



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 326 785**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00956238 .0**

(96) Fecha de presentación : **19.07.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1200114**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2002**

(54) Título: **Inhibidores de PPAR δ para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.**

(30) Prioridad: **23.07.1999 GB 9917405**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2009

(73) Titular/es: **The University of Dundee
Perth Road
Dundee DD1 4HN, GB**

(72) Inventor/es: **Palmer, Colin, Neil, Alexander;
Vosper, Helen y
Wolf, Charles, Roland**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de PPAR δ para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

5 La presente invención se refiere a un tratamiento y a una diana para el diseño de fármacos cardiovasculares y a compuestos que están dirigidos a esta diana.

La homeostasis de lípidos está fuertemente controlada durante el desarrollo normal y el estado sano; sin embargo, una disfunción en la homeostasis de lípidos da como resultado el desarrollo de enfermedades, como la aterosclerosis, la obesidad, la diabetes y el cáncer. Los reguladores críticos en la homeostasis de lípidos incluyen una familia de factores de transcripción sensibles a los lípidos conocidos por receptores activados del proliferador de peroxisomas (PPAR). Los PPAR son miembros de la subfamilia del receptor de hormonas esteroideas/nuclear que son activados por productos químicos con estructura diversa, como ácidos grasos, prostanoides, fármacos hipolipidémicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, sensibilizadores de insulina y contaminantes ambientales (1,2). El primer PPAR descrito, PPAR α , controla el metabolismo de lípidos en el hígado y es activado por fármacos que disminuyen los lípidos, como el clofibrato (3,4). Ratones que tienen el gen que codifica PPAR α interrumpido tienen una deficiencia en su capacidad para metabolizar y excretar los lípidos hepáticos, y los hepatocitos acumulan grandes gotas lipídicas en respuesta a fármacos hipolipidémicos (4). Otra isoforma, PPAR γ , es necesaria para el desarrollo de adipocitos estimulado por lípidos. El PPAR γ es un receptor nuclear de alta afinidad por prostanoides (5) y es la diana farmacológica para el grupo de tiazolidindiona de agentes antidiabéticos, como rosiglitazona (BRL49653) (6), solicitud internacional n° de publicación WO 94/05659 (SmithKline Beecham PLC). La ablación genética de este gen es letal (7).

La función de otra forma de PPAR, PPAR δ , sigue siendo desconocida. Se ha indicado que el PPAR δ se expresa a niveles muy bajos en todos los tejidos estudiados (8); sin embargo, los inventores ahora han observado que el PPAR δ se expresa selectivamente en el linaje de monocitos/macrófagos, y está sobreexpresado, junto con PPAR γ , durante la diferenciación de macrófagos inducida por forbol éster. El PPAR δ es un sensor de ácidos grasos y es activado por los ácidos grasos insaturados ácido linoleico y ácido oleico, y estos ácidos grasos se han implicado como compuestos de señalización importantes en la diferenciación de monocitos (9, 10, 11). El PPAR δ no es activado por fármacos de fibrato, como el clofibrato, o por tiazolidindionas, como BRL49653.

El documento WO 97/28149 (Merck & Co. Inc.) describe agonistas de PPAR δ que pretenden ser útiles para aumentar los niveles plasmáticos de la lipoproteína de alta densidad (HDL) en mamíferos, y para prevenir, detener o frenar el avance de enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas.

Se sabe que las dietas con alta cantidad de grasas son un factor importante en el desarrollo de la aterosclerosis, y muchos fármacos que se emplean en el tratamiento de la aterosclerosis modifican el metabolismo de lípidos. Los lípidos están físicamente asociados con la patología de la aterosclerosis en las células espumosas derivadas de macrófagos, que son macrófagos altamente activados que están llenos de gotas de lípidos. Estas células espumosas están presentes a altas concentraciones en lesiones vasculares conocidas como placas, que finalmente estallan y dan como resultado el bloqueo trombótico de vasos sanguíneos. Este bloqueo puede representarse clínicamente como un ataque cardíaco, accidentes cerebrovasculares o enfermedad de arterias periféricas. Los inventores ahora han demostrado que los macrófagos de ratón y la línea celular monocítica THP-1 humana expresan PPAR δ cuando son activados por forbol ésteres. Las células THP-1 activadas se hacen adherentes y se propagan sobre placas de cultivo de plástico. En las condiciones de ácidos grasos apropiadas, estas células se llenarán de lípidos, según se detecta mediante tinción de rojo aceite O y se convierten en células espumosas. Estas células expresan genes que están asociados con células espumosas *in vivo*, como IL-1 β , TNF α , IGF-1, CD36, MCP-1 y tromboxano sintasa. Estas células proporcionan un modelo de formación de células espumosas inducida por lípidos. Esta acumulación puede prevenirse mediante candidatos a fármacos antiaterosclerosis, como BRL49653, demostrando, con ello, una propiedad antiaterosclerótica del fármaco y que el modelo es útil para identificar fármacos antiateroscleróticos. Este ensayo puede realizarse en un formato de placa de microvaloración, y la tinción de los lípidos puede cuantificarse de modo óptico en un lector de placas de microvaloración.

Utilizando un vector de expresión seleccionable, los inventores han modificado células THP-1 para que expresen ARN antisentido de PPAR δ . Esta línea celular crece normalmente en cultivo pero sin embargo, cuando se trata con forbol éster, esta línea celular ya no puede diferenciarse. La tinción con azul de tripano de esta línea celular después de un tratamiento con forbol éster revela que las células se han muerto. Por tanto, la inhibición de la función de PPAR δ ha cambiado la respuesta a los estímulos inflamatorios desde la diferenciación a la muerte. La placa aterosclerótica está rellena de células espumosas derivadas de macrófagos altamente activados, y las concentraciones locales de mediadores inflamatorios son muy elevadas dentro de la placa. Sin querer limitarse por ninguna teoría, los inventores creen que la inhibición de la función de PPAR δ en células espumosas dentro, por ejemplo, de lesiones ateromatosas, será útil para iniciar una cascada de autodestrucción dentro de la placa. La eliminación controlada de células espumosas sin inflamación o necrosis recientemente ha demostrado ser un método eficaz para estimular la regresión de placas, utilizando la terapia antisentido contra BCL-X (Pollman *et al.* (1998), *Nature Medicine*, **4**, 222-227). Los inventores creen que es probable que establecer como diana al PPAR δ en el macrófago activado será muy específico, puesto que es una respuesta que se basa en el estado fenotípico específico de la célula espumosa activada.

La invención proporciona compuestos que interfieren con la formación del desarrollo de células espumosas, o conducen a la eliminación controlada de células espumosas potenciales. Se cree que estos compuestos son útiles en la

estimulación de la regresión de placas y, por tanto, para la reducción del riesgo de enfermedades cardíacas, accidentes cerebrovasculares o trombosis.

Los inventores han demostrado que el PPAR δ cumple un papel crítico en la activación de macrófagos y que la inhibición selectiva de la actividad PPAR δ puede prevenir la formación de células espumosas.

También han demostrado que los agonistas de PPAR γ inhiben la acumulación de lípidos, y que PPAR δ y PPAR γ se oponen entre sí en el proceso de formación de células espumosas.

Un primer aspecto de la invención se refiere a prevenir o reducir el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos u otras células, o eliminar las células espumosas poniendo en contacto dichos macrófagos u otras células o células espumosas con una cantidad eficaz de un inhibidor de la actividad de PPAR δ .

De forma adecuada, los macrófagos u otras células son aquellos implicados en una patología aterosclerótica.

Aunque el método descrito tiene uso en relación con el estudio de macrófagos y células espumosas en cultivo, el método es particularmente adecuado para prevenir o reducir el desarrollo de células espumosas, o eliminar células espumosas, *in vivo* en particular dentro del cuerpo de un ser humano u otro mamífero. Las células espumosas son células cargadas con lípidos, como leucocitos, normalmente macrófagos. Han internalizado los lípidos y los almacenan como gotas citoplásmicas, que dan a las células su aspecto espumoso característico bajo microscopía óptica.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a prevenir o reducir el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos u otras células, o eliminar las células espumosas, en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un inhibidor de la actividad de PPAR δ .

De forma adecuada, los macrófagos u otras células son aquellos implicados en una patología aterosclerótica.

Las células que pueden desarrollarse en células espumosa incluyen no sólo macrófagos, sino también células del músculo liso. Preferiblemente, el inhibidor de la actividad PPAR δ es aquel que previene o reduce el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos, o elimina las células espumosas derivadas de macrófagos. Más preferiblemente, esto puede utilizarse para prevenir o reducir el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos.

Sin perjuicio de otros aspectos de la invención, y sin estar limitados por ninguna teoría concerniente a la invención, se cree que el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos está asociado con diversos estados de enfermedad, y que un inhibidor de la actividad PPAR δ prevenirá o reducirá, al menos hasta un grado deseable, el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos. Las enfermedades que están asociadas con el desarrollo de células espumosas incluyen, pero no se limitan a aterosclerosis, enfermedad cardíaca, accidentes cerebrovasculares, enfermedades de arterias periféricas y angina.

Los métodos también pueden utilizarse para prevenir la reestenosis y para la regresión del ateroma.

El descubrimiento de que la inhibición de la actividad PPAR δ previene la activación de macrófagos también sugiere que los métodos pueden utilizarse en el tratamiento de trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen artritis reumatoide, esclerosis sistémica y lupus. En apoyo del papel del PPAR δ en la inflamación, el fármaco antiinflamatorio no esteroideo sulindaco, que bloquea la actividad transcripcional de PPAR δ , es incapaz de prevenir la hiperplasia epidérmica inducida por PMA (acetato miristato de forbol) y la inflamación en ratones sin PPAR δ (Peters, J.M., *et al.* (2000), *Mol. and Cell Biol.*, 20, 5119-5128).

Existe una amplia variedad de trastornos que surgen de la patología de la aterosclerosis e incluyen angina, enfermedad cardíaca coronaria, accidentes cerebrovasculares, enfermedad vascular periférica, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, esclerosis sistémica y degeneración vascular retiniana.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a prevenir o tratar una enfermedad vascular asociada con la formación de placas y/o el bloqueo trombótico de vasos sanguíneos en un paciente, comprendiendo dicho método administrar a un paciente una cantidad eficaz de un inhibidor de la actividad PPAR δ . También se cree que el método de esta invención es particularmente adecuado para la prevención o el tratamiento de la aterosclerosis, la enfermedad cardíaca coronaria, los accidentes cerebrovasculares o la enfermedad cardíaca periférica.

Los inventores han demostrado que la inhibición de la actividad PPAR δ inhibe la proliferación de células estimulada por PMA. Por tanto, un cuarto aspecto de la invención se refiere a prevenir o reducir la proliferación de células, comprendiendo dicho método poner en contacto las células con un inhibidor de la actividad PPAR δ . Las células que son estimuladas a proliferar por PMA incluyen células de la piel, células del colon, células de la mama, y células de la próstata. En apoyo al papel del PPAR δ en la tumorigénesis, en fechas recientes se ha descubierto que los agentes antiinflamatorios no esteroideos ejercen su actividad anticáncer en células derivadas del colon mediante el bloqueo de la actividad transcripcional de PPAR δ y estimulando la apoptosis (He, T.-C., *et al.*, 1999, *Cell*, **99**, 335-343).

El PPAR δ está implicado en la acción del promotor tumoral, PMA.

Por tanto, un quinto aspecto de la invención se refiere a tratar o prevenir el cáncer en un paciente, comprendiendo dicho método administrar al paciente una cantidad eficaz de un inhibidor de la actividad PPAR δ .

El método de la invención es particularmente adecuado para su uso en relación con los cánceres de piel.

El método de la invención también es particularmente adecuado para su uso en relación con los cánceres de mama.

El método de la invención también es particularmente adecuado para su uso en relación con los cánceres de colon.

El método de la invención también es particularmente adecuado para su uso en relación con los cánceres de próstata.

Una “cantidad eficaz de un inhibidor de la actividad PPAR δ ” incluye una cantidad que es eficaz para prevenir o reducir el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos u otras células, o eliminar células espumosas, en particular una cantidad que es eficaz para prevenir la enfermedad (en lo que se incluye la prevención del avance desde un estado asintomático hasta un estado sintomático) o tratar la enfermedad (en lo que se incluye mejorar los síntomas y frenar su avance) hasta un grado clínicamente útil. Un grado que sea clínicamente útil puede ser determinado por un médico.

Un “inhibidor de la actividad PPAR δ ” significa cualquier inhibidor adecuado que pueda reducir la actividad PPAR δ en la célula, por ejemplo en la célula de un paciente. Se prefiere particularmente que el inhibidor de la actividad PPAR δ sea aquel que inhiba la actividad PPAR δ en una célula de macrófago o una célula espumosa derivada de una célula de macrófago. La expresión “inhibidor de la actividad PPAR δ ” incluye compuestos que bloquean el efecto de agonistas de PPAR δ .

Se prefiere que el inhibidor de la actividad PPAR δ sea selectivo para PPAR δ . En particular, se prefiere que el inhibidor sea eficaz para inhibir la actividad PPAR δ pero que sea sustancialmente incapaz de inhibir la actividad de otras isoformas de PPAR, como PPAR α o PPAR γ . Aunque se prefiere que el inhibidor de la actividad PPAR δ no modifique la actividad de otras isoformas de PPAR, puede resultar ventajoso si la molécula es un agonista o un activador de la actividad PPAR γ . También se prefiere que el inhibidor de la actividad PPAR δ no modifique la actividad de otros receptores de la familia de receptores de hormonas esteroideas. “Selectivo” significa que el compuesto es al menos diez veces más eficaz para inhibir la actividad PPAR δ que lo es para modificar la actividad de otra isoforma de PPAR. Preferiblemente, es al menos 100 veces más selectivo.

El inhibidor puede ser aquel que previene la expresión de PPAR δ en una célula. “Evitar la expresión” significa prevenir sustancialmente la expresión o al menos reducir el nivel de expresión de PPAR δ hasta un grado útil. De forma típica, el compuesto que previene la expresión de PPAR δ en una célula es una molécula basada en un ácido nucleico.

Como se muestra en los ejemplos, los inventores han demostrado que el uso del antisentido de la secuencia codificadora de PPAR δ humana completa, incluyendo porciones de regiones no traducidas, es capaz de inhibir la formación de células espumosas a partir de macrófagos. Se apreciará que pueden utilizarse porciones más pequeñas de ADNc de PPAR δ como agentes antisentido, en especial aquellas que corresponden al inicio de la traducción de la proteína de PPAR δ .

Pueden diseñarse moléculas antisentido haciendo referencia a la secuencia de PPAR δ , ofreciéndose la secuencia del ADNc humano en Schmidt *et al.* (1992), *Mol. Endocrinol.*, **6**, 1634-1641 y en el GenBank n° de registro L07592.

Los agentes antisentido de PPAR δ incluyen agentes que se unen al ARNm de PPAR δ y preferiblemente inhiben su traducción. Un “agente antisentido” también incluye moléculas basadas en ácidos nucleicos que son capaces de formar tríplex con la secuencia genómica de PPAR δ y que previenen selectivamente la transcripción o la traducción del gen.

La molécula antisentido puede ser ARN (en cuyo caso se transcribe a partir de un vector diseñado para producir transcritos antisentido) o puede ser ADN o moléculas de tipo ADN, como oligonucleótidos antisentido.

Se cree que la sobreexpresión de ARN antisentido a partir de porciones adecuadas de secuencias genómicas humanas que corresponden a las posiciones 67886 a 139948 del clon humano PAC n° 109F14 será eficaz para inhibir la actividad PPAR δ . El clon PAC n° 109F14 está disponible en HGMP Resource Centre, Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SB, Reino Unido. La secuencia del gen de PPAR δ tiene el n° de registro AL022721.

Pueden diseñarse oligonucleótidos antisentido haciendo referencia al ADNc o a la secuencia génica de PPAR δ .

Los oligonucleótidos son susceptibles de ser degradados o inactivados por nucleasas endógenas celulares. Para hacer frente a este problema es posible utilizar oligonucleótidos modificados, por ejemplo con enlaces internucleotídicos alterados, en que los enlaces fosfodiéster que aparecen en la naturaleza han sido sustituidos por otro enlace. Por ejemplo, Agrawal, *et al.* (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7079-7083 demuestra una mayor inhibición en cultivo de tejidos de VIH-1 utilizando fosforamidatos y fosforotioatos de oligonucleótidos. Sarin, *et al.* (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7448-7451 demostraron una mayor inhibición del VIH-1 utilizando metilsfosfonatos de oligonucleóti-

dos. Agrawal, *et al.* (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7790-7794 demostraron la inhibición de la replicación del VIH-1 en cultivos celulares infectados de forma temprana y crónica, utilizando fosforotioatos de oligonucleótidos específicos de una secuencia de nucleótidos. Leither, *et al.* (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3430-3434 indican la inhibición en cultivo de tejidos de la replicación del virus de la gripe por fosforotioatos de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos con enlaces artificiales han demostrado ser resistentes a la degradación *in vivo*. Por ejemplo, Shaw, *et al.* (1991), en *Nucleic Acids Res.*, **19**, 747-750, indican que oligonucleótidos sin modificar de otra forma se hacen más resistentes a las nucleasas *in vivo* cuando se bloquean en su extremo 3' con ciertas estructuras de casquete, y que los fosforotioatos de oligonucleótidos sin casquete no se degradan *in vivo*.

