


PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
 SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C12Q 1/48</p>	A1	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 00/12755</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 9 de Marzo de 2000 (09.03.00)</p>						
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES99/00275</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 23 de Agosto de 1999 (23.08.99)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">P 9801828</td> <td style="width: 40%;">28 de Agosto de 1998 (28.08.98)</td> <td style="width: 30%;">ES</td> </tr> <tr> <td>P 9901878</td> <td>15 de Agosto de 1999 (15.08.99)</td> <td>ES</td> </tr> </table> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]; Calle Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).</p> <p>(72) Inventor; e</p> <p>(75) Inventor/solicitante (sólo US): LACAL SANJUAN, Juan Carlos [ES/ES]; Insto. Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES).</p> <p>(74) Mandatario: OJEDA GARCIA, Pedro; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Serrano, 113, E-28006 Madrid (ES).</p>		P 9801828	28 de Agosto de 1998 (28.08.98)	ES	P 9901878	15 de Agosto de 1999 (15.08.99)	ES	<p>(81) Estados designados: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben modificaciones.</i></p>
P 9801828	28 de Agosto de 1998 (28.08.98)	ES						
P 9901878	15 de Agosto de 1999 (15.08.99)	ES						
<p>(54) Title: SYSTEM FOR SCREENING COMPOUNDS WITH ANTITUMORAL, ANTIVIRAL, ANTIPARASITIC AND ANTIFUNGAL ACTIVITY</p> <p>(54) Título: SISTEMA DE IDENTIFICACION ("SCREENING") DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL, ANTIVIRAL, ANTIPARASITARIA Y ANTIFUNGICA</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Phosphorylcholine (PCho) participates in the transmission of intracellular signals involved in tumoral proliferation. The inhibition of the production of phosphorylcholine (PCho) can be achieved through inhibiting the choline kinase enzyme (Chok). The present invention discloses various alternative and reliable methods for the determination of the activity of the choline kinase <i>ex vivo</i> (in an assay tube, free of cells) or the determination of intracellular levels of Pcho, analysis <i>in vitro</i> (in intact living cells) in the presence or absence of potential compounds having antitumoral activity. The inhibition of the enzyme Chok and the reduction of the levels Pcho would identify said compounds as an antitumoral substance.</p> <p>(57) Resumen</p> <p>La fosforilcolina (PCho) participa en la transmisión de señales intracelulares implicadas en la proliferación tumoral. La inhibición de la producción de fosforilcolina PCho se puede conseguir mediante la inhibición de la enzima colina quinasa (Chok). En la presente invención se proponen diversos métodos alternativos y fiables para la determinación de la actividad de la colina quinasa <i>ex vivo</i> (en tubo de ensayo, libre de células) o la determinación de los niveles intracelulares de PCho, análisis <i>in vitro</i> (en células vivas intactas) en presencia o no de potenciales compuestos con actividad antitumoral. La inhibición de la enzima Chok y la reducción de los niveles de Pcho identificaría dicho compuesto como una sustancia antitumoral.</p>								

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia		Macedonia	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	ML	Mali	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MN	Mongolia	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MW	Malawi	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	MX	México	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NE	Níger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Países Bajos	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NO	Noruega	ZW	Zimbabue
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Nueva Zelanda		
CM	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
CN	China	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Rumanía		
CZ	República Checa	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
DE	Alemania	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapur		

TÍTULO

SISTEMA DE IDENTIFICACION ("SCREENING") DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL, ANTIVIRAL, ANTIPARASITARIA Y ANTIFUNGICA.

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención está relacionada con el diseño de una nueva estrategia para la identificación de compuestos tanto naturales como de síntesis que presenten actividad selectiva como anticancerosos, antivirales, antiparasitarios o antifúngicos.

10

En forma resumida, aquí se describe la utilización de la inhibición de la biosíntesis de fosforilcolina, mediante bloqueo selectivo de la enzima colina quinasa, en células tumorales o en células afectadas por infección parasitaria, como una nueva estrategia para el descubrimiento de compuestos que puedan ser utilizados para el tratamiento de tumores y de enfermedades parasitarias o producidas por virus y hongos en animales y en humanos. El campo de invención aquí descrito constituye una nueva estrategia para la identificación de compuestos de interés en el tratamiento de tumores y enfermedades parasitarias, vírales y fúngicas en animales y en humanos.

