y RSM-932A y D-NMAPPD.

Combinaciones de inhibidores de ChoK y agentes quimioterapéuticos (segunda composición de la invención)

Los autores de la presente invención han encontrado que, de forma sorprendente, la resistencia al tratamiento con el inhibidor de ChoK MN58b no se correlaciona con resistencias a agentes quimioterapéuticos convencionales tal como cisplatino, taxol, virrelbina o gemcitabina. Esto se ha observado tanto en tumores resistentes a inhibidores de ChoK (véase el ejemplo 1) así como en líneas celulares tumorales establecidas seleccionadas mediante ciclos repetidos de crecimiento en presencia de inhibidores de ChoK (ver el ejemplo 6 de la invención). Sin querer estar unido a ninguna teoría, se cree que la resistencia no cruzada entre inhibidores de ChoK y cisplatino se debe al hecho de que ambos fármacos actúan a través de mecanismos diferentes. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que combinaciones de un inhibidor de ChoK y cisplatino produce un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento de células tumorales cuando se compara con el tratamiento con los compuestos individuales (véase el ejemplo 7 de la invención) tanto cuando se prueban *in vitro* como *in vivo* en modelos de xenoinjerto (véase el ejemplo 7 de la invención). Además, los autores de la presente invención también han observado que el uso combinado de inhibidores de colina quinasa y 5-fluorouracilo produce un efecto antitumoral sinérgico cuando se prueban en diferentes líneas de células de cáncer de colon (véase el ejemplo 9).

De esta manera, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición (de aquí en adelante segunda composición de la invención) que comprende, de forma separada o junta, un primer componente que comprende uno o más inhibidores de ChoK específicos para la isforma alfa de colina quinasa y un segundo componente que comprende uno o más agentes de quimioterapia, en donde el agente de quimioterapia se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante de ADN, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, un inhbidor de toposiomerasa II, cetuximab, gefitinib e imatinib.

El término "composición" se refiere a uno o más compuestos en varias combinaciones según formas de realización alternativas de la esta invención. Preferiblemente, la composición comprende al menos un inhibidor de ChoK y al menos un agente alquilante.

Los inhibidores de ChoK adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen cualquiera de los inhibidores de ChoK definidos previamente en la Tabla 1 formando parte de la primera composición de la invención. El inhibidor de ChoK es un inhibidor específico para la isoforma alfa de ChoK.

El término "agente de quimioterapia", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente químico que inhibe la proliferación, crecimiento, vida o actividad metastásica de células cancerosas e incluye, sin limitación, fármacos alquilantes de ADN, antimetabolitos, inhibidores mitóticos, antraciclinas, inhibidores de topoisomerasa I y II, cetuximab, gefitinib e imatinib. En una forma de realización preferida, el agente de quimioterapia es un agente alquilante y, más en particular, un agente alquilante de ADN o un antimetabolito.

La expresión "agente alquilante", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos capaces de añadir residuos alquilo al material genético de células que se dividen rápidamente produciendo de esta manera una parada en la replicación y la muerte celular. Tales agentes incluyen compuestos basados en platino, mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, y triazenos, incluyendo, pero no limitados a, mecloretamina, ciclofosfamida (CytoxanTM), melfalán (L-sarcolisina), etopósido, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU), estreptozocina, clorozotocina, mostaza de uracilo, clormetina, ifosfamida, clorambucilo, pipobromán, trietilenmelamina, trietilentiofosforamina, busulfano, procarbazina, dacarbazina, y temozolomida.

En una forma de realización preferida, el agente alquilante es un compuesto basado en platino. Los compuestos basados en platino de ejemplo que se pueden usar en la presente invención incluyen, sin limitación, cisplatino, carboplatino, iproplatino, tetraplatino, oxaliplatino, JM118, JM149, JM216, JM335, transplatino, cis, trans, cis-Pt(NH3)(C6H11NH2)(OOCC3H7)2Cl, nedaplatino, malanato-1,2-diaminociclohexanoplatino(II), 5-sulfosalicilato-trans-(1,2-diaminociclohexano)platino(II) (SSP), poli-[(trans-1,2-diaminociclohexano)platino]-carboxiamilosa (POLY-PLAT) y 4-hidroxi-sulfonilfenilacetato (trans-1,2-diaminociclohexano) platino(II) (SAP).

El término "antimetabolito", como se usa en el presente documento, se refiere, en un sentido amplio, a sustancias que interrumpen el metabolismo normal y sustancias que inhiben el sistema de transferencia de electrones para prevenir la producción de intermedios ricos en energía, debido a sus similitudes estructurales o funcionales con

metabolitos que son importantes para los oreganismos vivos (tales como vitaminas, coenzimas, aminoácidos y sacáridos). Ejemplos de antimetabolitos que tienen actividades antitumorales incluyen, pero no están limitados a, análogos de ácidos fólico (por ejemplo, metotrexato (ametopterina)), denopterina, edatrexato, metotrexato, nolatrexed, pemetrexed, piritrexim, pteropterina, raltitrexed, trimetrexato; análogos de pirimidina (por ejemplo, fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU(R)), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FudR), doxifluridina y citarabina (citosina arabinósido)); análogos de purina (por ejemplo, mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) y pentostatina (2'-desoxicoformicina)).

Las combinaciones preferidas incluyen, sin limitación, MN58b y cisplatino y RSM-932A y cisplatino, MN58b y 5-fluorouracilo y RSM-932A y 5-fluorouracilo.

Combinaciones de inhibidores de ChoK y un ligando de un receptor de muerte (tercera composición)

Los autores de la presente invención han mostrado que el tratamiento de células tumorales con una combinación de un ligando de un receptor de muerte y un inhibidor de ChoK produce un aumento en la inhibición de la proliferación celular cuando se compara con el tratamiento de las células con el ligando del receptor de muerte o el inhibidor de ChoK de forma separada. Por ejemplo, como se muestra en el ejemplo 8 de la presente invención, el tratamiento de células de cáncer de colon con una combinación del inhibidor de colina quinasa RSM-932A (ChoKI) y TRAIL produce una citotoxicidad aumentada cuando se compara con el tratamiento de las mismas células con cada compuesto tomado de forma individual. Además, el ejemplo 8 de la presente invención muestra que el uso combinado del inhibidor de ChoK MN58b y TRAIL produce una inhibición de crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto tumoral que es mayor que el observado cuando cada uno de los compuestos se usa por separado.

De esta manera, en otro aspecto, también se divulga una composición que comprende, juntos o separados, un primer componente que comprende uno o más inhibidores de ChoK y un segundo componente que es uno o más ligandos de un receptor de muerte.

Los inhibidores de ChoK adecuados para su uso en las composiciones incluyen cualquiera de los inhibidores de ChoK definidos previamente en la Tabla 1 formando parte de la primera composición de la invención. En una forma de realización preferida, el inhibidor de ChoK es un inhibidor específico para ChoKα.

Los ligandos de receptores de muerte adecuados para su uso en composiciones incluyen NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL, TNF-α CD134L/OX40L, CD27L/CD70, FasL/CD95, CD30L, TNF-β/LT-α, LT-β y TRAIL. En una forma de realización preferida, el miembro de la familia del TNF es TRAIL, un derivado funcionalmente equivalente del mismo o un compuesto mimético pequeño del mismo. TRAIL (ligando inductor de apoptosis similar a TNF, por sus siglas en inglés), también conocido como "ligando Apo-2", "Apo-2L", "Apo2L", "Apo2L/TRAIL" y "ligando Apo-2/TRAIL", es una molécula que es capaz de inducir apoptosis en células que expresan el receptor afín de TRAIL. TRAIL se identificó hace varios años como miembro de la familia de TNF de citoquinas (Pitti et al., 1996, J.Biol.Chem., 271:12687-12690 y patente de EE UU 6.284.236). La secuencia completa nativa humana del polipéptido TRAIL tiene 281 aminoácidos de longitud, una proteína transmembrana de tipo II que tiene una secuencia como se define en SEQ ID NO: 7 (acceso UniProt P50591). Estudios cristalográficos de las formas solubles de TRAIL revelan una estructura homotrimérica similar a las estructuras del TNF y otras proteínas relacionadas. Sin embargo, se encontró que TRAIL, al contrario que otros miembros de la familia TNF, tenía una característica estructural única en que tres residuos de cisteína (en las posiciones 230 de cada subunidad en el homotrímero) juntas coordinan un átomo de zinc, y que la unión de zinc es importante para la estabilidad del trímero y la actividad biológica. La presente invención contempla el uso de cualquiera de las tres isoformas diferentes de TRAIL (TRAILα, TRAILβ, y TRAILγ) o combinaciones de las mismas.

Las variantes funcionalmente equivalentes de TRAIL incluyen isoformas solubles de TRAIL tal como las descritas en los documentos WO08088582 y US6284236 o los fragmentos de TRAIL 98-281, 114-281 descritos en el documento US2002128438, fusiones scFv:sTRAIL descritas por Bremer et al (Neoplasia, 2004, 6:636-45), formas de ayuste alternativo de TRAIL descritas en el documento US2002061525, péptidos de unión al receptor de TRAIL descritos en el documento WO04101608, variantes de TRAIL con especificidad aumentada para los receptores proapoptóticos tal como los mutantes de TRAIL 19IL, 199V, 201R, 213W, 215D y/o 193S descritos en el documento WO07063301 o variantes seleccionadas mediante presentación en fago de receptores descritos en el documento WO04001009A, anticuerpos agonistas dirigidos contra los receptores afines de TRAIL, TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5) tal como mapatumumab, lexatumumab, los anticuerpos descritos en el documento WO07128231, o los anticuerpos descritos en el documento WO02094880, el anticuerpo monoclonal AD5-10 descrito en el documento WO06017961, los diacuerpos y triacuerpos en tándem específicos de TRAIL descritos en el documento WO05056605, los anticuerpos quiméricos anti-DR4 descritos en el documento WO9937684, anticuerpos antagonistas anti-DR5 descritos en el documento WO03038043, los anticuerpos biespecíficos anti-receptor de TRAIL descritos en el documento WO02085946, anticuerpos específicos anti-DR4 descritos en el documento WO9832856, scFv anti-DR2 descritos por Park, K.J et al (Cancer Res., 2007, 67:7327-7334), proteínas de fusión triméricas de TRAIL descritas en los documentos WO08025516 y WO04014951, variantes dodecaméricas de TRAIL descritas en el documento WO07102690, TRAIL pegilado descrito en el documento WO07145457, vectores de ADN que comprende un

polinucleótido que codifica TRAIL tal como los descritos en los documentos US2006153809, WO04087930, US2005031593.

Las moléculas pequeñas que mimetizan TRAIL que tienen efecto proapoptótico incluyen los compuestos descritos en el documento WO2008094319.

Las combinaciones preferidas incluyen, sin limitación, RSM-932A y la región extracelular de TRAIL humano (aminoácidos 95-281) y MN58b y la región extracelular de TRAIL humano (aminoácidos 95-281).

Preparaciones farmacéuticas de la invención

Los compuestos que forman parte de la primera y segunda composiciones de la invención incluyen no sólo los compuestos como tal sino también sales, solvatos, profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. El término “sales, solvatos, profármacos farmacéuticamente aceptables” se refiere a cualquier sal, éster, solvato o cualquier otro compuesto farmacéutico que cuando se administra a un receptor es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto descrito en el presente documento. Sin embargo, se observará que las sales farmacéuticamente inaceptables también están dentro del ámbito de la invención porque las últimas pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, profármacos y derivados se puede llevar a cabo por medio de métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, se sintetizan sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos proporcionados en el presente documento por medio de métodos químicos convencionales a partir de un compuesto original que contiene un residuo básico o ácido. Tales sales se preparan generalmente, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de los compuestos con una cantidad esteoquimétrica de la base o ácido adecuados en agua o en un solvente orgánico o una mezcla de ambos. Los medios no acuosos, tal como DMSO (dimetilsulfóxido), éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo son generalmente preferidos. Ejemplos de sales de adición ácida incluyen sales de adición ácida mineral tal como por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición ácida orgánica tal como por ejemplo acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, matanosulfonato, y p-toluenosulfonato. Ejemplo de sales de adición de base incluyen sales inorgánicas tal como por ejemplo sales de sodio, potasio, bromuro, calcio, amonio, magnesio, aluminio, litio y sales de bases orgánicas tal como por ejemplo sales de etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina, glucamina y aminoácidos básicos.

Los derivados o profármacos particularmente preferidos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando tales compuestos se administran a un paciente (por ejemplo, haciendo que un compuesto administrado por vía oral se absorba más fácilmente en la sangre), o aumentando la liberación del compuesto original en un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) en relación a la especie original.

La invención también proporciona composiciones en donde al menos uno de los compuestos se encuentra como profármaco. El término “profármaco” se usa en su sentido más amplio e incluye aquellos derivados que se convierten in vivo en los compuestos de la invención. Tales derivados son evidentes para los expertos en la materia y dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula y sin limitación, incluyen los siguientes derivados de los compuestos presentes: ésteres, ésteres de aminoácidos, ésteres fosfato, ésteres sulfonato de sales de metales, carbamatos y amidas. Los ejemplos de métodos para producir un profármaco de un principio activo determinado los conoce el experto en la materia y se pueden encontrar por ejemplo en Krogsgaard-Larsen et al. “Textbook of Drug design and Discovery” Taylor & Francis (Abril 2002).

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y se pretende que ambos estén dentro del ámbito de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en la técnica. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables. En una forma de realización particular, el solvato es un hidrato. Los compuestos que forman las composiciones de la invención pueden incluir enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales en un C, o isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E). Los isómeros, enantiómeros o diasteroisómeros individuales y las mezclas de los mismos se incluyen en el ámbito de la presente invención.

Los diferentes sustituyentes seleccionados para los diferentes compuestos de la invención proporcionan una serie de factores que afectan considerablemente a los valores de log P. De esta manera, los grupos hidroxilo actúan como donantes de enlaces de hidrógeno y se pueden establecer enlaces intra o intermoleculares incluso en el caso de fenoles. La presencia de grupos carbonilo o carboxilo genera grupos aceptores de protones en la molécula. La presencia de halógenos genera carbonos muy deficientes y modifica considerablemente las propiedades biológicas. Los grupos amino generan nucleófilos buenos en la molécula y en la mayoría de los casos modifica significativamente su polaridad y polarizabilidad y la presencia de grupos alquilo y/o arilos adicionales aumenta la lipofilicidad de la molécula.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden la primera o segunda composiciones de la invención, su sal, derivado, profármaco, solvato, o esteroisómero del mismo farmacéuticamente aceptable junto con un soporte, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración a un paciente. La frase “soporte farmacéuticamente aceptable” como se usa aquí significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulación líquido o sólido, implicado en llevar o transportar los agentes objeto de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada soporte debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como soportes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tal como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tal como almidón de maíz y fécula de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tal como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites tal como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tal como propilenglicol; (11) polioles, tal como glicerina, sorbitol, manitol, solutol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tal como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua sin pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas tal como DMSO (dimetilsulfóxido) y sus derivados.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier vía adecuada de administración, por ejemplo una vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo vía subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular e intravenosa).

Las formas farmacéuticas adecuadas para la administración oral incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, pastillas, cápsulas, gránulos, etc.) o composición líquida (soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, etc.) y pueden contener excipientes convencionales conocidos en la técnica, tal como agentes aglutinantes, por ejemplo sirope, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona; rellenos, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para la preparación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, disgregantes, por ejemplo almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón o celulosa microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables tal como lauril sulfato de sodio.

Las composiciones orales sólidas se pueden preparar por medio de métodos convencionales para mezclar, rellenar o preparar comprimidos. Las operaciones de mezcla repetidas se pueden usar para distribuir el principio activo a través de las composiciones enteras usando grandes cantidades de agentes de relleno. Tales operaciones son convencionales en la técnica. Los comprimidos se pueden preparar, por ejemplo por medio de granulación húmeda o seca y se pueden cubrir opcionalmente según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal, particularmente con un recubrimiento entérico.

Las composiciones farmacéuticas también se pueden adaptar para la administración parenteral tal como soluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados en una forma farmacéutica unitaria adecuada. Se pueden usar excipientes adecuados tales como agentes de carga, agentes tamponantes o agentes tensioactivos. Las formulaciones mencionadas se prepararán usando los métodos normales tal como aquellos descritos en la Farmacopea Española y la Farmacopea de los Estados Unidos y texto de referencia similares.

La administración de los compuestos o composiciones usadas en la presente invención puede ser por cualquier método adecuado, tal como infusión intravenosa, preparaciones orales y administración intraperitoneal e intravenosa. Sin embargo, la vía de administración preferida dependerá de la afección del paciente. Se prefiere la administración oral debido a la comodidad para el paciente y el carácter crónico de las enfermedades que se van a tratar.

Para su aplicación en terapia, las composiciones de la invención se encontrarán preferiblemente en forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, las composiciones de la invención tienen un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los excipientes farmacéuticamente aceptables y sin incluir material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para los inhibidores de la ceramidasa ácida o para los inhibidores de la colina quinasa preferiblemente superan el 50%, más preferiblemente superan el 70%, más preferiblemente superan el 90%. En una forma de realización preferida, superan el 95%.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de los inhibidores de ceramidasa ácida o del agente quimioterapéutico, y de los inhibidores de la isoforma alfa de colina quinasa en las composiciones de la invención generalmente dependerán, entre otros factores, del individuo que va a ser tratado, de la gravedad de la enfermedad que padece dicho individuo, de la forma de administración elegida, etc. Por esta razón, las dosis mencionadas en esta invención se deben considerar como directrices para el experto en la materia y este último debe ajustar las dosis según las variables mencionadas previamente. Sin embargo, se puede administrar un inhibidor de ceramidasa ácida una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 veces al día en un cantidad diaria total típica comprendida entre 1 y 200 mg/kg de masa corporal/día, preferiblemente 1-10 mg/kg de masa corporal/día. De la misma manera se puede administrar un inhibidor de la colina quinasa una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 veces al día en un

cantidad diaria total típica comprendida entre 1 y 200 mg/kg de masa corporal/día, preferiblemente 1-10 mg/kg de masa corporal/día.

Las composiciones según la presente invención se pueden formular como una preparación única o, de forma alternativa, se pueden proporcionar como un producto para la administración simultánea, concurrente, separada o secuencial.

Las composiciones descritas en esta invención, sus sales, profármacos y/o solvatos farmacéuticamente aceptables, así como las composiciones farmacéuticas que las contienen se pueden usar junto con fármacos adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o alternativamente se pueden proporcionar en forma de una composición separada para su administración simultánea o no simultánea con la composición farmacéutica que comprende un inhibidor de ceramidasa ácida y un inhibidor de colina quinasa o un profármaco, solvato o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o proporcionarse como una composición separada para su administración al mismo tiempo o a tiempos diferentes.

Las composiciones de la invención se pueden administrar en combinación con otros agentes quimioterapéuticos conocidos en la técnica tal como

- Agentes antimetabolitos tal como análogos del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, e inhibidores de adenosina desaminasa, incluyendo, pero no limitados a citarabina (CYTOSAR-U), citosina arabinosido, fluorouracilo (5-FU), floxuridina (FudR), 6-tioguanina, 6-mercaptopurina (6-MP), pentostatina, 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato, 10-propargil-5, 8-dideazafolato (PDDF, CB3717), ácido 5, 8-dideazatetrahidrofólico (DDATHF), leucovorina, fosfato de fludarabina, pentostatina, y gemcitabina
- Productos naturales adecuados y sus derivados (por ejemplo, alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfoquinas y epipodofilotoxinas), incluyen, pero no están limitados a Ara-C, paclitaxel (Taxol (k), docetaxel (Taxotere), desoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, azatioprina; brequinar; alcaloides, por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, etc.; podofilotoxinas, por ejemplo, etoposido, teniposido, etc.; antibióticos, por ejemplo, antraciclina, clorhidrato de daunorubicina (daunomicina, rubidomicina, cerubidina), idarubicina, doxorubicina, epirubicina y derivados de morfolino, etc.; bisciclopéptidos de fenoxizona, por ejemplo, dactinomicina; glicopéptidos básicos, por ejemplo bleomicina; glicósidos de antraquinona, por ejemplo, plicamicina (mitramicina); antracenedionas, por ejemplo mitoxantrona; indoledionas de azirinopirrolo, por ejemplo mitomicina; imnunosupresores macrocíclicos, por ejemplo ciclosporina, FK-506 (tacrolimus, prograf), rapamicina, etc.; y similares. [00469] Otros agentes citotóxicos antiproliferativos son navelbena, CPT-11, anastrazol, letrazol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida, y droloxafina.
- Los agentes que afectan a microtúbulos que tienen actividad antiproliferativa también son adecuados para su uso e incluyen, pero no están limitados a, alocolchicina (NSC 406042), Halicondrina B (NSC 609395), colchicina (NSC 757), derivados de colchicina (por ejemplo, NSC 33410), dolstatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (Taxol), derivados de T ol, docetaxel (Taxotere), tiocolchicina (NSC 361792), tritil cisterina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, epotilonas naturales y sintéticas incluyendo pero no limitado a, epotilona A, epotilona B, discodermolida; estramustina, nocodazol, y similares.
- Inhibidores de tirosina quinasa tal como gefitinib, imatinib, sorafenib, dasatinib, y erlotinib.
- Inhibidores de topoisomerasa II incluyen, pero no están limitados a, epipodofilotoxinas tal como topotecano, irinotecano, etopósido y tenipósido.
- Antraciclinas (tal como daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona).
- Anticuerpos monoclonales tal como cetiximab, bevacizumab, rituximab, alemtuzumab y trastuzumab.

Además, en el caso de la primera composición de la invención, la composición puede comprender además un agente alquilante. Los agentes alquilantes adecuados para su uso en la primera composición de la invención incluyen compuestos basados en platino tal como carboplatino, cisplatino, nedaplatino, oxaliplatino, tetranitrato de triplatino, satraplatino y combinaciones de los mismos; sulfonatos de alquilo tal como Busulfano, etileniminas y metilmelaminas tal como hexametilmelamina, altretamina o Tiotepa, mostazas de nitrógeno tal como ciclofosfamida, mecloretamina o mustina, uramustina o mostaza de uracilo, Melfalan, Clorambucilo o Ifosfamida, nitrosoureas tal como carmustina o estreptozocina, triazenos tal como dacarbazina e imidazotetrazinas tal como temozolomida.

Además, en el caso de la primera y segunda composiciones de la invención, la composiciones pueden comprender también un ligando de receptor de muerte. Preferiblemente, dicho ligando del receptor de muerte se selecciona del grupo que consiste en NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL, TNF-α CD134L/OX40L, CD27L/CD70, FasL/CD95, CD30L, TNF-β/LT-α, LT-β y TRAIL. En una forma de realización preferida, el miembro de la familia del TNF es TRAIL, un derivado funcionalmente equivalente del mismo o un compuesto mimetizador pequeño del mismo. TRAIL (ligando inductor de apoptosis similar a TNF), también conocido como “ligando Apo-2”, “Apo-2L”, “Apo2L”, Apo2L/TRAIL” y “ligando Apo-2/TRAIL”, es una molécula que es capaz de inducir apoptosis en células que expresan el receptor afín de TRAIL. TRAIL se identificó hace varios años como miembro de la familia de TNF de citoquinas (Pitti et al., 1996, J.Biol.Chem., 271:12687-12690 y patente de EE UU 6.284.236). La secuencia completa nativa humana del

polipéptido TRAIL tiene 281 aminoácidos de longitud, proteína transmembrana de tipo II. Estudios cristalográficos de las formas solubles de TRAIL revelan una estructura homotrimérica similar a las estructuras del TNF y otras proteínas relacionadas. Se encontró que TRAIL, al contrario que otros miembros de la familia TNF sin embargo, tenía una característica estructural única en que tres residuos de cisteína (en las posiciones 230 de cada subunidad en el homotrímero) juntas coordinan un átomo de zinc, y que la unión de zinc es importante para la estabilidad del trímero y la actividad biológica. La presente invención contempla el uso de cualquiera de las tres isoformas diferentes de TRAIL (TRAILα, TRAILβ, y TRAILγ) o combinaciones de las mismas.

Las variantes funcionalmente equivalentes de TRAIL incluyen isoformas solubles de TRAIL tal como las descritas en WO08088582 y US6284236 o los fragmentos de TRAIL 98-281, 114-281 descritos en US2002128438, fusiones scFv:sTRAIL descritas por Bremer et al (Neoplasia, 2004, 6:636-45), formas de ayuste alternativo de TRAIL descritas en US2002061525, péptidos de unión al receptor de TRAIL descritos en WO04101608, variantes de TRAIL con especificidad aumentada para los receptores proapoptóticos tal como los mutantes de TRAIL 19IL, 199V, 201R, 213W, 215D y/o 193S descritos en WO07063301 o variantes seleccionadas mediante presentación en fago de receptores descritos en WO04001009A, anticuerpos agonistas dirigidos contra los receptores afines de TRAIL, TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5) tal como mapatumumab, lexatumumab, los anticuerpos descritos en WO07128231, o los anticuerpos descritos en WO02094880, el anticuerpo monoclonal AD5-10 descrito en WO06017961, los diacuerpos y triacuerpos en tándem específicos de TRAIL descritos en WO05056605, los anticuerpos quiméricos anti-DR4 descritos en WO9937684, anticuerpos antagonistas anti-DR5 descritos en WO03038043, anticuerpos biespecíficos anti-receptor de TRAIL descritos en WO02085946, anticuerpos específicos anti-DR4 descritos en WO9832856, scFv anti-DR2 descritos por Park, K.J et al (Cancer Res., 2007, 67:7327-7334), proteínas de fusión triméricas de TRAIL descritas en WO08025516 y WO04014951, variantes dodecaméricas de TRAIL descritas en WO07102690, TRAIL pegilado descrito en WO07145457, vectores de ADN que comprenden un polinucleótido que codifica TRAIL tal como los descritos en US2006153809, WO04087930, US2005031593.