Una descripción detallada de la estrategia del H-fosfonato para sintetizar fosforotioatos de oligonucleósidos se proporciona en Agrawal y Tang (1990), *Tetrahedron Letters*, **31**, 7541-7544, cuyas indicaciones se incorporan en la presente como referencia. La síntesis de metilfosfonatos, fosforoditioatos, fosforamidatos, ésteres fosfato, fosforamidatos con puentes y fosforotioatos con puentes, de oligonucleótidos es conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Agrawal y Goodchild (1987), *Tetrahedron Letters*, **28**, 3539; Nielsen, *et al.* (1988), *Tetrahedron Letters*, **29**, 2911; Jager, *et al.* (1988), *Biochemistry*, **27**, 7237; Uznanski, *et al.* (1987), *Tetrahedron Letters*, **28**, 3401; Bannwarth (1988), *Helv. Chim. Acta.*, **71**, 1517; Crosstick y Vyle (1989), *Tetrahedron Letters*, **30**, 4693; Agrawal, *et al.* (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1401-1405, cuyas indicaciones se incorporan en la presente como referencia. Otros métodos para la síntesis o la producción también son posibles. En una realización preferida, el oligonucleótido es un ácido desoxirribonucleico (ADN), aunque también pueden sintetizarse y aplicarse secuencias de ácido ribonucleico (ARN).

Los oligonucleótidos útiles en la invención preferiblemente se diseñan para resistir la degradación por enzimas nucleolíticas endógenas. La degradación *in vivo* de oligonucleótidos produce productos de la degradación de oligonucleótidos de longitud menor. Es más probable que estos productos de la degradación se impliquen en la hibridación no específica y es menos probable que sean eficaces, con relación a sus homólogos de longitud completa. Por tanto, resulta deseable utilizar oligonucleótidos que sean resistentes a la degradación en el cuerpo y que sean capaces de alcanzar las células diana. Puede hacerse que los presentes oligonucleótidos sean más resistentes a la degradación *in vivo* sustituyendo uno o más enlaces internucleotídicos artificiales internos por los enlaces fosfodiéster nativos, por ejemplo, sustituyendo el azufre por el fosfato en el enlace. Los ejemplos de enlaces que pueden utilizarse incluyen fosforotioatos, metilfosfonatos, sulfona, sulfato, cetilo, fosforoditioatos, diversos fosforoamidatos, ésteres de fosfato, fosforotioatos con puentes y fosforoamidatos con puentes. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes, puesto que en la técnica se conocen otros enlaces internucleotídicos. Véase, por ejemplo, Cohen (1990), *Trends in Biotechnology*. La síntesis de oligonucleótidos que tengan uno o más de estos enlaces sustituidos por enlaces internucleotídicos de fosfodiéster es muy conocida en la técnica, incluyendo las vías sintéticas para producir oligonucleótidos que tengan enlaces internucleotídicos mixtos.

Se puede hacer que los oligonucleótidos sean resistentes a la extensión por enzimas endógenas, introduciendo un "casquete" o incorporando grupos similares en el nucleótidos 5'- o 3'-terminales. Un reactivo para introducir un casquete está disponible en el mercado como Amino-Link IITM de Applied BioSystems Inc, Foster City, CA. Los métodos para la introducción de casquetes se describen, por ejemplo, en Shaw *et al.* (1991), *Nucleic Acids Res.*, **19**, 747-750, y Agrawal, *et al.* (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**(17), 7595-7599, cuyas indicaciones se incorporan en la presente como referencia.

Otro método para hacer que los oligonucleótidos sean resistentes al ataque de nucleasas es que se "autoestabilicen", según se describe en Tang, *et al.* (1993), *Nucl. Acids Res.*, **21**, 2729-2735, incorporado en la presente como referencia. Los oligonucleótidos autoestabilizados tienen estructuras de bucle en horquilla en sus extremos 3', y muestran mayor resistencia a la degradación por la fosfodiesterasa de veneno de serpiente, ADN polimerasa I y suero bovino fetal. La región autoestabilizante del oligonucleótido no interfiere en la hibridación con ácidos nucleicos complementarios, y los estudios farmacocinéticos y de estabilidad en ratones han mostrado una mayor persistencia *in vivo* de oligonucleótidos autoestabilizados con respecto a sus homólogos lineales.

Según la invención, la especificidad de unión inherente de los oligonucleótidos antisentido características del apareamiento de bases es potenciada limitando la disponibilidad del compuesto antisentido para su locus previsto *in vivo*, permitiendo utilizar dosificaciones menores y minimizando los efectos sistémicos. Por tanto, los oligonucleótidos se aplican de modo local para lograr el efecto deseado. La concentración de los oligonucleótidos en el locus deseado es mucho mayor que si los oligonucleótidos se administraran de forma sistémica, y el efecto terapéutico puede lograrse utilizando una cantidad total significativamente menor. La alta concentración local de oligonucleótidos potencia la penetración de las células diana y bloquea de forma eficaz la traducción de las secuencias de los ácidos nucleicos diana.

Los oligonucleótidos puede transportarse hasta el locus mediante cualquier medio apropiado para la administración localizada de un fármaco. Por ejemplo, una disolución de los oligonucleótidos puede inyectarse directamente en el sitio o puede administrarse mediante infusión utilizando una bomba de infusión. Los oligonucleótidos también pueden incorporarse en un dispositivo implantable que, cuando se coloca en el sitio deseado, permite que los oligonucleótidos se liberen hacia el locus circundante.

Los oligonucleótidos se administran, lo más preferiblemente, a través de un material de hidrogel. El hidrogel es no inflamatorio y biodegradable. Son conocidos muchos materiales de este tipo, incluyendo aquellos fabricados a partir

de polímeros naturales y sintéticos. En una realización preferida, el método aprovecha un hidrogel que es líquido por debajo de la temperatura corporal pero gelifica para formar un semisólido que conserva la forma a la temperatura corporal o a una temperatura cercana a ésta. Los hidrogeles preferidos son polímeros de unidades repetidas de óxido de etileno-óxido de propileno. Las propiedades del polímero dependen del peso molecular del polímero y del porcentaje relativo de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) en el polímero. Los hidrogeles preferidos contienen de aproximadamente 10% a aproximadamente 80% en peso de óxido de etileno, y de aproximadamente 20% a aproximadamente 90% en peso de óxido de propileno. Un hidrogel particularmente preferido contiene aproximadamente 70% de poli(óxido de etileno) y 30% de poli(óxido de propileno). Los hidrogeles que pueden utilizarse están disponibles, por ejemplo, en BASF Corp., Parsippany, NJ, con el nombre comercial de Pluronic™.

En esta realización, el hidrogel se enfría hasta un estado líquido y los oligonucleótidos se mezclan con el líquido a una concentración de aproximadamente 1 mg de oligonucleótidos por gramo de hidrogel. La mezcla resultante entonces se aplica a la superficie que se va a tratar, por ejemplo, mediante pulverización o pintándola durante cirugía, o utilizando un catéter o procedimientos endoscópicos. A medida que el polímero se calienta, se solidifica para formar un gel y los oligonucleótidos se difunden desde el gel hacia las células circundantes a lo largo de un periodo de tiempo definido por la composición exacta del gel.

Los oligonucleótidos pueden administrarse mediante otros implantes que están disponibles en el mercado o se describen en la bibliografía científica, incluyendo liposomas, microcápsulas y dispositivos implantables. Por ejemplo, pueden utilizarse implantes fabricados de materiales biodegradables, como polianhídridos, poliortoésteres, poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico) y sus copolímeros, colágeno, y polímeros de proteínas u otros materiales no biodegradables, como acetato de etilenvinilo (EVAc), poli(acetato de vinilo), alcohol etilenvinílico y sus derivados, de manera local para administrar los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos pueden incorporarse al material a medida que se polimeriza o solidifica, utilizando técnicas de fundido o de evaporación de disolventes, o pueden mezclarse de forma mecánica con el material. En una realización, los oligonucleótidos se mezclan con revestimientos para dispositivos implantables (o aplican sobre éstos), como esferas de sílice revestidas con dextrano, endoprótesis vasculares o catéteres.

La dosis de oligonucleótidos depende del tamaño de los oligonucleótidos y del fin para el cual se administran. En general, el intervalo se calcula basándose en el área superficial del tejido que se va a tratar. La dosis eficaz de oligonucleótidos depende, en parte, de la longitud y la composición química de los oligonucleótidos pero en general estará en el intervalo de aproximadamente 30 a 3000 µg por centímetro cuadrado de área superficial del tejido.

Los oligonucleótidos pueden administrarse al paciente de modo sistémico para fines terapéuticos y profilácticos. Los oligonucleótidos pueden administrarse mediante cualquier método eficaz, por ejemplo por vía parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular) u oral, nasal o mediante otros medios que permiten que los oligonucleótidos alcancen y circulen por la corriente sanguínea del paciente. Los oligonucleótidos administrados por vía sistémica se administran preferiblemente junto con oligonucleótidos administrados por vía local, pero también tienen utilidad sin que se lleve a cabo una administración local. Una dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 gramos por administración a un ser humano adulto será eficaz, en general, para este fin.

Además de los agentes antisentido descritos anteriormente, pueden diseñarse ribozimas, en particular ribozimas de cabeza de martillo, basándose en el ADNc o en la secuencia del gen de PPARδ, que se cree que son útiles como inhibidores de la actividad PPARδ.

Las ribozimas que pueden ser codificadas por el ácido nucleico que se va a transportar a la diana se describen en Cech y Herschlag, "Site-specific cleavage of single stranded DNA", documento US 5.180.818; Altman *et al.*, "Cleavage of targeted RNA by RNase P", documento US 5.168.053. Cantin *et al.*, "Ribozyme cleavage of HIV-1 RNA", documento US 5.149.796; Cech *et al.*, "RNA ribozyme restriction endoribonucleases and methods", documento US 5.116.742; Been *et al.*, "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endonucleases and methods", documento US 5.093.246; y Been *et al.*, "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endoribonucleases and methods; cleaves single-stranded RNA at specific site by transesterification", documento US 4.987.071, incorporados todos ellos en la presente como referencia. Las dianas adecuadas para las ribozimas incluyen factores de transcripción, como c-fos y c-myc, y bcl-2. Durai *et al.* (1997), *Anticancer Res.*, **17**, 3307-3312 describen una ribozima de cabeza de martillo contra bcl-2.

Pueden prepararse con facilidad construcciones genéticas que expresen las ribozimas o los compuestos antisentido útiles en los métodos de la invención. De forma adecuada, las construcciones genéticas son aquellas adaptadas para transportar y expresar la ribozima o la molécula antisentido en la célula diana. Por tanto, el método de la invención comprende un método de terapia génica.

La terapia génica puede realizarse según métodos aceptados en general, por ejemplo como se describe en Friedman, 1991. Se prepara un virus o un vector plasmídico (véanse más detalles a continuación) que contiene una copia del gen que codifica la ribozima o la molécula antisentido unido a elementos de control de la expresión y que es capaz de replicarse dentro de las células dianas. Se conocen vectores adecuados, como los descritos en la patente de EEUU 5.252.479 y en la solicitud de patente internacional n° de publicación WO 93/07282 (Boehringer Ingelheim International GmbH). El vector entonces se inyecta al paciente, de manera local en el sitio de la diana o de manera sistémica. Si el gen transfectado no se incorpora permanentemente en el genoma de cada una de las células diana, es posible que haya que repetir el tratamiento de forma periódica.

Los sistemas de transferencia de genes conocidos en la técnica pueden ser útiles en la práctica de los métodos de terapia génica de la presente invención. Éstos incluyen métodos de transferencia víricos y no víricos. Se ha utilizado una serie de virus como vectores de transferencia de genes, incluyendo papovavirus, por ejemplo SV40 (Madzak *et al.*, 1992), adenovirus (Berkner, 1992; Berkner *et al.*, 1988; Gorziglia y Kapikian, 1992; Quantin *et al.*, 1992; Rosenfeld *et al.*, 1992; Wilkinson *et al.*, 1992; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990), virus de vaccinia (Moss, 1992), virus adenoasociados (Muzyczka, 1992; Ohi *et al.*, 1990), herpesvirus incluyendo HSV y EBV (Margolskee, 1992; Johnson *et al.*, 1992; Fink *et al.*, 1992; Breakfield y Geller, 1987; Freese *et al.*, 1990), y retrovirus de origen aviar (Brandyopadhyay y Temin, 1984; Petropoulos *et al.*, 1992), murino (Miller, 1992; Miller *et al.*, 1985; Sorge *et al.*, 1984; Mann y Baltimore, 1985; Miller *et al.*, 1988), y humano (Shimada *et al.*, 1991; Helseth *et al.*, 1990; Page *et al.*, 1990; Buchschacher y Panganiban, 1992). Hasta la fecha, la mayoría de los protocolos de terapia génica humana se han basado en retrovirus murinos inutilizados. Se prefieren vectores basados en lentivirus.

Los métodos de transferencia génica no víricos conocidos en la técnica incluyen técnicas químicas, como coprecipitación con fosfato de calcio (Graham y van der Eb, 1973; Pellicer *et al.*, 1980); técnicas mecánicas, por ejemplo microinyección (Anderson *et al.*, 1980; Gordon *et al.*, 1980; Brinster *et al.*, 1981; Constantini y Lacy, 1981); transferencia mediada por fusión de membranas a través de liposomas (Felgner *et al.*, 1987; Wancy y Huang, 1989; Kaneda *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 1992; Nabel *et al.*, 1990; Lim *et al.*, 1992); y captación de ADN directa y transferencia de ADN mediada por receptores (Wolff *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1991; Zenke *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1989b; Wolff *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1991; Cotten *et al.*, 1990; Curiel *et al.*, 1991a; Curiel *et al.*, 1991b). Las transferencias de genes mediadas por virus puede combinarse con la transferencia de genes directa *in vivo* utilizando transporte con liposomas, lo cual permite dirigir a los vectores víricos hacia las células tumorales y no hacia las células circundantes que no se dividen. Como alternativa, la línea celular productora del vector retrovírico puede inyectarse en los tumores (Culver *et al.*, 1992). La inyección de células productoras entonces proporciona una fuente continua de partículas de vector. Esta técnica se ha aprobado para su uso en seres humanos con tumores cerebrales inoperables.

Otros sistemas adecuados incluyen el sistema híbrido retrovírico-adenovírico descrito por Feng *et al.* (1997), *Nature Biotechnology*, **15**, 866-870, o los sistemas víricos con ligandos de administración dirigida, como fragmentos Fv monocatenarios adecuados.

En una estrategia que combina los métodos de transferencia de genes biológicos y físicos, se combina ADN plasmídico de cualquier tamaño con un anticuerpo conjugado con polilisina específico de la proteína de hexón de adenovirus, y el complejo resultante se une a un vector de adenovirus. Entonces el complejo trimolecular se utiliza para infectar células. El vector de adenovirus permite una unión, una internalización y una degradación eficaces del endosoma antes de que el ADN acoplado sea dañado.

Se ha demostrado que complejos de liposomas/ADN son capaces de mediar la transferencia de genes directa *in vivo*. Mientras que en las preparaciones convencionales de liposomas, el proceso de transferencia de genes no es específico, se ha indicado una captación y una expresión localizadas *in vivo* en depósitos de tumores, por ejemplo, después de la administración directa *in situ* (Nabel, 1992).

Se prefieren las técnicas de transferencia de genes que dirigen al ADN directamente a macrófagos. La transferencia de genes mediada por receptores, por ejemplo, se logra mediante la conjugación de ADN (normalmente en forma de un plásmido superenrollado cerrado covalentemente) a un ligando de proteína a través de polilisina. Los ligandos se eligen basándose en la presencia de los correspondientes ligandos de receptores sobre la superficie celular de la célula diana/tipo de tejido. El receptor de manosa es bastante específico de macrófagos y se ha demostrado una administración dirigida específica de conjugados de ADN/manosa. Estos conjugados de ligando-ADN pueden inyectarse directamente a la sangre si se desea, y se dirigen al tejido diana en el que se produce la unión al receptor y la internalización del complejo de ADN-proteína. Para solucionar el problema de la destrucción intracelular del ADN, pueden incluirse coinfecciones con adenovirus para romper la función de los endosomas.

El compuesto es aquel que inhibe la actividad de la proteína PPAR δ .

Los compuestos adecuados pueden seleccionarse utilizando algunos de los métodos descritos a continuación.

