



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 121**

51 Int. Cl.:
A61K 31/688 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00916269 .4**
86 Fecha de presentación : **24.03.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1165137**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

54 Título: **Preparación que contiene esfingomielina destinada a mejorar la terapia tumoral.**

30 Prioridad: **25.03.1999 US 126189 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **CENTER FOR MOLECULAR MEDICINE
AND IMMUNOLOGY
520 Belleville Avenue
Belleville, New Jersey 07109-0023, US**

72 Inventor/es: **Modrak, David**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 269 121 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

Preparación que contiene esfingomielina destinada a mejorar la terapia tumoral.

5 **Antecedentes de la invención**

Tradicionalmente, la eficacia de muchas terapias anticancerosas se creyó que derivaba de la citotoxicidad debida al daño inducido en el ADN por la quimioterapia o la irradiación. Dicho daño del ADN se consideraba que disparaba una respuesta apoptótica. Véase, Eastman *et al.*, *Cancer Invest.*, 10:229-240 (1992); Allan, D.J., *Int. J. Radiat. Biol.*, 62:145-152 (1992). La apoptosis es conceptualmente una senda inducible preprogramada de eventos bioquímicos, que conducen a la activación de endonucleasas dependientes de calcio y magnesio que cortan la cromatina nuclear selectivamente en los conectores de los nucleosomas. Las señales generadas en la membrana de las células afectadas activan células vecinas y macrófagos infiltrantes que fagocitan las células muertas y sus núcleos desintegrados.

Una hipótesis inicial sobre la naturaleza del daño letal generado por las radiaciones ionizantes identificó las rupturas heterólogas de la doble cadena del ADN como el tipo más común de lesión que conduce a la muerte de las células de mamífero. Véase Radford, I.R., *Int. J. Radiat. Biol.*, 49:611-620 (1986); Ward, J.F., *Prog. Nucleic Acid Mol. Biol.*, 35:95-125 (1988). Tales lesiones se producen en el ADN mediante la interacción directa con rayos X o con intermediarios de oxígeno reactivo generados en la célula por la radiación. Véase: Steel *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.*, 56:525-537 (1989). Mientras que las células de los mamíferos son eficaces en la reparación de la mayoría de las rupturas de la doble cadena del ADN, no todas las lesiones son reparables. Véase: Ward, J.F., *Prog. Nucleic. Acid Mol. Biol.*, 35:95-125 (1988). Las lesiones residuales no reparadas del ADN pueden dar lugar a la muerte postmitótica de la célula. Véase: Bedford, J.S., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 21:1457-1469 (1991). Por consiguiente, hasta hace poco, se consideraba que la reparación ineficaz del ADN tenía una función clave en la sensibilidad a la radiación.

De modo semejante, algunas quimioterapias, por ejemplo, la antraciclina daunorrubicina (DNR), se creía que inducía citotoxicidad como resultado del daño inducido por el fármaco en el ADN. Se sugirió que el daño del material genético podía provenir de los radicales libres generados por la actividad redox de la quinona, de la distorsión inducida por la intercalación de la doble hélice o de la estabilización de los complejos de excisión formados entre el ADN y la topoisomerasa II. Véase: Chabner *et al.*, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, J.B. Lippencott Co., Philadelphia, PA. pp. 349-395 (1989). Sin embargo, el mecanismo mediante el que dicho daño inducía la senda apoptótica permanecía oscuro.

Recientemente, se ha establecido una alternativa a la hipótesis de que el daño directo al ADN debido a las terapias media en la inducción de la apoptosis. La senda de transmisión de señal de la esfingomielina para la inducción de apoptosis ha emergido como el principal mecanismo en muchas terapias contra el cáncer, que incluyen las radiaciones ionizantes, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y daunorrubicina. Véase, Haimovitz-Friedman *et al.*, *J. Exp. Med.*, 180:525-535 (1994); Kolesnick *et al.*, *cell*, 77:325-328 (1994); Jaffrezou *et al.*, *Embo J.*, 15:2417-2424 (1996); Bose *et al.*, *Cell*, 82:405-414 (1995).