Las moléculas pequeñas que mimetizan TRAIL que tienen efecto proapoptótico incluyen los compuestos descritos en WO2008094319.

Usos terapéuticos de las composiciones de la invención

Las composiciones de la invención, en vista de su efecto sinérgico en inhibir el crecimiento de células tumorales, se pueden usar en medicina. De esta manera, en otro aspecto, la invención se refiere a las composiciones de la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición que comprende (i) un inhibidor de ceramidasa ácida y un inhibidor de la isoforma alfa decolina quinasa, o (ii) un inhibidor de la isoforma alfa de colina quinasa y un agente quimioterapéutico, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante de ADN, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, un inhibidor de topoisomerasa II, cetuximab, gefininib e imatinib, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. De forma alternativa, la invención se refiere al uso de una composición que comprende (i) un inhibidor de ceramidasa ácida y un inhibidor de la isoforma alfa de colina quinasa o (ii) un inhibidor de la isoforma alfa de colina quinasa y un agente quimioterapéutico, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante de ADN, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, un inhibidor de topoisomerasa II, cetuximab, gefininib e imatinib, para su uso en el tratamiento de cáncer.

La invención también contempla la administración de cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyendo agentes antineoplásicos adicionales como se han definido anteriormente. Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de la cadena pasada, leucemias (por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, síndrome mielodisplásico, leucemia mielocítica juvenil, etc.), metástasis, neoplasias, tumores (por ejemplo, neuroma acústico, adenocarcinoma, cáncer de corteza suprarrenal, carcinoma anal, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma de células basales, carcinoma de vía biliar, carcinoma de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, carcinoma broncogénico, cáncer del peritoneo, cáncer cervical, condrosarcoma, cordoma, coriocarcinoma, carcinoma de colon, cáncer colorrectal, craniofaringioma, cistadenocarcinoma, carcinoma embrionario, carcinoma endometrial, endoteliosarcoma, ependimoma, carcinoma epitelial, cáncer de esófago, tumor de Ewing, fibrosarcoma, cáncer gastrointestinal, cáncer del aparato genitourinario, gliobastoma, glioma, cáncer de cabeza, hemangioblastoma, hepatoma, enfermedad de Hodgkin, cáncer de riñón, leiomiosarcoma, liposarcoma, cáncer de hígado, carcinoma de pulmón, linfangioentoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfomas, hipercalcemia maligna, insulanoma pancreática maligna, carcinoma medular, meduloblastoma, melanoma, meningioma, mesotelioma, cáncer de cuello, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, carcinoma de pulmón no microcítico, oligodendrioma, sarcoma osteogénico, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, adenocarcinomas papilares, carcinoma papilar, carcinoma de pene, pinealoma, lesiones premalignas de la piel, tumores cerebrales primarios, macroglobulemia primaria, trombocitosis primaria, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de glándulas salivares, sarcoma, carcinoma de glándulas sebáceas, seminoma, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago, sinovioma, carcinoma de glándulas sudoríparas,

tumor de testículos, cáncer de tiroides, carcinoma uterino, cáncer de vulva, y tumor de Wilms), o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado.

En una forma de realización preferida, el cáncer es cáncer de pulmón. “Cáncer de pulmón”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier modificación neoplásica que afecta a una o más células presentes en el tejido pulmonar. Tipos ejemplares no limitantes de cáncer de pulmón que se pueden tratar usando las composiciones de la invención incluye cáncer de pulmón microcítico y no microcítico, incluyendo carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes y mesotelioma. En una forma de realización más preferida, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

En otra forma de realización preferida, el cáncer es cáncer de colon o cáncer colorrectal. Como se usa en el presente documento, el término “cáncer colorrectal” incluye cualquier tipo de neoplasia de colon, recto y apéndice y se refiere tanto a adenomas tempranos como tardíos y a carcinomas así como al cáncer hereditario, familiar o esporádico. CCR hereditario incluye esos síndromes que incluyen la presencia de pólipos, tales como los síndromes de poliposis hamartomatosa y el más conocido poliposis adenomatosa familiar (PAF) así como síndromes no polipósicos tales como cáncer colorrectal no polipósico hereditario (CCNPH) o síndrome de Lynch I. La presente invención permite el diagnóstico de cáncer colorrectal en sus diferentes fases tales como fases A, B, C1, C2 y D según la clasificación de Duke, fases A, B1, B2, B3, C1, C2, C3 y D según la clasificación de Astler-Coller, fases TX, T0, Tis, T1, T2, T3, NX, N0, N1, N2, MX, M0 y M1 según el sistema TNM así como fases 0, I, II, III y IV según la clasificación AJCC (American Joint Committee on Cancer).

Las composiciones según la presente invención se pueden formular como una preparación individual o, de forma alternativa, se pueden proporcionar como un producto para la administración simultánea, concurrente, separada o secuencial.

Uso de inhibidores de ceramidasa ácida, agentes quimioterapéuticos o ligandos de receptores de muerte para sensibilizar células tumorales al tratamiento con inhibidores de ChoK

Los autores de la presente invención también han observado que la respuesta a inhibidores de colina quinasa aumenta cuando las células se tratan previamente o simultáneamente con un inhibidor de ceramidasa ácida (véase el ejemplo 6 de la presente invención), con un agente quimioterapéutico (véase los ejemplos 7 y 9) o con un ligando de receptores de muerte (véase el ejemplo 8).

De esta manera, en otro aspecto, también se divulga un método para aumentar la sensibilidad de células tumorales a un inhibidor de colina quinasa que comprende tratar dichas células tumorales con un inhibidor de ceramidasa ácida, con un agente quimioterapéutico o con un ligando de receptores de muerte. En aún otro aspecto, la invención se refiere al uso de un inhibidor de ceramidasa ácida, un agente quimioterapéutico o un ligando de receptores de muerte para aumentar la sensibilidad de una célula tumoral a un inhibidor de colina quinasa.

El término “sensibilidad”, como se usa en el presente documento, se refiere a la respuesta de una célula a un inhibidor de colina quinasa determinado y normalmente se determina como la dosis mínima de inhibidor de colina quinasa que produce una inhibición del 50% en el crecimiento de una célula tumoral. De esta manera, el inhibidor de ceramidasa ácida, con un agente quimioterapéutico o con un ligando de receptores de muerte actúa aumentando la sensibilidad o disminuyendo la dosis mínima necesaria para alcanzar inhibición de crecimiento del 50%.

La sensibilización de células tumorales al tratamiento con inhibidores de ChoK se puede llevar a cabo tratando las células con un inhibidor de ceramidasa ácida, con un agente quimioterapéutico o con un ligando de receptores de muerte simultáneamente, después o antes de la administración de los inhibidores de ChoK. El inhibidor de ceramidasa ácida, el agente quimioterapéutico y el ligando de receptores de muerte que se pueden usar para aumentar la sensibilidad de una célula tumoral a un inhibidor de ChoK puede ser cualquiera de los compuestos descritos previamente como que forman parte de las composiciones de la invención. Además, los inhibidores de ChoK que se pueden usar en el tratamiento de células que se han sensibilizado con los inhibidores de ceramidasa ácida o con el ligando de receptores de muerte son esencialmente cualquiera de los inhibidores descritos previamente como componentes de las composiciones de la invención.

Método para la identificación de pacientes de cáncer que muestran resistencia a inhibidores de ChoK

Además, los descubrimientos de los autores de la invención abren la posibilidad de identificar pacientes de cáncer que probablemente muestren resistencia al tratamiento con inhibidores de ChoK determinando los niveles de ceramidasa ácida en una muestra de dicho paciente. Si los niveles de ceramidasa ácida están aumentados respecto a una muestra de referencia, esto será indicativo de que los pacientes probablemente muestren resistencia a los inhibidores de ChoK ya que la ceramidasa proapoptótica liberada en respuesta a la inhibición de ChoK se hidrolizará dando lugar a esfingosina que tiene efectos promitóticos. Por el contrario, si los niveles de ceramidasa ácida están disminuidos o al menos no aumentados con respecto a los niveles en una muestra de referencia, esto es indicativo de que el paciente responderá favorablemente al tratamiento con inhibidores de ChoK.

De esta manera, en otro aspecto, también se divulga un método (de aquí en adelante el primer método) para la identificación de pacientes de cáncer resistentes a terapia con inhibidores de ChoK que comprende determinar los niveles de ceramidasa ácida en una muestra de dicho paciente en donde el paciente se identifica como que es resistente a inhibidores de ChoK cuando los niveles de ceramidasa ácida en dicha muestra son mayores que en una muestra de referencia.

Para llevar a cabo el primer método, se obtiene una muestra del sujeto en estudio. El término "muestra" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra que se puede obtener del paciente. El método presente se puede aplicar a cualquier tipo de muestra biológica de un paciente, tal como una muestra de biopsia, tejido, célula o fluido (suero, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), lágrimas, moco, sudor, leche, extractos de cerebro y similares). En una forma de realización particular, dicha muestra es una muestra de tejido o una parte del mismo, preferiblemente una muestra de tejido tumoral o una parte del mismo. Dicha muestra se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, biopsia, utilizando métodos que conocen bien los expertos en las técnicas médicas relacionadas. Los métodos para obtener una muestra de la biopsia incluyen partición en trozos grandes de un tumor, o microdisección u otros métodos de separación de células conocidos en la técnica. Las células tumorales se pueden obtener de forma adicional mediante citología por aspiración con una aguja fina. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, estas se pueden fijar en formalina y embeber en parafina o congelar primero y después embeber en un medio criosolidificable, tal como compuesto OCT, mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permite la congelación rápida.

Una vez que la muestra del paciente está disponible, el primer método comprende la determinación de los niveles de ceramidasa ácida. Como aprecia el experto en la materia, los "niveles de ceramidasa ácida" se pueden determinar midiendo los niveles del ARNm que codifica la ceramidasa ácida, determinando los niveles de ceramidasa ácida o midiendo la actividad enzimática de ceramidasa ácida.

En el caso de que los "niveles de expresión" se determinen midiendo los niveles de expresión del ARNm de ceramidasa ácida, la muestra biológica se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o célula, para liberar los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos para análisis adicionales. Los ácidos nucleicos se extraen de la muestra mediante procedimientos que conoce el experto en la materia y disponibles comercialmente. El ARN se extrae después a partir de muestras congeladas o recientes mediante cualquiera de los métodos típicos en la técnica, por ejemplo Sambrook, J., et al., 2001 Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3. Preferiblemente, se tiene cuidado para evitar la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

En una forma de realización particular, el nivel de expresión se determina usando el ARNm obtenido de una muestra de tejido fijada en formalina, embebida en parafina. El ARNm se puede aislar de una muestra patológica de archivo o una muestra de biopsia que primero se desparafiniza. Un método de desparafinización de ejemplo implica lavar la muestra en parafina con un solvente orgánico, tal como xileno. Las muestras desparafinizadas se pueden rehidratar con una solución acuosa de un alcohol inferior. Los alcoholes inferiores adecuados, incluyen por ejemplo, metanol, etanol, propanoles, y butanoles. Las muestras desparafinizadas se pueden rehidratar con lavados sucesivos con soluciones de alcoholes inferiores de concentración decreciente, por ejemplo. De forma alternativa, la muestra se desparafiniza y rehidrata simultáneamente. La muestra se lisa después y se extrae el ARN de la muestra.

Mientras que todas las técnicas de determinación del perfil de expresión génica (RT-PCR, SAGE, o TaqMan) son adecuadas para el uso al realizar los aspectos anteriores de la invención, los niveles de expresión del ARNm del gen se determinan con frecuencia mediante transcripción inversa reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). En una forma de realización particular, los niveles de expresión del ARNm de ceramidasa ácida se determinan mediante PCR cuantitativa, preferiblemente PCR a tiempo real. La detección se puede llevar a cabo en muestras individuales o en micromatrices de tejidos.

Para normalizar los valores de expresión el ARNm entre las diferentes muestras, es posible comparar los niveles de expresión del ARNm de interés en las muestras a ensayar con la expresión de un ARN control. Un "ARN control" como se usa en el presente documento, se refiere a un ARN cuyos niveles de expresión no cambian o solo cambian en cantidades limitadas en células tumorales con respecto a células no tumorigénicas. Preferiblemente, el ARN control es ARNm derivado de genes de mantenimiento y que codifica proteínas que se expresan de forma constitutiva y que llevan a cabo funciones celulares esenciales. Los ejemplos de genes de mantenimiento para su uso en la presente invención incluyen β-2-microglobulina, ubiquitina, proteína ribosómica de 18-S, ciclofilina, GAPDH y actina. En un forma de realización preferida, el ARN control es el ARNm de la β-actina. En una forma de realización la cuantificación de la expresión génica relativa se calcula según el método comparativo Ct usando β-actina como control endógeno y controles de ARN comerciales como calibradores. Los resultados finales, se determinan según la fórmula 2-(ΔCt de la muestra-ΔCt del calibrador), donde los valores ΔCT del calibrador y la muestra se determinan sustrayendo el valor CT del gen diana del valor del gen de mantenimiento.

Una vez que se han determinado los niveles de expresión del ARNm de ceramidasa ácida, el primer método implica comparar los niveles de expresión con los determinados en una muestra de referencia. Mediante "muestra de referencia", como se usa en el presente documento, se entiende una muestra que muestra niveles de referencia del

ARNm de la ceramidasa ácida. Por ejemplo, la muestra de referencia puede ser una muestra de tumor obtenida de un paciente similar al tumor del paciente en estudio pero que no es resistente a inhibidores de ChoK. De forma alternativa, la muestra de referencia puede ser un conjunto de muestras de tejidos tumorales derivadas de varios pacientes que sufren del mismo tipo de tumor que está en estudio. Alternativamente, también es posible determinar los niveles de expresión de ARNm en una colección de muestras de tumores y determinar el valor mediana a partir de todos los valores individuales. El valor mediana resultante se usa después como referencia para determinar si los valores de expresión de ARNm obtenidos en la muestra en estudio se consideran aumentados o no.

Debido a la variabilidad entre sujetos (por ejemplo, aspectos referidos a la edad, raza, etc.) es muy difícil (si no prácticamente imposible) establecer valores de referencia absolutos para los niveles de ARNm. De esta manera, en una forma de realización particular, los valores de referencia para expresión “aumentada” o “disminuida” de los niveles de ARNm de ceramidasa ácida se determinan calculando los percentiles por medios convencionales que implica ensayar un grupo de muestras aisladas de sujetos normales (es decir, personas sin diagnóstico de NSCLC) para los niveles de expresión del ARNm de ceramidasa ácida. Los niveles “aumentados” se pueden entonces asignar, preferiblemente, a muestras en donde los niveles de expresión del ARNm de la ceramidasa ácida son iguales a o superan el percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o en exceso al percentil 60 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 70 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 80 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 90 en la población normal, e iguales a o en exceso al percentil 95 en la población normal.

Alternativamente, en otra forma de realización particular, los niveles de ceramidasa ácida se pueden determinar midiendo los niveles de la proteína ceramidasa ácida. La determinación de los niveles de expresión de las proteínas se puede llevar a cabo mediante técnicas inmunológicas tal como por ejemplo, ELISA, inmunotransferencia o inmunofluorescencia. La inmunotransferencia se basa en la detección de proteínas previamente separadas mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes e inmovilizadas en una membrana, generalmente nitrocelulosa mediante incubación con un anticuerpo específico y un sistema de revelado (por ejemplo, quimioluminiscencia). El análisis mediante inmunofluorescencia requiere el uso de un anticuerpo específico para la proteína diana para el análisis de la expresión. El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con enzimas de modo que los conjugados formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado producen la formación de complejos enzimáticamente activos. Puesto que uno de los componentes (el antígeno o el anticuerpo marcado) están inmovilizados sobre un soporte, los complejos antígeno-anticuerpo están inmovilizados sobre el soporte y de esta manera, se pueden detectar mediante la adición de un sustrato que es convertido por la enzima en un producto que es detectable mediante, por ejemplo, espectrofotometría o fluorometría.

De forma alternativa, la determinación de los niveles de expresión de la proteína ceramidasa ácida se puede llevar a cabo construyendo una micromatriz de tejidos (TMA) que contiene las muestras del paciente ensambladas, y determinando los niveles de expresión de la proteína por técnicas inmunohistoquímicas. La intensidad de la inmunotinción la pueden evaluar dos patólogos diferentes y puntuar usando criterios de valoración uniformes y claros, para mantener la reproducibilidad del método. Las discrepancias se pueden resolver por reevaluación simultánea. Brevemente, el resultado de la inmunotinción se puede registrar como expresión negativa (0) frente a expresión positiva, y expresión baja (1+) frente a expresión moderada (2+) y alta (3+), considerando la expresión en células tumorales y límite específico para cada marcador. Como criterio general, se seleccionaron los límites para facilitar la reproducibilidad y, donde fue posible, trasladar hechos biológicos.

Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a las proteínas diana con alta afinidad para detectar la cantidad de proteínas diana. Se prefiere, sin embargo, el uso de un anticuerpo, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo, Fv, Fab, Fab’ y F(ab’)2, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados.

Independientemente de si se determinan los niveles de ceramidasa ácida midiendo los niveles de expresión del ARNm o los niveles de proteína, se necesita comparar los valores obtenidos con los de una muestra de referencia. Una muestra de referencia puede corresponder a una muestra obtenida juntando cantidades iguales de un número de pacientes sanos. Una vez establecido el valor de esta muestra de referencia, se puede comparar el nivel de este marcador expresado en tejidos tumorales de pacientes con este valor mediana, y de esta manera ser asignado un nivel de “bajo”, “normal” o “alto”. La colección de muestras de la que deriva el nivel de referencia preferiblemente estará constituida por personas sanas de la misma edad que los pacientes. En cualquier caso puede contener un número diferente de muestras, Preferiblemente la colección debe ser suficiente para proporcionar un nivel de referencia fiable. Preferiblemente el número de muestras usado para hacer los valores de referencia es más de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500 muestras.

En una forma de realización particular, un aumento en expresión por encima del valor de referencia de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más comparado con el valor de referencia se considera como expresión “alta”. En una forma de realización particular, una disminución en expresión por debajo del valor de referencia de al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos comparado con el valor de referencia se considera como expresión “baja”.

Por otra parte, la determinación de los niveles de expresión de la proteína se puede llevar a cabo construyendo una micromatriz de tejido (TMA) que contiene las muestras del sujeto ensambladas, y determinar los niveles de expresión de las proteínas por técnicas de inmunohistoquímica bien conocidas en el estado de la técnica.

En otra forma de realización, la determinación de los niveles de ceramidasa ácida se lleva a cabo mediante la determinación de la actividad enzimática de ceramidasa ácida en la muestra en estudio. Los métodos para la determinación de la actividad enzimática de ceramidasa ácida son muy conocidos para el experto en la materia y se han descrito en detalle anteriormente.

Método para seleccionar una terapia personalizada para un paciente que padece cáncer

Los resultados proporcionados por los autores de la presente invención permiten la identificación de aquellos pacientes que padecen cáncer que van a mostrar resistencia al tratamiento con inhibidores de ChoK basado en los niveles de expresión de ceramidasa ácida en una muestra del paciente. De esta manera, en un aspecto adicional, también se divulga un método (de aquí en adelante el segundo método) para seleccionar una terapia personalizada para un paciente que padece cáncer que comprende determinar los niveles de ceramidasa ácida en una muestra de dicho paciente en donde si los niveles de expresión de la ceramidasa ácida en dicha muestra son más altos que en la muestra de referencia, el paciente es candidato a ser tratado con una combinación de un inhibidor de ChoK y un inhibidor de ceramidasa ácida.

Los pasos del segundo método son esencialmente como se ha descrito en el primer método e incluye la determinación de los niveles de ceramidasa ácida en una muestra del paciente (preferiblemente una muestra de tumor) en donde dichos niveles se pueden determinar determinando los niveles del ARNm, los niveles de proteína o la actividad ceramidasa ácida usando cualquier método previamente descrito.

Una vez que se han determinado los niveles de ceramidasa ácida y se han comparado con una muestra de referencia, niveles de ceramidasa ácida más altos que los encontrados en la muestra de referencia serán indicativos de que el paciente es un candidato para ser tratado con una combinación de un inhibidor de ChoK y un inhibidor de ceramidasa ácida.

En una forma de realización preferida, el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico.

Método para la identificación de compuestos que aumentan el efecto terapéutico de los inhibidores de ChoK

Los autores de la presente invención han observado que las células tumorales que muestran resistencia aumentada a inhibidores de ChoK muestran niveles aumentados de ceramidasa ácida. Por tanto, midiendo los niveles de aumento en ceramidasa ácida en respuesta a un compuesto determinado, será posible determinar si este compuesto es capaz de disminuir la resistencia a inhibidores de ChoK, es decir, aumentar el efecto terapéutico de estos compuestos.

De esta manera, en otro aspecto, también se divulga un método (de aquí en adelante tercer método de la invención) para la identificación de compuestos capaces de aumentar el efecto terapéutico de un inhibidor de ChoK para el tratamiento de cáncer que comprende los pasos de

(i) poner un contacto una célula tumoral que muestra resistencia a inhibidores de ChoK con un compuesto candidato y
(ii) determinar en dicha célula los niveles de ceramidasa ácida

en donde si los niveles de ceramidasa ácida en la célula después de haber sido tratada con un compuesto candidato son menores que antes del tratamiento, entonces el compuesto candidato se considera que es capaz de aumentar el efecto de los inhibidores de ChoK para el tratamiento del cáncer.

El tercer método comprende un primer paso que consiste en poner en contacto una célula tumoral que muestra resistencia a inhibidores de ChoK con un compuesto candidato. Se apreciará que dicho paso de poner en contacto se puede llevar a cabo in vivo en un animal no humano que contiene un tumor formado por células resistentes a inhibidores de ChoK o se puede llevar a cabo in vitro en un cultivo de células que muestran resistencia a inhibidores de ChoK.

Cuando el tercer método se lleva a cabo in vitro, se requiere un cultivo celular de células tumorales resistentes a inhibidores de ChoK. Los cultivos se pueden obtener de células tumorales que se han seleccionado previamente basadas en su resistencia a inhibidores de ChoK, de células tumorales sometidas previamente a una o más rondas de selección con concentraciones crecientes de un inhibidor de ChoK, con células que sobreexpresan ChoK o con células que expresan de forma constitutiva un ARNip específico para ChoK. Si las células se seleccionan mediante una o más rondas de selección con concentraciones crecientes de inhibidores de ChoK, cualquiera de los inhibidores de ChoK mencionado en los párrafos previos será adecuado para este fin.

Una vez que se ha establecido un cultivo de células resistentes a inhibidores de ChoK, el cultivo se pone en contacto con el compuesto candidato cuyo efecto sobre el aumento del efecto terapéutico del inhibidor de ChoK se va a medir. Según la invención, "poner en contacto" una célula con un compuesto candidato incluye cualquier manera posible de poner el compuesto candidato dentro de la célula que expresa la construcción de ADN. De esta manera, en el caso de que el compuesto candidato sea una molécula de bajo peso molecular, es suficiente añadir dicha molécula al medio de cultivo. En el caso de que el compuesto candidato sea una molécula de alto peso molecular (por ejemplo, polímeros biológicos tales como un ácido nucleico o una proteína), es necesario proporcionar los medios de modo que esta molécula tenga acceso al interior de la célula. En el caso de que la molécula candidata sea un ácido nucleico, se pueden aplicar medios de transfección convencionales usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (fosfato de calcio, DEAE-dextrano, polibreno, electroporación, microinyección, fusión mediada por liposomas, lipofección, infección por retrovirus y transfección biolística). En el caso de que el compuesto candidato sea una proteína, la célula se puede poner en contacto directamente con la proteína o con el ácido nucleico que la codifica acoplado a elementos que permiten su transcripción/traducción una vez que están en el interior de la célula. De forma alternativa, es posible poner la célula en contacto con una variante de la proteína que se va a estudiar que se ha modificado con un péptido que puede fomentar la translocación de la proteína al interior de la célula, tal como el péptido Tat derivado de la proteína TAT del VIH-1, la tercera hélice de la proteína de homeodominio Antennapedia de D. melanogaster, la proteína VP22 del virus del herpes simple y oligómeros de arginina (Lindgren, A. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, Mol. Therapy 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393).