Se apreciará que la cantidad eficaz de un inhibidor de la actividad PPAR δ puede administrarse al paciente mediante cualquier vía adecuada y en cualquier formulación adecuada. La idoneidad de cualquier método de administración o de cualquier formulación puede ser determinada con facilidad por los expertos en la técnica haciendo referencia a la naturaleza del inhibidor. Por ejemplo, los inhibidores basados en ácidos nucleicos pueden formularse y administrarse en diferentes formas a inhibidores basados en moléculas pequeñas, como se conoce en la técnica.

Los compuestos de la invención mencionados anteriormente o los compuestos para su uso en los métodos de la invención o sus formulaciones pueden administrarse mediante cualquier método convencional, incluyendo la vía oral y la inyección parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa o intramuscular). El tratamiento puede consistir en una única dosis o en una pluralidad de dosis a lo largo de un periodo de tiempo.

Se espera que las dosis típicas estén en el intervalo de 0,01-20 mg/kg.

Aunque es posible que un compuesto de la invención se administre solo, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica, junto con uno o más vehículos aceptables. El o los vehículos deben ser “aceptables” en el sentido de ser compatibles con el compuesto de la invención y no ser nocivos para el receptor del mismo. De forma típica, los vehículos serán agua o disolución salina, que serán estériles y apirógenos.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Estos métodos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo (el compuesto de la invención o el compuesto para su uso en los métodos de la invención) con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto íntimo y uniforme el ingrediente activo con vehículos líquidos o con vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

Las formulaciones según la presente invención adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada una de ellas una cantidad predefinida del ingrediente activo; como polvo o gránulos; como disolución o suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como emulsión líquida de aceite en agua o emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también se puede presentar como bolo, electuario o pasta.

Un comprimido se puede preparar por prensado o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos prensados pueden prepararse prensando, en una máquina adecuada, el ingrediente activo en forma fluida, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un ligante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), un lubricante, un diluyente inerte, un conservante, un disgregante (por ejemplo almidón glicolato de sodio, povidona reticulada, carboximetilcelulosa de sodio reticulada), un agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar moldeando una mezcla de polvo del compuesto humedecido con un diluyente líquido inerte en una máquina adecuada. Los comprimidos pueden estar opcionalmente revestidos o marcados, y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en su interior utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en diversas proporciones para proporcionar un perfil de liberación deseado.

Las formulaciones para la administración por vía parenteral incluyen disoluciones para inyección esterilizadas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones esterilizadas, acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Se pueden presentar las formulaciones en envases de dosis unitaria o en envases multidosis, por ejemplo ampollas selladas y viales y se pueden conservar en estado liofilizado, que requiera sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las disoluciones y suspensiones extemporáneas para inyección se pueden preparar a partir de polvos, gránulos, y comprimidos estériles del tipo descrito previamente.

Las formulaciones en dosis unitarias preferidas son las que contienen una dosis o unidad diaria, una subdosis diaria o una fracción apropiada de ésta, de un ingrediente activo.

Deberá entenderse que además de los ingredientes mencionados anteriormente de forma particular, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica que guarden relación con el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para la administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Las formulaciones mencionadas en la presente se preparan utilizando métodos convencionales, como los descritos o los que se mencionan en textos como las Farmacopeas Británica y de EEUU, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.), Martindale The Extra Pharmacopoeia (Londres, The Pharmaceutical Press).

Los métodos terapéuticos de la invención pueden utilizarse para tratar cualquier mamífero, incluyendo seres humanos. Por tanto, se contempla que el método pueda utilizarse para tratar, por ejemplo, animales domésticos como perros y gatos, o animales de granja como caballos, vacas, ovejas, cabras o cerdos, u otros mamíferos de importancia comercial. Cuando el inhibidor de la actividad PPAR δ es una molécula basada en un ácido nucleico, se apreciará que se diseñará haciendo referencia al ADNc o gen de PPAR δ de mamífero.

Se prefiere que el paciente que se va a tratar sea un paciente humano.

Otro aspecto de la invención proporciona un inhibidor de la actividad PPAR δ , según se reivindica, para su uso en medicina.

El inhibidor se envasa y se presenta para su uso en medicina. En particular, puede envasarse y presentarse para su uso para tratar la aterosclerosis, o para tratar la enfermedad cardíaca o para tratar los accidentes cerebrovasculares o para tratar la enfermedad de arterias periféricas o para tratar una enfermedad vascular asociada con la formación de placas o para tratar el bloqueo trombótico de vasos sanguíneos o para tratar la enfermedad de Alzheimer o para tratar el cáncer.

Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la actividad PPAR δ , según se reivindica, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otros aspectos de la invención proporcionan el uso de un inhibidor de la actividad PPAR δ , según se reivindica, en la fabricación de un medicamento para prevenir o reducir el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos u otras células, o eliminar células espumosas, en un paciente; el uso de un inhibidor de la actividad PPAR δ , según se reivindica, para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad vascular asociada con la formación de placas y/o el bloqueo trombótico de vasos sanguíneos; el uso según se reivindica de un inhibidor de la actividad PPAR δ para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer.

De forma adecuada, los macrófagos u otras células son aquellos implicados en una patología aterosclerótica.

Hasta el presente trabajo, no se consideró que los inhibidores de la actividad PPAR δ serían útiles, en particular en medicina. También se describen métodos para identificar compuestos que inhiben la actividad PPAR δ y, en particular, que inhiben la actividad PPAR δ en células de macrófagos o en células espumosas. Los compuestos identificados de esta manera pueden ser, en sí mismos, útiles en medicina o pueden ser útiles como compuestos de partida para su posterior desarrollo en compuestos médicamente útiles. Puede considerarse que estos métodos descritos, o los medios para realizar dichos métodos, son “métodos de búsqueda de fármacos” o “ensayos de búsqueda de fármacos”.

La aplicación describe un método para identificar un compuesto que puede ser o que puede utilizarse como compuesto de partida para producir un compuesto que puede ser útil en medicina, comprendiendo dicho método seleccionar un compuesto que inhiba la actividad PPAR δ . De forma típica, el método puede implicar la selección de una serie de compuestos de ensayo que están presentes en un banco de compuestos de ensayo. Por tanto, la identificación de un compuesto que inhiba la actividad PPAR δ comprende seleccionar, a partir de un banco de compuestos de ensayo, cualquier compuesto que inhiba la actividad PPAR δ .

Los métodos mencionados anteriormente pueden utilizarse para seleccionar compuestos que inhiban la expresión del gen de PPAR δ o la producción de la proteína PPAR δ (es decir, la traducción) en una célula, o que inhiban la actividad de la proteína PPAR δ .

Los formatos de ensayo adecuados son muy conocidos por los expertos en la técnica y algunos de ellos se describen con más detalle en el ejemplo 3.

Con relación a la identificación de compuestos que inhiban la expresión del gen de PPAR δ , puede utilizarse el promotor del gen de PPAR δ unido operativamente a un gen indicador, como por ejemplo luciferasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina o similares. La expresión del gen indicador en una célula puede medirse en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo. Los compuestos de ensayo que reducen selectivamente la expresión del gen indicador se seleccionan como compuestos que pueden ser útiles para inhibir o reducir la expresión del gen de PPAR δ , de forma que se produce la inhibición de la actividad PPAR δ .

Con relación a los compuestos que inhiben la actividad de la proteína PPAR δ , una actividad particular que resulta deseable inhibir es la capacidad de la proteína PPAR δ para activar transcripcionalmente genes bajo su control. Por tanto, un gen indicador, como uno de los listados anteriormente, se une operativamente a un promotor o secuencia potenciadora que está bajo el control de PPAR δ . Los genes que están bajo el control de PPAR δ incluyen CYP4A6, acil CoA oxidasa, y lipoproteína lipasa; por tanto, se cree que los promotores de estos genes son útiles en esta realización de la invención. En esta realización también son útiles los elementos potenciadores sintéticos derivados de estos genes, unidos a promotores heterólogos, como los del gen de timidina quinasa de HSV. Una construcción genética que contenga el promotor o el gen potenciador/indicador se transfecta en una célula adecuada, como un monocito o células de macrófagos. También pueden utilizarse células COS-1 o CV-1, siendo ambas sublíneas de células renales de mono verde africano. También se transfecta una construcción genética que codifica PPAR δ en la célula, y se evalúa la capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir la expresión del gen indicador. Las células transfectadas se incuban con un agonista de PPAR δ conocido, como el compuesto F como se describe en la página 9 del documento WO 97/28149 (denominado en lo sucesivo compuesto F) en combinación con el compuesto de ensayo y se puede determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interferir con la acción del agonista. Los compuestos que reducen o inhiben la expresión del gen indicador se seleccionan para su posterior estudio.

Puede utilizarse un CARLA (ensayo de interacción de coactivador/receptor/ligando) como se describe en el ejemplo 3. Estos ensayos se basan en la dependencia de la unión de correceptores en presencia de un ligando adecuado para PPAR δ . En los ensayos CARLA está presente un agonista y se evalúa la capacidad del compuesto de ensayo para interferir con la acción del agonista.

Los compuestos particularmente preferidos que pueden seleccionarse son los que se unen a la porción de unión al ligando de PPAR δ de una manera transcripcionalmente fútil y, con ello, evitan la acción de ligandos agonistas del PPAR δ .

Se prefiere realizar una etapa de “preselección” para identificar compuestos que se unen a PPAR δ , antes de determinar si son un inhibidor o un antagonista de la actividad PPAR δ . Los ensayos de unión de receptor-ligando son muy conocidos en la técnica y pueden ser diseñados y ejecutados con facilidad por los expertos en la técnica.

Puede realizarse una etapa de “preselección” que es fundamentalmente el ensayo de células espumosas descrito a continuación. Por tanto, de esta manera pueden seleccionarse compuestos que son activos para prevenir o reducir

el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos u otras células, o eliminar células espumosas, y que son inhibidores de PPAR δ .

De forma adecuada, los macrófagos u otras células son aquellos implicados en una patología aterosclerótica.

Pueden identificarse los inhibidores de PPAR δ utilizando una estrategia de dos híbridos para controlar la interacción de PPAR δ y coactivadores como SRC-1. En este caso, se une PPARA (o una porción funcional de éste) a una proteína de unión a ADN (como el dominio de unión de ADN de GAL4), y la molécula coactivadora o una porción funcional de ésta (como SRC-1) se unirá a una proteína de transactivación (como el dominio de transactivación de VP16). Se generan levaduras que expresen ambas fusiones y que tengan un gen indicador integrado (como β -galactosidasa) bajo el control de promotor dependiente de la proteína de unión al ADN (por ejemplo, dependiente de GAL4).

La levadura se cultiva en presencia de un agonista de PPAR δ y una amplia gama de compuestos de ensayo. Los cultivos con baja actividad β -galactosidasa indican la presencia de un antagonista de PPAR δ .

Se apreciará que los métodos para identificar un compuesto, como se describió anteriormente, son útiles para identificar compuestos que pueden ser o que pueden utilizarse como compuesto de partida para producir un compuesto que puede, (1) evitar o reducir el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos o eliminar células espumosas, (2) prevenir o ser útil para tratar una enfermedad vascular asociada con la formación de placas y/o con el bloqueo trombótico de vasos sanguíneos, (3) prevenir o ser útil para tratar el cáncer, o (4) prevenir o ser útil para tratar la enfermedad de Alzheimer.

Cuando un compuesto se ha seleccionado por su capacidad para inhibir o reducir la actividad PPAR δ puede utilizarse, de modo conveniente, en una posterior selección para determinar, por ejemplo, si puede prevenir o reducir el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos u otras células, o eliminar células espumosas, si puede prevenir o ser útil para tratar una enfermedad vascular asociada con la formación de placas y/o el bloqueo trombótico de vasos sanguíneos, o si previene o es útil para tratar el cáncer, o si previene o es útil para tratar la enfermedad de Alzheimer.

De forma adecuada, los macrófagos u otras células son aquellos implicados en una patología aterosclerótica.

Los métodos de selección para determinar estas propiedades son conocidos a partir de esta solicitud (con relación al desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos) o son conocidos en la técnica.

Pueden realizarse otras selecciones útiles sobre el compuesto seleccionado para determinar, por ejemplo, su solubilidad, su perfil farmacológico y el perfil de metabolismo del fármaco. De forma similar, pueden realizarse selecciones para determinar la selectividad de los compuestos para inhibir la actividad PPAR δ . Por ejemplo, pueden realizarse selecciones para determinar si un compuesto particular puede modificar la actividad de otra isoforma de PPAR. De forma típica, se prefiere seleccionar compuestos que no modifiquen sustancialmente la actividad de otras isoformas de PPAR. Sin embargo, puede resultar ventajoso que el compuesto que se seleccione inhiba la actividad PPAR δ pero sea un agonista o activador de la actividad PPAR γ . Igualmente, puede resultar ventajoso que el compuesto que se seleccione inhiba la actividad PPAR δ pero sea un agonista o activador de la actividad PPAR α .

El compuesto seleccionado en los métodos de selección de la invención puede ser un “compuesto de tipo fármaco”.

La expresión “compuesto de tipo fármaco” es muy conocida por los expertos en la técnica y puede incluir el significado de ser un compuesto que tiene características que lo hacen adecuado para su uso en medicina, por ejemplo como ingrediente activo en un medicamento. Así, por ejemplo, un compuesto de tipo fármaco puede ser una molécula que puede sintetizarse mediante técnicas de química orgánica, menos preferiblemente mediante técnicas de biología molecular o bioquímica, y es preferiblemente una molécula pequeña, que puede tener un peso molecular menor que 5000 daltons y que puede ser soluble en agua. Un compuesto de tipo fármaco también puede mostrar características de interacción selectiva con una proteína o proteínas concretas y puede estar biodisponible y/o ser capaz de penetrar las membranas celulares diana, pero se apreciará que estas características no son esenciales.

La expresión “compuesto de partida” también es conocida por los expertos en la técnica, y puede incluir el significado de que el compuesto, aunque en sí mismo no sea adecuado para su uso como fármaco (por ejemplo, porque es sólo débilmente potente contra su diana prevista, no sea selectivo en su acción, sea inestable, sea poco soluble, sea difícil de sintetizar o tenga una baja biodisponibilidad), puede proporcionar un punto de partida para el diseño de otros compuestos que puedan tener unas características más deseables.

Las expresiones “compuesto de tipo fármaco” y “compuesto de partida” se refieren, de forma típica, a moléculas orgánicas relativamente pequeñas, en lugar de, por ejemplo, moléculas basadas en ácidos nucleicos relativamente grandes. No obstante, se apreciará que muchas realizaciones de los métodos de selección de la invención son adecuadas para identificar moléculas basadas en ácidos nucleicos, en particular aquellas que muestran expresión del gen de PPAR δ o traducción de la proteína de PPAR δ .

Como se conoce en la técnica del descubrimiento de fármacos, un compuesto de partida que se ha encontrado en una selección puede modificarse, y el compuesto modificado puede seleccionarse para determinar su actividad.

ES 2 326 785 T3

La solicitud también describe un modelo *in vitro* para la formación de células espumosas inducida por las grasas de la dieta y su uso para identificar compuestos útiles.

La formación de células espumosas es, en la primera etapa, un proceso en dos etapas en que la célula se convierte en un precursor de células espumosas sometiendo a un estímulo inflamatorio, como PMA, o poniéndose en contacto con un factor del crecimiento adecuado, como GMCSF (factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos). En la segunda etapa, las células precursoras se transforman en células espumosas en presencia de una concentración adecuada de ácidos grasos.

Por tanto, la solicitud describe un método para identificar un compuesto que puede ser, o puede utilizarse como compuesto de partida para producir un compuesto que puede, (1) prevenir o reducir el desarrollo de células espumosas a partir de macrófagos u otras células, de forma adecuada estos macrófagos u otras células están implicados en una patología aterosclerótica, o eliminar las células espumosas, o (2) prevenir o ser útil para tratar una enfermedad vascular asociada con la formación de placas y/o el bloqueo trombótico de vasos sanguíneos, comprendiendo el método las etapas de seleccionar:

(a) una línea celular o población celular primaria adecuadas,

(b) suministrar a la línea celular un estímulo inflamatorio o un factor del crecimiento que facilite la diferenciación hasta un precursor de células espumosas,

(c) suministrar al precursor de células espumosas una concentración adecuada de un ácido graso, y

(d) medir la acumulación de ácidos grasos en la célula en presencia o ausencia del compuesto.

Una línea celular o población celular primaria adecuadas son aquellas implicadas en una patología aterosclerótica.

El tipo celular puede ser cualquier tipo celular adecuado. Preferiblemente, es una célula leucocítica. Se prefiere particularmente que la línea celular leucocítica sea un macrófago o una línea celular precursora de macrófagos.

De forma típica, las células son THP-1 o U937. Las THP-1 están disponibles como n° de depósito celular ECACC 85011440, y las U937 están disponibles como n° de depósito celular ECACC 88081201. Sin embargo, cualquier célula leucocítica adecuada puede utilizarse, aunque se prefiere emplear una célula de tipo monocítico o de tipo macrófago. Las células THP-1 son de “tipo monocítico” y pueden diferenciarse en células de tipo macrófago mediante forbol éster (PMA).