La esfingomielina es una clase de esfingolípido, que constituye una de las clases principales de lípido en las células, especialmente la membrana plasmática. Véase Merrill *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 142:208-225 (1997). La esfingomielina se encuentra compartimentalizada en dos almacenes diferentes en la membrana plasmática. Véase Linnardic *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:23530-23537 (1994). Se ha propuesto que el almacén de esfingomielina localizado en la hoja interna de la membrana plasmática está dedicada exclusivamente a la señalización intracelular. La observación de que no hay diferencia entre las especies moleculares de esfingomielina de estos dos almacenes de esfingomielina de la membrana plasmática sugiere la importancia de la compartimentalización en la transducción de señal. Véase Fritzgerald *et al.*, *Lipids*, 30:805-809 (1995).

Muchas de las terapias contra el cáncer inician la senda de la esfingomielina al inducir la hidrólisis rápida de la esfingomielina a ceramido. El ceramido tiene una función clave en múltiples procesos celulares, que incluyen regular la muerte celular programada. Véase Merrill *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 142:208-225 (1997). La especificidad del ceramido como un segundo mensajero de la apoptosis se demostró mediante el hecho de que los análogos del ceramido permeables a las células, pero no los análogos de otros segundos mensajeros lipídicos, fueron capaces de recapitular los efectos del TNF- α , Fas y la radiación ionizante e inducir la apoptosis directamente. La inducción de apoptosis por el ceramido es asimismo estereoespecífica, ya que el dihidroceraido no induce apoptosis. También se ha propuesto que el ceramido inicia activando la senda de proteína quinasa activada por el estrés. Véase Verheij *et al.*, *Nature*, 380:75-79 (1996).

Mientras que muchas terapias tienen éxito en iniciar la senda de transducción de la esfingomielina, la respuesta apoptótica inducida puede ser limitada o breve. Debido a razones desconocidas, las células tumorales tienen composiciones de lípidos anormales, incluida la esfingomielina. Los tejidos tumorales típicamente tienen concentraciones más elevadas de esfingomielina que los tejidos normales; sin embargo, es posible que algunas células tumorales tengan una capacidad de síntesis de esfingomielina reducida. Véase Koizumi *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.*, 649:393-403 (1991); Van Blitterswijk *et al.*, *Biochem. Biosphys. Acta.*, 778:521-529 (1984). Además, el metabolismo alterado de los lípidos en las células tumorales puede producir cambios en la distribución intracelular de la esfingomielina. Tal redistribución en la membrana plasmática puede dar lugar a esfingomielina mal dirigida incapaz de ser un sustrato de los enzimas que hidrolizan esfingomielina responsables de generar ceramido en respuesta a un tratamiento citotóxico.

Véase Bettaieb *et al.*, *Blood*, 88:1465-1472 (1996). En consecuencia, la reorganización de la esfingomielina en la membrana plasmática puede impedir la capacidad de las células tumorales para la apoptosis inducida por ceramido y conducir a una sensibilidad reducida a ciertas terapias.

5 Modrak, D.E. *et al.*, *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting* (15.03.1999), da a conocer la potenciación de la quimioterapia con 5-fluorouracilo por la esfingomielina en ratones desnudos portadores de tumores de colon HT-29. Por consiguiente continúa existiendo la necesidad de un procedimiento para superar la alteración del metabolismo de los lípidos en las células tumorales con el fin de maximizar una terapia tumoral que utiliza la senda de la esfingomielina con el fin de inducir apoptosis.

10

Sumario de la invención

Es por consiguiente un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para mejorar las terapias tumorales que utiliza la senda de la esfingomielina con el fin de inducir apoptosis.

15

De acuerdo con la presente invención se proporciona la utilización de una cantidad terapéuticamente efectiva de esfingomielina de acuerdo con la reivindicación 1.

20

En una forma de realización de la presente invención, la esfingomielina de ocurrencia natural (C16:0) se administra junto con terapia tumoral. En otra forma de realización, se utilizan esfingomielinas de cadenas laterales más cortas (C₂-C₁₅).

25

En todavía otra forma de realización de la presente invención, se administra esfingomielina oralmente a un paciente, mientras que en otra forma de realización se administra parenteralmente.

30

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente. Se debe entender que los ejemplos se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

Breve descripción de los dibujos

35

La Figura 1 demuestra gráficamente que la administración conjunta de 5-fluorouracilo y esfingomielina reduce la velocidad de crecimiento de los tumores GW39 mucho más y durante más tiempo que el 5-fluorouracilo solamente.