El compuesto que se va a ensayar preferiblemente no se aísla sino que forma parte de una mezcla más o menos compleja derivada de una fuente natural o formando parte de una biblioteca de compuestos. Ejemplos de bibliotecas de compuestos que se pueden ensayar según el método de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, peptidotecas que incluyen tanto péptidos como análogos de péptidos que comprenden D-aminoácidos o péptidos que comprende enlaces no peptídicos, genotecas de ácidos nucleicos que incluyen ácidos nucleicos con enlaces tipo fosfotioato no fosfodiéster o ácidos péptido nucleicos, bibliotecas de anticuerpos, de hidratos de carbono, de compuestos de bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, o peptidomiméticos y similares. En el caso de que se use una biblioteca de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, la bibliteca se puede preseleccionar de modo que contenga compuestos que pueden acceder al interior de la célula más fácilmente. Los compuestos se pueden seleccionar de esta manera en base a ciertos parámetros tal como tamaño, lipofilicidad, hidrofilicidad, capacidad de formar puentes de hidrógeno.

Los compuestos que se van a ensayar alternativamente pueden formar parte de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser una fuente animal, vegetal obtenida de cualquier medio, incluyendo pero no limitado a extractos de tierra, aire, organismos marinos y similares.

En un segundo paso, el tercer método comprende la determinación de los niveles de ceramidasa ácida de las células tratadas con el compuesto candidato. La determinación de los niveles de ceramidasa ácida se puede realizar, como se ha descrito previamente, determinando los niveles de ARNm, los niveles de proteína o la actividad ceramidasa ácida en extractos de las células usando cualquiera de los métodos bioquímicos descritos previamente. Aquellos compuestos que produzcan un descenso en los niveles de ceramidasa ácida se seleccionarán como compuestos candidatos para aumentar la respuesta de células tumorales a inhibidores de ChoK.

En el caso de que el compuesto candidato forme parte de una mezcla más o menos compleja, la invención comprende además uno o varios pasos (iii) de fraccionar dicha mezcla y la repetición de los pasos (i), (ii) y (iii) del método de la invención un número variable de veces hasta que se aísle el compuesto de la mezcla responsable de fomentar la actividad promotora de la transcripción. Los métodos para fraccionar los compuestos presentes en una mezcla incluyen cromatografía (cromatografía de capa fina, de gas, de exclusión molecular en gel, de afinidad), cristalización, destilación, filtración, precipitación, sublimación, extracción, evaporación, centrifugación, espectrometría de masa, adsorción y similares.

En otra forma de realización, el método de cribado se lleva a cabo in vivo en un modelo animal de cáncer obtenido implantando en un animal no humano células tumorales que muestran resistencia al inhibidor de ChoK. Las células se pueden obtener usando cualquiera de los métodos previamente mencionados. Las células resistentes a inhibidores de ChoK se pueden implantar en cualquier animal no humano de cualquier especie, preferiblemente mamíferos y, más preferiblemente, primates (mono, babuino, chimpancé y similares), roedores (ratón, rata, conejo, cobaya, hámster y similares) o un cerdo. Para facilitar la implantación de las células tumorales, el animal puede ser un animal inmunodeficiente. Las células tumorales que se pueden implantar en el organismo receptor incluyen células tumorales circulantes, células troncales tumorales, líneas celulares derivadas de la inmortalización de células tumorales circulantes, células tumorales micrometastásicas, líneas celulares derivadas de la inmortalización de células tumorales micrometastásicas, líneas celulares derivadas de células tumorales inmortalizadas que han sido previamente purificadas de tumores sólidos, células tumorales primarias de tumores sólidos, un trozo de tumor reciente que se ha cortado de un tumor sólido, células tumorales primarias, líneas celulares derivadas de células

inmortalizadas que se han purificado previamente de metástasis clínicas (es decir, la línea celular PC3) y cualquier combinación de esas.

Una vez se ha obtenido el modelo animal que lleva un tumor formado por células resistentes a inhibidores de ChoK, el primer paso comprende poner en contacto dichas células tumorales con un compuesto candidato. El paso de poner en contacto se puede llevar a cabo administrando el compuesto candidato al animal en condiciones adecuadas para que el compuesto acceda a las células tumorales. La administración de los compuestos de prueba se puede realizar mediante cualquier vía adecuada incluyendo por ejemplo, administración oral, transdérmica, intravenosa, infusión, intramuscular etc.

Una vez el tumor se ha puesto en contacto con el compuesto candidato, se determinan los niveles de expresión de ceramidasa ácida en dicho tumor como se ha descrito previamente, es decir, determinando los niveles del ARNm de ceramidasa ácida, los niveles de proteína ceramidasa ácida o la actividad ceramidasa ácida.

El tercer método de la invención implica comparar los niveles de ceramidasa ácida en las células tumorales después del tratamiento con el compuesto candidato con los niveles observados antes del tratamiento. Como se usa en el presente documento, se considera que la ceramidasa ácida son menores cuando muestran un descenso de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100%, es decir los niveles de ceramidasa ácida son indetectables.

La invención se describe ahora en detalle por medio de los siguientes métodos y ejemplos que se deben considerar como meramente ilustrativos y no limitantes del ámbito de la invención.

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Para este análisis se usaron muestras de tejido de cáncer de pulmón de 84 pacientes seleccionados al azar que sufrieron extirpación quirúrgica de NSCLC entre 2001 y 2004 y que fueron seguidos por la división de Oncología Médica del Hospital de La Paz en Madrid. No se administró terapia adyuvante a estos pacientes. El estudio fue aprobado por el comité de ética de investigación clínica de los hospitales, y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes.

Cultivos primarios de tumores NSCLC

Se disociaron los tejidos extirpados de pacientes con NSCLC (kit de molido de tejido por tamizado con disociación de células CD1, SIGMA), y las células obtenidas se sembraron en placas de 24 pocillos (BD, Falcon, Bioscience, San Jose, CA, EE UU). Las células se trataron con concentraciones crecientes (0, 0,5, 1, 5, 10 y 20 μM) de cDDP, taxol, vinorelbina, gemcitabina y MN58b durante 10 días en DMEM:F12HAM (Ref: D8437, SIGMA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (SBT, Life Technologies, Grand Island, NY). La población final persistente en cada pocillo se cuantificó mediante el método de violeta cristal como se ha descrito previamente (Rodríguez-González, A. et al., Oncogene, 22:8803-8812).

Compuestos

MN58b se ha descrito en el documento WO9805644 y corresponde a dibromuro de 1,4-(4-4'-bis-((4-(dimetilamino)piridinio-1-il)metil)difenil)butano. RSM-932A se ha descrito en la solicitud de patente de EE UU US2007185170 y corresponde a dibromuro de 1,1'-(bifenil- 4,4'- diilmetilen) bis [4-(4-cloro-N-metilanilino-) quinolinio]. NOE ha sido descrito por Sugita et al (Biochim.Biphys.Acta, 1975, 398:125-131) y corresponde a N-oleoiletanolamina (NOE). D-NMAPPD corresponde a 3-etoxi-1-(2-metilaminoetil)-3-fenil-indol-2-ona (CAS 35922-06-6) y ha sido descrito por Raisova, M., et al. (FEBS Lett., 2002, 516:47-52) y Selzner, M. et al. (Cancer Res., 2001, 61:1233-1240). TRAIL se ha descrito previamente y corresponde al dominio extracelular de TRAIL humano (aminoácidos 95-281).

Aislamiento de ARN y análisis de expresión génica

Los ARN de las biopsias seleccionadas se aislaron para micromatrices y QT-PCR, usando el mini kit RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se prepararon y la matriz se hibridó según el manual técnico de Análisis de Expresión GeneChip de Affymetrix. Los procedimientos de hibridación a Affymetrix U133plus2 GeneChips (series de 54.614 sondas, que representan 47.000 transcritos), tinción, lavados y escaneado se llevaron a cabo en el Centro de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, España) como se describe en www.affymetrix.com (Affymetrix, Santa Clara, CA). La señal de razón logarítmica estima la

magnitud y dirección del cambio de un transcrito. La escala logarítmica usada es base 2, de esta manera una señal de razón logarítmica de 1,0 indica un aumento del nivel del transcrito de 2 veces y -1,0 indica un descenso de dos veces. Una señal de razón logarítmica de cero indicaría que no hay cambio.

Los genes se clasificaron según los procesos biológicos usando el software Ingenuity Pathway (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com). Los genes diferencialmente regulados entre resistentes y sensible se sobrepusieron en una red molecular global desarrollada a partir de la información contenida en la base de conocimiento de Ingenuity Pathway. Se generaron después redes de genes expresados diferencialmente de forma algorítmica basadas en su conectividad y la red final creada es una representación gráfica de las relaciones moleculares entre genes. Todas las conexiones representadas están apoyadas por referencias publicadas, libros o por información canónica almacenada en la base de conocimiento de Ingenuity Pathway (Sorensen G, BMC Genomics, 2008, 9:114; Kim SY et al., Stat. Methods Med. Res., 2006, 15:3-20).

Validación por PCR cuantitativa a tiempo real de los análisis de micromatrices

Se usó 1 µg de ARN para generar ADNc usando el kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems), y se llevó a cabo PCR cuantitativa en tiempo real en triplicado usando el detector de secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems). Se amplificaron el ARNm de GAPDH y ribosómico de 18S como controles internos. Las sondas usadas para la amplificación eran de Applied Biosystems como Ensayos de Expresión Génica Taqman (ASAH1: sonda Taqman HS00602774_M1, ASAH2: sonda Taqman HS00184096_M1 y ASAH3: sonda Taqman HS00370322_M1; DUT: sonda Taqman HS00798995_S1, TYMS: sonda Taqman HS00426591_M1, UPP1: sonda Taqman HS00427695_M1, RRM2: sonda Taqman HS00357247_G1). Se usó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak KJ., Methods. 2001; 25:402-8) para calcular la expresión relativa de cada gen.

Cultivo de células y generación de líneas celulares resistentes a inhibidores de ChoK

Todas las líneas celulares usadas en este estudio se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura (37ºC), humedad (95%) y dióxido de carbono (5%). Las células epiteliales bronquiales primarias humanas, NHBE (BEC) (Cambrex, CC-2541) se hicieron crecer en BEGM (medio de crecimiento de células epiteliales bronquiales) BulletKit (Cambrex, CC-3170). Las células epiteliales mamarias primarias humanas, HMEC (Clonetics, CC-2551) se hicieron crecer en medio MEBM suplementado con un bullet kit (Clonetics, CC-3150). Las células epiteliales de cáncer de pulmón no microcítico H460 y H1299, y las líneas celulares de cáncer de pulmón microcítico H510 y H82 se mantuvieron en RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% (SBF) (Life Technologies, Grand Island, NY).

Las líneas celulares resistentes a MN58b y RSM-932A (identificadas como MN58R y RSM-932A-R, respectivamente) se generaron mediante exposición continua prolongada a concentraciones crecientes de cada fármaco. Se mantuvo en cultivo un control paralelo (H460 parental) de la línea celular en ausencia de los compuestos durante el mismo tiempo.

Ensayos de proliferación celular

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (BD, Falcon, Bioscience, San Jose, CA, EE UU) a una densidad de 6000 células/pocillo, y se incubaron durante 24 horas en condiciones estándar. A continuación, las células se trataron con diferentes concentraciones de inhibidores de ChoK (cuadruplicados de cada concentración) y se mantuvieron durante 72 horas. La cuantificación del número de células que quedaron en cada pocillo se llevó a cabo mediante el método de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Se lee la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE UU). Para la sensibilización con inhibidor de ceramidasa ácida, las células se pretrataron 4 horas con la CI50 correspondiente para NOE antes del tratamiento con inhibidores de ChoK. NOE (N-oleoil etanolamina) se obtuvo de Calbiochem (La Jolla, CA, EE UU).

Xenoinjertos y ensayos de inhibición de crecimiento tumoral in vivo

Se resuspendieron las células indicadas en DMEM justo antes de la inoculación (10^6 células/0,1 ml) y se inyectaron por vía subcutánea en ratones inmunosuprimidos nu/nu. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio según las directrices del gobierno español. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 0,1 cm^3, los ratones se distribuyeron al azar en grupos control y tratado. Los tratamientos con los agentes antitumorales (y vehículo para los ratones control) se realizaron por vía i.p. siguiendo los programas indicados. Los tumores se controlaron tres veces a la semana midiendo los diámetros mayor (D) y menor (d), y se calculó el volumen tumoral mediante $V=(D*d^2)/2$. El análisis estadístico de cambios significativos en el crecimiento tumoral se calculó usando el software SPSS v. 13.0.

Detección de apoptosis usando anexina V

Se analizó la muerte celular por citometría de flujo usando el kit de apoptosis Aposcreen Annexin V (Southern Biotech) según los procedimientos del fabricante. Las células se sembraron a $4x10^5$ células por pocillo en seis pocillos. Veinticuatro horas después, las células se trataron con los compuestos indicados. Las células se lavaron

dos veces con PBS frío y después de eliminarlo las células se resuspendieron en tampón de unión 1X frío a una concentración de $1x10^6$ a $1x10^7$ célulals/ml. Se recogieron 100 µl de estas células en un tubo de citometría de flujo y se añadieron 10 µl de anexina V. Después de agitar suavemente, los tubos se incubaron durante 15 minutos en hielo, protegidos de la luz. Sin lavar, se añadieron 380 µl de tampon de union 1X a cada muestra antes de 10 µl de yoduro de propidio. Las células se analizaron inmediatamente por citometría de flujo.

Análisis del ciclo celular por FACS

Se realizó el análisis del ciclo celular en células (1 X 106) fijadas en etanol al 70% y teñidas con yoduro de propidio 4 µg/ml, usando un Beckton Dickinson FACs SCAN. Los datos de citometría se analizaron usando el programa de análisis Cell Quest (Becton Dickinson) y software FlowJo.

Determinación de los niveles intracelulares de ceramida

Se sembraron células a $1x10^5$ células por pocillo en placas de seis pocillos y se marcaron los lípidos con [^{14}C]-Serina durante dos días. Las células se trataron sin cambiar el medio marcado durante 24 horas. Después se extrajeron los lípidos y se analizaron por TLC usando un protocolo previamente descrito (van Echten-Deckert, G. (2000) Sphingolipid extraction and analysis by thin-layer chromatography. *Methods Enzymol*, **312**, 64-79). Antes de la extracción de lípidos, las células se mantuvieron a -20ºC. Las células se recogieron en metanol y los lípidos se extrajeron en una relación final de cloroformo-metanol-agua de 60:30:6 (v/v/v). La fase orgánica se secó en un concentrador con flujo de N_2 a 37ºC. Las muestras se resuspendieron en cloroformo-metanol (1:1, v/v) y se aplicaron a placas de TLC. Los lípidos se separaron usando una mezcla de solventes de cloroformo-metanol-amonio 2M (60:45:4, v/v/v). La cuantificación se llevó a cabo por Instantimager (Pakard, Meriden, CT, EE UU).

Análisis LC-MS de ceramida y dihidroceramida

Las células se sembraron a una densidad de of $8x10^5$ células por placa p100. Veinticuatro horas después, las células se trataron con los compuestos indicados. Después, las células se lavaron en PBS, se recogieron por tripsinización corta. Se tomó una alícuota de las células para medidas de proteínas. Se prepararon y analizaron extractos de esfingolípidos, fortificados con estándares internos (*N*-dodecanoilesfingosina, *N*-dodecanoilglucosilesfingosina y N-dodecanoil esfingosilfosforilcolina, 0,5 nmol de cada una). La cromatografía líquida-espectrometría de masas consitía en un sistema Waters Aquity UPLC conectado a espectrómetro de masas de tiempo de vuelo acelerado ortogonal Waters LCT Premier (Waters, Millford, MA), operado en modo de ionización de electrospray positivo. Se adquieron espectros de barrido totales de 50 a 1500 Da y los espectros individuales se sumaron para producir puntos de datos cada 0,2 s. Se mantuvieron la precisión de masa y reproducibilidad usando un espray de referencia independiente a través de interferencia LockSpray. La columna analítica era una Acquity UPLC BEH 100 mm × 2,1mm de di, 1,7 µm C8 (Waters). Las dos fases móviles fueron fase A: MeOH/H_2O/HCOOH (74:25:1 v/v/v); fase B: MeOH/HCOOH (99/1 v/v), ambas también contenían formiato de amonio 5 mM. Se programó un gradiente -0,0 min B al 80%; 3 min, B al 90%; 6 min, B al 90%; 15 min, B al 99%; 18 min, B al 99%; 20 min, B al 80%. La velocidad de flujo fue 0,3 ml min^{-1}. La columna se mantuvo a 30ºC. La cuantificación se llevó a cabo usando el cromatograma de ión extraído de cada compuesto, usndo ventanas de 50 mDa. El intervalo dinámico lineal se determinó inyectando mezclas de estándares. La identificación positiva de los compuestos se basó en la medida precisa de masa con un error <5 ppm y su tiempo de retención de LC, comparado con el de un estándar (±2%).

Determinación de la expresión de proteína mediante inmunotransferencia

El análisis por inmunotransferencia de cantidades iguales de lisados celulares (30 µg) se realizó usando cada anticuerpo correspondiente. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 2 horas en leche desnatada en polvo al 5% en T-TBS. La determinación de ASAH1 se llevó a cabo usando un anticuerpo monoclonal (1:250) obtenido de BD Transduction Laboratories (Ref. 6123012). Como control de carga, las membranas se ensayaron contra la α-tubulina (Sigma T9026). La determinación de caspasa-3 y PARP se llevó a cabo usando anticuerpos anti-caspasa-3 y anti-PARP (Santa Cruz Biotecnología, Santa Cruz, CA).

Ensayo de índice de combinación

Los ensayos de crecimiento de MTT descritos anteriormente se usaron para evaluar cisplatino en combinación con inhibidores de ChoK. Tras una incubación durante la noche, se añadió cisplatino en concentraciones variables y se incubó durante 3 horas. Se añadieron después inhibidores de ChoK en concentraciones crecientes durante 40 horas, y después, se cultivaron las células durante 24 horas adicionales en medio de cultivo fresco. Los resultados de los ensayos de combinación en términos de sinergia, aditividad o antagonismo se analizaron usando el método de índice de combinación de isobolograma de Chou Talalay (Chou TC. et al., Trends Pharmacol Sci, 1983, 4:450-4). Los intervalos de IC se establecen a partir de los ya descritos (Chou TC. et al., *supra.*). Los índices de combinación (IC) <1 son indicativos de interacciones sinergísticas entre los dos agentes, las interacciones aditivas se indican por IC=1, y IC>1 indica antagonismo entre ellos. Los efectos cooperativos se consideran como interacciones con un

IC<1,0. Los efectos cooperativos se consideran como interacciones con un IC < 1,0. Todos los experimentos se realizaron en cuadruplicado.

Análisis estadístico

Se determinó la correlación de las tasas de sucesos usando la estadística estándar de Pearson ji cuadrado. Todos los valores de P descritos son bilaterales. Se definió la significancia estadística como P<0,05. Los análisis estadísticos se realizaron usando el software SPSS, versión 13.0 (Inc., Chicago, Illinois).

EJEMPLO 1

Farmacorresistencia intrínseca a la inhibición de ChoK por MN58b en pacientes de NSCLC

Para identificar el posible mecanismo de farmacorresistencia en la inhibición específica de ChoK por MN58b, se realizó un estudio preclínico en 84 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) del hospital La Paz en Madrid (España). Para este fin, se establecieron cultivos primarios de tumores extirpados de estos pacientes y se cultivaron durante 10 días, en los que se trataron con concentraciones crecientes del inhibidor específico de ChoK MN58b hasta 20 μM, una concentración que representa de 7 a 50 veces la CI50 para varias líneas celulares derivadas de tumores generadas de tumores de pulmón humano (véase la tabla 6). Como se muestra en la figura 1, se observaron diferentes respuestas a este tratamiento. Por una parte, una serie de 39 muestras (el 46,4%) eran completamente resistentes a MN58b, ya que cerca del 100% de células permanecieron vivas a la máxima concentración del fármaco el día 10. Por otra parte, los otros 45 tumores (el 53,6%) eran sensibles al efecto antiproliferativo de MN58b. Entre ellos, se consideró un grupo de 15 muestras como muy sensible a MN58b (el 33,3%), ya que la viabilidad celular estaba totalmente anulada incluso a concentraciones bajas del fármaco el día 10. Por último se consideró un grupo de 30 muestras (el 66,7%) como parcialmente sensibles a MN58b, permaneciendo alrededor del 50% de las células vivas al final del tratamiento.

Además, los cultivos primarios de estos pacientes también se trataron con terapias convencionales usadas en NSCLC (Belani CP, Lung Cancer. 2005, 50 Suppl 2: S3-8). De esta manera, la viabilidad celular de 62 muestras de estos pacientes se trataron con cisplatino, las mismas 62 muestras con taxol, 52 de estas muestras también se trataron con gemcitabina, y 39 con vinorelbina. Como se muestra en la tabla 3, se encontró que MN58b era el fármaco anticanceroso más eficaz en estas condiciones, ya que el 55,5% eran sensibles al fármaco, seguido por cisplatino con el 50% de los tumores que respondía.

FÁRMACO	MUESTRAS TOTALES	SENSIBLES	RESISTENTES
MN58b	63	35 (55%)	28 (44,4%)
cDDP	62	31 (50%)	31 (50%)
Taxol	62	27 (43,5%)	35 (56,5%)
Vinorelbina	39	15 (38,5%)	24 (61,5%)
Gemcitabina	52	18 (34,6%)	34 (65,4%)

Tabla 3. Incidencia de resistencia de tumores NSCLC a varios agentes quimioterapéuticos.

Además, se realizó un análisis estadístico para la correlación de la resistencia entre los diferentes fármacos. La resistencia a cisplatino estaba significativamente asociada con resistencia a taxol, vinorelbina y gemcitabina. También se observaron resultados similares cuando se analizó la resistencia a taxol. Además, la resistencia a vinorelbina estaba asociada con resistencia a cisplatino y taxol, y la resistencia a gemcitabina estaba asociada con resistencia a taxol. Sin embargo, la única droga cuya respuesta no estaba asociada a resistencia a ningún otro agente quimioterapéutico era MN58b (Tabla 4).

	Correlaciones	MN58b	cDDP	Taxol	Vinorelbina	Gemcitabina
MN58b	Correlación de Pearson	1	-0,096	-0,09	-0,124	0,133
	Sig. (bilateral)		0,46	0,488	0,45	0,346
	N	63	62	62	39	52
cDDP	Correlación de Pearson	-0,096	1	0,319(*)	0,469(*)	0,074
	Sig. (bilateral)	0,46		0,012	0,003	0,603
	N	62	62	62	39	52
Taxol	Correlación de Pearson	-0,09	0,319(*)	1	0,421(*)	0,364(*)
	Sig. (bilateral)	0,488	0,012		0,008	0,008
	N	62	62	62	39	52
Vinorelbina	Correlación de Pearson	-0,124	0,469(*)	0,421(**)	1	0,174
	Sig. (bilateral)	0,45	0,003	0,008		0,304
	N	39	39	39	39	37
Gemcitabina	Correlación de Pearson	0,133	0,074	0,364	0,174	1
	Sig. (bilateral)	0,346	0,603	0,008	0,304	
	N	52	52	52	37	52

* Significancia Estadística (bilateral) a 0,05
** Significancia Estadística (bilateral) a 0,01
Tabla 4. Correlación entre la resistencia a los agentes quimioterapéuticos en tumores de pacientes con NSCLC.

Estos resultados sugieren que los pacientes con NSCLC que no responden a ninguno de estos tratamientos antitumorales podrían responder de forma eficaz a la terapia basada en la inhibición de ChoK ya que su mecanismo para la resistencia es diferente que para los otros cuatro fármacos investigados. Por otra parte, estos resultados también sugieren la existencia de un sistema de quimiorresistencia particular para la inhibición de ChoK.

EJEMPLO 2

Identificación de los mecanismos de farmacorresistencia para la inhibición de ChoK en NSCLC

Para estudiar la diferencia genética de tumores que eran intrínsecamente resistentes a la inhibición de ChoK de aquellos que eran sensibles, se analizó el perfil transcripcional de tumores de pacientes representativos con NSCLC. Se uso la micromatriz Affymetrix Gene Chip Human Genome HG-U133 plus 2 para comparar un grupo de 5 pacientes con tumores resistentes a MN58b, frente a otro grupo de 5 pacientes con tumores muy sensibles a este tratamiento. Esta plataforma de micromatriz contiene 54.614 series de sondas, que representan 47.000 transcritos. Considerando un -2≤ veces de cambio≥ 2 (-1≤razón de señal≥1), 912 transcritos elegibles mostraron una regulación diferencial significativa en muestras de tumores resistentes comparados con los que responden. Para interpretar la significación biológica de genes diferencialmente expresados, se realizó un análisis de la ontología génica usando Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systems) (Sorensen G., BMC Genomics. 2008, 9:114).

Las interacciones entre los genes regulados encontrados se investigaron más y se determinaron 32 redes diferencialmente moduladas en las que responden con puntuaciones asignadas por el software de más 20, lo que indica la relevancia de estos genes en la entrada en la hoja de datos y una buena conectividad entre ellos. Las vías de mayor relevancia indican que las funciones principales de los genes implicados en estas redes están relacionadas con el ciclo celular, muerte celular, cáncer, respuesta inmune, metabolismo de lípidos y metabolismo de fármacos.