El “suministro de un estímulo inflamatorio a la célula” puede incluir el suministro de cualquier estímulo inflamatorio adecuado que facilite la estimulación de las células para formar células espumosas.

Un “factor del crecimiento que facilita la diferenciación en células espumosas” incluye cualquier factor del crecimiento adecuado, como GMCSF, y en el contexto de la invención, PMA. Se prefiere el PMA o un forbol éster funcionalmente equivalente.

De forma típica, el forbol éster es PMA puede ser cualquier forbol éster que facilite la diferenciación de las células.

De forma típica, el PMA se utiliza a una concentración entre 0,1 y 10 ng/ml.

El ácido graso puede suministrarse a la célula en el suero en que la célula está creciendo. Los inventores han descubierto que el suero de ternera fetal inactivado con calor de Gibco BRL produce un bajo trasfondo de acumulación de lípidos, mientras que se logra un nivel alto de acumulación de lípidos utilizando el sustituto de suero de proceso controlado (CPSR-3) de Sigma. Como alternativa, puede suministrarse (por ejemplo, añadiéndolo al medio de cultivo de crecimiento) en una concentración adecuada. Los ácidos grasos adecuados incluyen ácidos grasos mono- y poliinsaturados con una longitud de cadena de 18-22, incluyendo el ácido linoleico. De forma adecuada, los ácidos grasos se suministran a una concentración entre 10 y 100 μ M.

La acumulación de ácidos grasos en la célula puede medirse utilizando cualquier método adecuado. Los métodos particularmente convenientes implican el uso de tinciones de ácidos grasos, como rojo del Nilo o rojo aceite O, que pueden utilizarse *in situ* y leerse con un lector de placas. Otros métodos que pueden utilizarse para medir la acumulación de ácidos grasos incluyen TLC, HPLC y LC-MS.

Se evalúa la acumulación de ácidos grasos en la célula en presencia o ausencia del compuesto de ensayo, y los compuestos que conducen a una reducción en la acumulación de ácidos grasos en la célula se seleccionan para su posterior ensayo.

Se apreciará con facilidad que puesto que las células pueden cultivarse en placas de cultivo de múltiples células (por ejemplo, placas de cultivo de 64 células) y puesto que la tinción de los lípidos puede cuantificarse, por ejemplo,

de manera óptica en un lector de placas de microvaloración, el método de selección puede automatizarse con facilidad para una selección de alta capacidad de procesamiento.

Se cree que los compuestos identificados e identificables mediante los métodos de selección descritos en la presente son útiles para tratamientos. La invención ahora se describirá con más detalle haciendo referencia a la siguiente descripción, ejemplos y figuras, en las que:

La figura 1 muestra la expresión de PPAR en células THP-1. Se realizaron análisis de expresión con ARNasa para ARNm de PPAR α y δ sobre el ARN total de hígado de ratón y humano y varias líneas celulares humanas. La línea celular Huh7 es una línea celular de hígado humana que contiene cantidades idénticas de ARNm de PPAR δ (barras negras) y α (barras blancas) cuando se compara con el ARN total aislado a partir de hígado humano (>1% de actina). Tanto Huh7 como el hígado humano no responden a proliferadores de peroxisomas en términos de aumentos en el metabolismo de lípidos y transcripción a partir de construcciones indicadoras que contienen PPARE. Las líneas celulares monocíticas, como las células U937 y THP-1, expresan niveles relativamente altos de PPAR δ (5-6% de actina). Se analizaron otros tejidos humanos para la expresión de α y δ , como colon, ovario, testículos, riñón, glándulas suprarrenales. En todos los casos, los niveles de expresión fueron menores que 1% de actina (los datos no se muestran). Sin embargo, es posible que componentes celulares individuales de estos tejidos complejos expresen niveles significativos de estos receptores.

La figura 2 muestra la expresión de genes aterogénicos en células THP-1. Se analizó el ARN total procedente de células THP-1 mediante RT-PCR para determinar la expresión de diversos productos génicos asociados con el proceso aterogénico. Se muestran geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio del análisis de células THP-1 en condiciones de crecimiento normales (-PMA), de células THP-1 adherentes después de un tratamiento con forbol éster (+PMA) y un tratamiento con forbol éster en presencia de ácido linoleico 100 μ M. Todas las sondas se diseñaron para que cruzasen los límites de intrón/exón y no amplificaban el ADN genómico.

La figura 3 demuestra que los ácidos grasos y los rexinoides que estimulan la formación de células espumosas son inhibidos por la rosiglitazona. Los rexinoides son fármacos específicos de RXR, como ácido 9-cis-retinoico y el compuesto farmacéutico de ligando LG100268 (Mukherjee, R., *et al.*, 1997, Nature 386, 407-410). La rosiglitazona es fabricada por SmithKline Beecham y también se conoce como *Avandia* y BRL49653.

A. Los ácidos grasos cooperan con los rexinoides en la formación de células espumosas

Se trataron células THP-1 con PMA 5 ng/ml y DMSO (sulfóxido de dimetilo al 0,5%), ácido linoleico (30 μ M), LG 100268 (5 μ M) y ácido linoleico con LG 100268. El tratamiento se continuó durante 3 días, y las células se fijaron en paraformaldehído 0,66 M, se tiñeron con una disolución saturante de rojo aceite O y después se contratiñeron con hematoxilina. Se observó una mayor acumulación de lípidos con el tratamiento con ácido linoleico o con LG 100268. La adición de ambos compuestos produce un efecto aditivo sobre la acumulación de lípidos.

B. La rosiglitazona estimula la eliminación de lípidos

Células THP-1 tratadas con PMA se trataron con BRL49653 20 μ M durante 3 días, y se tiñeron para observar la acumulación de lípidos como se describió anteriormente.

La figura 4 demuestra que la rosiglitazona modula la expresión génica en células THP-1.

A. La rosiglitazona reduce la expresión de IL-1 β

Se realizó un análisis de protección con ARNasa sobre los niveles de ARNm de interleuquina 1 β en células THP-1 tratadas con PMA (+PMA), células tratadas con PMA y ácido linoleico (+PMA+FA), y células tratadas con PMA y BRL49653 (+PMA+BRL). También se muestra la señal de normalización de la actina.

B. La rosiglitazona reduce la expresión de TNF α

Se realizó un análisis de protección con ARNasa sobre los niveles de ARNm de TNF α en células THP-1 control (-PMA), células tratadas con PMA (+PMA), células tratadas con PMA y ácido linoleico (+PMA+FA), y células tratadas con PMA y BRL49653 (+PMA+BRL). También se muestra la señal de normalización de la actina.

C. La rosiglitazona aumenta la expresión de CD36

Se realizó un análisis de clasificación de células activadas con fluorescencia (FACS) de la expresión del antígeno CD36 en células THP-1 control (-PMA), y células tratadas con PMA y BRL49653 (+PMA+BRL). El tratamiento se realizó durante 48 horas a BRL49653 50 μ M. Las células se rascaron de las placas de cultivo, se fijaron y se incubaron con anticuerpo CD36 conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Coulter Immunotech). Se realizó un análisis de FACS utilizando un clasificador de células Coulter EPIC V.

La figura 5 muestra la generación de líneas celulares que expresan PPAR δ de forma constitutiva. Se subclonó la secuencia codificadora completa de PPAR δ humano en el vector de expresión eucariota pCLDN (Brighty, D.W., *et*

al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7802-7805 (1991)). Los plásmidos resultantes se transfectaron en células THP-1 utilizando un procedimiento de DEAE-dextrano modificado (Fujita, *et al.* (1986), *Cell*, **46**, 401-407). Las células se mantuvieron en un medio que contenía G418 1 mg/ml y medio acondicionado con THP-1 al 10%, aplicando procedimientos de lavado rigurosos para eliminar las células muertas. Esto continuó hasta que se detuvo la muerte de las células y se observó un crecimiento robusto. Se obtuvieron 6 líneas de cada uno de pCLDN (vector vacío), pCLDNPPAR δ , pCLDNPPAR δ AS, pCLDNPPAR α y pCLDNPPAR α AS. "AS" significa construcción antisentido. Todas estas líneas fueron fundamentalmente idénticas en crecimiento y viabilidad. Se realizaron experimentos de diferenciación iniciales con las líneas celulares de PPAR δ en el medio de selección. Éstos fueron negativos para todas las construcciones, incluyendo la línea de control con el vector vacío. Las células para todas las construcciones se mantuvieron con vida después de un tratamiento con PMA, aparte de las líneas antisentido de PPAR δ que mostraron toda captación de azul de tripano. Las células entonces se cultivaron con G418 hasta que las líneas control con el vector vacío respondieron a PMA de una manera similar al control parental. Esto entonces reveló que las líneas pCLDNPPAR δ se diferenciaban todas de una manera similar, pero las líneas pCLDNPPAR δ AS no pudieron diferenciarse.

Se prepararon ARN y proteínas a partir de las líneas celulares sentido de PPAR δ y se analizaron para ARNm de PPAR δ mediante protección de ARNasa (B) y para la proteína de PPAR δ mediante análisis de la transferencia Western (C). Las 6 líneas expresaron aumentos en >10 veces en ARNm de PPAR δ frente a la línea celular parental. Estos niveles son mucho mayores que los observados en células tratadas con PMA. Se han observado unos niveles elevados de proteína de PPAR δ en líneas denominadas delta-1 y delta-2. Las otras 4 líneas no se analizaron mediante análisis de la transferencia Western. Todos los experimentos posteriores se realizaron con estas líneas.

La figura 6 demuestra que la sobreexpresión de PPAR δ estimula la formación de células espumosas.

A. Las células THP-1 parentales y las células pCLDNPPAR δ se trataron con PMA 5 ng/ml y DMSO (al 0,5%) o BRL49653 (50 μ M). El tratamiento se continuó durante 3 días, y las células se fijaron en paraformaldehído 0,66 M, se tiñeron con una disolución saturante de rojo aceite O y después se contratiñeron con hematoxilina. Los experimentos posteriores demostraron que la acción del BRL49653 es eficaz a concentraciones submicromolares.

B. Se trataron los cultivos como anteriormente y después se extrajeron con metanol/cloroformo/PBS (1:1:1 vol/vol). La fase orgánica se ensayó sobre una placa de TLC de gel de sílice (Merck:Kieselgel 60 con zona de concentración) con heptano (al 80%), éter dietílico (al 18%) y ácido acético (al 2%) como disolvente. Los lípidos entonces se tiñeron con un aerosol de ácido fosfomolibdico en metanol. Se muestra la movilidad relativa del colesterol libre (FCHOL), el ácido araquidónico libre (FFA), el triacilglicerol muy insaturado (TG), los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), los ésteres de colesterol (CE) y también el hidroxianisol butilado (BHT) que están presentes en el sistema disolvente.

La figura 7 demuestra que el eflujo de ácidos grasos es reprimido en células que sobreexpresan PPAR δ activado.

A. Captación de ácidos grasos

Se incubaron 1 millón de células en 2 ml de medio con 5 μ Ci de 3 H-ácido oleico durante la noche con o sin ácido linoleico 100 μ M (ALTO CONTENIDO EN GRASAS y BAJO CONTENIDO EN GRASAS, respectivamente). Las células entonces se sedimentaron, se lavaron y se resuspendieron en medio fresco sin ácidos grasos marcados. Se determinó el porcentaje de incorporación mediante recuento de centelleo de una parte alícuota del medio y las células lavadas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

B. Eflujo de ácidos grasos

Las células lavadas se incubaron durante 50 horas más y se controló la liberación de radiactividad a lo largo del tiempo. Las células parentales con alto contenido en grasas se muestran como diamantes y con bajo contenido en grasas se muestran como cuadrados. Las células que sobreexpresan PPAR δ con alto contenido en grasas se muestran como triángulos y con bajo contenido en grasas como círculos.

C. Eflujo de ácidos grasos de células activadas con PMA

Las células se trataron con PMA y se incubaron con ácido oleico radiomarcado como se describió anteriormente. Las células adherentes se lavaron y se midió la emisión de radiactividad desde estas células a lo largo del tiempo. La línea celular parental (cuadrados) muestra mayor nivel de emisión de radiactividad que las células que sobreexpresan PPAR δ (diamantes).

La figura 8 demuestra que la expresión del gen ApoE está regulada por ácidos grasos a través de PPAR δ .

Se preparó el ARN total a partir de las células THP-1 parentales tratadas con PMA (THP-1), o PMA y ácido linoleico (THP-1+FA), y la línea celular que sobreexpresa PPAR δ sin tratar (DELTA). Se preparó ADNc a partir de estas muestras de ARN, y el ADNc se analizó para detectar secuencias ApoE utilizando procedimientos TAQMAN. El resultado mostrado es la expresión relativa normalizada para la expresión de β -actina, y las barras de error representan la desviación estándar en muestras por duplicado.

La figura 9 demuestra que la inhibición de PPAR δ evita la formación de células espumosas. Las células se trataron durante la noche con PMA 5 ng/ml y se puntuaron según su diferenciación (adherencia a la placa de cultivo) y viabilidad (exclusión de azul de tripano). Las células THP-1 parentales y las células que sobreexpresan PPAR δ (sentido) se diferencian bien en presencia de PMA. Sin embargo, las células que expresan PPAR δ antisentido (antisentido) no se diferencian en absoluto y se hacen muy permeables al azul de tripano. Estas células PPAR δ antisentido crecen normalmente con alta viabilidad en ausencia de PMA.

La figura 10 demuestra que la protección de PPAR δ frente a la muerte no se produce corriente abajo del PKC. Se incubaron células parentales y con PPAR δ antisentido, con PMA y un inhibidor de la actividad PKC (Bis) y dos inhibidores de la actividad PLA2 (OBAA y mepacrina). Estos inhibidores se incluyeron a concentraciones utilizadas en estudios previos para la inhibición específica.

Bis es bisindoilmaleamida I y puede adquirirse en Sigma. OBAA es el ácido 3-(4-octadecil)benzoilacrílico y puede adquirirse en Calbiochem. La mepacrina es 6-cloro-9-[(4-dietilamino)-1-metilbutil]amino-2-metoxiacridina y puede adquirirse en Calbiochem.

Todos los inhibidores evitaron la diferenciación de las células THP-1 parentales (A). Esto confirmó el papel del PKC en la acción del forbol éster. La acción de los inhibidores de PLA2 parece revelar nuevos aspectos de la diferenciación de macrófagos. Sin embargo, cuando los inventores estudiaron la viabilidad de estas células mediante exclusión de azul de tripano (B) descubrieron que no bloqueaba la "muerte" inducida por PMA de la línea celular de PPAR δ antisentido (barras negras). Solo la mepacrina parecía presentar algún signo de toxicidad en las células parentales (barras blancas).

La figura 11 muestra que la acumulación de lípidos es estimulada por un agonista de PPAR δ , el compuesto F.

La figura 12 demuestra que el compuesto F, un agonista de PPAR δ , estimula la formación de células espumosas de macrófagos a partir de células gliales THP-1.

La figura 13 demuestra que el compuesto F estimula la formación de células espumosas de macrófagos a partir de monocitos humanos primarios.

La figura 14 demuestra la acumulación de lípidos en células gliales estimulada por PPAR δ .

La figura 15 demuestra que el compuesto F estimula la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata.

Descripción: El papel del PPAR δ en la formación de células espumosas

Cultivo de tejidos

Se cultivaron células de glioblastoma astrocitoma U373 humanas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% v/v (GibcoBRL, Paisley, Escocia), penicilina (5000 IU/ml) (GibcoBRL, Paisley, Escocia) y estreptomycin (5000 μ g/ml) (Gibco, Paisley, Escocia). Los cultivos se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ y se transfirieron cuando se logró una confluencia del 100%.

Tratamiento con fármacos de las líneas celulares

Se cultivaron en placa células confluentes en placas de ensayo de seis pocillos en 2 ml del medio utilizado para el cultivo de tejidos detallado anteriormente y se trataron con 5 μ M y 1 μ M del agonista específico de PPAR δ compuesto F. Se empleó DMSO como control. El compuesto F y el medio se renovaron cada tres días y las células se trataron durante una semana.

Experimentos de tinción

Se realizaron experimentos de tinción con rojo aceite O con contratinción con hematoxilina en células procedentes de cada uno de los tratamientos descritos en el párrafo anterior. El medio se desechó y los pocillos se lavaron con PBS (2 ml). Las células se fijaron en formaldehído al 10% (1 ml) durante una hora y después se lavaron dos veces en PBS antes de un breve enjuagado en alcohol isopropílico al 60%. Se añadió una disolución de rojo de aceite O (1 ml) (Sigma) y se retiró después de tres horas. Los pocillos entonces se lavaron dos veces con PBS. Para la contratinción se añadió contratinte de hematoxilina (1:10, 1 ml) (Sigma) y se retiró después de cinco minutos mediante un lavado doble con PBS. El segundo lavado se dejó en los pocillos.