15

ESTADO ANTERIOR DE LA TÉCNICA

20

Los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular programada (apoptosis) en los organismos eucariotes superiores, tres de los fenómenos directamente relacionados con la transformación celular, se realiza mediante la comunicación entre células a través de complejos mecanismos de transmisión de señales (Rozengurt, E. 1986. Science 234: 161-166). Estos procesos se controlan mediante factores difusibles que se transportan a través del torrente sanguíneo y son reconocidos por receptores específicos ubicados en las células efectoras. En los últimos años se ha producido un espectacular avance en el conocimiento de los sistemas enzimáticos involucrados en la cascada de señales responsables de la regulación de estas funciones celulares.

25

Una de las características fundamentales de muchos receptores para factores de crecimiento es la actividad de tirosina quinasa asociada al receptor tras la unión al ligando

30

(Hunter, T. y Cooper, J.A. 1985. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 897-930; Sibley, D.R. et al. 1987. *Cell* 48: 913-922). Mediante diferentes estrategias, se han identificado numerosos substratos intracelulares de estos receptores tales como PI-PLC, Src, Syp, Shc, GAP-ras y PI3 Kinase (Lacal, J.C. y Carnero A. 1994. *Oncology Reports* 1: 677-693). Tras la conexión de estas
5 rutas de señalización, se produce la activación específica de factores de transcripción, bien citoplasmáticos o nucleares, que controlan la expresión de los genes reguladores de la respuesta celular. Los oncogenes identificados hasta la fecha se pueden relacionar directamente con la función de alguno de los componentes estructurales de esta cascada de señales. Las células transformadas por estos oncogenes muestran alteraciones en las rutas de
10 señalización utilizadas por las células normales, manteniendo de forma permanentemente activas cascadas que en condiciones normales solo se inducen de forma transitoria tras la estimulación oncogénica.

Una de las rutas metabólicas controladas por factores de crecimiento y alterada tras la transformación oncogénica de más relevancia desde el punto de vista de la regulación de la
15 proliferación celular la constituye el metabolismo de fosfolípidos, en particular de fosfatidilinositoles (PIs) y fosfatidilcolina (PC) (Berridge, M.J., y Irvine, R.F. 1989. *Nature* 341: 197-205; Pelech, S.L. y Vance, D.E. 1989. *Trends in Biochem. Sci.* 14: 28-30.). La hidrólisis de fosfatidil-inositol bifosfato (PIP₂) mediante la acción de las PLCs, origina la formación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG). La hidrólisis de PC por una PLD
20 origina colina y ácido fosfatídico (PA), que posteriormente se convierten en fosforilcolina (PCho) y DAG respectivamente.

Entre los diversos componentes estructurales que integran la cascada de señales intracelulares, la proteína p21-ras ocupa un lugar destacado pues funciona como un interruptor molecular que regula la proliferación (Mulcahy, L.S. et al. 1985. *Nature* 313: 241-
25 243.) y la transformación celular (Smith, M.R. et al. 1986. *Nature* 320: 540-543).

Existe abundante información que establece una clara conexión entre factores de crecimiento, metabolismo de fosfolípidos y oncogenes. Así, en células transformadas por los oncogenes ras, src, sis y fms, los niveles basales de diferentes metabolitos fosfolipídicos está, de forma constitutiva, por encima de los que presentan las células normales (Wolfman, A. y
30 Macara, I.G. *Nature* 325:359-361; Wolfman, A. et al. 1987. *J. Biol. Chem.* 262:16546-16552;

Lacal, J.C. et al. 1987. *Nature*: 330: 269-272; Fleischman, L. et al. 1994. *Science* 231: 407-410; del Peso L. et al., 1997. *Biochem. J.* 322:519-528). Por otra parte, la PI3K ha sido identificada como un efector de la proteína Ras (Rodríguez-Viciana, P. et al. *Nature* 370: 527-532). Estos resultados sugieren la existencia de diferentes niveles de regulación del metabolismo de fosfolípidos en células transformadas por oncogenes; de aquí la importancia del conocimiento de los factores que intervienen en la regulación de estas rutas metabólicas en la transformación celular.