Para evitar tasas de falsos positivos debido al alto número de transcritos presentes en la micromatriz, se usó un segundo análisis estadístico conocido como “B”, que permite filtraciones adicionales de genes cuya expresión diferencial es estadísticamente significativa dentro de todo el experimento (Kim SY., Stat Methods Med Res., 2006, 15:3-20). En este experimento, el uso de muestras humanas hizo este análisis muy restrictivo, encontrando 50 genes que cumplían los criterios (B > 0). Dieciocho genes coincidían en ambos análisis (expresión diferencial de dos veces, y B>0), estando cuatro de ellos sobreexpresados en las muestras consideradas resistente a MN58b, y 14 disminuidos. Entre estos genes, la ceramidasa ácida (ASAH1) estaba significativamente aumentada en muestras resistentes tras estos dos análisis.

EJEMPLO 3

Expresión de ceramidasa ácida en líneas celulares de NSCLC de tumores resistentes a MN58b

Como se ha mencionado anteriormente, la ceramidasa ácida (ASAH1), una enzima implicada en el metabolismo lipídico, se encontró significativamente sobreexpresada según cualquier criterio de selección en aquellos tumores que eran resistentes a MN58b.

Se estudió en detalle el comportamiento de las diferentes ceramidasas en líneas celulares de NSCLC resistentes de MN58b por micromatriz. Como se muestra en la tabla 5, la ceramidasa que se modula en tumores NSCLC

resistentes a MN58b sólo es la ceramidasa ácida. Además, se ha observado que, aunque no de una manera significativa tras la estadística B, una enzima identificada llamada similar a ceramidasa ácida que parece tener la misma localización y función que la ceramidasa ácida, también está aumentada en muestras resistentes (Tabla 5).

TIPOS	LOCALIZACIÓN	Micromatrices
ASAH1 (Ceramidasa ácida EC 3.5.1.23)	Lisosoma	1,94 (2,42* / 1,72* / 1,70*)
ASAH2 (Ceramidasa Neutra EC 3.5.1.23)	Membrana celular (Mitocondria)	SC (1,03)
ASAH3 (Ceramidasa Alcalina EC 3.5.1.23)	Retículo Endoplásmico	SC (1,15)
ASAHL (Similar a ceramidasa ácida EC 3.5.1.-)	Lisosoma	1,94 (2,09 / 1,78)

Valor medio de la expresión génica. Datos de sondas diferentes presentes en la micromatriz. SC: sin cambios diferenciales. * Significación estadística.

Tabla 5. Perfil de expresión génica de las diferentes ceramidasas determinada en el análisis de micromatriz.

Para validar que los cambios observados en el análisis de micromatrices corresponden a cambios reales en la expresión del gen ASAH1, se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real en este gen usando una sonda taqman específica (ensayo de Applied Biosystems Hs00602774_m1), y sobre las ceramidasas neutra y alcalina (Applied Biosystems, ensayos respectivos Hs00184096_m1 y Hs00370322_m1) como controles negativos. Para este fin, las 5 muestras tanto de tumores resistentes como respondedores se usaron en el análisis de micromatriz, así como un nuevo lote de 5 muestras de pacientes adicionales en cada caso se usaron para este análisis. La PCR a tiempo real reveló que ASAH1, pero no ASAH2 o ASAH3, se expresaba diferencialmente en tumores resistentes confirmando los resultados obtenidos en el análisis de micromatriz (Figura 2). Estos resultados verifican que la ceramidasa ácida aumenta específicamente en pacientes con tumores resistentes a inhibición de ChoK y es la base para el modelo propuesto para un mecanismo de resistencia a inhibición de ChoK (Figura 3). Por tanto, la inhibición de la actividad ChoK por inhibidores específicos (ChoKI) induce una reducción en los niveles de PCho. Como consecuencia, se activa una vía alternativa para la generación de PCho que consiste en la actividad aumentada de la esfingomielinasa (SMLasa). Esta enzima genera tanto PCho como ceramidas. Este último metabolito es un inductor potente de la muerte celular. La resistencia a la acción de ChoKI se puede producir si la actividad de la enzima responsable para la conversión de ceramida en esfingosinas aumenta. Esta enzima es la ceramidasa ácida (ASAH1) (Figura 3).

EJEMPLO 4

<u>La inhibición de la ceramidasa ácida sensibiliza las células de NSCLC a los inhibidores de ChoK</u>

Primero, se investigaron los niveles de ASAH1 en una serie de cuatro líneas celulares de tumores de pulmón humanos (H460 y H1299 como líneas celulares de NSCLC y H510 y H82 como SCLC). Como se muestra en la Figura 4, las líneas celulares derivadas de SCLC muestran niveles de ceramidasa ácida similares a los encontrados en células senescentes BEC control, y mucho más bajos que los niveles encontrados en células de NSCLC. De forma interesante, estas líneas celulares de SCLC también muestran los niveles más altos de colina quinasa alfa, y eran mucho más sensibles a la inhibición de ChoK que las células de NSCLC (Tabla 6), lo que sugiere que los niveles bajos de ceramidasa ácida podrían ser responsable de al menos parte de la respuesta extremadamente alta a inhibidores de ChoK de las células SCLC.

Línea celular	**CI50 48h**	**CI50 72h**	**CI50 144h**
BEC primarias	40,5 ± 6,2	18,3 ± 4,8	4,2 ± 0,8
HMEC primarias	44,7 ± 4,95	20,9 ± 2,7	3,4 ± 0,13
H1299	10,3 ± 2,5 (**4**)	2,7 ± 0,7 (**8**)	0,9 ± 0,1 (**4**)
H460	7,03 ± 2,03 (**6**)	2,6 ± 0,8 (**8**)	1,1 ± 0,1 (**3**)
H510	1,1 ± 0,1 (**41**)	0,4 ± 0,05 (**53**)	0,1 ± 0,03 (**27**)
H82	1,9 ± 0,2 (**24**)	0,8 ± 0,04 (**27**)	0,27 ± 0,01 (**12**)

Tabla 6. Sensibilidad a inhibición de ChoK de diferentes líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón humano.

De esta manera, la interrupción en los niveles de ceramidasa ácida puede permitir a los inhibidores de ChoK tener un mejor efecto en estas células. Para verificar esta hipótesis, se usó el inhibidor de ceramidasa ácida previamente caracterizado, N-oleoiletanolamina (NOE) (Grijalvo S., Chem Phys Lipids. 2006; 144:69-84), para investigar si la inhibición de la ceramidasa ácida sensibiliza las líneas de células tumorales a los inhibidores de ChoK. Para este fin, las células H460 se pretrataron con NOE durante tres horas para inhibir la ceramidasa ácida. Después, las células se trataron con concentraciones crecientes de inhibidores de ChoKα MN58b y RSM-932A y se determinó la concentración a la que el 50% del total de la población celular estaba afectada (CI50). Como se muestra en la tabla 7, el pretratamiento de células H460 con el inhibidor de la ceramidasa ácida NOE, sensibilizó las células a la

inhibición de ChoKα. Estos resultados son consistentes con la asunción de que niveles aumentados de ceramidasa ácida pueden otorgar un mecanismo de farmacorresistencia en la inhibición de ChoK.

H460	NOE	MN58b	NOE + MN58b	RSM-932A	NOE + RSM-932A
IC_{50} 72h	32,5 µM	0,28 µM	0,06 µM	1,11 µM	0,35 µM

Tabla 7.- Inhibición de ceramidasa ácida con NOE sensibiliza células humanas de NSCLC a la inhibición de ChoK inhibición (4,7 veces de inducción para MN58b y 3,2 para RSM-932A).

Con el fin de validar estos resultados, se realizaron experimentos adicionales usando otro inhibidor conocido de ceramidasa ácida, CAY10466 (CAY) (D-NMAPPD (1R,2R)-B13; 10006305 Cayman Chemical) (punto VIII en la tabla 2) y un inhibidor de la ceramidasa alcalina como control negativo D-eritro-MAPP (DMP) (10165 Cayman Chemical). Se pretrataron células H460 con estos compuestos durante tres horas para inhibir las ceramidasas. Después, se trataron las células con concetraciones crecientes de inhibidores de ChoKα MN58b y RSM-932A y se determinó la concentración a la que el 50% de la población total de células estaba afectada (CI50). Como se muestra en la tabla 8, el pretratamiento de células H460 con el inhibidor de ceramidasa ácida D-NMAPPD, pero no con D-eritro-MAPP, sensibilizó las células a inhibición de ChoKα. Estos resultados son consistentes con la asunción que los niveles aumentados de ceramidasa ácida pueden conferir un mecanismo de farmacorresistencia a la inhibición de ChoK. Además, el uso combinado de inhibidores de ChoK e inhibidores de ceramidasa ácida proporciona una actividad anticancerosa adicional más fuerte.

Tratamiento de células H460		**CI_{50} (72h) µM**
Inhibidor de colina quinasa	Inhibidor de ceramidasa ácida	
-	CAY	28
-	DEM	31
MN58b	-	0,28
RSM-932A	-	1,11
MN58b	CAY	0,065
RSM-932A	CAY	0,22
MN58b	DEM	0,32
RSM-932A	DEM	1,12

Tabla 8 - La inhibición de ceramidasa ácida con el inhibidor específico de ceramidasa ácida CAY10466 (CAY) sensibiliza células NSCLC humanas a inhibición de ChoK (inducción de 4,3 veces para MN58b y 5 veces para RSM-932A) cuando se compara con la inhibición de la ceramidasa alcalina con el inhibidor específico de ceramidasa alcalina D-eritro-MAPP (DMP).

EJEMPLO 5

Generación de células de NSCLC resistentes a inhibidores de ChoK

Para estudiar más el mecanismo que subyace en la resistencia a la inhibición de ChoK, así como la implicación de la ceramidasa ácida en este efecto, se usó la línea de células H460 derivada de NSCLC humano para una serie de experimentos in vitro. Manteniendo esta línea celular en cultivo durante 9 meses con dosis ligeramente crecientes de MN58b y un inhibidor de ChoKα de segunda generación, RSM-932A, se establecieron nuevas líneas celulares con resistencia adquirida a estos inhibidores de ChoKα. También se estableció una línea celular control (H460 parental) manteniendo H460 en cultivo durante el mismo tiempo sin tratamiento. De esta manera, las células establecidas resistentes a MN58b (H460 MN58R) y resistente a RSM-932A (H460 RSM-932A-R) no estaban afectadas a concentraciones donde células H460 normales o células control H460 parental estaban drásticamente afectadas. Por consiguiente, la concentración necesaria para inhibir el 50% de la proliferación celular (CI50) en estas células resistentes con MN58b y RSM-932A es significativamente mayor que el observado en células control (Tabla 9). Además, se encontró una fuerte resistencia cruzada entre ambos inhibidores de ChoK como se esperaría debido a los mecanismos de acción similares de estos dos fármacos antitumorales (Tabla 9).

	CI50	
	(µM)	(µM)
Línea celular	**MN58b**	**RSM-932A**
H460	0,28	1,11
H460 parental	0,39	1,32
H460 MN58R	19,2 **(49)**	9,5 **(7)**

H460 RSM-932AR	28,8 **(72)**	10,8 **(8)**

Tabla 9. Sensibilidad a inhibidores de ChoK y cisplatino de líneas celulares H460 generadas con resistencia adquirida a inhibidores de ChoK.

Con el propósito de probar si esta resistencia a morir en respuesta a inhibidores de ChoKα se debe a un aumento en los niveles de ceramidasa ácida, se realizaron análisis tanto de QT-PCR como de inmunotransferencia para medir los niveles de esta enzima en estas células. De acuerdo con resultados previos, los niveles tanto de expresión génica como de proteína estaban sobreexpresados en las células resistentes a la inhibición de ChoK con respecto a las células control H460 parental (Figura 5).

EJEMPLO 6

Resistencia no cruzada entre inhibidores de ChoK y cisplatino

Como se ha mencionado anteriormente, el análisis estadístico de la correlación de los respondedores a los diferentes agentes quimioterapéuticos realizado en cultivos primarios de tumores de pacientes con NSCLC reveló que la resistencia a MN58b no estaba asociada a la resistencia a ningún otro fármaco antioncogénico ensayado (Tabla 4). Para verificar los datos obtenidos de las muestras de pacientes y establecer que el mecanismo de resistencia a la inhibición de ChoK era independiente a la resistencia a otros fármacos antitumorales convencionalmente usados en el tratamiento de NSCLC, se analizó el efecto antiproliferativo de cisplatino en las células establecidas resistentes a la inhibición de ChoK. Como se muestra en la tabla 10, H460 MN58R y H460 RSM-932AR eran incluso más sensibles al efecto antiproliferativo de cisplatino que las células H460 parental. Estos resultados sugieren que la adquisición de resistencia a la inhibición de ChoK va a través de un mecanismo específico probablemente relacionado con la sobreexpresión de la ceramidasa ácida, y no interfiere con el mecanismo de acción de otraos fármacos antioncogénicos tal como cisplatino.

	CI 50 (ug/mL)
Línea celular	**Cisplatino**
H460	5
H460 parental	4,5
H460 MN58R	2 **(0,4)**
H460 RSM-932AR	1,5 **(0,3)**

Tabla 10. Las células resistentes a inhibidores de ChoK son incluso más sensibles a cisplatino que las células parentales de NSCLC humanas.

EJEMPLO 7

Eficacia de una terapia combinada de cisplatino e inhibidores de ChoK en NSCLC

Los resultados mostrados anteriormente sugieren que los inhibidores de ChoK se podrían usar como agentes antitumorales para pacientes con NSCLC que no responden a cisplatino, y viceversa. Se analizó después el efecto potencial de una terapia combinada de inhibidores de ChoK y la terapia basada en platino convencional con cisplatino. Se evaluaron los efectos sobre la viabilidad celular de cisplatino más los inhibidores de ChoK MN58b y RSM-932A en la línea celular de NSCLC H460 usando ensayos de MTT. Se realizaron tratamientos secuenciales en los que el cisplatino se administraba durante 3 horas seguido por 40 horas de inhibidores de ChoK. Se analizaron los resultados usando el método de índice de combinación de isobolograma de Chou Talalay (Chou et al., *supra.*). Como se muestra en la Figura 6, se observó una fuerte inhibición sinergística del crecimiento (IC<0,5) entre cisplatino y ambos inhibidores de ChoK MN58b o RSM-932A en células H460 (IC = 0,1 e IC = 0,4 respectivamente), lo que indica que la combinación de estas dos terapias podría producir una ventaja significativa en el control del crecimiento tumoral de NSCLC.

Con el fin de verificar que la combinación de estas dos terapias podría producir una ventaja significativa en el control del crecimiento tumoral de NSCLC, se realizaron experimentos in vivo usando xenoinjertos de NSCLC. Siguiendo los descubrimientos de los experimentos in vitro, se realizaron tratamientos secuenciales *in vivo* en los que se administró cisplatino durante la primera semana (dos veces a la semana), seguido por dos semanas de tratamiento con inhibidores de ChoK (tres veces a la semana). Se incluyó un grupo adicional de tratamiento concomitante para MN58b y cisplatino durante las tres semanas. Como se muestra en la figura 7, se observó una fuerte inhibición sinergística del crecimiento entre cisplatino y ambos inhibidores de ChoK MN58b (figura 7A) o RSM-932A (figura 7B)

en xenoinjertos de H460 sin aumentar la toxicidad (figura 7C), lo que indica que la combinación de estas dos terapias podría producir una ventaja significativa en el tratamiento de NSCLC.

Es importante considerar que para obtener la misma proporción de actividad antitumoral con cisplatino solo que las obtenidas en los planes combinados, la concentración de cisplatino se tiene que cuadriplicar y se observan signos clínicos de toxicidad tal como pérdida de peso (figura 7D). De esta manera, una terapia combinada secuenciasl con cisplatino e inhibidores de ChoK produce un efecto antitumoral fuerte mientras disminuye la toxicidad a niveles imperceptibles similares a los obtenidos cuando se usa una disminución de dos veces en la concentración del agente quimioterapéutico.

EJEMPLO 8 (Ejemplo comparativo)

Los inhibidores de colina quinasa y TRAIL cooperan para inducir muerte celular en líneas celulares derivadas de cáncer colon

Para investigar si las actividades antitumorales de RSM-932A y TRAIL siguen mecanismos de acción similares o distintos, se probó la combinación de un inhibidor de colina quinasa (ChoKI) y TRAIL para un efecto cooperativo en la citotoxidad de células tumorales. Para este fin, se usaron cinco líneas celulares derivadas de cáncer de colon: DLD-1, HT-29, HCT-116, SW620 y SW480.

Para este fin, las células se sembraron en placas multipocillos de 96 a una densidad de $1x10^4$ células/pocillo 24 horas antes del tratamiento. Las células se trataron con diferentes concentraciones de RSM-932A (ChoKI) o TRAIL durante tiempos diferentes y se cuantificó la proliferación celular usando el ensayo colorimétrico del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio].

El resultado muestra que la sensibilidad a ChoKI era muy similar en todas las líneas celulares analizadas (Figura 8A). Sin embargo, la sensibilidad a TRAIL era también muy similar para todas las líneas celulares excepto para SW620, que es casi resistente al tratamiento con TRAIL (Figura 8B). A continuación, las mismas líneas celulares que se habían pretratado con ChoKI durante 2 horas, suficiente para alcanzar una inhibición eficaz de la colina quinasa, se trataron después con TRAIL durante 24 horas adicionales. Cuando se trataron las células DLD-1 con ChoKI o TRAIL solos, la citotoxicidad era del 53% y del 12% respectivamente, determinada como el porcentaje de muerte celular observada. Cuando se combinaron ambos fármacos, la citotoxicidad aumentó al 75% de muerte celular (Figura 9A). En células HT-29, la citotoxicidad inducida por ChoKI y TRAIL fue del 48% y el 18% respectivamente, mientras que en combinación la citotoxicidad aumentó al 81% (Figura 9B). En células SW620, que son resistentes a TRAIL, la citotoxicidad de ChoKI fue del 9%, mientras que en combinación la citotoxicidad aumentó hasta el 41% (Figura 9C). Este resultado se confirmó mediante análisis por inmunotransferencia, ya que hay también aumento de la degradación de PARP o activación de caspasa 3 cuando TRAIL y el inhibidor de la colina quinasa se combinan (Figura 9D).

Los resultados de la cooperación entre RSM-932A, designado como ChoKI en este ejemplo, y TRAIL se analizaron usando el método de índice de combinación de isobolograma de Chou Talalay (Chou et al., *supra.*). Como se muestra en la figura 10, se observó una fuerte sinergia (IC<0,5) en la inhibición del crecimiento entre estos compuestos (IC=0,19 para DLD-1, IC=0,12 para HT-29 e IC=0,085 para SW620), lo que indica que la combinación de estas dos terapias podría producir una ventaja significativa en el control del crecimiento de tumores de colon. Estos resultados se verificaron usando el inhibidor de ChoK MN58b en células DLD-1 y SW620, obteniéndose resultados similares (IC=0,10 e IC=1,15, respectivamente) (figura 10).

La sinergia observada *in vitro* también se analizó por citometría de flujo usando tinción con anexina V & IP para distinguir entre apoptosis y necrosis o apoptosis tardía. Después de 7 horas de tratamiento, con MN58b solo hay un pequeño aumento en apoptosis en células DLD-1 porque MN58 necesita más de 7 horas para inducir la muerte de células tumorales. Cuando las células DLD-1 se tratan con TRAIL solo, hay un 35% de apoptosis. En combinación la muerte de células tumorales se amplifica hasta el 50%. Cuando se tratan DLD-1 con RSM-932A en combinación con TRAIL hay un aumento del 55% en muerte de células tumorales pero principalmente en la población necrótica o de apoptosis tardía porque RSM-932A tiene un efecto que es más rápido que MN58. En SW620, que son resistentes a TRAIL, la población apoptótica también aumenta hasta el 35% en combinación con MN58. Cuando TRAIL se combina con RSM-932A, la población necrótica o apoptótica tardía aumenta y hay una muerte celular total del 59% después de 7 horas de tratamiento (figura 11), verificando el efecto sinérgico de la combinación de TRAIL e inhibidores de ChoK en células de cáncer de colon.

TRAIL es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y puede inducir apoptosis por la vía extrínseca asociada mediante la estimulación de receptores de muerte DR4 (TNFRSF10A o TRAIL-R1) y DR5 (TNFRSF10B o TRAIL-R2). Para determinar el mecanismo de la efectividad de la terapia combinada de TRAIL e inhibidores de ChoK, se analizaron los niveles de DR5 y DR4 por PCR cuantitativa en líneas de células DLD-1 y SW620 después de tratamientos con MN58b, TRAIL o su combinación simultánea. No se encontraron cambios significativos en los niveles de DR4, pero el tratamiento con MN58b aumentó los niveles de DR5 produciendo una

aumento de 2 veces en la línea celular SW620 y un aumento de 1,6 en la línea celular DLD-1 (figura 12), lo que podría explicar el mecanismo de acción del efecto sinérgico observado entre inhibidores de ChoK y TRAIL.

Se ha descrito previamente que tanto MN58b como TRAIL aumentan los niveles intracelulares de ceramida. Para estudiar la generación de ceramida en este sistema, se marcaron los lípidos intracelulares con [^{14}C]-serina durante 48 horas antes de tratar células DLD-1 con MN58 o TRAIL. Después de la extracción, los lípidos se analizaron por cromatografía de capa fina y se cuantificaron. Como se puede observar en la figura 13, cuando MN58b y TRAIL se combinan de forma simultánea hay un aumento de 3 veces en los niveles de ceramida. Además, se ha descrito previamente que la resistencia de SW620 a TRAIL está asociada con defectos en la señalización de ceramida y se puede superar mediante ceramida exógena. Según esto, la ceramida C16 no aumenta en SW620 después del tratamiento. Para investigar si la inhibición de ChoK puede contribuir a generar ceramida C-16, se han analizado las especies de ceramida por cromatografía líquida y espectrometría de masas, obteniéndose un aumento del 50% en ceramida C-16 cuando MN58 b y TRAIL se combinan (figura 13).

Por último, los tratamientos combinatorios *in vivo* también se realizaron usando un modelo de xenoinjerto en ratones desnudos. Los tratamientos combinatorios simultáneos empezaron cuando los tumores adquirieron un volumen de 0,15 cm^3. Se incluyeron 10 ratones por grupo. Los ratones se traron lunes, miércoles y viernes con MN58b (2 mg/kg), y martes y jueves con 20 mg/kg de TRAIL. Como se puede observar en la figura 14, después de tres semanas de tratamiento se obtuvo una inhibición de crecimiento tumoral del 68% y 75% en xenoinjertos DLD-1 y SW620, respectivamente, lo que confirma la fuerte sinergia observada en los experimentos *in vitro*.

EJEMPLO 9

Inhibidores de coolina quinasa y 5-FU cooperan para inducir muerte celular en líneas celulares derivadas de cáncer de colon

Además, también se ha analizado el efecto potencial de una terapia combinada de inhibidores de ChoK y la terapia convencional basada en 5-fluorouracilo (5-FU) en cáncer de colon. Se evaluaron los efectos en viabilidad celular de 5-FU más inhibidores de ChoK MN58b y RSM-932A (TCD-717) en células DLD-1, SW620 y HT-29 usando ensayos de MTT. Se identificaron las mejores opciones de combinaciones como tratamientos concomitantes o tratamientos secuenciales en los que se administraron los inhibidores de ChoK durante tiempos cortos (9-24 h), seguido de tiempos más largos de 5-FU (48-72 h). Los resultados se analizaron usando el método de índice de combinación de isobolograma de Chou Talalay (Chou et al., *supra.*). Como se muestra en la figura 15, se observó un efecto sinérgico en la inhibición de crecimiento entre 5-FU y ambos inhibidores de ChoK MN58b o RSM-932A en todas las células de cáncer de colon humano analizadas, lo que indica que la combinación de estas dos terapias podría producir una ventaja significativa en el control de crecimiento tumoral de colon.

Estos resultados también se verificaron por análisis de citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 16, el análisis del ciclo celular no solo reveló que la terapia combinada pordujo un aumento significativo en la muerte celular incluso usando bajas concentraciones de estos agentes, sino que también reveló que mientras que los inhibidores de ChoK muestran un efecto en la fase G0/G1 del ciclo celular, 5-FU ejerce su efecto afectando a la fase G2/M del ciclo celular, según artículos previos. Estos resultados dan la evidencia del requerimiento del pretratamiento con inhibidores de ChoK cuando se sigue una terapia combinada para sensibilizar células al efecto antiproliferativo de 5-FU.

Con el fin de investigar además el mecanismo de sensibilización de los ChoKI al efecto antitumoral de 5-FU, se realizó un análisis de expresión de genes de la vía de metabolización de 5-FU en células H460 tratadas a diferentes tiempos con MN58b y RSM-932A usando tecnología affymetrix. Como se puede observar en la tabla 11, varios genes de vía resultaron significativa y comúnmente afectados por los inhibidores de ChoK, lo que sugiere que el pretratamiento con inhibidores de ChoK modifica la expresión de enzimas que potencian el efecto de 5-FU.