Resultados

Después de una semana, las células control no mostraron acumulación de lípidos. Para las células tratadas con el compuesto F, se observó acumulación de lípidos y fue notablemente macrovesicular, es decir, la acumulación de lípidos no sólo estaba presente en el área perinuclear sino también en los procesos astrocíticos (véase la figura 14).

Ejemplo 1

El papel del PPAR δ en la formación de células espumosas ateroscleróticas

5 Los macrófagos activados expresan las tres formas de receptor activado del proliferador de peroxisomas, es decir alfa (α), gamma (γ), y delta (δ). En el trabajo descrito en el ejemplo 1 los inventores demostraron que se requiere la expresión de PPAR δ para la activación de macrófagos mediante forbol ésteres, y que el PPAR δ estimula la formación de células espumosas de macrófagos. Se ha demostrado previamente que los agonistas de PPAR γ regulan negativamente la activación de macrófagos y tienen profundas acciones antiinflamatorias. En este ejemplo se demuestra que
10 el agonista de PPAR γ , rosiglitazona, inhibe la formación de células espumosas de macrófagos. Por tanto, PPAR γ y PPAR δ desempeñan papel opuestos en la diferenciación y el metabolismo de lípidos de macrófagos. Estos resultados indican que, de forma sorprendente, los ligandos antagonistas de PPAR δ son potentes candidatos a fármacos para la prevención de la enfermedad cardiovascular.

15 Los materiales y métodos experimentales se describen en las leyendas de las figuras.

*Resultados**Validación de un modelo de células espumosas*

20 Las líneas celulares monocíticas se utilizan con amplitud en la investigación básica para determinar la base molecular de la aterogénesis. Los inventores han investigado la influencia de los lípidos y de la grasa de la dieta, y la influencia del estrés y de la inflamación. La línea celular más versátil para esta investigación es la línea celular humana THP-1. Esta línea celular crece en suspensión bajo condiciones normales, aunque estímulos inflamatorios, como
25 forbol ésteres, provocan una fuerte respuesta de diferenciación e inflamatoria, en la que estas células se hacen adherentes y más parecidas a macrófagos. Esta línea celular también se sabe que responde a los ácidos grasos y al LDL oxidado mediante cambios en la expresión génica, y se ha demostrado que el LDL oxidado estimula la acumulación citoplásmica de lípidos. Se considera que estos fenómenos reguladores representan los acontecimientos iniciales que se producen en la formación de placas ateroscleróticas (12).

30 Los inventores ahora han descubierto una conexión importante entre el proceso inflamatorio y la patología de lípidos de estas células, con la observación de que la estimulación con forbol éster de células THP-1 conduce a un gran aumento en los niveles de ARNm de PPAR δ . Otros grupos han mostrado que los estímulos inflamatorios sobrerregulan la expresión de PPAR γ en macrófagos de ratón y humanos, así como en líneas celulares derivadas de monocitos, como
35 THP-1 y U937 (13-15). También se ha demostrado que el PPAR δ se expresa en macrófagos peritoneales producidos con tioglicolato en ratones (13). Los inventores también han demostrado que las células THP-1 activadas expresan muchos productos génicos inflamatorios asociados con la aterogénesis, como MCP (proteína quimioatrayente de monocitos), IL-8, IL-1 β y tromboxano sintasa (figura 2), y han descubierto que la expresión de varios de estos productos génicos, tras la activación, es modulada por ácidos grasos. El descubrimiento de que la expresión de la apolipoproteína E aumenta tras la activación, y de que esto es fuertemente reprimido por los ácidos grasos, es significativo. Estos
40 resultados demuestran que este sistema responde a ácidos grasos y a estímulos inflamatorios de una manera adecuada para que se considere un buen modelo para la enfermedad vascular humana. Los inventores también han observado que el tratamiento de células THP-1 adherentes con ácidos grasos poliinsaturados, como ácido linoleico, conduce a la acumulación de gotas de lípidos en el citoplasma (figura 3A). Estos macrófagos cargados de lípidos se conocen como
45 células espumosas. Se ha sugerido la implicación de un heterodímero de PPAR/RXR en la regulación de la formación de células espumosas, por la observación de que un ligando activador para el receptor X de retinoides (LG 100268) estimula la formación de células espumosas en cooperación con ácidos grasos. El ácido linoleico no es un ligando muy específico para los PPAR, aunque se ha demostrado que activa al PPAR alfa y delta de manera eficaz, mientras que un activador pobre del PPAR γ . El tratamiento de estas células con el activador de PPAR α Wy 14.643 no tiene
50 ningún efecto, lo cual es coherente con la baja expresión de este isoforma en el macrófago activado (figura 1). El uso de la rosiglitazona, BRL49653, tampoco produjo células espumosas; sin embargo, se sabe que estas células contienen PPAR γ . De hecho, el tratamiento con BRL49653 da como resultado la reducción de los depósitos de lípidos cuando se compara con células sin tratar (figura 3A) y puede inhibir la estimulación por ácido linoleico y retinoides de las
55 células espumosas (los datos no se muestran). Estos datos sugieren, de modo colectivo, por primera vez que el PPAR δ es la diana molecular para los ácidos grasos en la estimulación de la formación de células espumosas, y que el PPAR γ es un regulador negativo de la función de células espumosas.

La rosiglitazona (BRL49653) se opone a la formación de células espumosas

60 Los datos de los inventores apoyan el papel del PPAR γ en el antagonismo de la activación de macrófagos y la acumulación de lípidos. También han observado que la adherencia celular de las células THP-1 tras un tratamiento con BRL49653 es más lenta que la observada para las células sin tratar (los datos no se muestran). Este papel inhibitorio también fue sugerido en dos artículos en *Nature*, en los que se demostró la regulación negativa de los mediadores inflamatorios por PPAR γ (13,14). Los inventores han confirmado la acción antiinflamatoria de los TZD estudiando el
65 efecto de BRL49653 sobre la expresión de IL-1 β . En efecto, un tratamiento con BRL49653 conduce a una disminución en los niveles de ARNm de IL-1 β (figura 4A). También se observó una reducción del ARNm de TNF α , cuando se compara con la actina; sin embargo, esta reducción no es tan drástica (figura 4B). Se ha demostrado que la captación de lípidos por el receptor captador CD36 es regulada por PPAR γ en células THP-1 (16,17), y los inventores han

descubierto que el CD36 es regulado por TZD en las células THP-1 activadas (figura 3C), aunque estas células no forman células espumosas (figura 2). Por tanto, la sobreexpresión de CD36 no es suficiente para la formación de células espumosas y el efecto global de la activación de PPAR γ es antagonizar la formación de células espumosas. Las TZD son la clase de fármacos de tiazolidindiona que incluye el BRL49653.

Modulación genética del modelo de células espumosas

Para determinar si el PPAR δ está o no implicado en la formación de células espumosas inducida por ácidos grasos se generaron líneas celulares a partir de células THP-1 que sobreexpresan PPAR δ o que expresan ARNm antisentido de PPAR δ . El ADNc que codifica PPAR δ se clonó en un vector (pCLDN) que dirige la transcripción bajo el control de un potenciador poderoso procedente del citomegalovirus humano (figura 5A). Este vector también contiene el gen de resistencia a la neomicina para la selección de las células diana. El ADNc se insertó en ambas orientaciones para expresar el ADN sentido para la expresión de la proteína de PPAR δ (pCLDNPPAR δ -S) y en la dirección antisentido para bloquear la expresión de PPAR δ (pCLDNPPAR δ -AS). Las células THP-1 se transfectaron con pCLDNPPAR δ -S o pCLDNPPAR δ -AS y se seleccionaron con G418 1 mg/ml hasta que se observó un crecimiento robusto en G418. Las células entonces se liberaron de la selección con G418, puesto que incluso los controles con solo vector no se diferenciaban en presencia de G418. Se sabe que el G418 es un inhibidor conocido de la actividad proteína quinasa C y, por tanto, es un antagonista de la acción del forbol éster. Después de la recuperación de la selección con G418, se confirmó la sobreexpresión de PPAR δ en seis líneas celulares policlonales transfectadas de forma independiente mediante protección con ARNasa (figura 5B) y análisis de la transferencia Western (figura 5C). Estas líneas celulares crecen con normalidad y no muestran adherencia a los matraces de cultivo de tejidos: sin embargo, cuando se tratan con PMA, se hace adherentes y acumulan grandes cantidades de lípidos intracelulares cuando se comparan con las células de tipo salvaje, incluso en ausencia de ácidos grasos añadidos (figura 6). El tratamiento con BRL49653 puede evitar la formación de células espumosas conducida por PPAR δ . Un análisis de los ácidos grasos demostró que los aumentos en los lípidos celulares están compuestos principalmente por triglicéridos y que este conjunto es eliminado por la acción del BRL49653 (figura 6B). Utilizando ácido oleico tritiado los inventores han analizado la captación y el flujo de los ácidos grasos en líneas celulares parentales y que sobreexpresan PPAR δ . Se ha descubierto que la captación y el flujo son fundamentalmente idénticos entre las dos líneas celulares en el estado no activado (figuras 7A y B). Sin embargo, en las células activadas es evidente que el flujo es notablemente inferior en las líneas celulares que sobreexpresan PPAR δ (figura 7C).

Las células que sobreexpresan PPAR δ tiene unos niveles de ARNm de ApoE que están notablemente reducidos (en 35 veces) comparados con la línea celular parental (figura 8). Es importante advertir que la apoE se reduce en los mismo niveles que los observados en la línea celular parental después de un tratamiento con ácido linoleico. Estos datos revelan que el PPAR δ media en la represión por ácidos grasos de la expresión del gen apoE. Las células que expresan el ARN antisentido de PPAR δ (PPAR δ AS) también crecieron con normalidad; sin embargo, cuando se trataron con PMA, estas células no se diferenciaban (figura 9A). No se observó diferenciación a ninguna concentración de PMA (0,1 ng-25 ng/ml). La tinción con azul de tripano de células PPAR δ AS tratadas con PMA durante la noche reveló que las células habían muerto tras el tratamiento (figura 9B). No hay pruebas de la condensación de ADN, según se juzga mediante la tinción con DAPI (4N,6-diamidino-2-fenilindol, Molecular Probes, Oregón) (los datos no se muestran). No se observó fragmentación de ADN en una electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico preparado a partir de estas células muertas (los datos no se muestran). Por tanto, las células con PPAR δ antisentido tratadas con PMA no parece que mueran por apoptosis. Utilizando inhibidores de PKC y fosfolipasa A, los inventores han demostrado que pueden bloquear la diferenciación de células THP-1 parentales (figura 10A); sin embargo, parece que las células con PPAR δ antisentido mueren en presencia de forbol éster y estos inhibidores (figura 10B). Esto sugiere que la causa de la muerte no está corriente abajo de la activación de PKC en el proceso de diferenciación.

Los inventores han demostrado que se requiere PPAR δ para la activación inflamatoria de macrófagos (según se evidencia mediante la activación de células THP-1), y que el PPAR δ estimula la formación de células espumosas. La sobreexpresión de PPAR δ altera profundamente la acumulación de lípidos en estas células y se logra, en parte, alterando la expresión del gen que codifica la apolipoproteína E. La inhibición (antagonismo) de la actividad PPAR δ puede evitar la formación de células espumosas y el desarrollo de fármacos que sean inhibidores de la actividad PPAR δ resulta útil para la prevención y/o el tratamiento de un gran número de trastornos que aparecen como consecuencia de la aterogénesis.

Ejemplo 2

La acumulación de lípidos es estimulada por un agonista de PPAR δ

Un agonista selectivo de PPAR δ (el compuesto F en la página 9 del documento WO 97/28149) estimula la acumulación de lípidos y estimula la formación de células espumosas en el ensayo de THP-1 descrito en el ejemplo 1. Aunque el documento WO 97/28149 propone utilizar este agonista de PPAR δ (así como otros compuestos descritos) para tratar la enfermedad cardiovascular, los inventores ahora han demostrado que este compuesto estimula la formación de células espumosas. Este efecto resulta evidente a menos de 500 nM y es máximo entre 5 y 10 μ M (véase la figura 11A). El compuesto F coopera con el ligando de RXR LG100268 en la estimulación de la formación de células espumosas (véase la figura 11B). Esta actividad farmacológica es que la que se predice a partir de los estudios descritos en el ejemplo 1. El compuesto F también estimula la formación de células espumosas de macrófagos en células THP-1 (figura 12) y en monocitos humanos primarios (figura 13).

Ejemplo 3

Selección de inhibidores de la actividad PPAR δ 5 *Ensayos de unión**Ensayos de filtración de radioligandos*

10 Se mezcló hPPAR δ recombinante con el ligando radiactivo [^3H]₂ L-783483 según se describe en el documento WO 97/28149 y en Berger *et al.* (1999), *J. Biol. Chem.*, **274**, 6718-6725, en presencia de un compuesto de ensayo. El L-783483 tiene una $K_d = 1\text{nM}$. La mezcla se aplica a filtros de celulosa mixtos y el fluido se hace pasar a través del filtro mediante presión al vacío. La radiactividad que permanece sobre el filtro representa L-783483 unido a PPAR δ . Una disminución en la radiactividad unida indicará la presencia de un compuesto que compite con PPAR δ . Este ensayo determina las propiedades de unión del compuesto de ensayo.

15 *Desplazamiento de ácidos grasos fluorescentes*

20 La unión de ácido *cis*- o *trans*-parinámico proporciona un ensayo fluorescente para los ligandos de PPAR. El “ácido *cis*-parinámico” es el ácido 9,15-*cis*, 11,13-*trans*-parinámico. El “ácido *trans*-parinámico” es el ácido 9,11,13,15-*trans*-parinámico. Ambos pueden adquirirse en Molecular Probes, Oregón. El PPAR δ recombinante se mezcla con estos ácidos grasos y un compuesto de ensayo producirá menos fluorescencia que la observada en presencia de sólo ácido graso/PPAR si se ha producido una unión significativa del compuesto de ensayo. Este ensayo determina si el compuesto de ensayo se une a PPAR δ .

25 Este ensayo puede automatizarse con facilidad realizándolo en un formato de múltiples pocillos con un fluorímetro apropiado, produciendo una alta capacidad de procesamiento.

Ensayo de interacción de coactivador/receptor/ligando (CARLA)

30 La unión de proteínas coactivadoras, como RIP140 o SRC-1, a PPAR δ depende de la presencia de un ligando. RIP140 y SRC-1 son proteínas que se unen a PPAR δ (Krey *et al.* (1997), *Mol. Endocrinol.*, **11**, 779-791). Los coactivadores se traducen *in vitro* en presencia de metionina marcada con ^{35}S y se mezclan con hPPAR δ recombinante purificado, en presencia de los compuestos de ensayo. El hPPAR inmunoprecipitará y el precipitado se analizará con SDS/PAGE, seguido de una autorradiografía, indicando la presencia de una señal radiactiva que corresponde al receptor la presencia de un ligando de PPAR δ . Este ensayo puede utilizarse para identificar la unión de coactivadores que pueden demostrar ser antagonistas; esto se logra teniendo agonistas conocidos en cada ensayo (véase anteriormente).

*Ensayos funcionales*40 *Ensayo de la transfección transitoria de la construcción indicadora*

Se transfectan células Cos-1 o CV-1 con una construcción de expresión para PPAR δ y una construcción indicadora con la luciferasa bajo el control de un potenciador dependiente de PPAR. Los potenciadores dependientes de PPAR δ incluyen los derivados de los genes de acil-CoA oxidasa y citocromo P450A6. Esto puede realizarse en una diversidad de formatos de cultivo de múltiples pocillos y las células transfectadas se tratan con un agonista conocido de PPAR δ y los compuestos de ensayo. Las células se lisan *in situ* y se ensayan para la actividad luciferasa en un luminómetro. Pueden adquirirse luminómetros que sean compatibles con una selección de alta capacidad de procesamiento. El ensayo descrito anteriormente estudia la capacidad de los compuestos de ensayo para bloquear la actividad de un agonista de PPAR δ .

50 *Ensayo de la construcción indicadora con líneas celulares estables.*

Se transfectaron líneas celulares con construcciones similares a las indicadas anteriormente, excepto que también codificaban marcadores de resistencia a antibióticos. Esto permite la selección de líneas celulares que expresen de forma estable PPAR δ y que contengan las secuencias indicadoras integradas en el genoma. Esta línea celular se cultiva y se emplea para la detección de compuestos activadores de PPAR δ sin necesidad de repetidas y caras transfecciones.

Ejemplo 4

60 *Ensayos con células espumosas*

Se emplean ensayos de células espumosas para identificar compuestos antiaterogénicos potenciales. Se tratan células THP-1 en cultivos de placas de 96 pocillos con PMA 0,1 a 10 ng/ml para inducir la diferenciación de macrófagos. Las células THP-1 están disponibles en ECACC n° de registro 88031201.

65 Se suministra una fuente de ácido graso que es suero (suero de sustitución CPSR-3 de Sigma) o ácido linoleico 20-100 μM .