En estudios anteriores del nuestro grupo se ha observado que en células transformadas por diversos oncogenes los niveles de ciertos metabolitos lipídicos como DAG y fosforilcolina (PCho) están aumentados respecto a los niveles de células normales (Lacal, J.C et al. 1987, *Nature* 330: 269-272; Carnero A. et al., 1994. *Oncogene* 9, 1387-1395; del Peso L. et al., 1997. *Biochem. J.* 322:519-528). La producción de DAG y PCho proviene de la activación de una PC-PLD que genera ácido fosfatídico (PA) y colina, que posteriormente se convierten en DAG y PCho por acción de la PA-hidrolasa y la colina quinasa, respectivamente (Carnero, A., Cuadrado, A., del Peso, L. y Lacal, J.C. 1994. *Oncogene* 9: 1387-1395).

Estas conclusiones se basan en la observación de que en células estimuladas con suero o factores de crecimiento individualmente se produce una subida de los niveles intracelulares de fosforilcolina (PCho). A tiempos cortos, contados desde el inicio del estímulo, (menos de 5 minutos) se produce un incremento de PCho transitorio, y a tiempos largos (más de 3 horas de la estimulación) se produce un incremento mayor de aproximadamente 2-3 veces los niveles basales (Jiménez, B., del Peso, L., Montaner, S., Esteve, P. y Lacal, J.C. 1995: *J. Cell. Biochem.* 57: 141-149). En células transformadas por diferentes oncogenes, también se aprecia que los niveles de PCho están incrementados de forma constitutiva. La producción de PCho tras la estimulación mitogénica o transformación por oncogenes es debida a la actividad colina quinasa, pues se consigue su total desaparición mediante la acción de inhibidores de esta enzima (Carnero, A., Cuadrado, A., del Peso, L. y Lacal, J.C. 1994. *Oncogene* 9: 1387-1395; Jiménez, B., del Peso, L., Montaner, S., Esteve, P. y Lacal, J.C. 1995: *J. Cell. Biochem.* 57: 141-149; Cuadrado, A., Carnero, A., Dolfi, F., Jiménez, B. y Lacal J.C. 1993. *Oncogene* 8: 2959-2968; Hernández-Alcoceba R., Saniger L.,

Campos J., Núñez M.C., Khaless F., Gallo M.A., Espinosa A., and Lacal J.C. 1997. *Oncogene* 15, 2289-2301). Los inhibidores de colina quinasa no solo bloquean totalmente la producción de fosforilcolina inducida por factores de crecimiento y suero o células transformadas por oncogenes, sino que inhibe drásticamente la proliferación celular, tanto en
5 células normales como en transformadas. Esta inhibición se revierte cuando se añade fosforilcolina a las células o mediante la adición de suero, reforzándose el concepto de inhibición específica a través del enzima colina quinasa (Carnero, A., Cuadrado, A., del Peso, L. y Lacal, J.C. 1994. *Oncogene* 9: 1387-1395; Jiménez, B., del Peso, L., Montaner, S., Esteve, P. y Lacal, J.C. 1995: *J. Cell, Biochem.* 57:141-149; Cuadrado, A., Carnero, A.,
10 Dolfi, F., Jiménez, B. y Lacal J.C. 1993. *Oncogene* 8: 2959-2968).

Dada la importancia de la colina quinasa en el sistema de transducción de señales mitogénicas, también se ha estudiado el posible papel de la PCho, producto de la colina quinasa, como segundo mensajero. Nuestros resultados demuestran claramente que la PCho es necesaria para la actividad mitogénica de factores de crecimiento en células NIH 3T3
15 (Jiménez, B., del Peso, L., Montaner, S., Esteve, P. y Lacal, J.C. 1995: *J. Cell. Biochem.* 57: 141-149). En presencia de inhibidores de colina quinasa, el crecimiento celular está drásticamente inhibido en células estimuladas por factores de crecimiento como PDGF o FGF, o en células transformadas por oncogenes como ras o sis. La adición de insulina, sin embargo, revierte este efecto (Jiménez, B., del Peso, L., Montaner, S., Esteve, P. y Lacal, J.C.
20 1995: *J. Cell. Biochem.* 57: 141-149; Cuadrado, A., Carnero, A., Dolfi, F., Jiménez, B. y Lacal J.C. 1993. *Oncogene* 8: 2959-2968). Asimismo, en presencia de suero no se observa el efecto inhibitorio de estos compuestos. Por tanto, la inhibición de la capacidad mitogénica de factores de crecimiento y oncogenes por inhibidores de la colina quinasa no es debido a un proceso de toxicidad celular inespecífica, sino al bloqueo selectivo y específico de las rutas
25 intracelulares de señalización. Este efecto de inhibición de la proliferación celular se revierte por adición de PCho, remarcándose con ello la especificidad del sistema.