Símbolo oficial		Gen	RSM-932A		MN58b	
			9h	24h	9h	24h
UPP1	UP	Uridina fosforilasa 1	+1,83	+2,48	+1,54	+1,76
RRM2	RRM2	Ribonucleótido Reductasa	-1,39	-3,69	-1,48	-2,50
TYMS	TS	Timidilato sintetasa	-1,03	-2,73	-1,30	-2,39
DUT	DUT	Desoxiuridina trifosfatasa	-1,12	-2,08	-1,17	-2,03

Tabla 11. Análisis de expression de genes de la vía de metabolización de 5-FU en células H460 tratadas con inhibidores de ChoK determinados por ensayo de expresión de genes de affymetrix.

Puesto que H460 son células derivadas de NSCLC, estos resultados se validaron usando tecnología QT-PCR en tres líneas de células cancerosas derivadas de colon para determinar si este mecanismo de potenciación de muerte celular inducida por 5-FU podría ser independiente de célula y la modificación de los niveles de expresión de genes de esta vía podría explicar los efectos de la sensibilización de los ChoKI encontrada en el sistema de cáncer de

colon. Como se puede observar de la tabla 12, esta vía está significativamente alterada en un grado similar en todas las células cancerosas analizadas, lo que sugiere que la alteración en la metabolización de 5-FU podría ser un mecanismo de acción de esta terapia combinada.

DLD-1	DUT	RRM	TYM	UPP
932A	DR	DR	DR	UR
MN58b			DR	UR

HT29	DUT	RRM	TYM	UPP
932A	DR	DR	DR	UR
MN58b	DR	DR	DR	

SW62	DUT	RRM	TYM	UPP
932A	DR	DR	DR	UR
MN58b		DR	DR	UR

Tabla 12. Validación por PT-PCR de la alteración de la expression de genes en la vía de metabolización de 5-FU (DUT: desoxiuridina trifosfato; RRM: Ribonucleótido reductasa; TYM: timidilato sintetasa; UPP: uridina fosforilasa 1) después de tratamiento con inhibidores de ChoK RSM-932A (932A) y MN58b (MN58b) en células de cáncer de colon DLD-1, HT29 and SW62. DR (Disminución); UR (Aumento)

Por último, con el fin de verificar que la combinación de estas dos terapias podría producir una ventaja significativa en el control del crecimiento tumoral de NSCLC, se realizaron experimentos *in vivo* usando dos xenoinjeros diferentes de colon. Siguiendo los descubrimientos de los experimentos *in vitro*, se realizaron *in vivo* tratamientos concomitantes o tratamientos secuenciales en los que se administraron inhibidores de ChoK MN58b o RSM-932A (TCD-7) durante la primera semana (tres veces a la semana), seguido por dos semanas de tratamiento con 5-FU (dos veces a la semana). Como se muestra en la figura 17, se observó una fuerte inhibición sinergística del crecimiento entre 5-FU y el inhibidor de ChoK usando xenoinjertos tento de DLD-1 como de SW620, lo que sugiere que la combinación de estas dos terapias podría producir una ventaja significativa para el control de crecimiento en tumores de colon.

Lista de secuencias

<110> TRANSLATIONAL CANCER DRUGS PHARMA, S.L.

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> P4096PC00

<150> EP08380270.2
<151> 17-09-2008

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1188
<212> ADN
<213> Humano

<400> 1

```
atggcggccg aggcgacagc tgtggccgga agcggggctg ttggcggctg cctggccaaa      60
gacggcttgc agcagtctaa gtgcccggac actaccccaa aacggcggcg cgcctcgtcg     120
ctgtcgcgtg acgccgagcg ccgagcctac caatggtgcc gggagtactt gggcggggcc     180
tggcgccgag tgcagcccga ggagctgagg gtttaccccg tgagcggagg cctcagcaac     240
ctgctcttcc gctgctcgct cccggaccac ctgcccagcg ttggcgagga gccccgggag     300
gtgcttctgc ggctgtacgg agccatcttg cagggcgtgg actccctggt gctagaaagc     360
gtgatgttcg ccatacttgc ggagcggtcg ctggggcccc agctgtacgg agtcttccca     420
gagggccggc tggaacagta catcccaagt cggccattga aaactcaaga gcttcgagag     480
ccagtgttgt cagcagccat tgccacgaag atggcgcaat ttcatggcat ggagatgcct     540
ttcaccaagg agccccactg gctgtttggg accatggagc ggtacctaaa acagatccag     600
gacctgcccc caactggcct ccctgagatg aacctgctgg agatgtacag cctgaaggat     660
gagatgggca acctcaggaa gttactagag tctaccccat cgccagtcgt cttctgccac     720
aatgacatcc aggaagggaa catcttgctg ctctcagagc cagaaaatgc tgacagcctc     780
atgctggtgg acttcgagta cagcagttat aactataggg gctttgacat tgggaaccat     840
ttttgtgagt gggtttatga ttatactcac gaggaatggc ctttctacaa agcaaggccc     900
acagactacc ccactcaaga acagcagttg cattttattc gtcattacct ggcagaggca     960
aagaaaggtg agaccctctc ccaagaggag cagagaaaac tggaagaaga tttgctggta    1020
gaagtcagtc ggtatgctct ggcatcccat ttcttctggg gtctgtggtc catcctccag    1080
gcatccatgt ccaccataga atttggttac ttggactatg cccagtctcg gttccagttc    1140
tacttccagc agaaggggca gctgaccagt gtccactcct catcctag                 1188
```

<210> 2
<211> 395
<212> PRT
<213> Humana

<400> 2

Met Ala Ala Glu Ala Thr Ala Val Ala Gly Ser Gly Ala Val Gly Gly
1 5 10 15

Cys Leu Ala Lys Asp Gly Leu Gln Gln Ser Lys Cys Pro Asp Thr Thr
20 25 30

Pro Lys Arg Arg Arg Ala Ser Ser Leu Ser Arg Asp Ala Glu Arg Arg
35 40 45

Ala Tyr Gln Trp Cys Arg Glu Tyr Leu Gly Gly Ala Trp Arg Arg Val
50 55 60

Gln Pro Glu Glu Leu Arg Val Tyr Pro Val Ser Gly Gly Leu Ser Asn
65 70 75 80

Leu Leu Phe Arg Cys Ser Leu Pro Asp His Leu Pro Ser Val Gly Glu
85 90 95

Glu Pro Arg Glu Val Leu Leu Arg Leu Tyr Gly Ala Ile Leu Gln Gly
100 105 110

Val Asp Ser Leu Val Leu Glu Ser Val Met Phe Ala Ile Leu Ala Glu
115 120 125

Arg Ser Leu Gly Pro Gln Leu Tyr Gly Val Phe Pro Glu Gly Arg Leu
130 135 140

Glu Gln Tyr Ile Pro Ser Arg Pro Leu Lys Thr Gln Glu Leu Arg Glu
145 150 155 160

Pro Val Leu Ser Ala Ala Ile Ala Thr Lys Met Ala Gln Phe His Gly
165 170 175

Met Glu Met Pro Phe Thr Lys Glu Pro His Trp Leu Phe Gly Thr Met
180 185 190

Glu Arg Tyr Leu Lys Gln Ile Gln Asp Leu Pro Pro Thr Gly Leu Pro
195 200 205

Glu Met Asn Leu Leu Glu Met Tyr Ser Leu Lys Asp Glu Met Gly Asn
210 215 220

Leu Arg Lys Leu Leu Glu Ser Thr Pro Ser Pro Val Val Phe Cys His
225 230 235 240

Asn Asp Ile Gln Glu Gly Asn Ile Leu Leu Leu Ser Glu Pro Glu Asn
245 250 255

Ala Asp Ser Leu Met Leu Val Asp Phe Glu Tyr Ser Ser Tyr Asn Tyr
260 265 270

Arg Gly Phe Asp Ile Gly Asn His Phe Cys Glu Trp Val Tyr Asp Tyr
275 280 285

Thr His Glu Glu Trp Pro Phe Tyr Lys Ala Arg Pro Thr Asp Tyr Pro
290 295 300

Thr Gln Glu Gln Gln Leu His Phe Ile Arg His Tyr Leu Ala Glu Ala
305 310 315 320

Lys Lys Gly Glu Thr Leu Ser Gln Glu Glu Gln Arg Lys Leu Glu Glu
325 330 335

Asp Leu Leu Val Glu Val Ser Arg Tyr Ala Leu Ala Ser His Phe Phe
340 345 350

Trp Gly Leu Trp Ser Ile Leu Gln Ala Ser Met Ser Thr Ile Glu Phe
355 360 365

Gly Tyr Leu Asp Tyr Ala Gln Ser Arg Phe Gln Phe Tyr Phe Gln Gln
370 375 380

Lys Gly Gln Leu Thr Ser Val His Ser Ser Ser
385 390 395

<210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de un ARNhc específico para ChoK alfa

<400> 3
aactgatgct cattgatttc g 21

<210> 4
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> ARNip específico para colina quinasa

<400> 4

caugcuguuc cagugcucc 19

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ARNip específico para ceramidasa ácida descrito en Morales et al (Oncogene, 2007, 26:605-916)

<400> 5
aaaatcaacc tatcctcctt c 21

<210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ARNip específico para ceramidasa ácida descrito en el documento WO2007136635

<400> 6
aatcaaccta tcctccttca g 21

<210> 7
<211> 281
<212> PRT
<213> Humana

<400> 7
Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr Cys
1 5 10 15

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala
20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys
35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr
50 55 60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
65 70 75 80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
85 90 95

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
100 105 110

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
115 120 125

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
130 135 140

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
145 150 155 160

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
165 170 175

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
180 185 190

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
195 200 205

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
210 215 220

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
225 230 235 240

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
245 250 255

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
260 265 270

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
275 280

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende, de forma separada o junta, un primer componente que comprende uno o más inhibidores de colina quinasa específicos para la isoforma alfa de colina quinasa y un segundo componente seleccionado del grupo de uno más inhibidores de ceramidasa ácida y uno o más agentes de quimioterapia, en donde el agente de quimioterapia se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante de ADN, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, un inhibidor de topoisomerasa II, cetuximab, gefitinib e imatinib.

2. Una composición según la reivindicación 1 en donde el inhibidor de colina quinasa específico para la isoforma alfa de colina quinasa es un compuesto como se define en la Tabla 1.

3. Una composición según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el inhibidor de ceramidasa ácida es un compuesto como se define en la Tabla 2.

4. Una composición según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el agente alquilante es un compuesto basado en platino.

5. Una composición según la reivindicación 4, en donde el compuesto basado en platino es cisplatino.

6. Una composición según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el antimetabolito es 5-fluorouracilo, gemcitabina o pemetrexed.

7. Una composición según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el inhibidor mitótico es docetaxel.

8. Una composición según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la antraciclina es doxorrubicina.

9. Una composición farmacéutica que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 con un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en medicina.

11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento del cáncer.

12. Una composición para su uso según la reivindicación 11 en donde el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de colon.

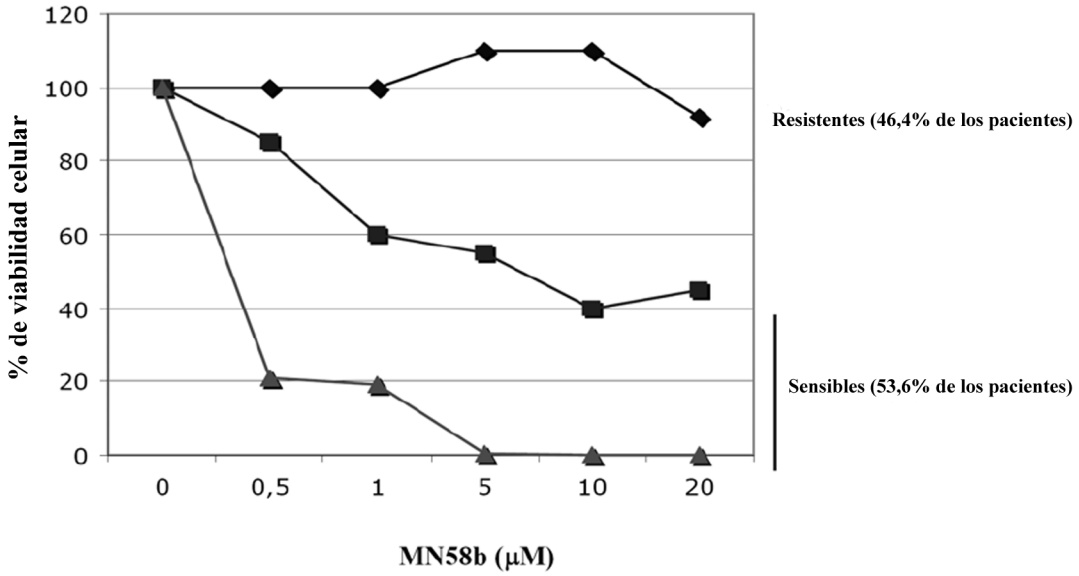

120
100
80
60
40
20
0
% de viabilidad celular
0
0,5
1
5
10
20
MN58b (μM)
Resistentes (46,4% de los pacientes)
Sensibles (53,6% de los pacientes)

FIGURA 1

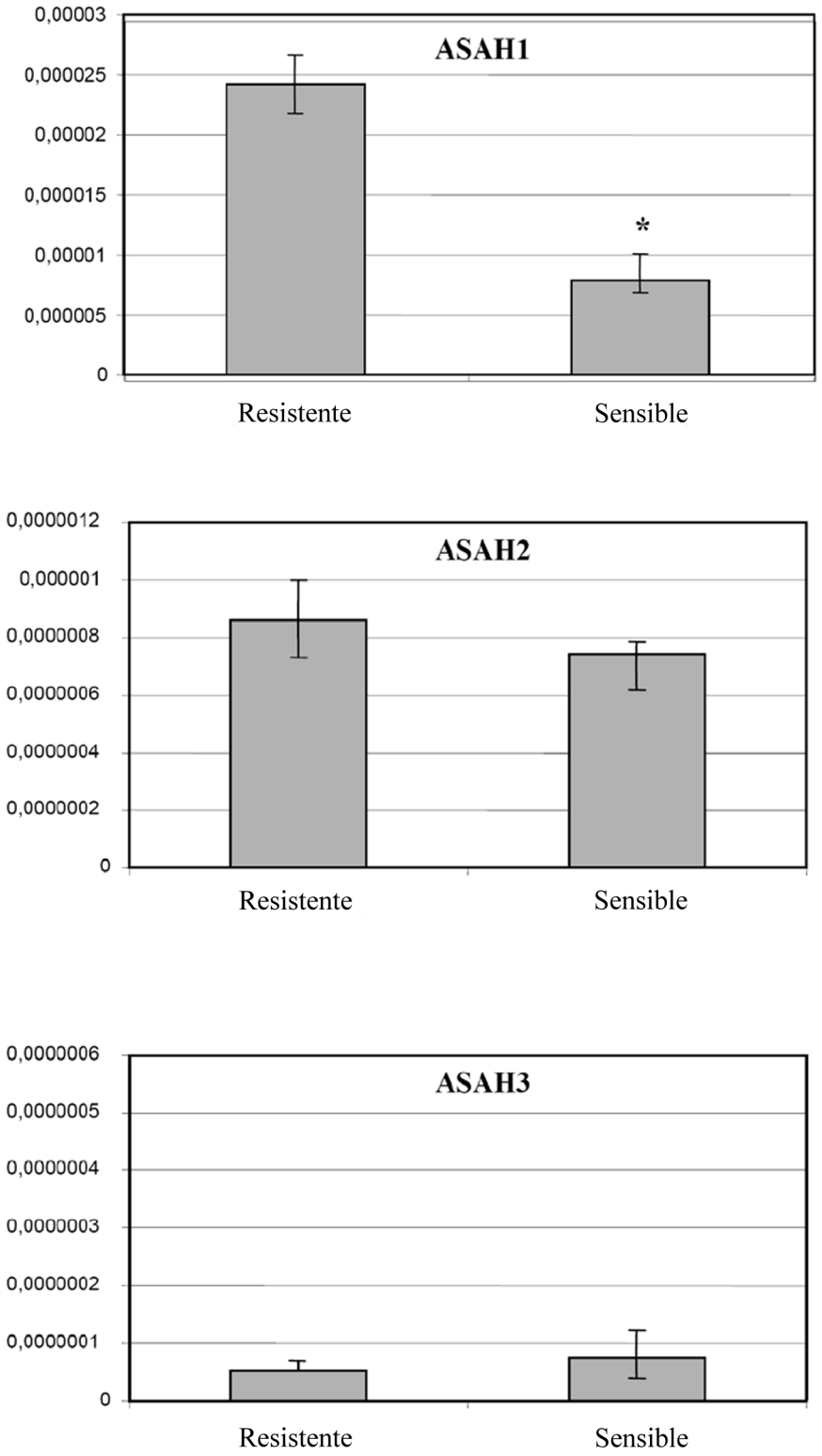

ASAH1
0,00003
0,000025
0,00002
0,000015
0,00001
0,000005
0
*
Resistente
Sensible
ASAH2
0,0000012
0,000001
0,0000008
0,0000006
0,0000004
0,0000002
0
Resistente
Sensible
ASAH3
0,0000006
0,0000005
0,0000004
0,0000003
0,0000002
0,0000001
0
Resistente
Sensible

FIGURA 2

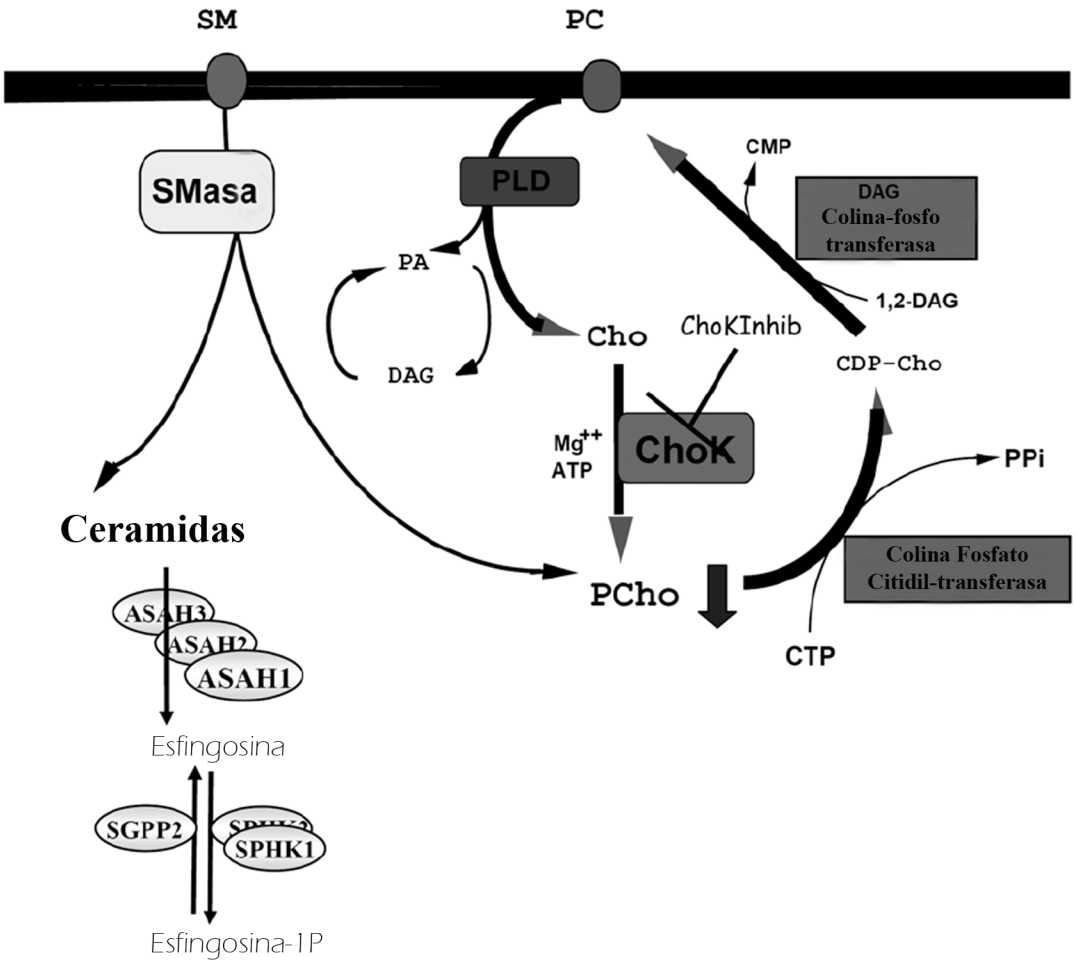

SM
PC
SMasa
PLD
CMP
DAG
Colina-fosfo
transferasa
PA
1,2-DAG
Cho
ChoKInhib
DAG
CDP-Cho
Mg++
ATP
ChoK
PPi
Ceramidas
Colina Fosfato
Citidil-transferasa
PCho
ASAH3
ASAH2
ASAH1
CTP
Esfingosina
SGPP2
SPHK1
Esfingosina-1P

FIGURA 3

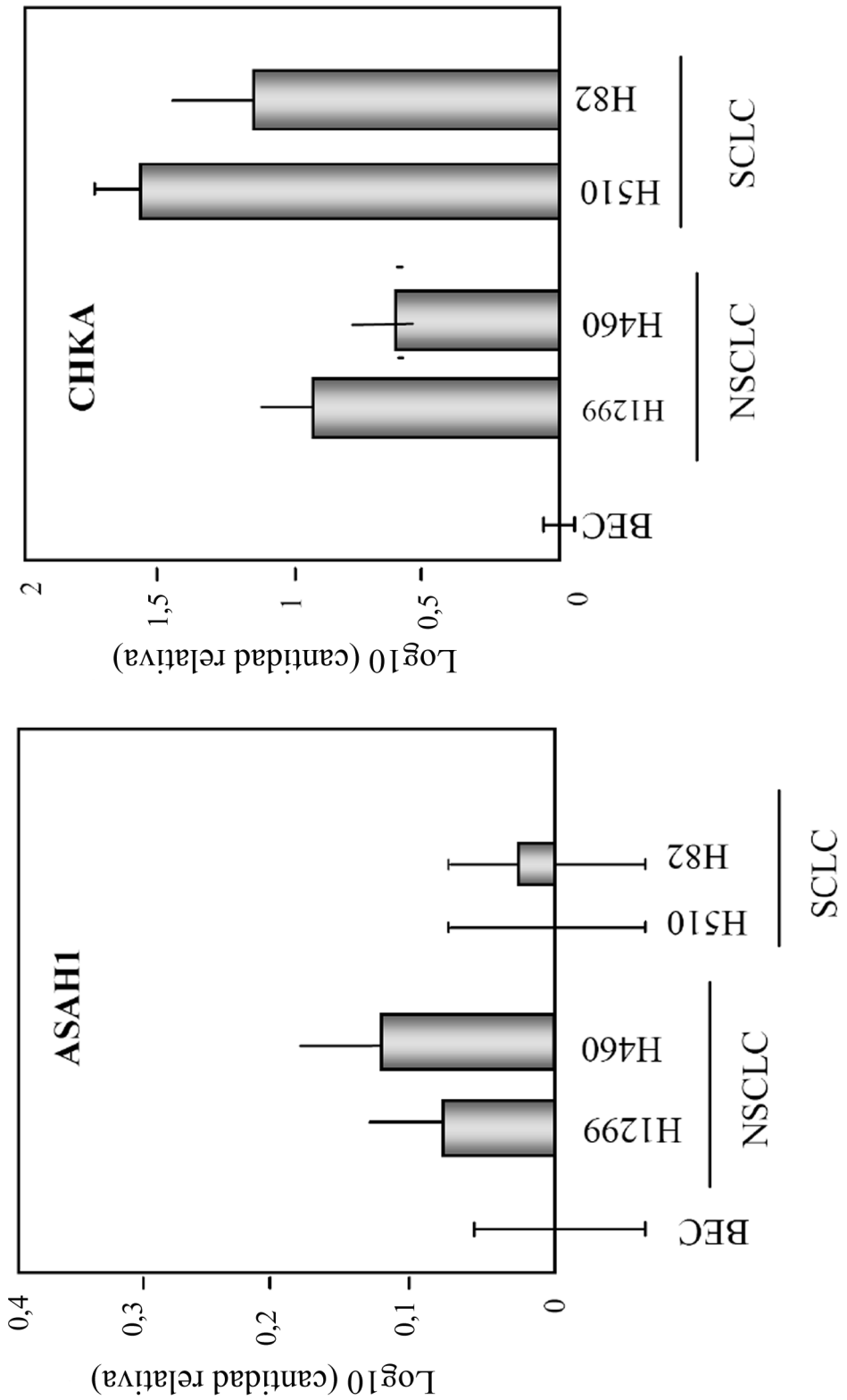

ASAH1
Log10 (cantidad relativa)
0,4
0,3
0,2
0,1
0
BEC
H1299
H460
H510
H82
NSCLC
SCLC
CHKA
Log10 (cantidad relativa)
2
1,5
1
0,5
0
BEC
H1299
H460
H510
H82
NSCLC
SCLC