La acumulación de ácidos grasos en las células de macrófagos en diferenciación se mide en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo después de 3 a 7 días utilizando el tinte rojo del Nilo.

Los compuestos de ensayo que reducen la acumulación de grasas, comparado con la ausencia de compuesto de ensayo, se seleccionan como agentes antiaterogénicos potenciales o como compuestos de partida.

Ejemplo 5

Ensayos de células de cáncer de próstata

Los inventores han descubierto que el agonista de PPAR δ , el compuesto F, puede estimular el crecimiento epitelial prostático. Tanto las células mínimamente transformadas PNT1A como las células de cáncer de próstata no transformadas (LNCaP) tienen un crecimiento estimulado por hasta 40% por concentraciones bajas del compuesto F. Este efecto también se observa con el ligando de RXR LG100268. Además, concentraciones bajas del compuesto F y de LG100268, que no aumentan significativamente el crecimiento celular, estimulan el crecimiento celular cuando se añaden juntos en el medio de cultivo. La línea celular de cáncer de próstata altamente transformada PC3 es la que más rápido crece de estas líneas y no es estimulada por el compuesto F.

Los inventores transfectaron células PC3 con construcciones de expresión para ARN antisentido de PPAR δ ; no pudieron crecer. Por contraste, se han generado las líneas celulares que expresan ARN antisentido de PPAR γ que tienen un crecimiento alterado pero sostenible. En todos los experimentos, se han generado líneas celulares que contenían el vector de expresión vacío y sin fenotipo. Estos experimentos apoyan la afirmación de que el PPAR δ es proproliferativo y que los antagonistas de PPAR δ serán útiles en el tratamiento del cáncer.

Las líneas celulares se cultivaron en placa a 2.500 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se cultivaron en RPMI que contenía FCS tratado con carbón revestido de dextrano al 5%. Se incluyeron concentraciones crecientes del compuesto F o LG100268 en el medio de cultivo y los cultivos se mantuvieron durante 7 días con cambios de fármacos y medio cada 48 horas. El número final de células entonces se determinó mediante un ensayo colorimétrico (Landegreen, U., *J. Immunol. Meth.*, **67**, 379-388, (1984)), y el crecimiento relativo se expresó como porcentaje del número de células en los pocillos control.

Bibliografía

1. **Issemann, I. & Green, S.** (1990) "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators" *Nature* **347**, 645-50.

2. **Dreyer, C. et al** (1992) "Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors" *Cell* **68**, 879-87.

3. **Palmer, C.N.A. et al** (1998) "Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver" *Molecular Pharmacology* **53**, 14-22.

4. **Lee, S.S-T. et al** (1995) "Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators" *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3012-3022.

5. **Forman, B.M. et al** (1995) "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma" *Cell* **83**, 803-812.

6. **Lehmann, J.M. et al** (1995) "An anti-diabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for Peroxisome proliferator activated receptor γ " *J. Biol. Chem.* **270**, 12953-12956.

7. **Barak, Y. et al** (1998) "PPAR γ -null mice - Early embryonic lethality due to a putative placental defect" Abstract No 303. Keystone Symposium on The Nuclear Receptor Gene Family. Incline Village, Nevada.

8. **Schmidt, A. et al** (1992) "Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids" *Molecular Endocrinology* **6**, 1634-1641.

9. **Saxena, U. et al** (1992) "Lipoprotein lipase-mediated lipolysis of very low density lipoproteins increases monocyte adhesion to aortic endothelial cells" *Biochemical & Biophysical Research Communications* **189**, 1653-1658.

10. **Frostegard, J. et al** (1990) "Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 904-908.

11. **Terkeltaub, R. et al** (1994) "Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity" *Arterioscler. Thromb.* **14**, 47-53.

12. **Ross, R.** (1993) "The pathogenesis of atherosclerosis; A perspective for the 1990s" *Nature* **362**.801.

13. **Ricote**, M. *et al* (1998) "The peroxisome proliferator activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation" *Nature* **391**, 79-82.

14. **Jiang**, C. *et al* (1998) "PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines" *Nature* **391**, 82-86.

15. **Marx**, N. *et al* (1998) "Macrophages in human atheroma contain PPAR γ " *Aran J. Pathol.* **153**, 17-23.

16. **Tontonoz**, P. *et al* (1998) "PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidised LDL" *Cell* **93**, 241-252.

17. **Nagy**, L. *et al* (1998) "Oxidised LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ " *Cell* **93**, 229-240.

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición para su uso en el tratamiento de la aterosclerosis o de enfermedades asociadas con la aterosclerosis, la enfermedad cardíaca, los accidentes cerebrovasculares, las enfermedades de arterias periféricas, la angina, la reestenosis y el ateroma, o una enfermedad vascular seleccionada de una cualquiera de aterosclerosis, enfermedad cardíaca, accidentes cerebrovasculares o enfermedad de arterias periféricas, o para el tratamiento o la prevención del cáncer seleccionado de cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de colon o cáncer de próstata, comprendiendo dicha composición un inhibidor de la actividad PPAR δ , en el que dicho inhibidor de la actividad PPAR δ es un inhibidor basado en ácidos nucleicos de la actividad PPAR δ en una célula, siendo una molécula antisentido selectiva de PPAR δ o una ribozima selectiva de PPAR δ .

15 2. El uso de un inhibidor de la actividad PPAR δ para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la aterosclerosis o de enfermedades asociadas con la aterosclerosis, la enfermedad cardíaca, los accidentes cerebrovasculares, las enfermedades de arterias periféricas, la angina, la reestenosis y el ateroma, o de una enfermedad vascular seleccionada de una cualquiera de aterosclerosis, enfermedad cardíaca, accidentes cerebrovasculares o enfermedad de arterias periféricas, o para el tratamiento o la prevención del cáncer seleccionado de cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de colon o cáncer de próstata, en el que dicho inhibidor es un inhibidor basado en ácidos nucleicos de la actividad PPAR δ en una célula, siendo una molécula antisentido selectiva de PPAR δ o una ribozima selectiva de PPAR δ .

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

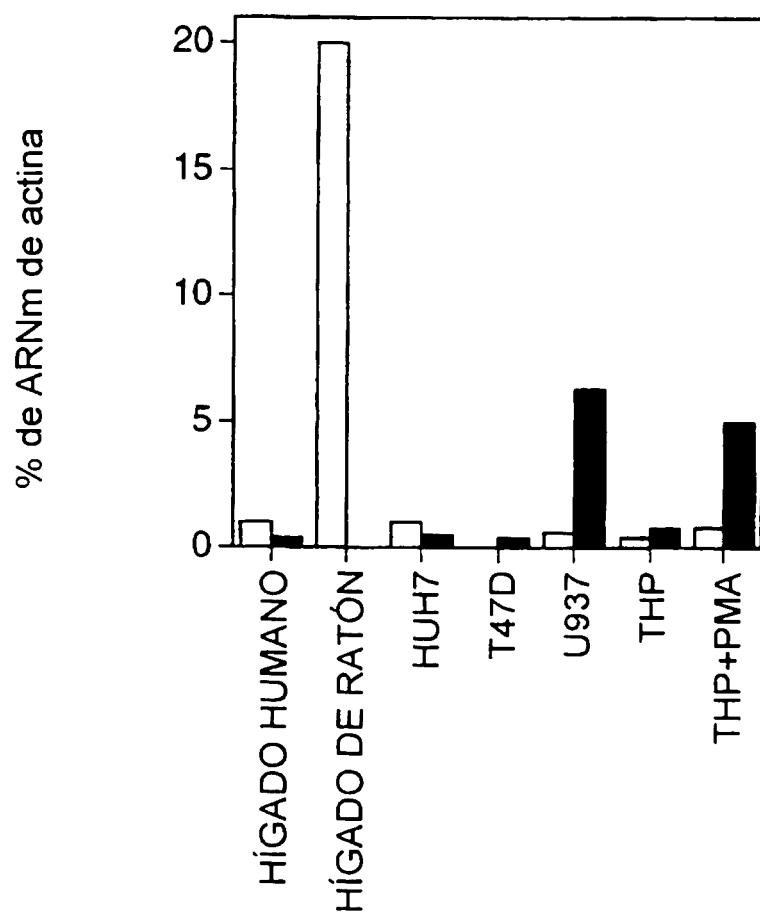


FIGURA 2

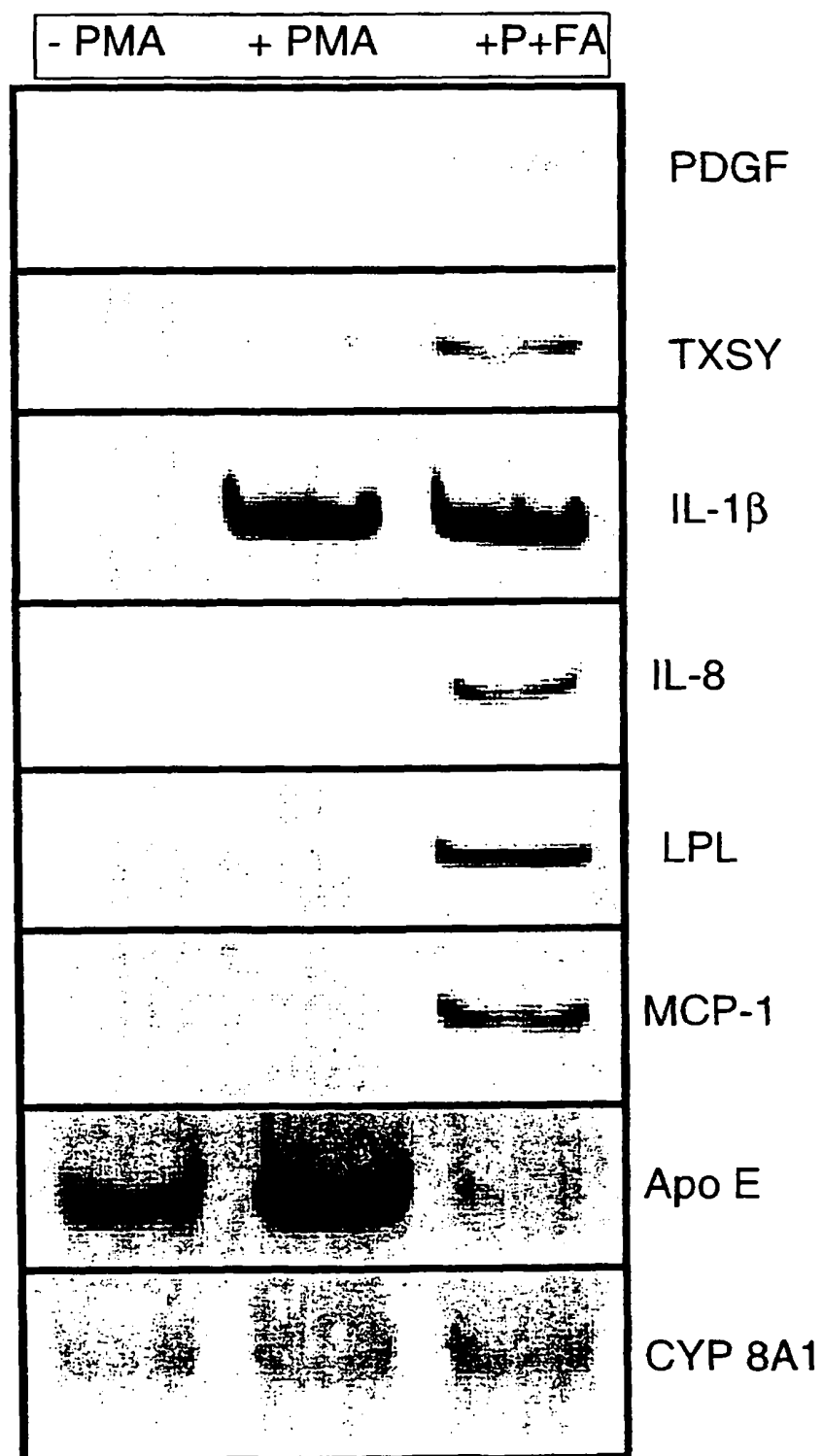
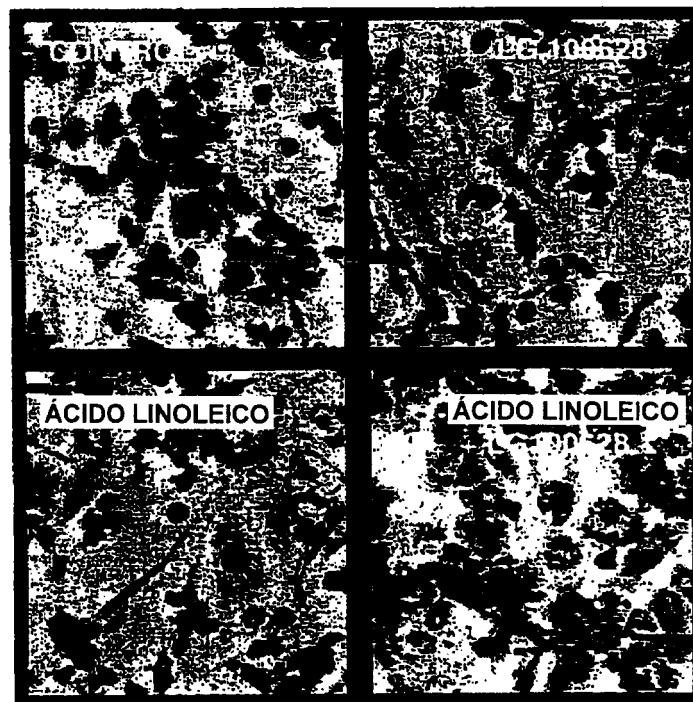


FIGURA 3

A



B



FIGURA 4

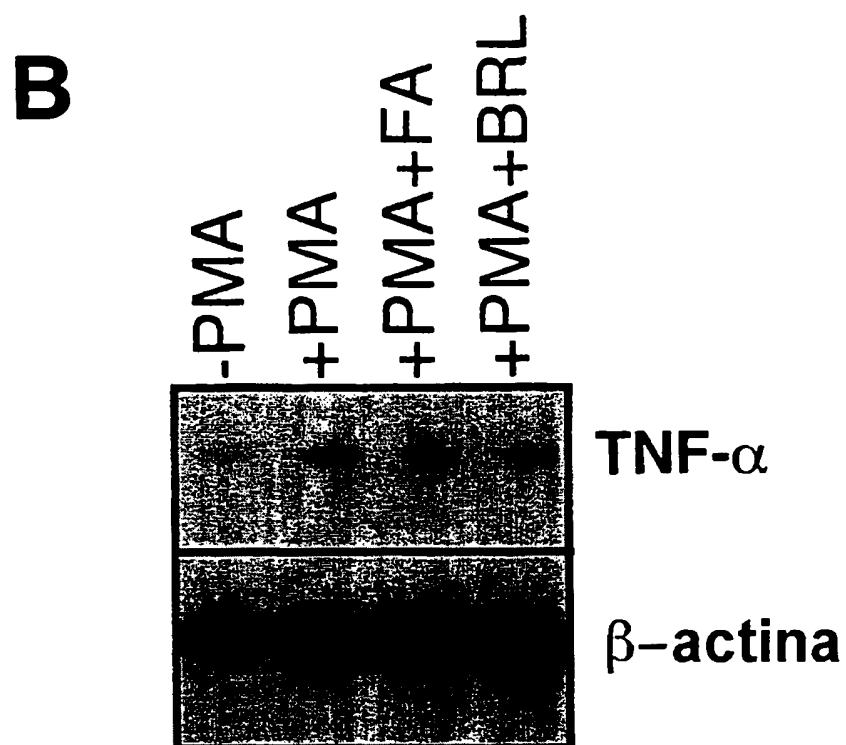
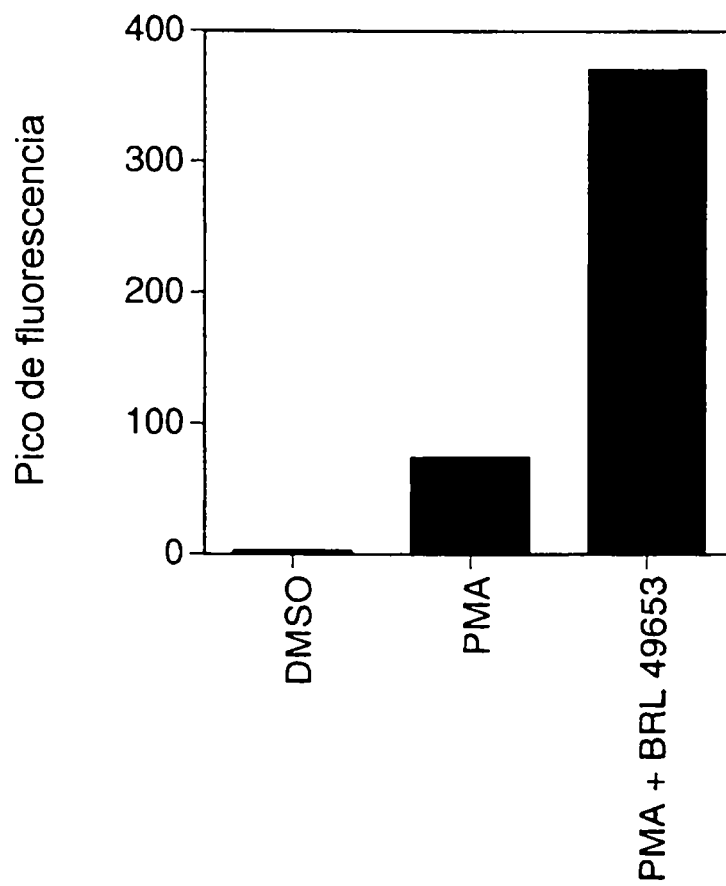
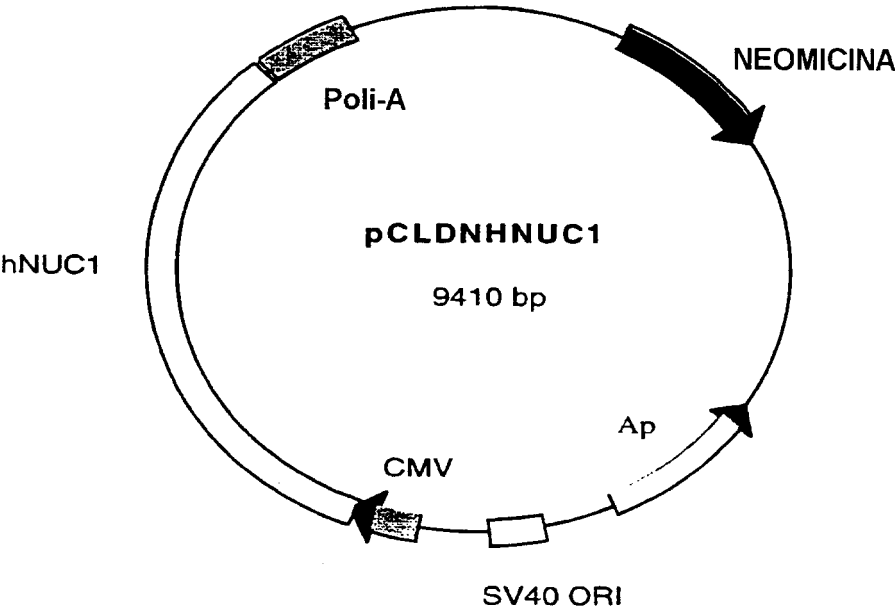