40

La Figura 2 muestra gráficamente que la administración conjunta de esfingomielina mejora el tratamiento de tumores HT29 con 5-fluorouracilo. Los grupos de ensayo fueron como sigue: sin tratamiento (●), 0,45 mg 5FU/día durante 5 días (■), 10 mg SM/día durante 7 días (▲) o combinación de 5FU y SM iniciados el mismo día (◆).

45

La Figura 3 demuestra que la esfingomielina altera la quimiosensibilidad al 5FU de las líneas de células tumorales *in vitro*. Los valores de IC₅₀ se muestran en la gráfica con las desviaciones estándar. Se utilizan los siguientes símbolos: m, media (no lípido); SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina. Se compilaron entre tres y seis experimentos independientes y después se compararon mediante ANOVA: *, p < 0,1; **, p < 0,05; ***, p < 0,01; ****, p < 0,005.

50

La Figura 4 demuestra que la esfingomielina altera la quimiosensibilidad a DOX de las líneas de células tumorales *in vitro*. Los valores IC₅₀ se muestran en la gráfica con las desviaciones estándar. Se utilizan los siguientes símbolos: m, media (no lípido); SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina. Se compilaron entre tres y seis experimentos independientes y se compararon mediante ANOVA: *, p < 0,1; **, p < 0,05; ***, p < 0,01; ****, p < 0,005.

55

Descripción detallada de la invención

60

La presente invención mejora la terapia tumoral. La presente invención se cree que mejora la capacidad de las células tumorales para sufrir apoptosis inducida por ceramido mediante el incremento de los niveles de esfingomielina en todos los compartimentos celulares, proporcionando de este modo suficiente sustrato para la esfingomielinasa activada. Las células tumorales tienen típicamente un metabolismo lipídico alterado, que incluye la composición y la compartimentalización anormal de la esfingomielina. Mientras que la mayoría de las células tumorales pueden tener niveles de esfingomielina anormalmente elevados, puede no estar disponible a su enzima hidrolizante, la esfingomielinasa, debido a una compartimentalización subcelular anormal de la esfingomielina. La alteración en el metabolismo de la esfingomielina puede dificultar la capacidad de las células para generar ceramido y puede conducir a una sensibilidad reducida a ciertas terapias. Sorprendentemente e inesperadamente, la presente invención demuestra que la administración de esfingomielina adicional incrementa la acción tumoricida de la terapia tumoral.

65

Según la presente invención, la actividad tumoricida de la terapia tumoral se amplifica mediante la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de esfingomielina junto con la terapia. Mientras que la invención no queda limitada al mecanismo propuesto, la administración de esfingomielina es probable que mejore toda terapia que utilice la senda de señalización de la esfingomielina para inducir apoptosis. Esto incluye, pero sin quedar limitado, las terapias que buscan controlar o inhibir el crecimiento rápido anormal.

Según la presente invención, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de esfingomielina a un paciente que sigue una terapia con antraciclina (p. ej., doxorubicina/adriamicina, daunorubicina, idarrubicina).

En otra forma de realización, la quimioterapia puede estar dirigida a las células tumorales utilizando un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La utilización de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o péptidos que se unen a receptores para dirigir terapia específicamente a las células tumorales amplifica la administración de dosis quimioterapia tumoricida a la vez que reduce significativamente la toxicidad de los tejidos normales.

En una forma de realización de la presente invención, se administra esfingomielina natural a un paciente con el fin de mejorar la actividad tumoricida de la quimioterapia. La esfingomielina natural típicamente comprende derivados de cadena lateral larga (grupos C₁₆-C₃₀ N-acilo). Tales esfingomielinas se pueden obtener de fuentes comerciales y generalmente están obtenidas a partir de yemas y contienen principalmente cadenas palmitoilo. Véase Sigma Chemicals (St Louis, MO), nº de catálogo S0756.

La biosíntesis de *ново* de la esfingomielina se inicia mediante la condensación de serina y palmitoil-CoA que resulta en la formación de 3-cetoefinganina (3-cetodihidro-esfingosina), que a continuación se reduce a dihidroesfingosina. Véase Hammun, Y.A., *J. Biol. Chem.*, 269:3125-3218 (1994). El dihidroceramido se forma mediante la unión amida de grupos grasos acilo a la dihidroesfingosina. El cerámido se forma a partir del dihidroceramido mediante la introducción de un doble enlace trans-4,5 y sirve de precursor de todos los demás esfingolípidos complejos. La esfingomielina se forma mediante la adición de un grupo fosforilcolina de cabeza al ceramido, principalmente mediante la transferencia de fosfato de colina derivado de la fosfatidilcolina mediante la acción de la fosfatidilcolina:ceramido colin fosfotransferasa.