FIGURA 4

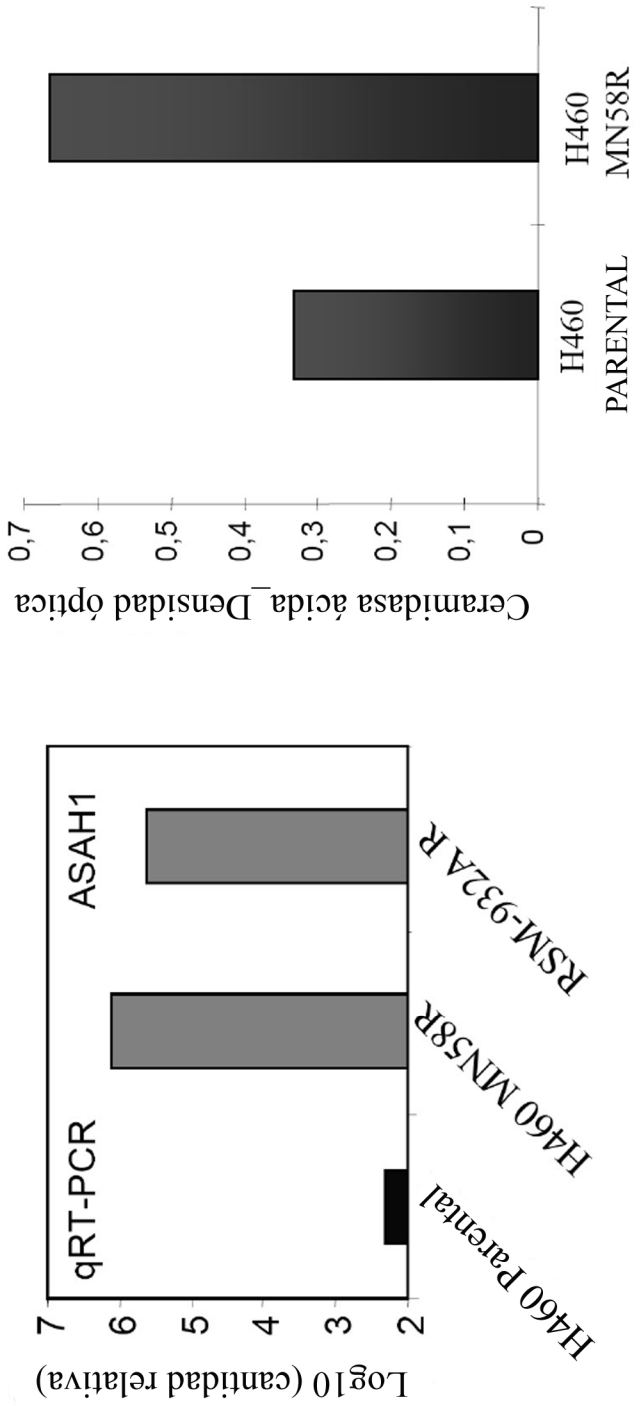
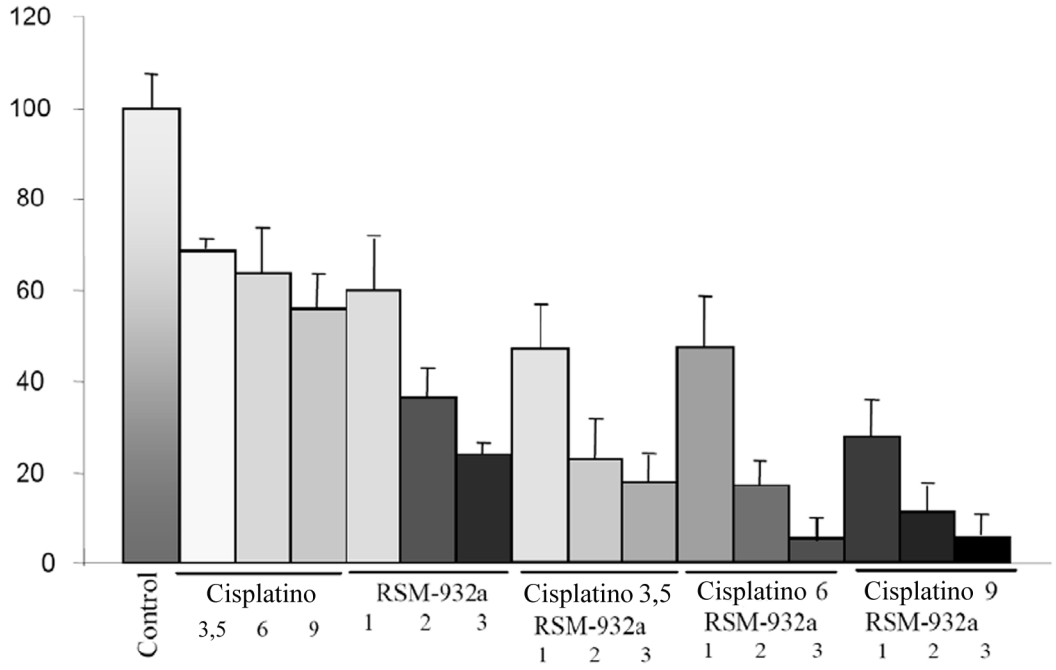

Log10 (cantidad relativa)
7
6
5
4
3
2
qRT-PCR
ASAH1
H460 Parental
H460 MN58R
RSM-932A R
Ceramidasa ácida_Densidad óptica
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
H460 PARENTAL
H460 MN58R

FIGURA 5


120
100
80
60
40
20
0
Control
Cisplatino
3,5 6 9
RSM-932a
1 2 3
Cisplatino 3,5
RSM-932a
1 2 3
Cisplatino 6
RSM-932a
1 2 3
Cisplatino 9
RSM-932a
1 2 3

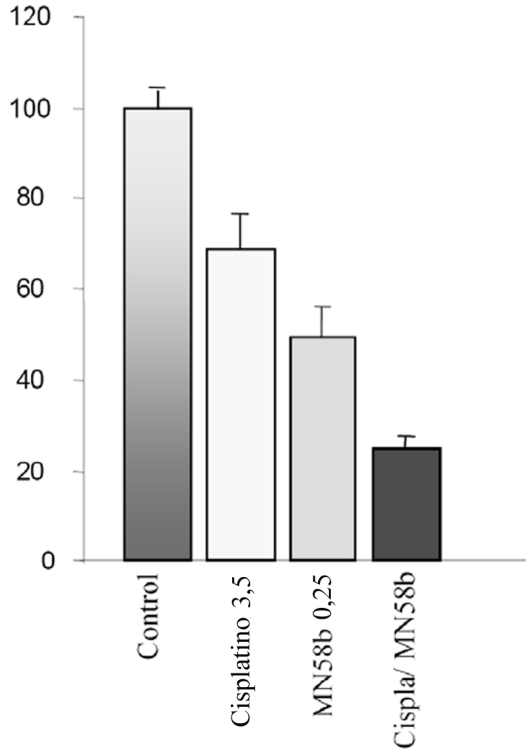

120
100
80
60
40
20
0
Control
Cisplatino 3,5
MN58b 0,25
Cispla/ MN58b

FIGURA 6

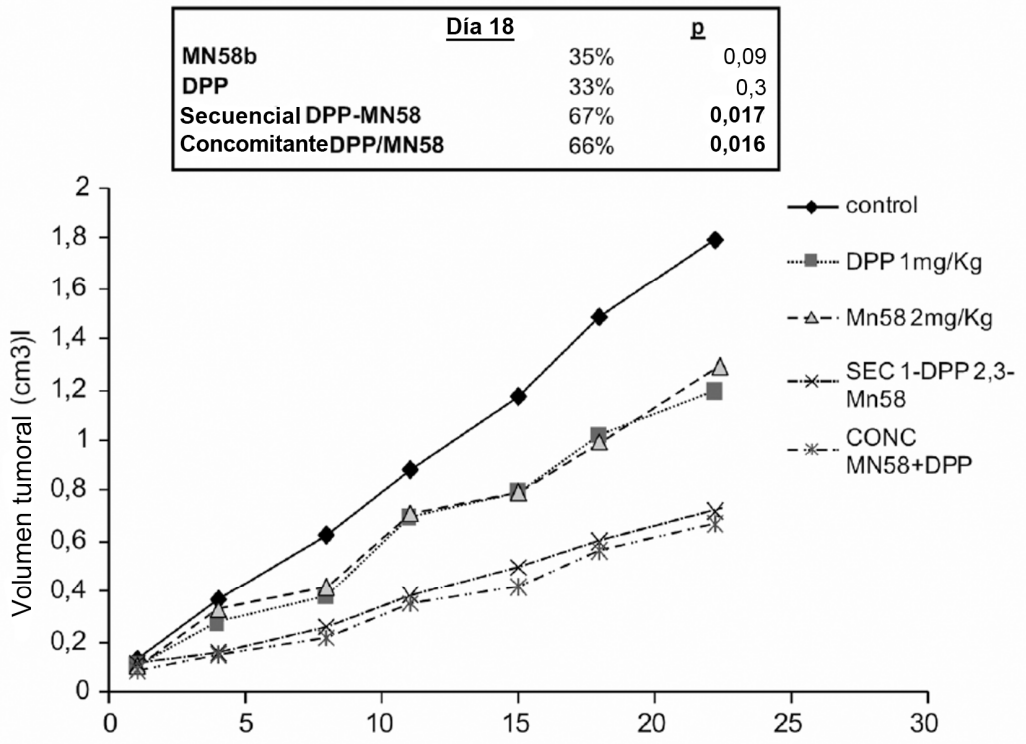

Día 18
p
MN58b 35% 0,09
DPP 33% 0,3
Secuencial DPP-MN58 67% 0,017
ConcomitanteDPP/MN58 66% 0,016
Volumen tumoral (cm3)l
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
5
10
15
20
25
30
control
DPP 1mg/Kg
Mn58 2mg/Kg
SEC 1-DPP 2,3-Mn58
CONC MN58+DPP

FIGURA 7A

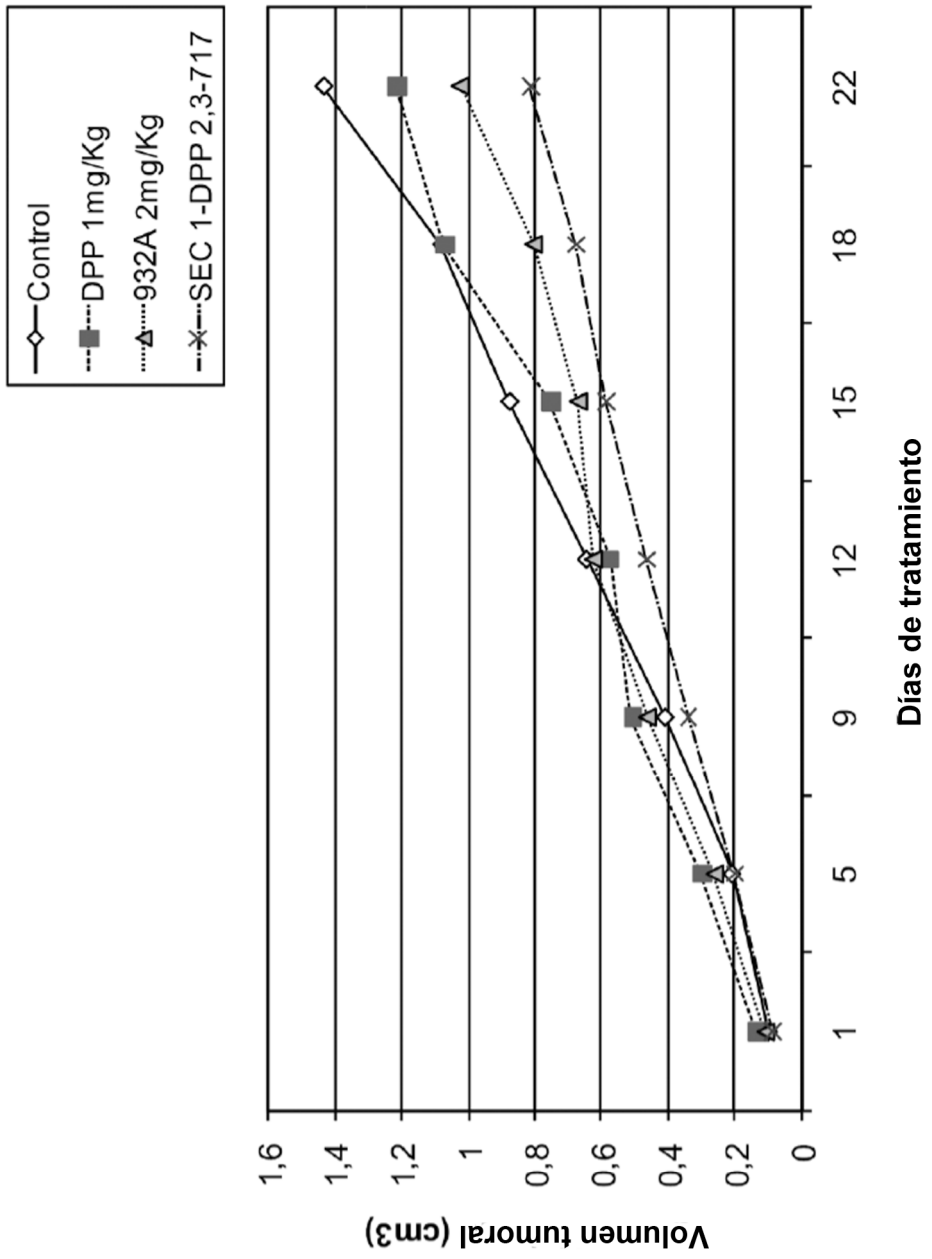
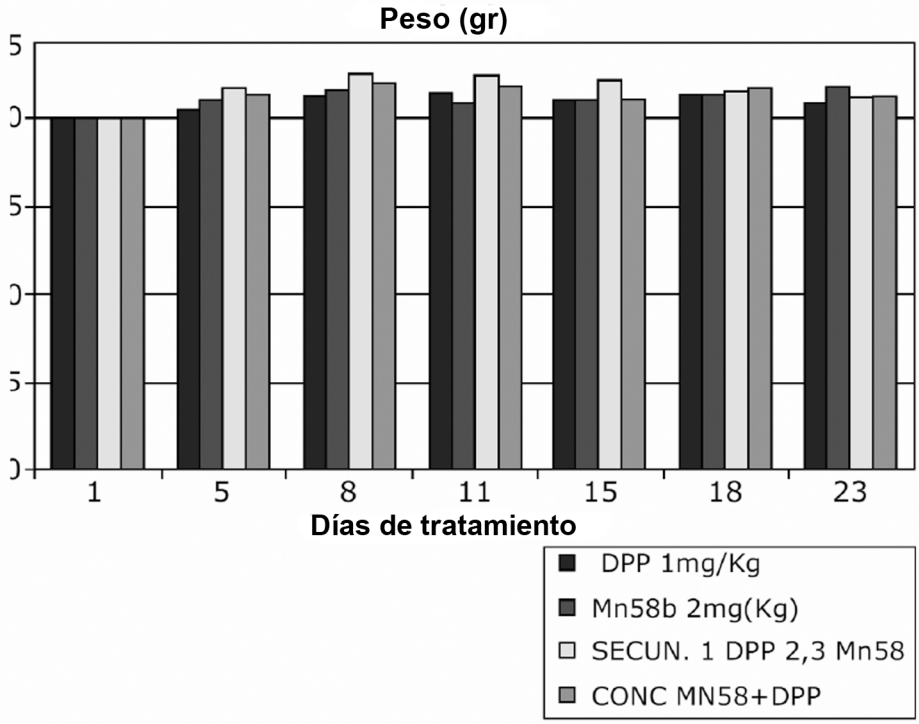

Control
DPP 1mg/Kg
932A 2mg/Kg
SEC 1-DPP 2,3-717
Volumen tumoral (cm3)
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1
5
9
12
15
18
22
Días de tratamiento

FIGURA 7B


Peso (gr)
1
5
8
11
15
18
23
Días de tratamiento
DPP 1mg/Kg
Mn58b 2mg(Kg)
SECUN. 1 DPP 2,3 Mn58
CONC MN58+DPP

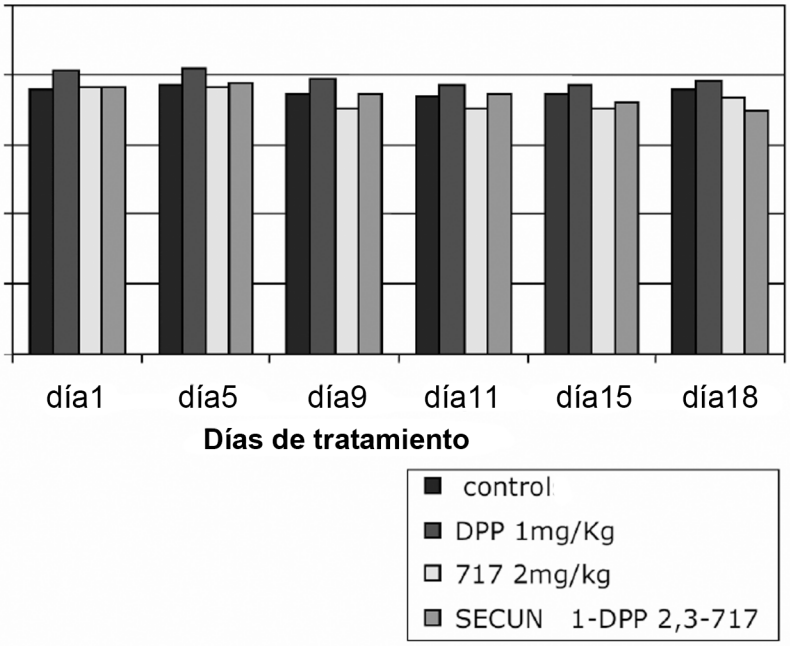
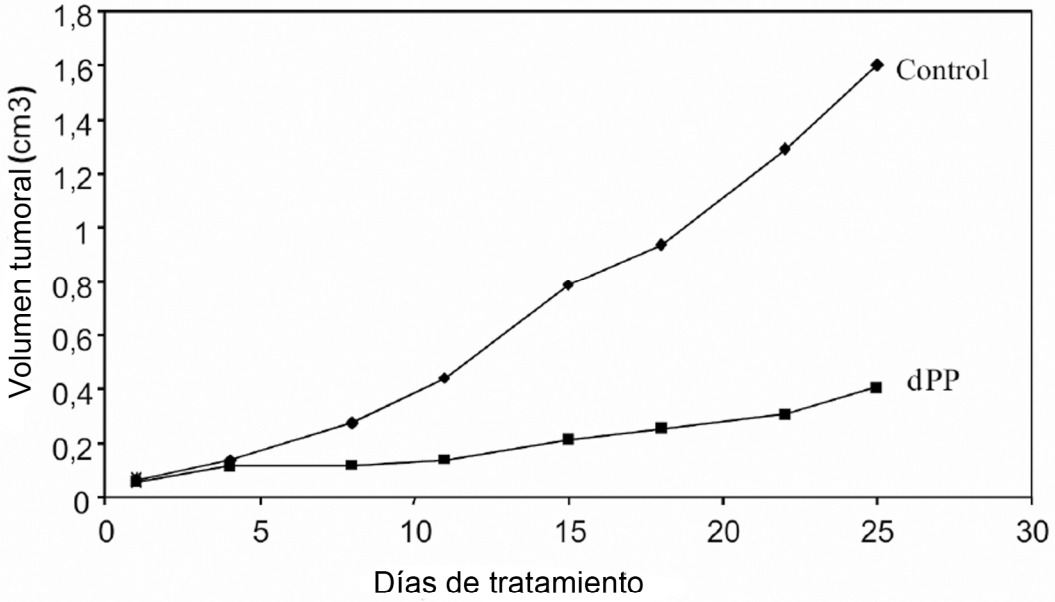

día1
día5
día9
día11
día15
día18
Días de tratamiento
control
DPP 1mg/Kg
717 2mg/kg
SECUN 1-DPP 2,3-717

FIGURA 7C


Volumen tumoral (cm3)
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
5
10
15
20
25
30
Días de tratamiento
Control
dPP

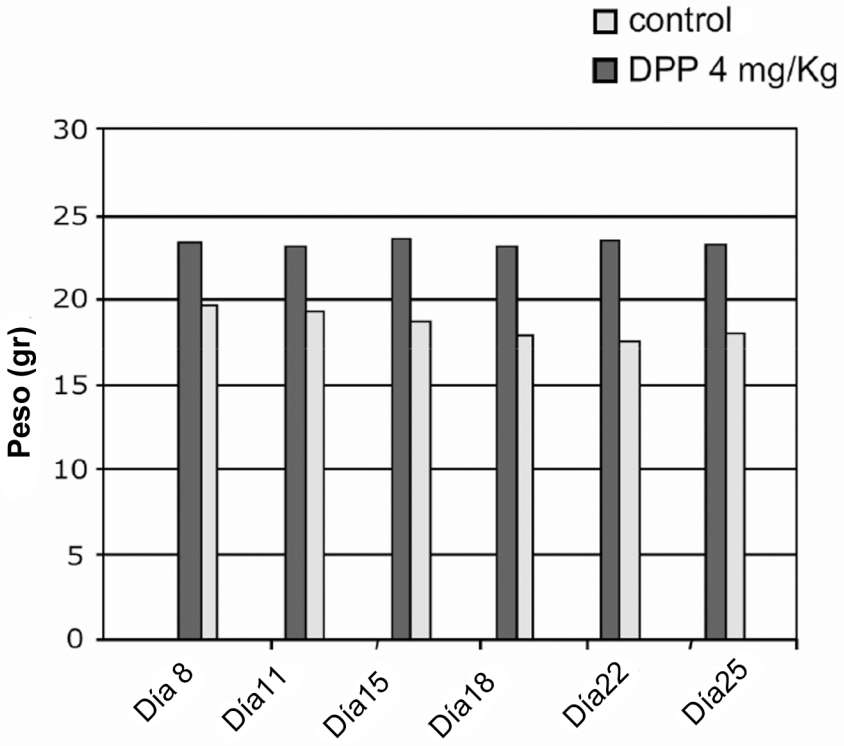
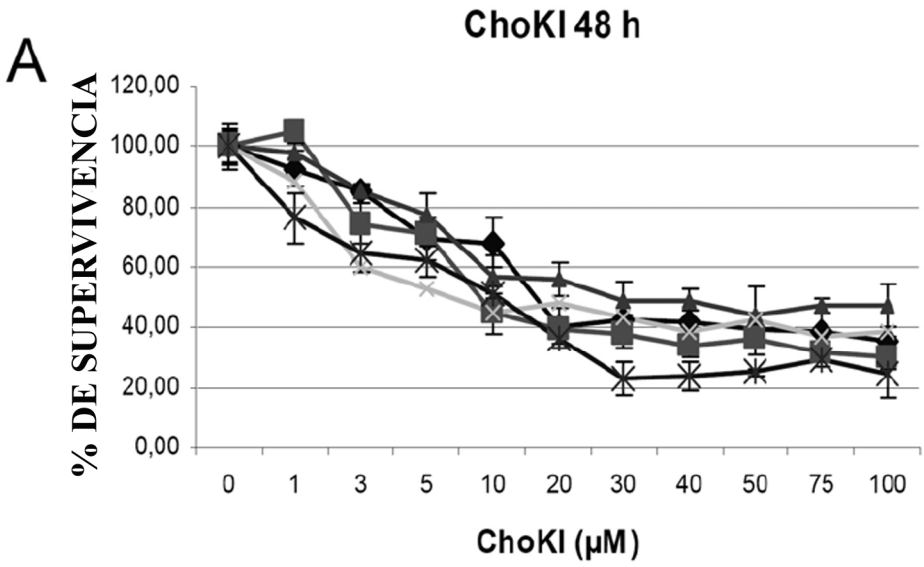

control
DPP 4 mg/Kg
Peso (gr)
30
25
20
15
10
5
0
Día 8
Día11
Día15
Día18
Día22
Día25

FIGURA 7D


A
ChoKI 48 h
% DE SUPERVIVENCIA
120,00
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
0
1
3
5
10
20
30
40
50
75
100
ChoKI (µM)

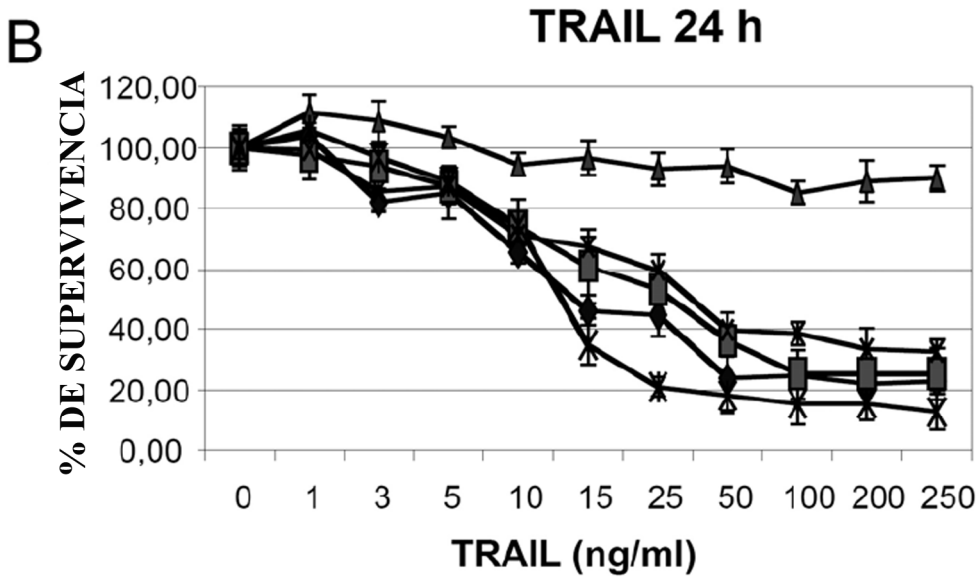

B
TRAIL 24 h
% DE SUPERVIVENCIA
120,00
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
0
1
3
5
10
15
25
50
100
200
250
TRAIL (ng/ml)