FIGURA 4C

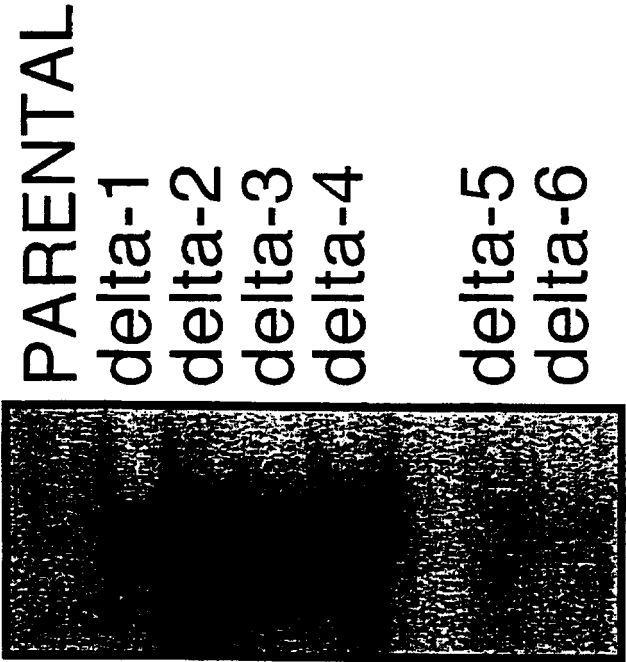


A

FIGURA 5



B



C



FIGURA 6A



FIGURA 6B

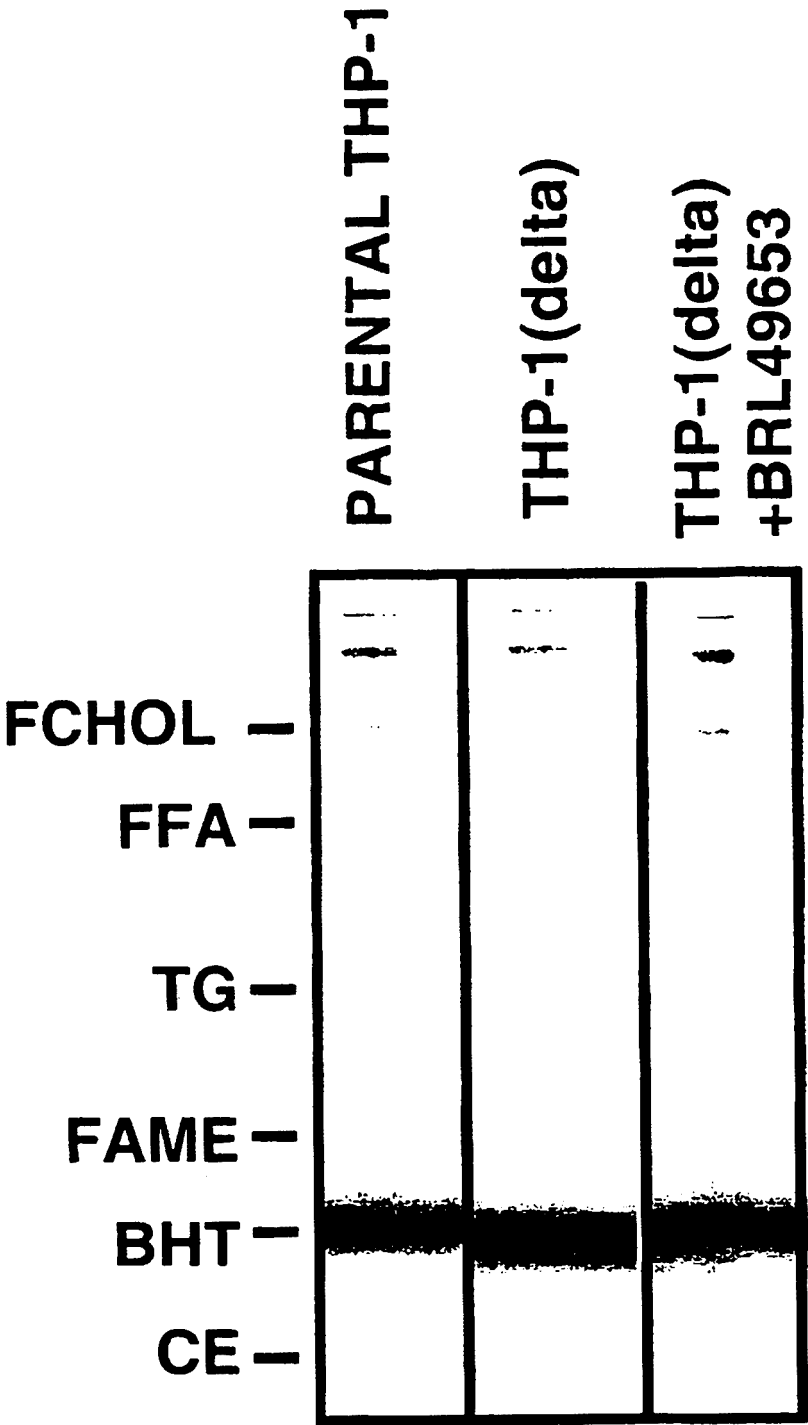


Figura 7

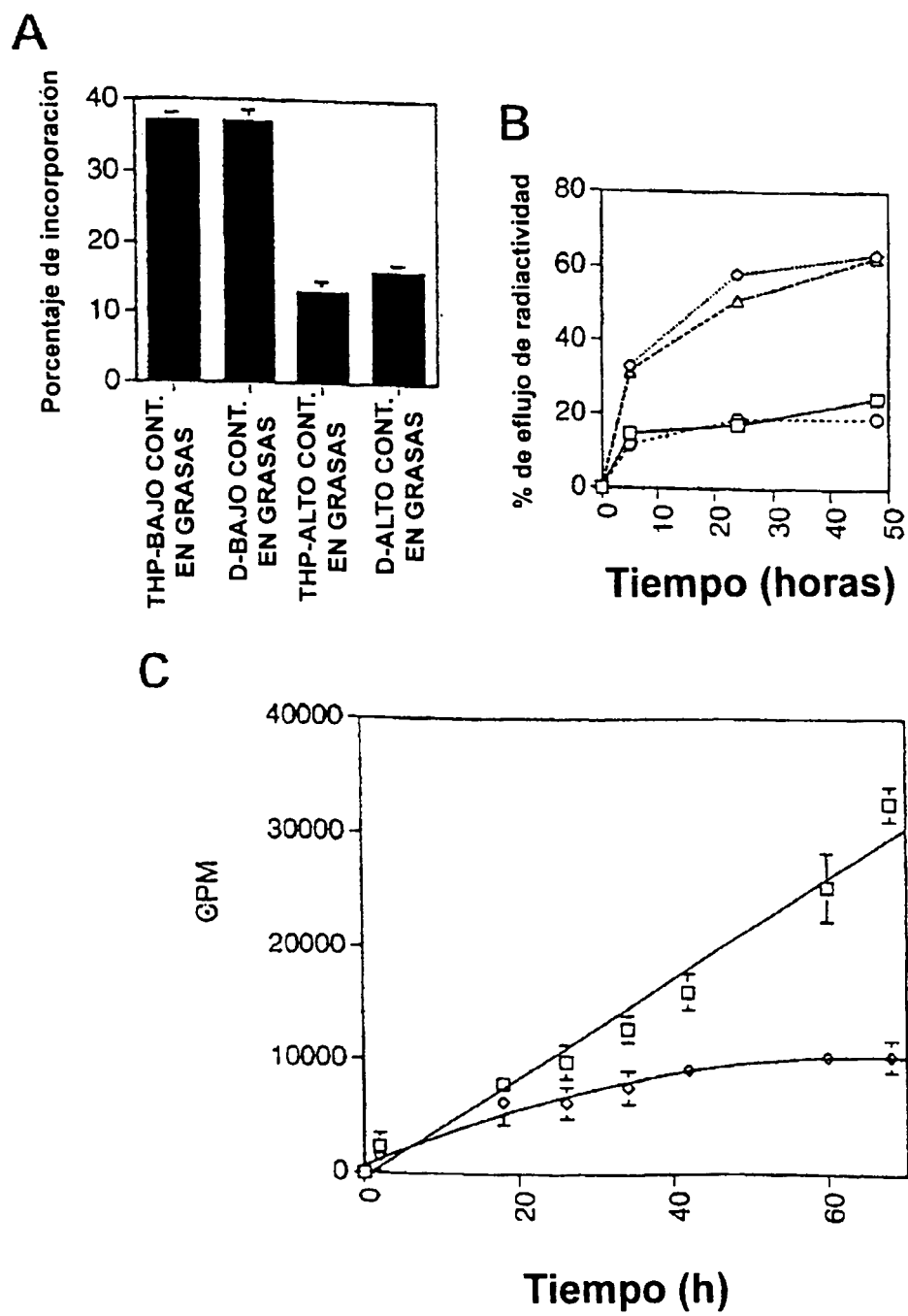


FIGURA 8

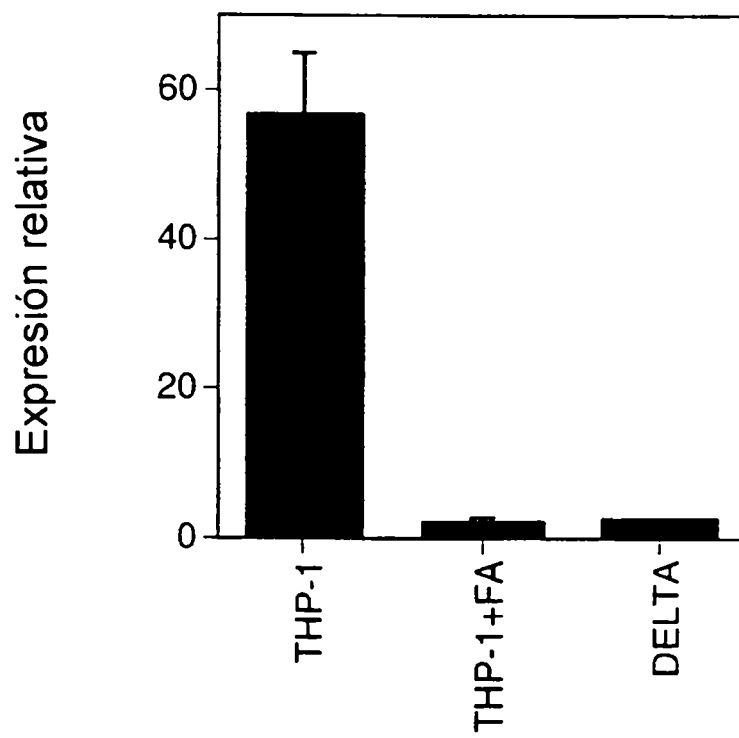
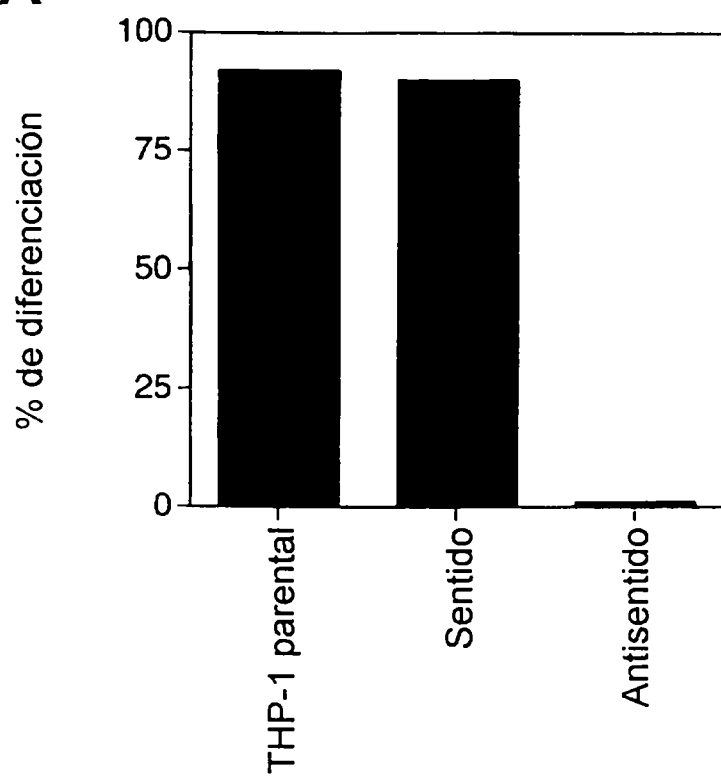


FIGURA 9

A



B

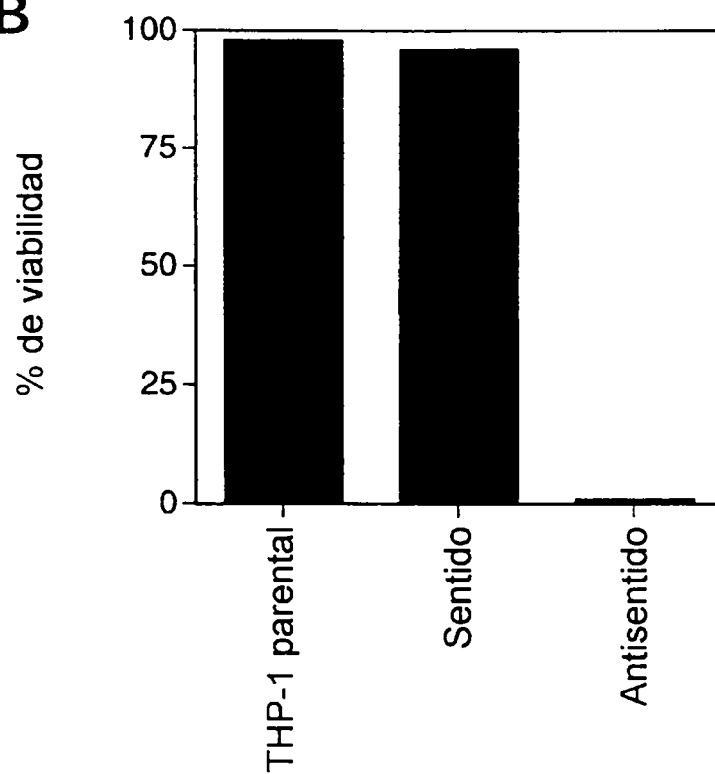
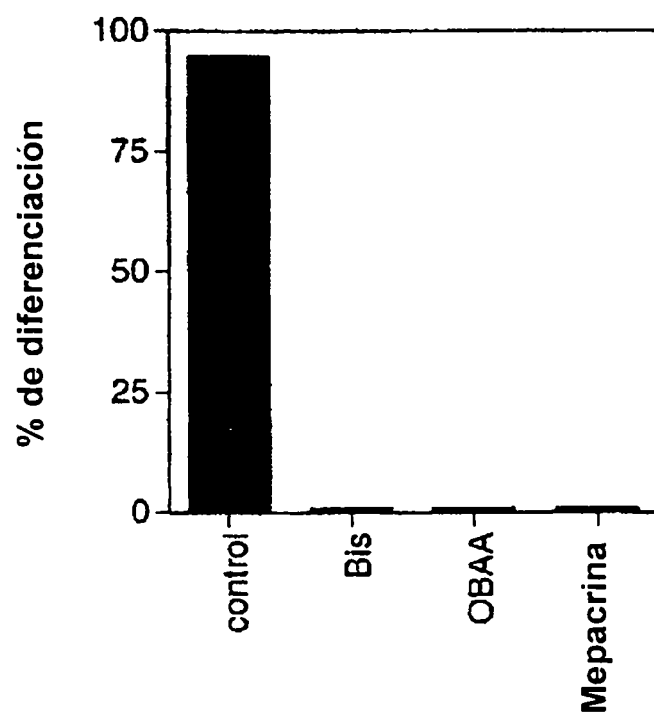