La esfingomielina con cadenas laterales modificadas se puede administrar a un paciente para mejorar la actividad tumoricida de la terapia tumoral. Por ejemplo, se pueden utilizar análogos de la esfingomielina con cadenas laterales más cortas que las naturales, que incluyen cadenas laterales C₂-C₁₅. Los estudios de apoptosis han demostrado que los análogos de ceramido con cadenas laterales cortas (C₂, C₈) inducen apoptosis con efectividad y pueden actuar más rápidamente que las moléculas con moléculas de longitud normal. Véase Bose *et al.*, *Cell*, 82:405-414 (1995); Haimovitz-Fredman *et al.*, *J. Exp. Med.*, 180:525-535 (1994). De modo semejante, los análogos de esfingomielina con cadenas laterales más cortas que las normales producen una mayor mejora de la actividad tumoricida de los agentes de terapia tumoral. Por el contrario, las cadenas más largas que las normales, que incluyen C₂₄, también pueden ser efectivas.

En la técnica se conocen numerosas estrategias para alterar la actividad de las moléculas biológicas mediante la modificación de su estructura. En general, las modificaciones de un compuesto natural pueden incrementar su actividad biológica o facilitar su absorción mediante la maquinaria celular adecuada. Además de la modificación de la longitud de las cadenas laterales de una molécula, la incorporación de elementos adicionales o grupos funcionales puede asimismo mejorar la acción de un compuesto natural. Los ejemplos de tales sustituyentes incluyen, pero sin quedar limitado a éstos, grupos alifáticos, p. ej., grupos alquilo o cicloalquilo C₁-C₆ de cadena lineal o ramificada, grupos aromáticos, grupos funcionales, p. ej., ciano-, nitro-, azida-, haluro- y epóxido, y otros elementos, p. ej., azufre, selenio, boro y metales, así como la inserción de p. ej., átomos de oxígeno o nitrógeno en las cadenas laterales. La actividad de la esfingomielina se puede asimismo mejorar mediante la adición de enlaces dobles o triples a la molécula. Véase Kishida *et al.*, *J. Lipid. Mediat. Cell Signal*, 16:127-137 (1997).

En una forma de realización de la presente invención, la esfingomielina se administra oralmente a un paciente. En otra forma de realización, se administra parenteralmente. Administración parenteral se refiere a una multiplicidad de procedimientos para la administración de un compuesto a un paciente que incluyen, de manera no limitativa, la administración intravenosa/intraarterial, intracecal, subcutánea y mediante un parche transdermal.

La terapia génica se puede utilizar con el fin de incrementar la concentración de esfingomielina en las células diana de un paciente que sufre terapia tumoral citotóxica. La terapia génica necesita de un sistema para introducir un vector que contiene un enzima implicado en la síntesis de esfingomielina en las células diana. Se puede utilizar un enzima cualquiera, incluyendo las de origen mamífero, bacteriano o de hogo, que sea capaz de incrementar la concentración de esfingomielina en una célula. Los ejemplos incluyen, de manera no limitativa, serinpalmitoiltransferasa, ceramido sintetasa y esfingomielinasa.

La construcción de un vector adecuado se puede lograr mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en la materia para la inserción de ADN exógeno en un vector. Véase Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, NY. Además, la técnica anterior enseña múltiples procedimientos destinados a introducir genes exógenos en las células *in vivo*. Véase Rosenberg *et al.*, *Science* 242:1575-1578 (1988); Wolff *et al.*, *PNAS* 86:9011-9014 (1989). Las vías de administración incluyen la administración sistémica y la administración *in situ*. Los procedimientos bien conocidos incluyen la administración sistémica mediante liposomas catiónicos y la administración *in situ* mediante vectores víricos. Véase, Caplen *et al.*, *Nature Med.*, 1:39-46 (1995); Zhu *et al.*, *Science*, 261:209-211 (1993); Berkner *et al.*, *Biotechniques*, 6:616-629 (1988); Trapnell *et al.*, *Advanced Drug Delivery Rev.*, 12:185-199 (1993); Hodgson *et al.*, *BioTechnology* 13:222 (1995). Los vectores y los sistemas de administración de genes que dirigen a los genes exógenos específicamente a las células diana son los más preferidos. Se anticipa que las mejoras futuras en la administración de genes aumentarán la importancia de esta forma de realización.