FIGURA 8

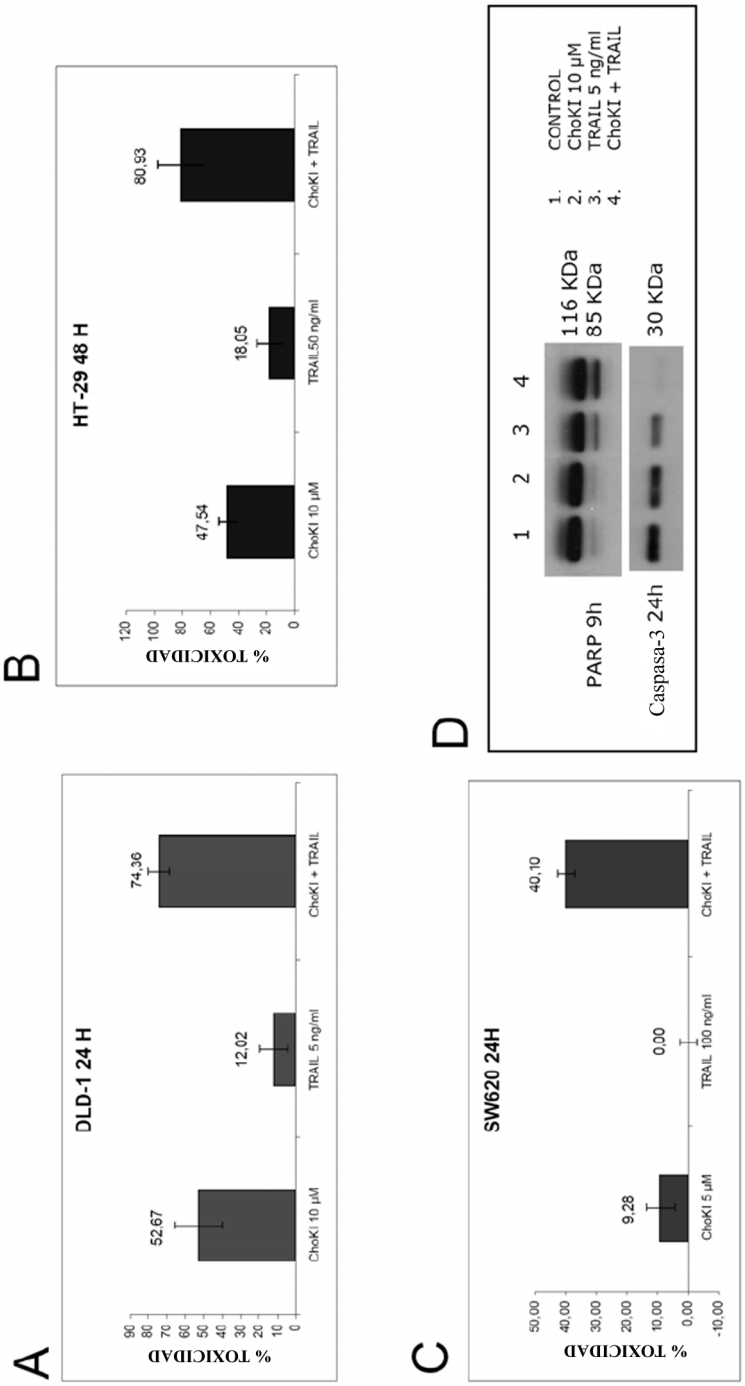

A
DLD-1 24 H
% TOXICIDAD
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
52,67
12,02
74,36
ChoKI 10 µM
TRAIL 5 ng/ml
ChoKI + TRAIL
B
HT-29 48 H
% TOXICIDAD
120
100
80
60
40
20
0
47,54
18,05
80,93
ChoKI 10 µM
TRAIL50 ng/ml
ChoKI + TRAIL
C
SW620 24H
% TOXICIDAD
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
-10,00
9,28
0,00
40,10
ChoKI 5 µM
TRAIL 100 ng/ml
ChoKI + TRAIL
D
PARP 9h
1
2
3
4
116 KDa
85 KDa
Caspasa-3 24h
30 KDa
1. CONTROL
2. ChoKI 10 µM
3. TRAIL 5 ng/ml
4. ChoKI + TRAIL

FIGURA 9

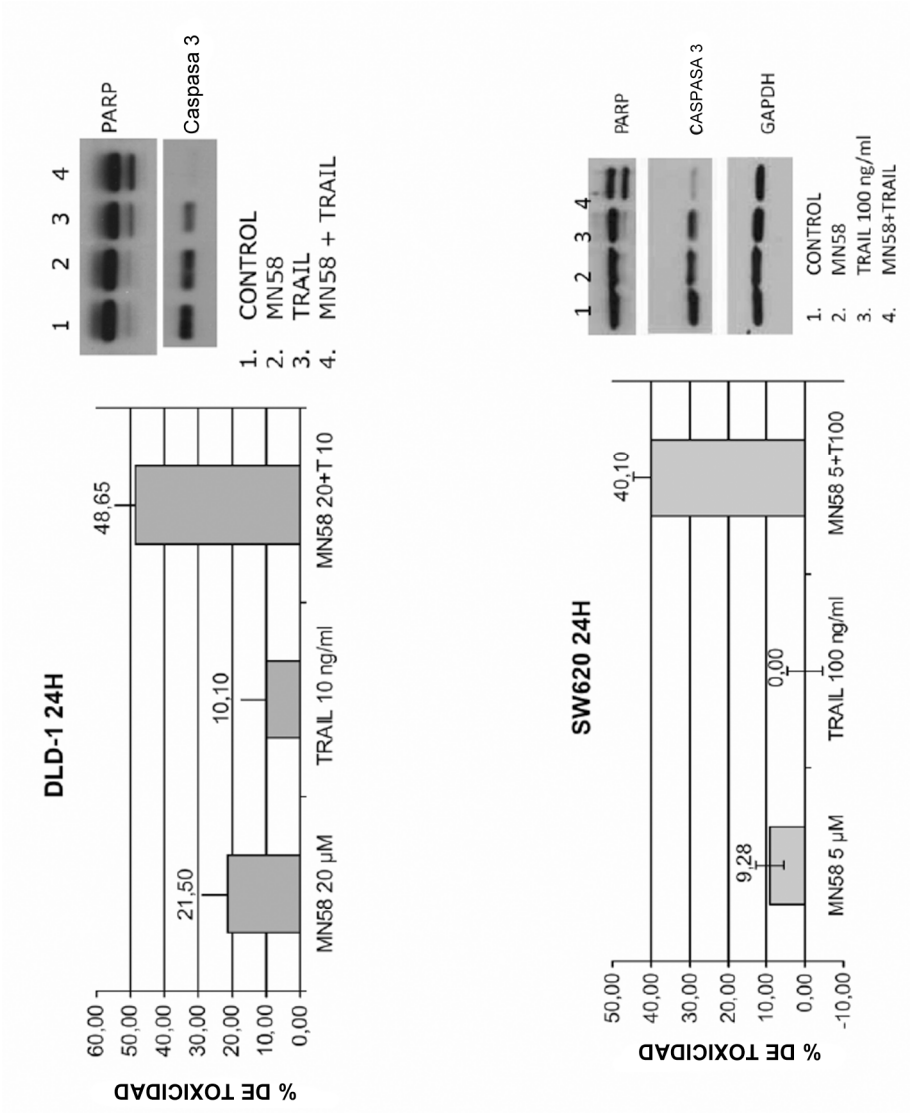
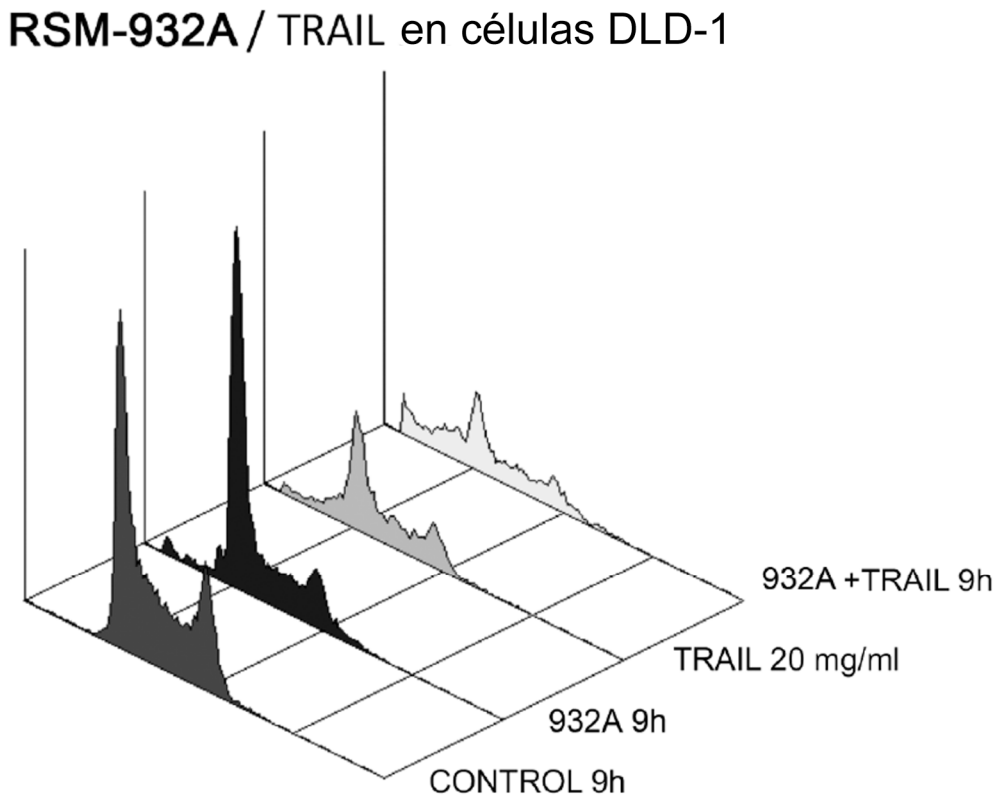
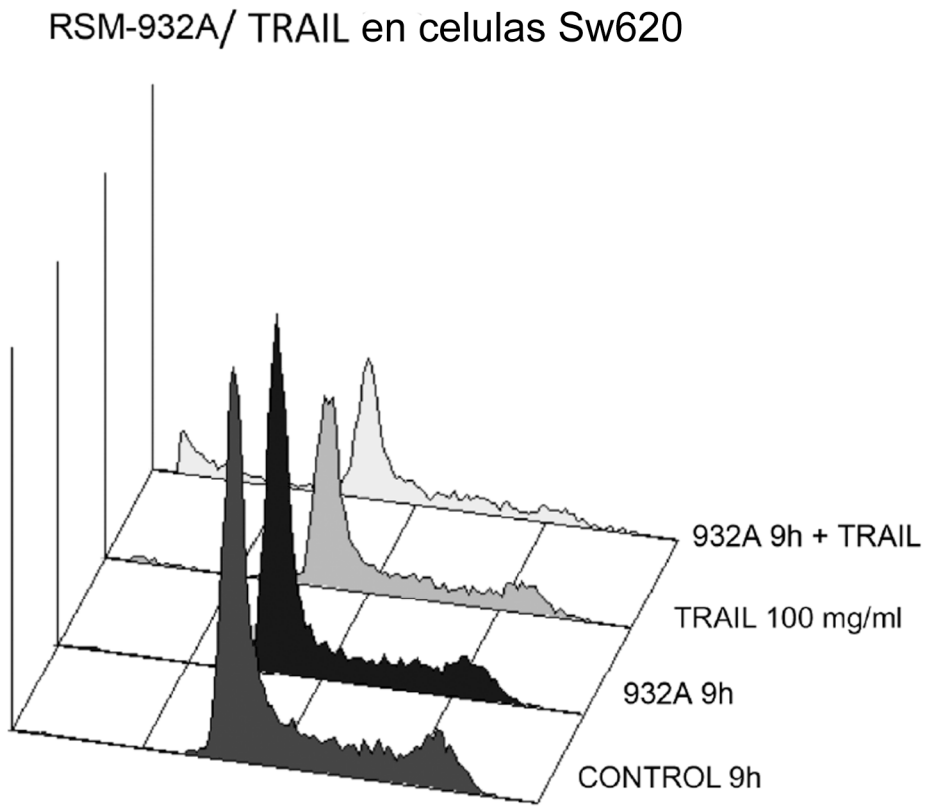

DLD-1 24H
% DE TOXICIDAD
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
21,50
10,10
48,65
MN58 20 µM
TRAIL 10 ng/ml
MN58 20+T 10
1
2
3
4
PARP
Caspasa 3
1. CONTROL
2. MN58
3. TRAIL
4. MN58 + TRAIL
SW620 24H
% DE TOXICIDAD
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
-10,00
9,28
0,00
40,10
MN58 5 µM
TRAIL 100 ng/ml
MN58 5+T100
1
2
3
4
PARP
CASPASA 3
GAPDH
1. CONTROL
2. MN58
3. TRAIL 100 ng/ml
4. MN58+TRAIL

FIGURA 10



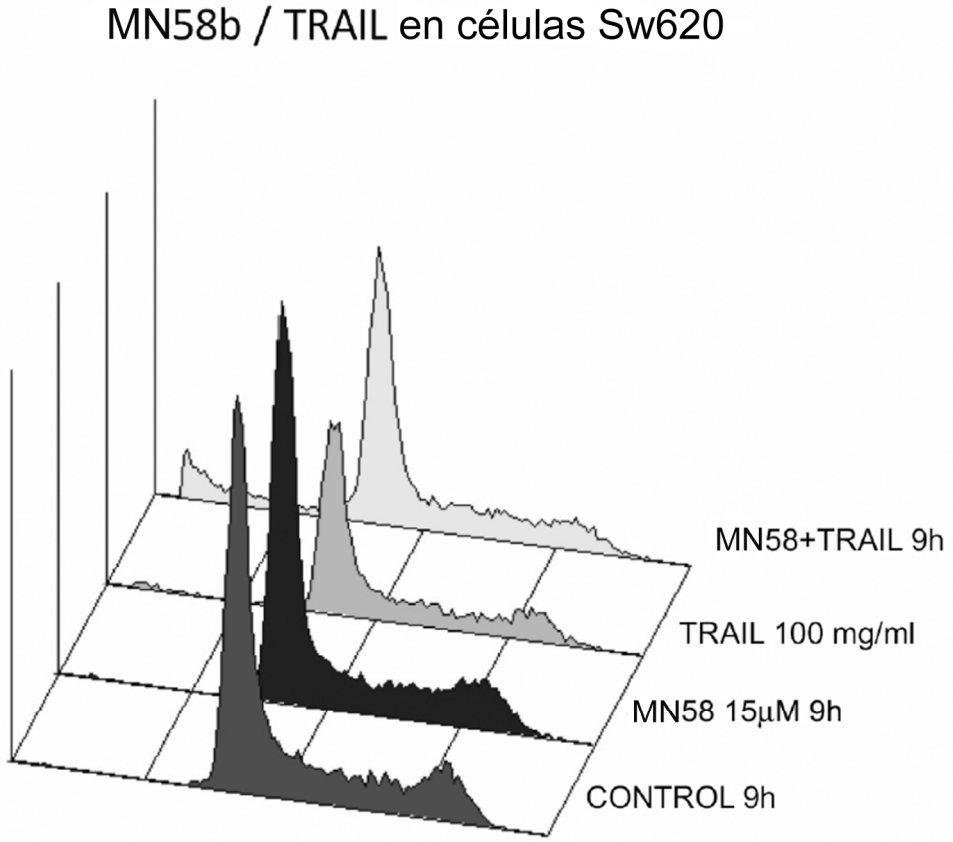
9h	Apoptosis	G0/G1	S	G2/M
Control	1,4	44,7	33,5	20,4
RSM-932A 15 µM	8,1	57,2	21	12,9
TRAIL 20ng/ml	10,8	47,3	23,3	18,5
RSM-932A+ TRAIL	33,4	28,8	17	18,3

FIGURA 11A



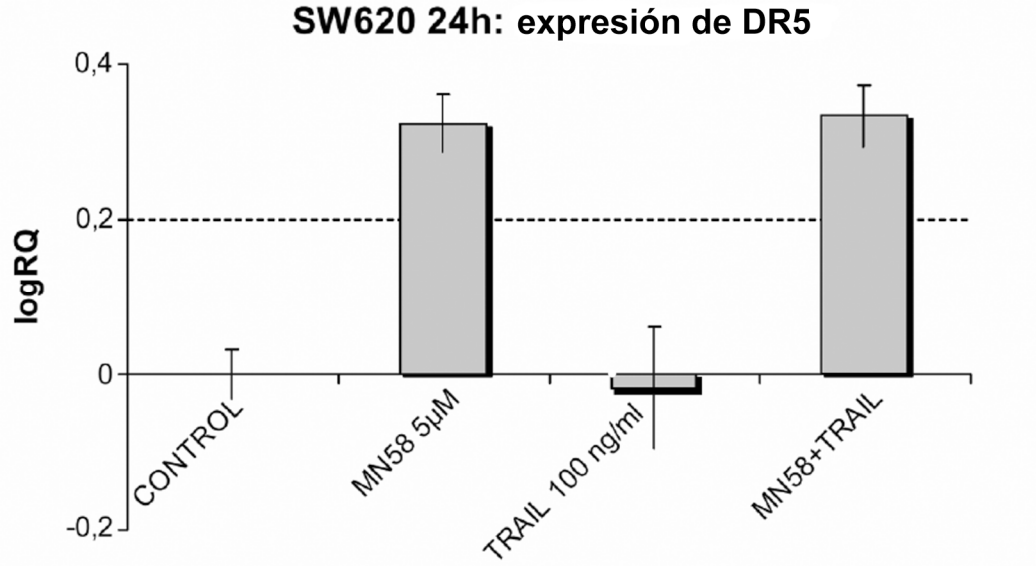
9h	Apoptosis	G0/G1	S	G2/M
Control	1,0	58,0	25,9	14,4
RSM-932A 15 µM	1,9	60,4	25,0	12,0
TRAIL 20ng/ml	3,6	55,5	26,4	13,6
RSM-932A + TRAIL	23,3	46,5	21,6	7,5

FIGURA 11B



9h	Apoptosis	G0/G1	S	G2/M
Control	1,0	58,0	25,9	14,4
MN58b 15 µM	1,3	58,7	25,8	13,9
TRAIL 20ng/ml	3,6	55,5	26,4	13,6
MN58b + TRAIL	16,2	50,9	23,0	9,1

FIGURA 11C


SW620 24h: expresión de DR5
logRQ
0,4
0,2
0
-0,2
CONTROL
MN58 5µM
TRAIL 100 ng/ml
MN58+TRAIL

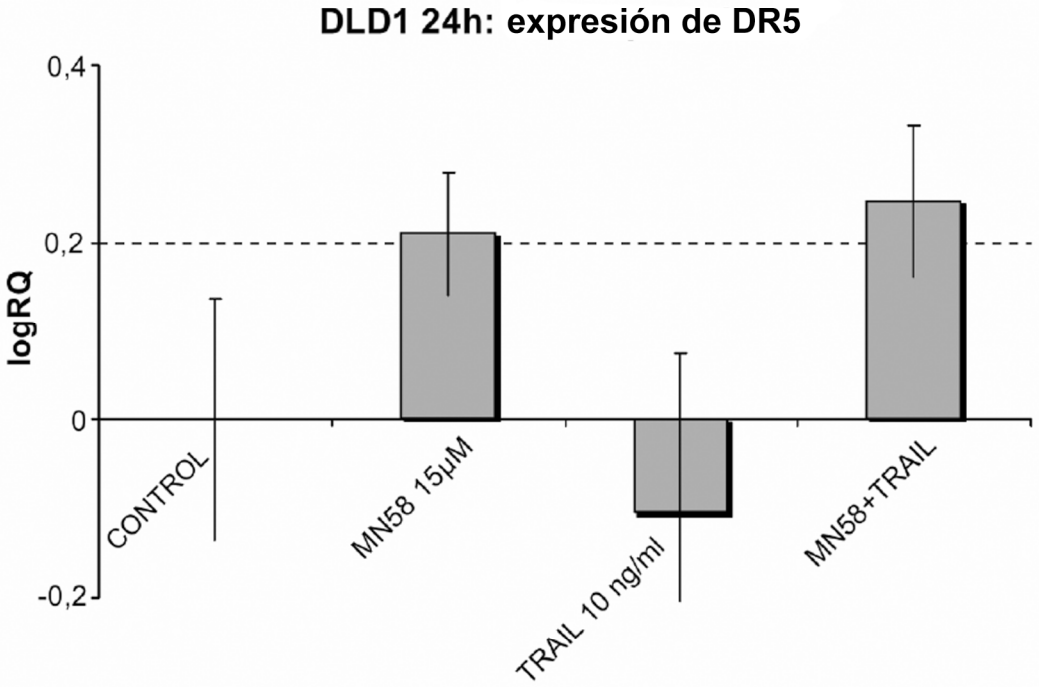

DLD1 24h: expresión de DR5
logRQ
0,4
0,2
0
-0,2
CONTROL
MN58 15µM
TRAIL 10 ng/ml
MN58+TRAIL