Figura 10

A



B

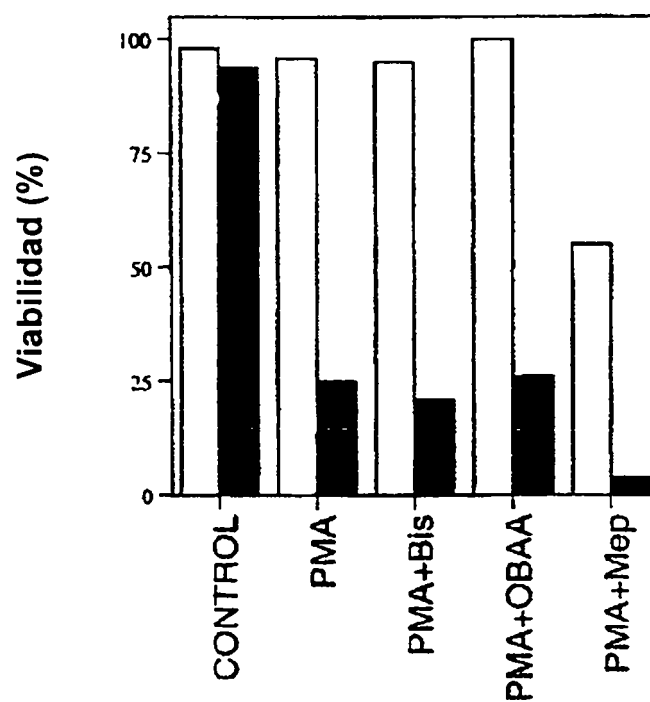


Figura 11a

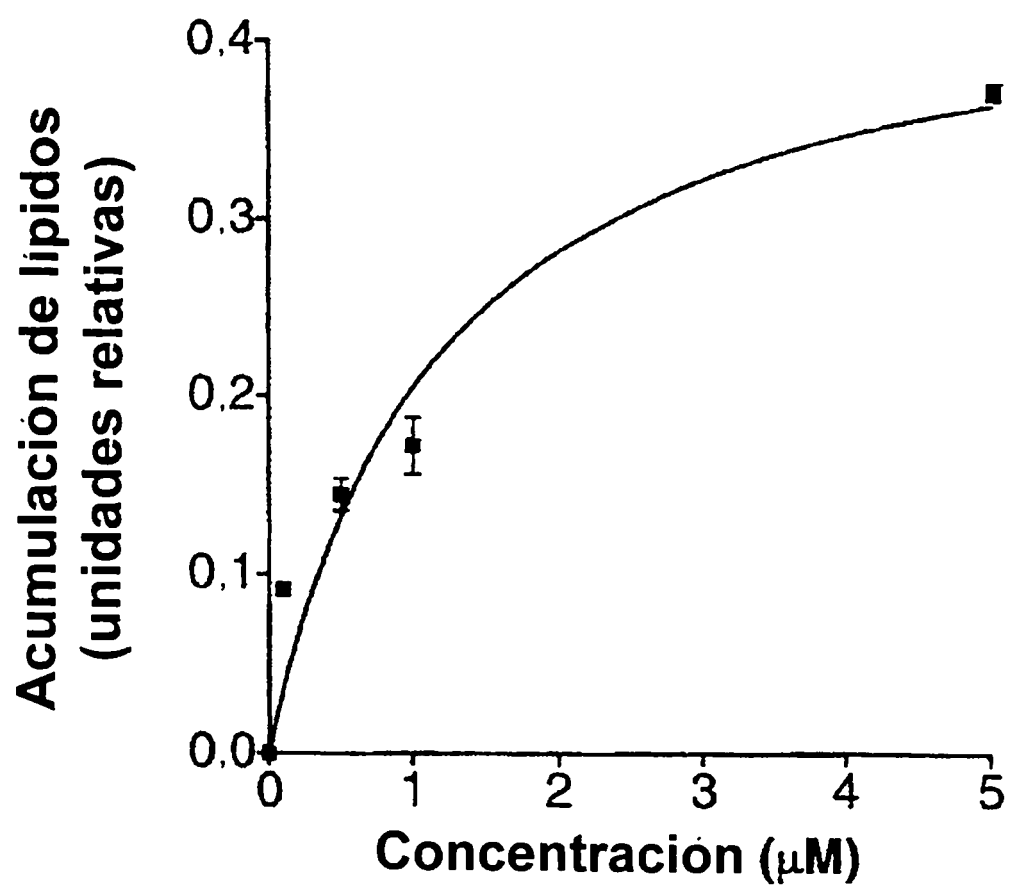


Figura 11b

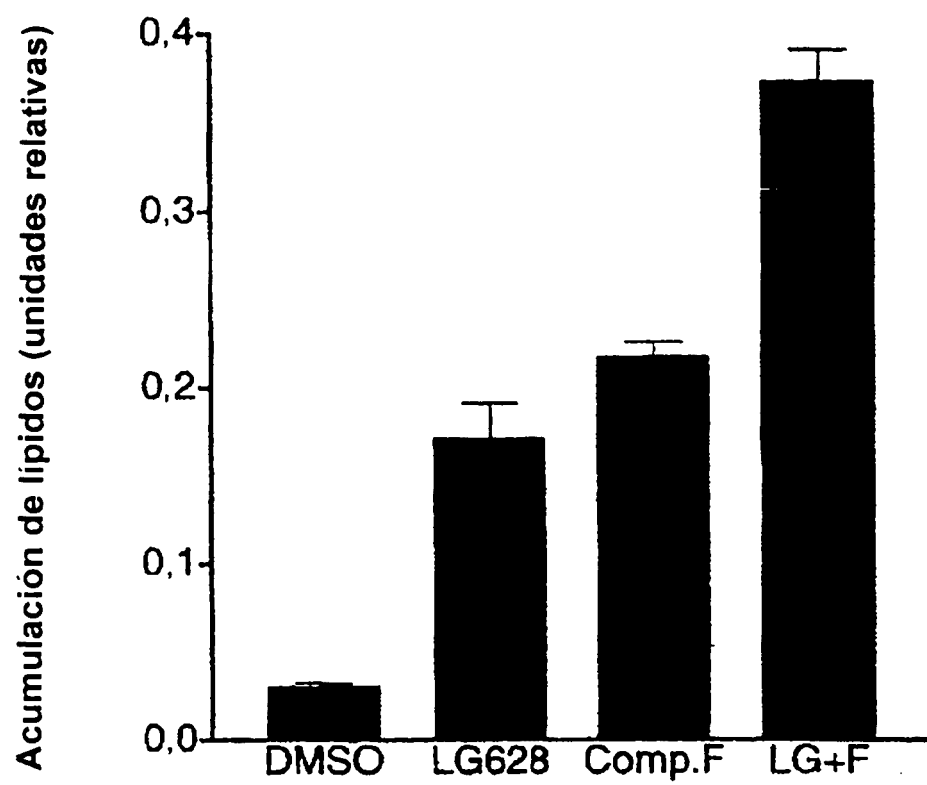


Figura 12

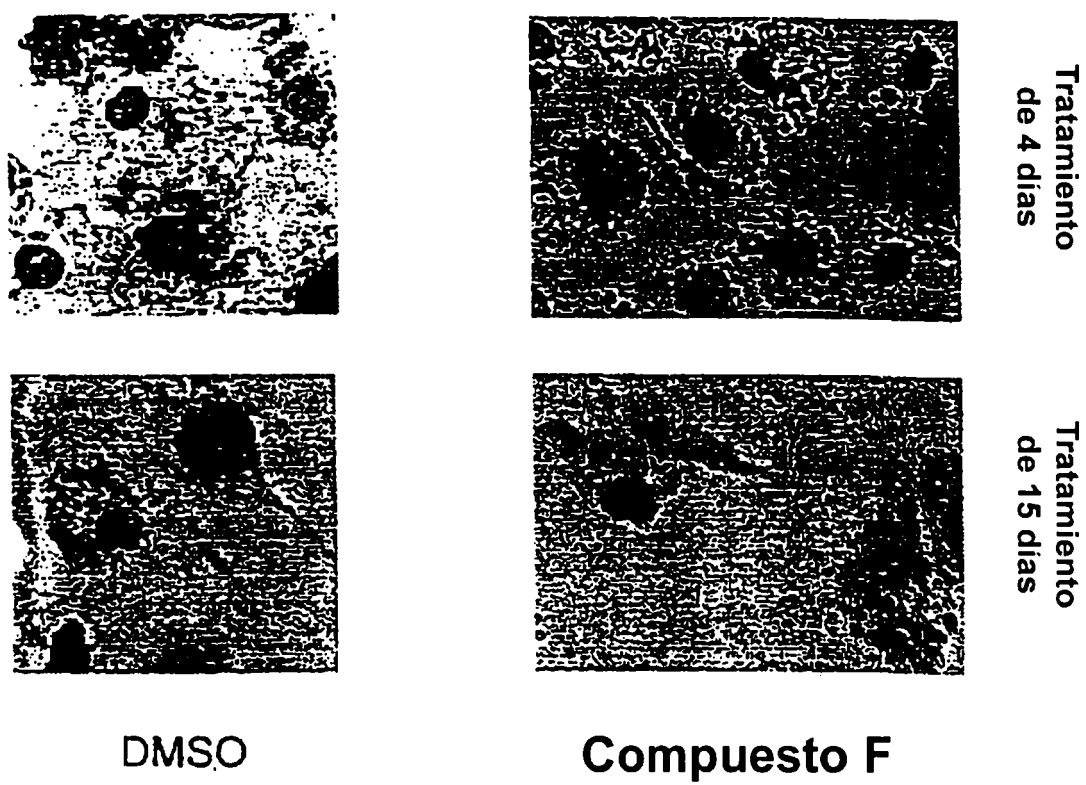


Figura 13

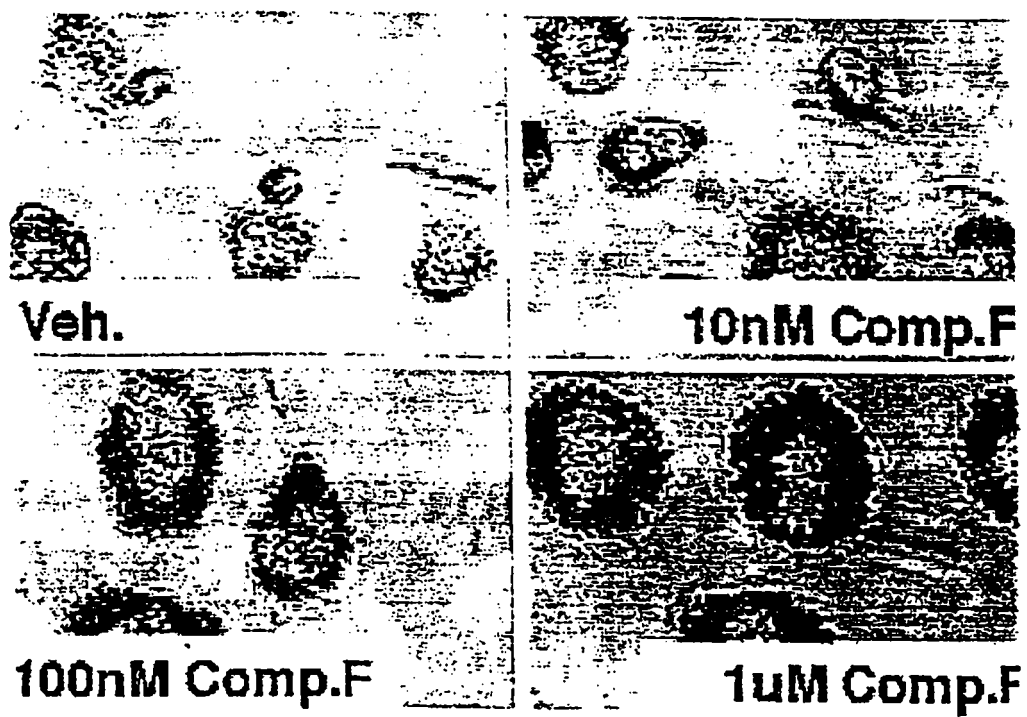
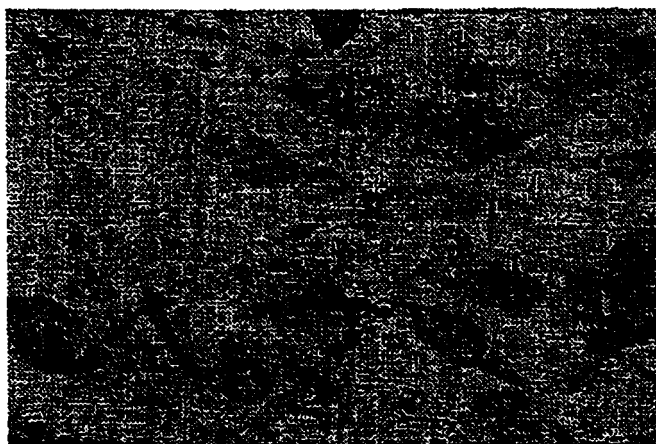


Figura 14

CONTROL



COMPUESTO F

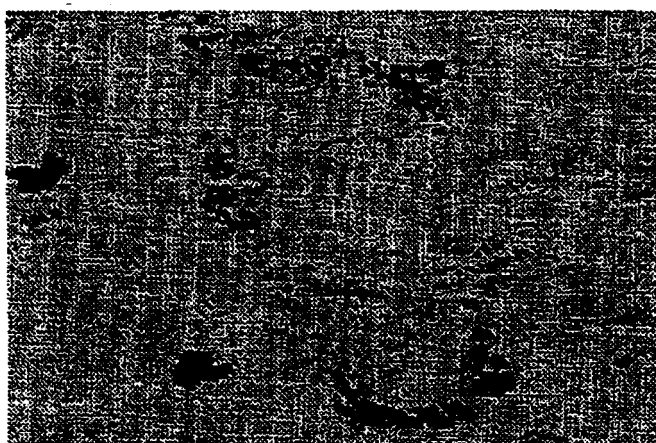
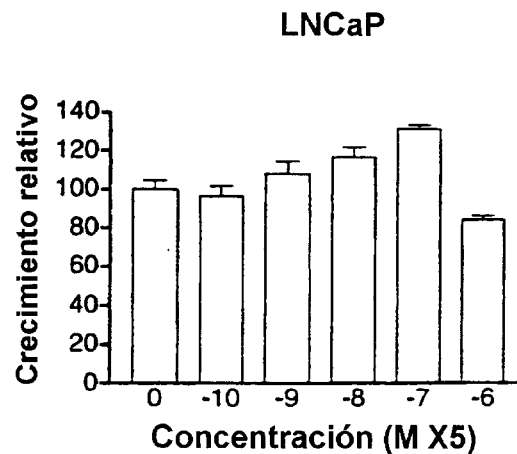
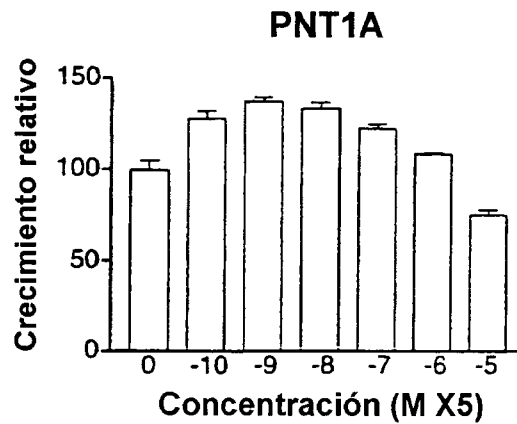


Figura 15

ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA POR EL COMPUESTO F



PPAR δ y RXR cooperan en la estimulación del crecimiento celular (LNCaP)