Una cantidad terapéutica de esfingomielina se puede determinar mediante la prevención o la disminución de los síntomas negativos de la enfermedad, daños o trastornos que se tratan. La optimización y de los tiempos y dosis de la esfingomielina administrada a un paciente junto con la terapia tumoral se adapta por convención a, entre otras cosas,

las características particulares del paciente y la extensión de la tumorigénesis. Tales adaptaciones son de rutina y no necesitan de una innecesaria experimentación o habilidad en la técnica. De manera similar, la optimización de los tiempos y las dosis de esfingomielina administrada al paciente como terapia para la artritis reumatoide se adaptan asimismo a, entre otras cosas, las características particulares del paciente. Los procedimientos y composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden utilizar para tratar múltiples mamíferos y se utilizan preferentemente con el fin de tratar seres humanos y animales domésticos, tales como el ganado y los animales de compañía.

I. Preparación de los reactivos

Preparación de esfingomielina

Se pueden obtener múltiples formas de esfingomielina en polvo de Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Se mezcla 1 g de esfingomielina en polvo con 9,5 ml de disolución salina estéril o disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y QS hasta 10 ml. Se sonica la suspensión resultante en un baño de agua a entre 80 y 90°C durante 1 hora. La suspensión se debe administrar en una hora después de la sonicación y debe estar a aproximadamente la temperatura ambiente (25 a 30°C). La suspensión se puede almacenar a 4°C; sin embargo, se debe volver a sonicar durante 30 minutos en un baño de agua a entre 80 y 90°C antes de su administración.

II. Procedimiento para amplificar la terapia tumoral

Ejemplo 1

Evaluación in vivo de la terapia con esfingomielina de tumores de colon GW39

Se valoró la mejora de la quimioterapia mediante la medición de los efectos del tratamiento con 5-fluorouracilo (5FU) de tumores GW39 de colon en ratones. Se implantaron tumores GW39 subcutáneamente en ratones desnudos. Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño de 0,5 cm³, se dividieron los ratones en grupos de diez y se les administró una de las terapias siguientes: no tratamiento (●), 0,45 mg/día de 5-fluorouracilo durante cinco días (■), 10 mg/día de esfingomielina (SM) durante siete días (▲), o 0,45 mg/día de 5-fluorouracilo durante 5 días y 10 mg/día de esfingomielina durante siete días (◆). Tanto el 5-fluorouracilo como la esfingomielina se administraron mediante inyección intravenosa. Al grupo que recibió 5-fluorouracilo y esfingomielina se le administraron las dos terapias durante cinco días y a continuación continuó recibiendo inyecciones de esfingomielina durante dos días. En cada animal se valoró el volumen de los tumores a intervalos de una semana durante tres semanas después del tratamiento.

Los resultados se muestran en la Figura 1. La esfingomielina sola no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral. El tratamiento con 5-fluorouracilo ralentizó inicialmente la velocidad de crecimiento, pero la velocidad de crecimiento aumentó después de la segunda semana. Sin embargo, la administración conjunta del 5-fluorouracilo y la esfingomielina redujo la velocidad de crecimiento mucho más y durante más tiempo que el 5-fluorouracilo por sí solo. Esto no forma parte de la presente invención.

Ejemplo 2

Evaluación in vivo de la terapia con esfingomielina de tumores de colon HT29

La mejora debido a la esfingomielina de la quimioterapia se valoró mediante la medición de su efecto en el tratamiento con 5-fluorouracilo de tumores de colon HT29 en ratones. Se implantaron ratones desnudos subcutáneamente con tumores HT29. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 0,5 cm³, se separaron los ratones en grupos de diez y se les administró la siguiente terapia: sin tratamiento (●), 0,45 mg/día de 5-fluorouracilo durante cinco días (■), 10 mg/día de esfingomielina durante siete días (▲), o 0,45 mg/día de 5-fluorouracilo durante cinco días y 10 mg/día de esfingomielina durante siete días (◆).