FIGURA 12

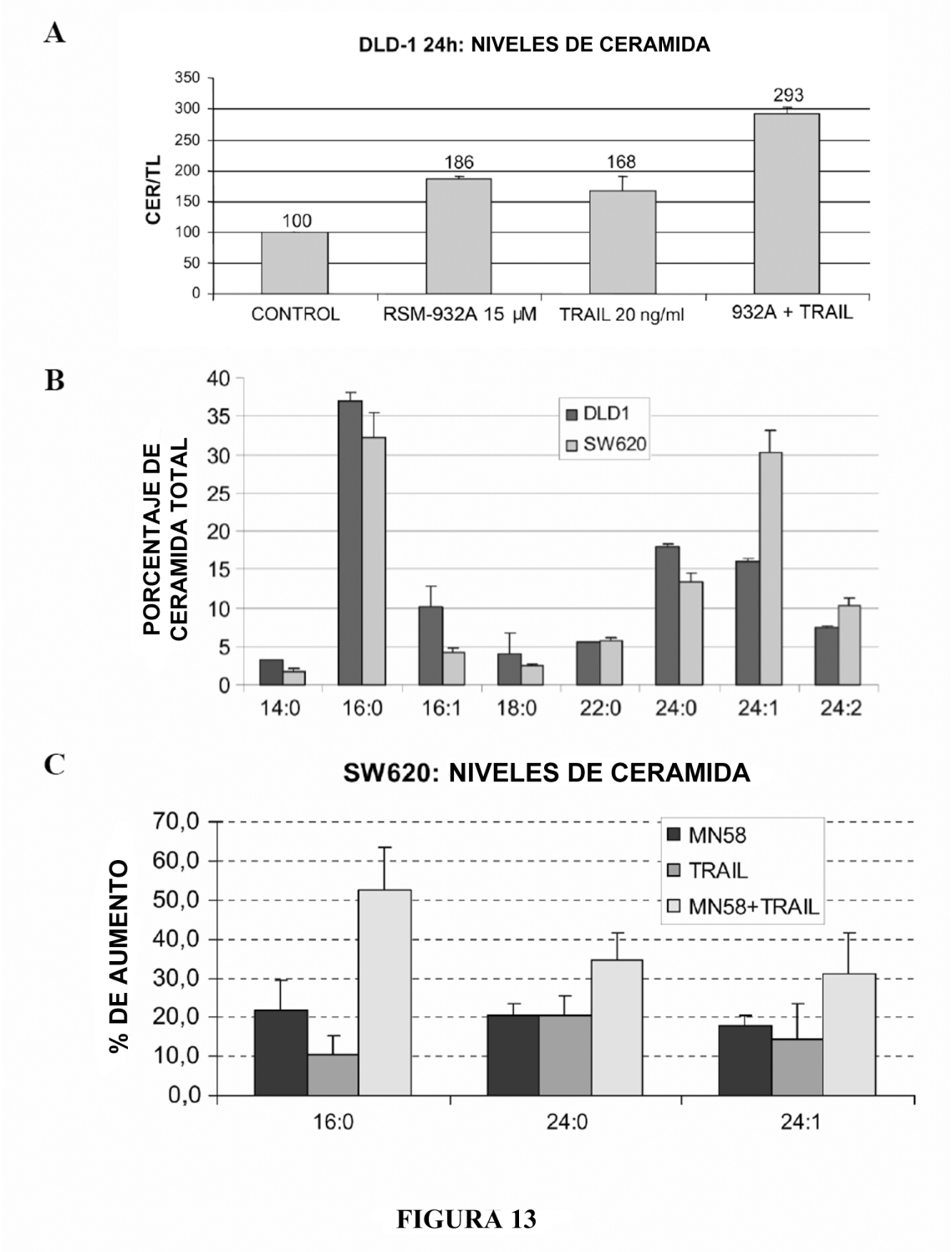
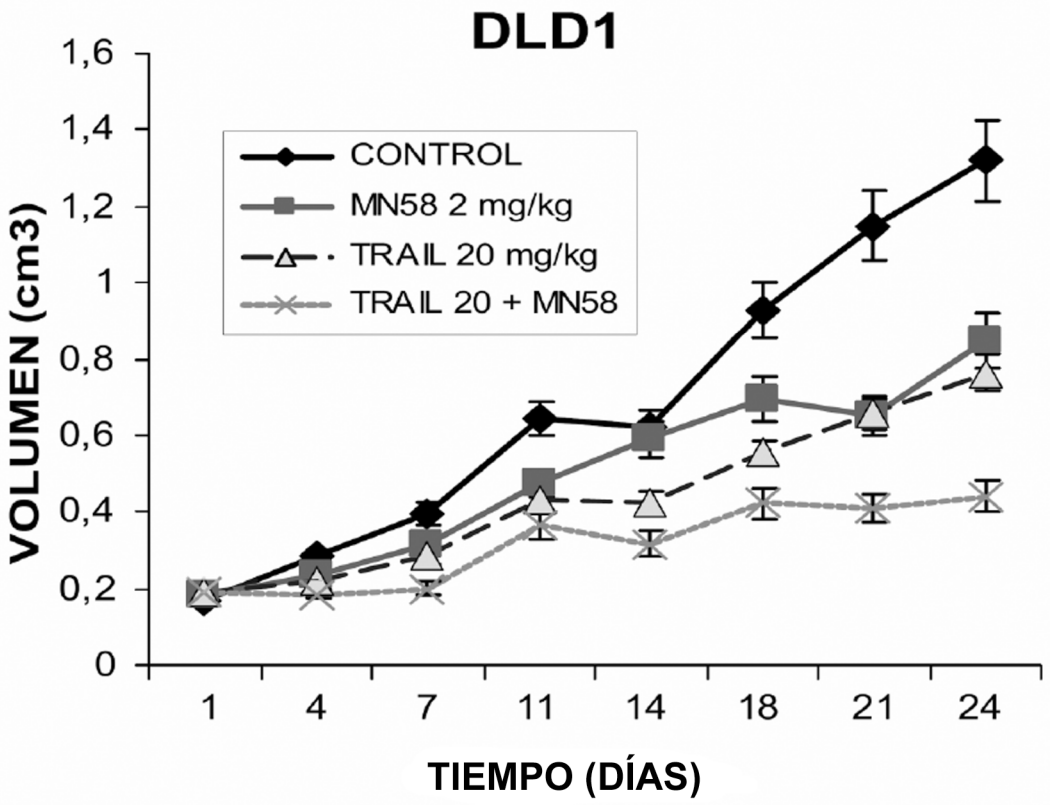
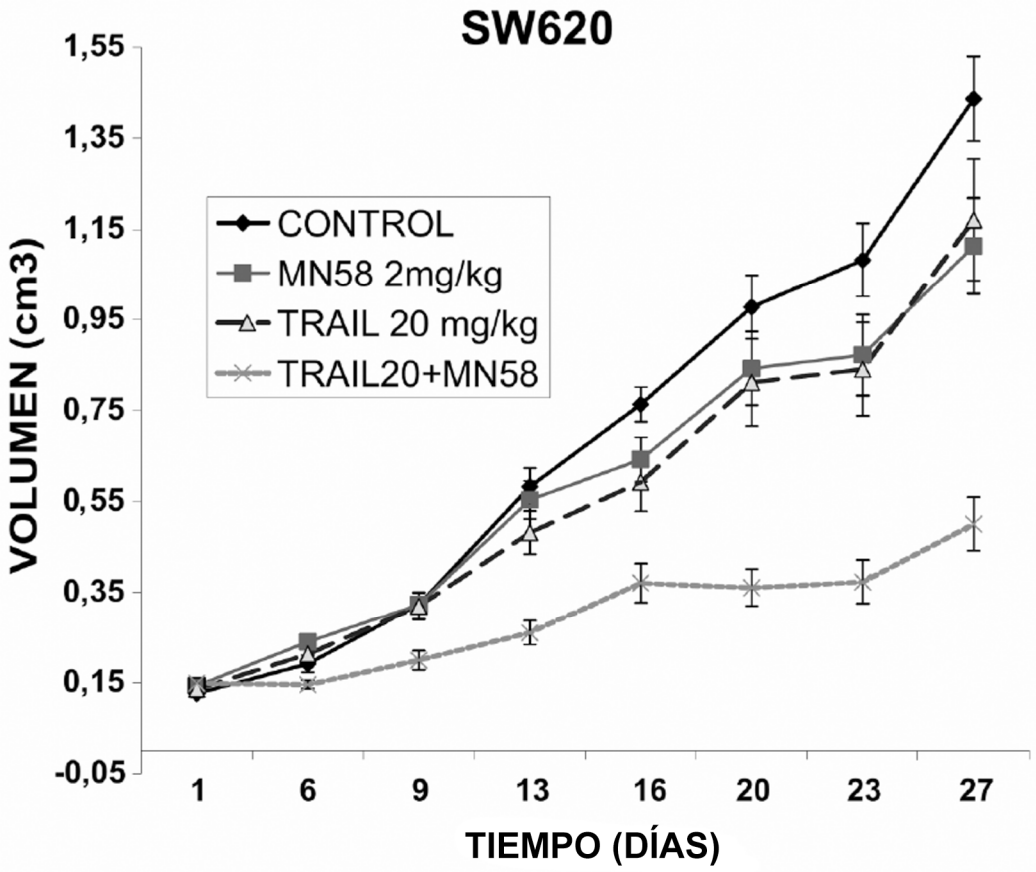

A
DLD-1 24h: NIVELES DE CERAMIDA
CER/TL
350
300
250
200
150
100
50
0
100
186
168
293
CONTROL
RSM-932A 15 µM
TRAIL 20 ng/ml
932A + TRAIL
B
PORCENTAJE DE CERAMIDA TOTAL
40
35
30
25
20
15
10
5
0
DLD1
SW620
14:0
16:0
16:1
18:0
22:0
24:0
24:1
24:2
C
SW620: NIVELES DE CERAMIDA
% DE AUMENTO
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
MN58
TRAIL
MN58+TRAIL
16:0
24:0
24:1

FIGURA 13



	DÍA 24	
	%INH	valor de p
MN58	**42,58**	0,00428676
TRAIL 20	**50,78**	0,00016458
T20+MN58	**78,30**	2,4727E-06

FIGURA 14A



	DÍA 27 %INH	valor de p
MN58	**26,03**	0,0282404
TRAIL20	**21,03**	0,0734883
MN+T20	**73,16**	4,146E-05

FIGURA 14B

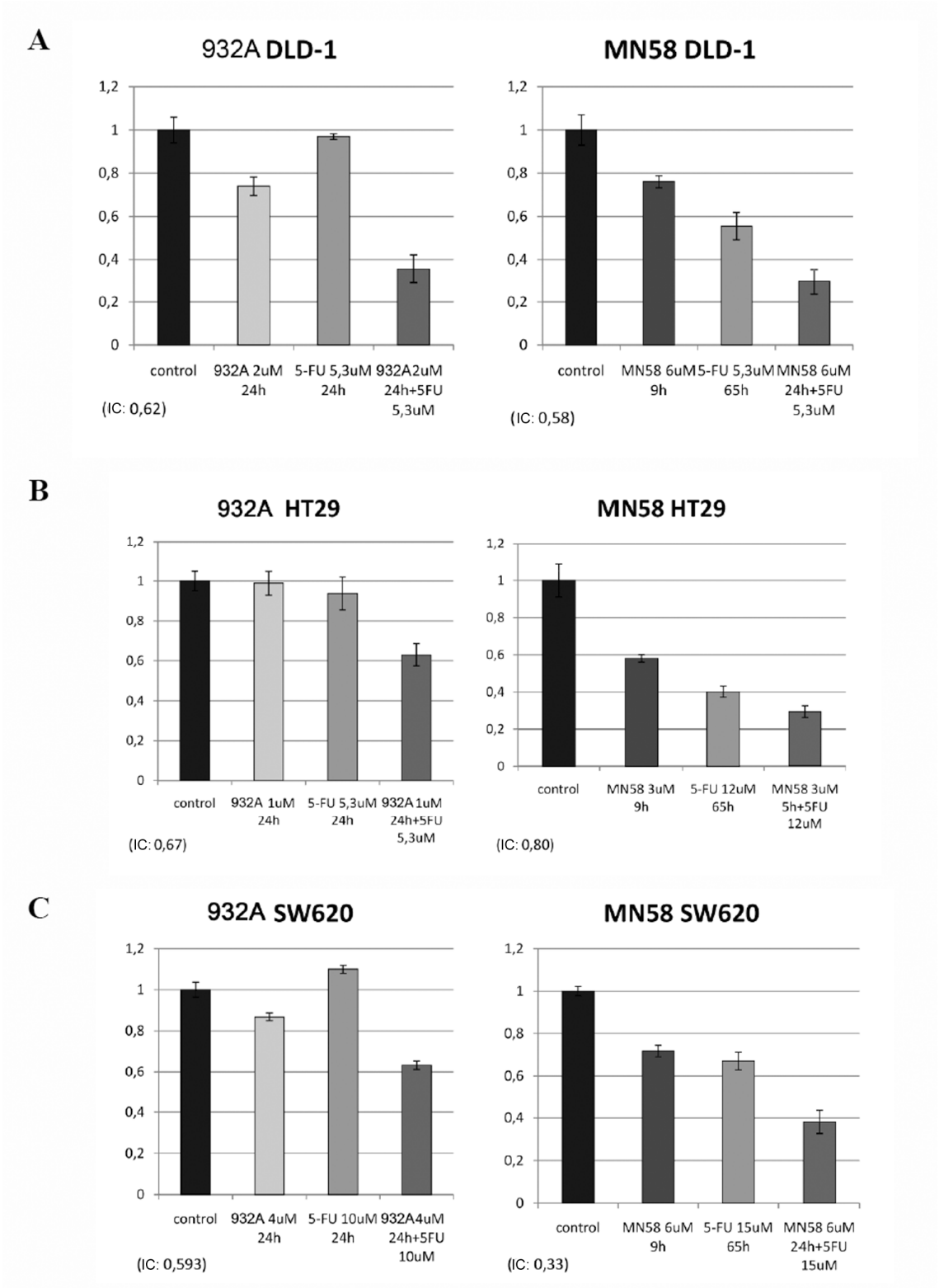

A
932A DLD-1
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
control
932A 2uM 24h
5-FU 5,3uM 24h
932A2uM 24h+5FU 5,3uM
(IC: 0,62)
MN58 DLD-1
control
MN58 6uM 9h
5-FU 5,3uM 65h
MN58 6uM 24h+5FU 5,3uM
(IC: 0,58)
B
932A HT29
control
932A 1uM 24h
5-FU 5,3uM 24h
932A 1uM 24h+5FU 5,3uM
(IC: 0,67)
MN58 HT29
control
MN58 3uM 9h
5-FU 12uM 65h
MN58 3uM 5h+5FU 12uM
(IC: 0,80)
C
932A SW620
control
932A 4uM 24h
5-FU 10uM 24h
932A4uM 24h+5FU 10uM
(IC: 0,593)
MN58 SW620
control
MN58 6uM 9h
5-FU 15uM 65h
MN58 6uM 24h+5FU 15uM
(IC: 0,33)

FIGURA 15

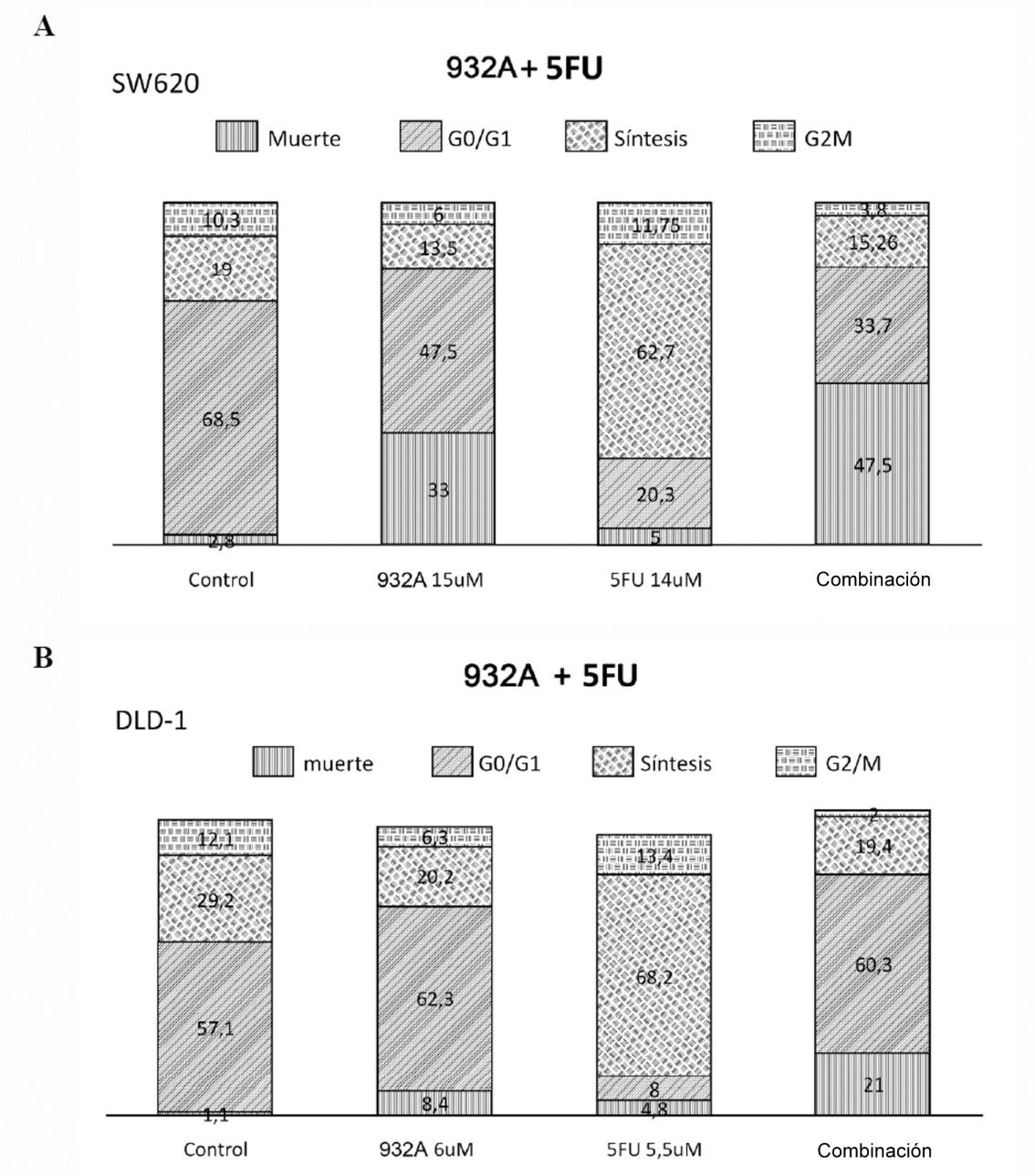
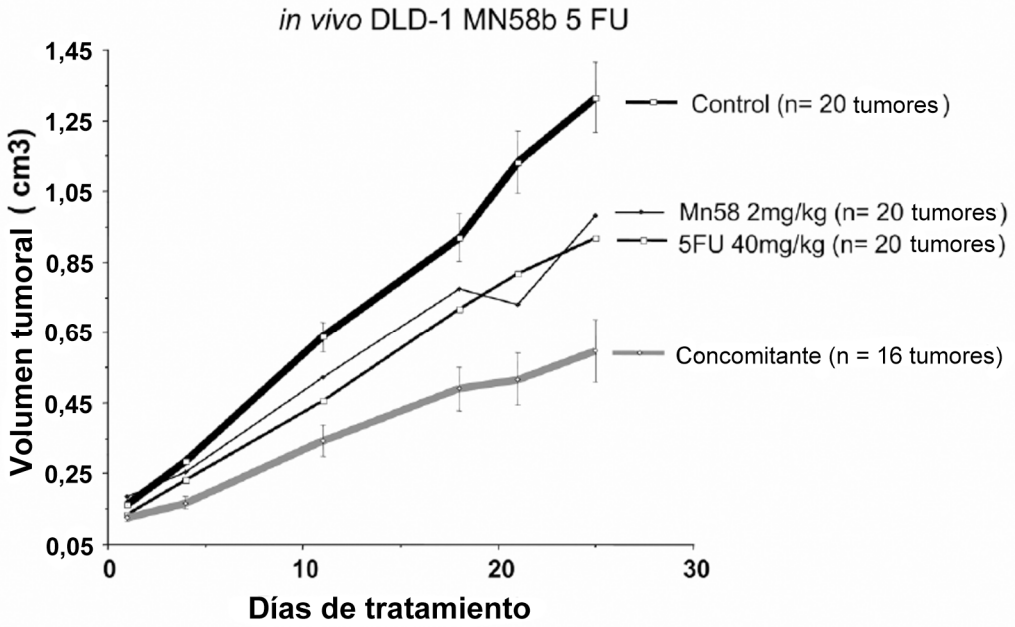
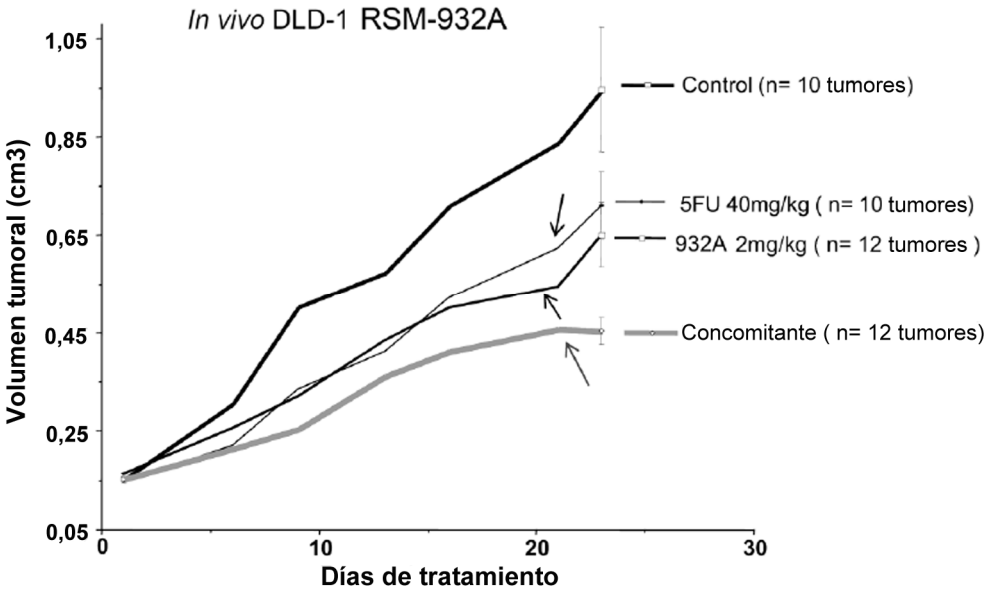

A
SW620
932A+ 5FU
Muerte
G0/G1
Síntesis
G2M
10,3
19
68,5
2,8
6
13,5
47,5
33
11,75
62,7
20,3
5
3,8
15,26
33,7
47,5
Control
932A 15uM
5FU 14uM
Combinación
B
932A + 5FU
DLD-1
muerte
G0/G1
Síntesis
G2/M
12,1
29,2
57,1
1,1
6,3
20,2
62,3
8,4
13,4
68,2
8
4,8
7
19,4
60,3
21
Control
932A 6uM
5FU 5,5uM
Combinación

FIGURA 16



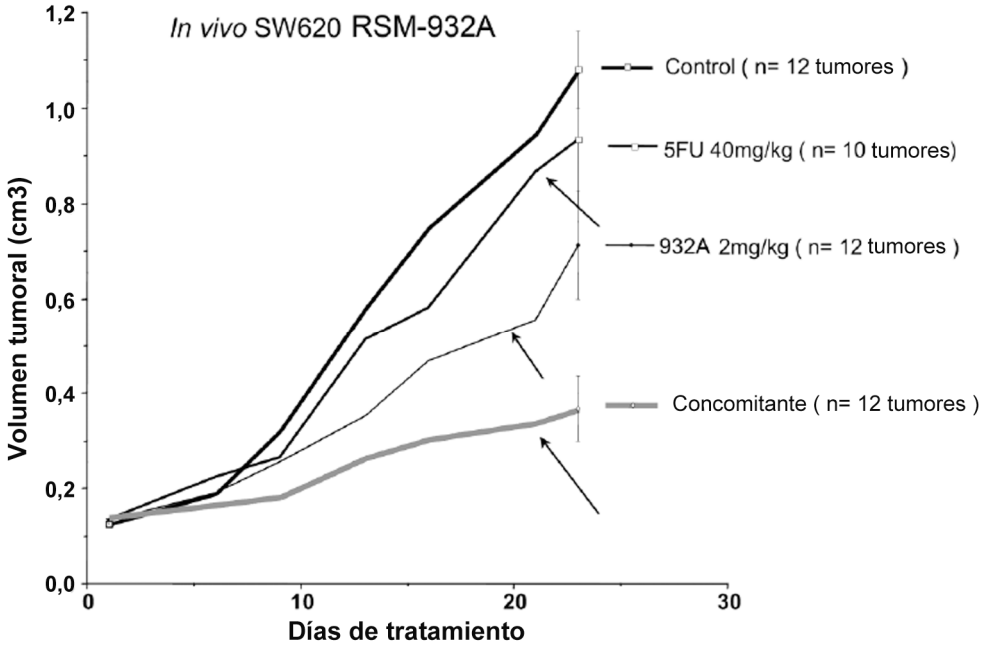
valores de P	control	% de reducción
MN58b 2mg/kg	0,014	30,3206235
5FU 40mg/kg	0,004	31,647883
Concomitante	5,27096E-05	58,6031421

FIGURA 17A



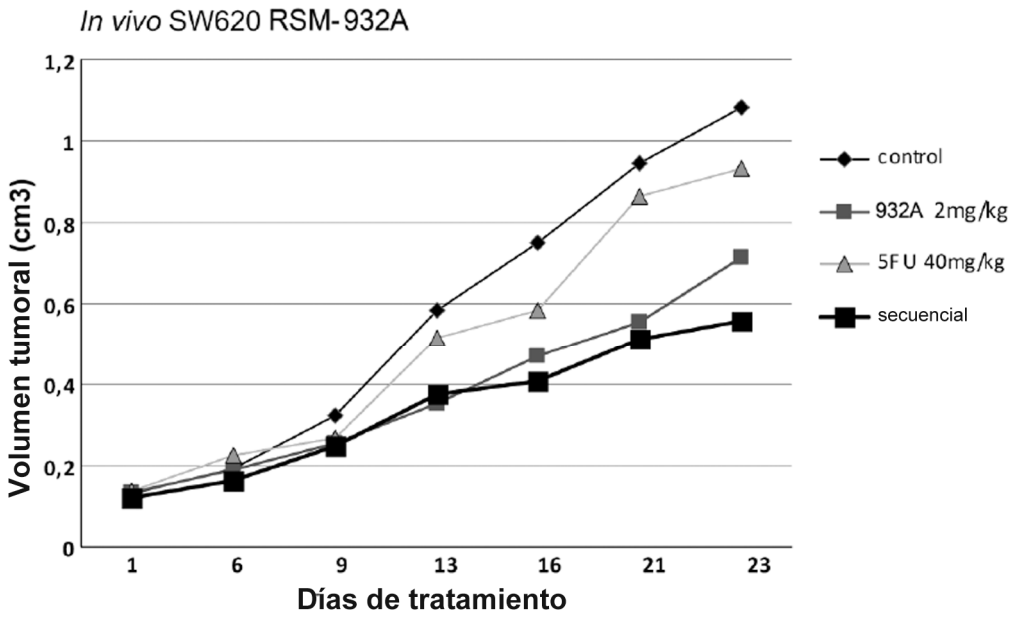
Valores de P	control	% de reducción
932A 2mg/kg	0,176	28,96
5FU 40mg/kg	0,091	38,62
Concomitante	0,0004711	62,03

FIGURA 17B



valores de P	control	% de reducción
932A 2mg/kg	0,021	39,05
5FU 40mg/kg	0,553	16,04
Concomitante	0,0001096	76,18

FIGURA 17C



valores de P	control	% de reducción
932A 2mg/kg	0,021	39,05
5FU 40mg/kg	0,553	16,04
Secuencial	0,00107	54,1

FIGURA 17D