Tanto el 5-fluorouracilo como la esfingomielina se administraron mediante inyección intravenosa. Al grupo que recibió 5-fluorouracilo y esfingomielina se le administraron las dos terapias durante cinco días y a continuación continuó recibiendo inyecciones de esfingomielina durante dos días. El volumen tumoral en cada animal se midió a intervalos semanales durante cinco semanas después del tratamiento, excepto el grupo de solamente esfingomielina que se evaluó durante cuatro semanas. El promedio de los datos de cada grupo se ajustó a una curva de crecimiento exponencial utilizando regresión no lineal. Las curvas se compararon utilizando ANOVA.

Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 2. Ni la esfingomielina ni el 5-fluorouracilo, administrados por sí solos, tuvieron efecto sobre el crecimiento del tumor ($p < 0,1$ para cada uno de los compuestos en comparación con el grupo no tratado). Sin embargo, la administración conjunta de tanto 5-fluorouracilo como esfingomielina redujo la velocidad de crecimiento del tumor aproximadamente un 250% ($p < 0,0002$). Esto no forma parte de la presente invención.

Ejemplo 3

Evaluación in vitro de la terapia con esfingomielina de tumores de colon

5 Se valoró la mejora debida a la esfingomielina de la quimioterapia mediante su efecto en el tratamiento con 5-fluouracilo o doxorubicina (DOX) de tumores de colon crecidos en cultivo. La viabilidad celular se midió utilizando el colorante MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) en el formato de placa de 24 pocillos. Véase Mosmann, T., *J. Immunol. Methods*, 65:55-63 (1983). Las líneas celulares HCT15, HT29, LoVo, LS174T, MOSER, SW480 y WiDr de tumor de colon humano se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 10% suero bovino fetal. Se utilizaron como control células endoteliales de cordón umbilical venoso humano (HUVEC) (Clonetics/BioWhittaker, San Diego, CA) de donantes agrupados. Las células se sembraron (10^4 /pocillo) en presencia de múltiples concentraciones del fármaco y esfingomielina y se cultivaron en un incubador humidificado. Como control adicional, se añadió a las células fosfatidilcolina (PC) de yema de huevo (Sigma, St. Louis, MO) en lugar de esfingomielina. Los fármacos y lípidos se añadieron a las células HUVEC 24 horas después del sembrado, pero con esta excepción se se trataron del mismo modo. Después de cuatro días, se reemplazó el medio por medio que contenía 0,5 mg/ml MTT y se incubaron durante entre dos y cuatro horas a 37°C. Se añadió un volumen igual de 0,04 N HCl en isopropanol y se midió la absorbancia a 570 nm. Los valores de IC_{50} , definidos como la concentración de fármaco necesaria para reducir la viabilidad de las células en el 50%, de entre tres y siete experimentos independientes se promediaron y compararon utilizando ANOVA.

20 Los resultados se describen gráficamente en las Figuras 3 y 4. En presencia de 1 mg/ml de SM, las células HT29 mostraron prácticamente la misma IC_{50} para 5FU ($0,52 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$, media; $0,38 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$, SM; $0,39 \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$, PC) y DOX ($92 \pm 64 \text{ ng/ml}$, media; $67 \pm 23 \text{ ng/ml}$, SM; $139 \pm 63 \text{ ng/ml}$, PC). La esfingomielina sensibilizó las seis líneas celulares restantes tanto al 5FU como a DOX en diversos grados (ver Figuras 3 y 4). La esfingomielina incrementó la sensibilidad a 5FU y DOX en HCT15 (140% y 340%, respectivamente) LS174T (70% y 70%, respectivamente), MOSER (90% y 100%, respectivamente) y SW480 (260% y 180%, respectivamente). Las líneas celulares HT29, LoVo y WiDr no se quimiosensibilizaron mediante la esfingomielina *in vitro*. De manera similar, la esfingomielina no sensibilizó a las células HUVEC a la terapia con 5FU o DOX (datos no mostrados). La amplificación de la quimiosensibilidad parece ser una función de la porción ceramido de la esfingomielina, ya que PC no genera un efecto semejante al de la esfingomielina. Las diferencias entre los resultados *in vitro* e *in vivo* puede deberse al ambiente en el que crecen las células tumorales.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 269 121 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de una cantidad terapéuticamente efectiva de esfingomielina en la preparación de un medicamento destinado a mejorar la terapia antitumoral citotóxica utilizando quimioterapia en la que dicha esfingomielina se administra al paciente junto con una antraciclina.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que la antraciclina es la doxorrubicina.

10 3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición de esfingomielina se coadministra junto con la terapia tumoral citotóxica.

4. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha esfingomielina se administra antes de la administración de la terapia tumoral.

15 5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el paciente es un paciente humano.

6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la doxorrubicina está dirigida a las células tumorales mediante la utilización de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

20 7. Utilización según la reivindicación 6, en la que dicha terapia está dirigida a las células tumorales utilizando un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo monoclonal.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

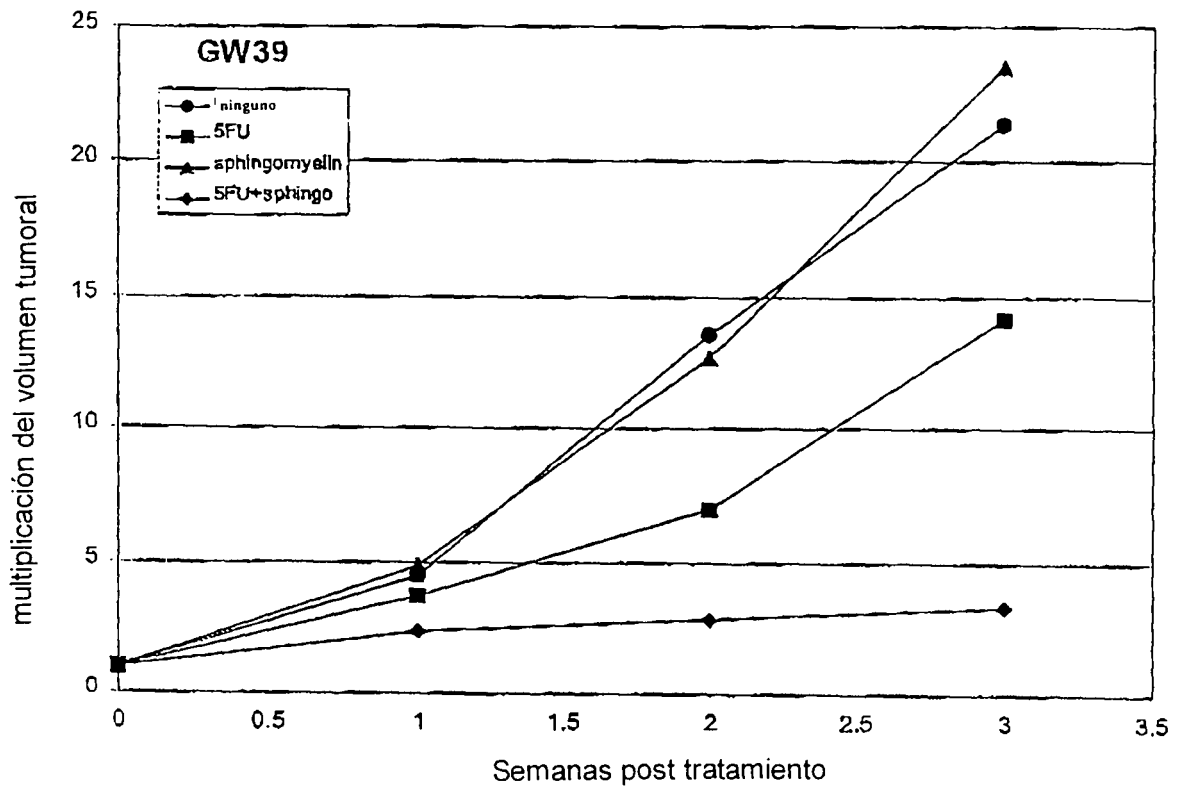


Figura 2

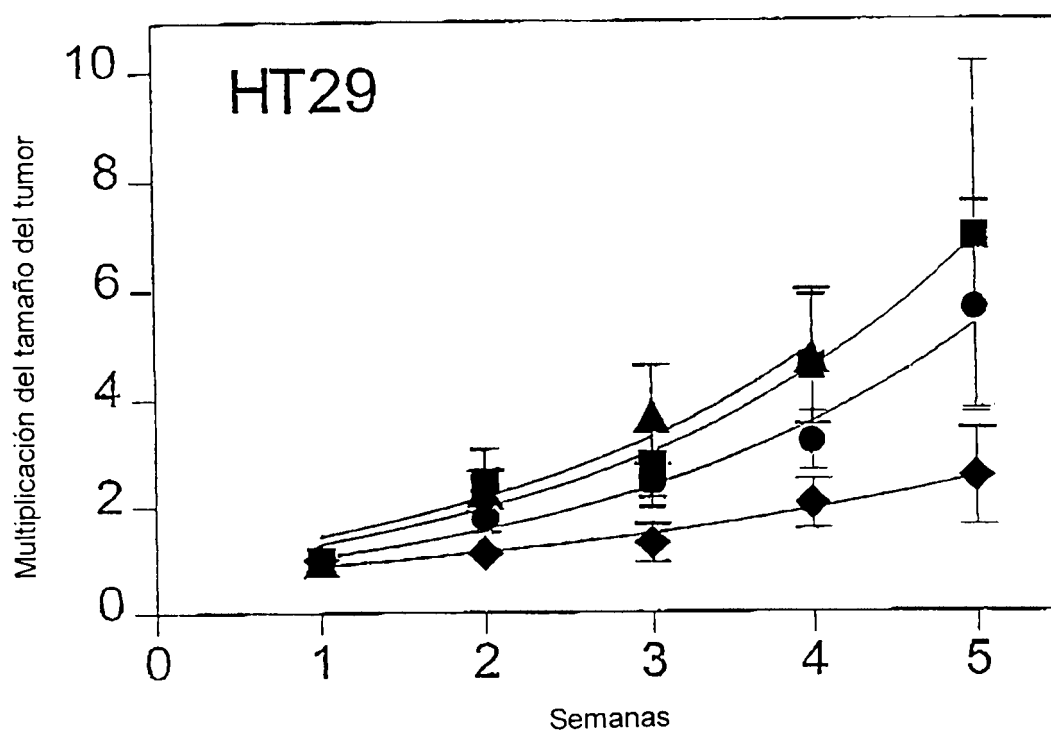


Figura 3

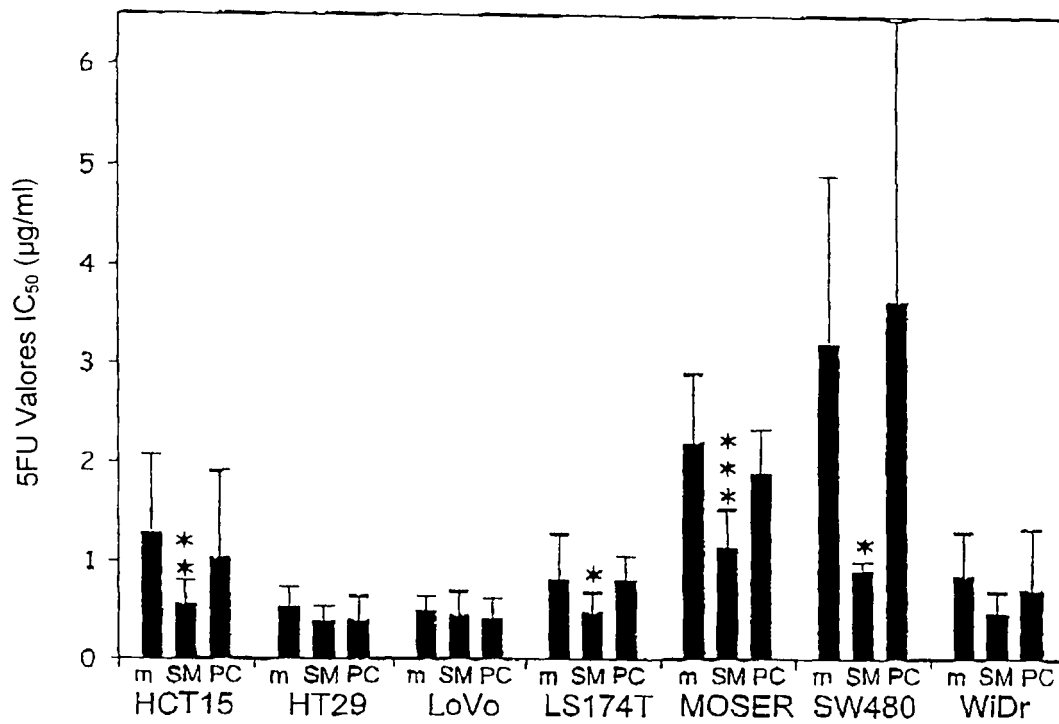


Figura 4