En resumen, todos estos resultados previos demuestran una alta especificidad de la inhibición de la proliferación celular por inhibidores de la colina quinasa. La colina quinasa es, por tanto, un paso importante en la regulación de la proliferación celular y, como
30 consecuencia, todos los compuestos que manifiesten actividad de inhibición de la colina

quinasa son excelentes candidatos para el desarrollo de agentes con actividad antitumoral. El diseño de derivados que afecten directamente a la actividad colina quinasa puede permitir desarrollar terapias antitumorales efectivas.

Es de destacar que el descubrimiento de compuestos con potencial actividad antitumoral, antiviral, antiparasitaria o antifúngica se basa en el análisis de su capacidad inhibitoria de la proliferación celular en sistemas de células en cultivo, o de complejos sistemas de análisis de inhibición de la replicación viral, de parásitos o de hongos en cultivos apropiados (XX). Se ha comprobado que estos patógenos humanos también pueden precisar de la generación de fosforilcolina para su sobrevivencia (Harnett W., Parkhouse R.M.E., 1995, Perspectives in nematode physiology and biochemistry, pp.207-242, M/S Narendra Publication House, New Delhi) y esto sugiere la posibilidad de utilizar inhibidores de la colina quinasa para combatir las enfermedades que producen. Por tanto, un sistema de análisis rápido y económico que sirva para la identificación de compuestos con capacidad de inhibir la colina quinasa es un mecanismo eficaz de identificación de moléculas con potencial de utilización como antitumorales, antivirales, antiparasitarios y antifúngicos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los ensayos que se utilizarán para el cribaje de compuestos con posible actividad antitumoral se basan en la capacidad de los mismos para inhibir la producción de fosforilcolina (PCho). El esquema de síntesis de fosfatidilcolina (PC) se puede resumir en la siguiente proceso biológico:

1	2	3
colina --->	fosforilcolina --->	CDP-colina --->
	(Pcho)	(PC)

donde 1 corresponde a la colina quinasa (EC 2.7.1.32), 2 a la citidilil-transferasa (EC 2.7.7.15), y 3 a la colino-fosfotransferasa (EC 2.7.8.2).

La idea original, en la que se basa la solicitud de la patente, implica que la PCho es utilizada por las células para una ruta de transmisión de señales, alternativa y diferente a la de síntesis de PC, esencial para la regulación del crecimiento celular. Esta hipótesis ha sido

publicada (Jiménez, B., del Peso, L., Montaner, S., Esteve, P. y Lacal, J.C. 1995: J. Cell. Biochem. 57: 141-149) por el investigador solicitante. Por último, hemos demostrado también que las células transformadas por diversos oncogenes presentan unos niveles elevados de PCho debido a la activación de la ruta dependiente de la colina quinasa. Estos trabajos han sido publicados recientemente (Cuadrado, A. et al., 1993. Oncogene 8: 2959-2968; Carnero A. et al., 1994. Oncogene 9, 1387-1395; del Peso L. et al., 1997. Biochem. J. 322:519-528). Basado en estos descubrimientos, se puede concluir que se puede inhibir drásticamente y específicamente la proliferación celular de líneas tumorales inhibiendo directamente la colina quinasa, responsable directa de la producción de PCho.

10 La inhibición de la producción de PCho se puede conseguir mediante la inhibición de la enzima colina quinasa (ChoK). Los compuestos que se pretenden identificar como potencialmente interesantes para su estudio como antitumorales son los inhibidores de la colina quinasa de origen tanto natural como de síntesis. Para medir su actividad se pueden emplear tanto sistemas ex vivo (en tubo de ensayo, libre de células) como in vitro (en células vivas intactas). Se proponen diversos métodos alternativos y fiables para la determinación de la actividad de la colina quinasa ex vivo o la determinación de los niveles intracelulares de PCho (análisis in vitro) y que forman parte de la presente invención. Por otro lado, la colina quinasa se presenta en levaduras, hongos, algas, plantas, parásitos y en distintas especies animales (mamíferos, anfibios, peces, insectos,...) por lo que se puede utilizar cada una de estas colina quinasa, específica de cada organismo, en cada uno de los ensayos que se describen en la presente invención y que forman parte de la misma. El uso de estas colina quinasa específicas de distintos organismos permitiría identificar compuestos más específicos de cada uno de estos organismos, lo que redundará en una mayor eficacia de los mismos.

25 Dentro del campo de la invención mencionada, se describen dos ensayos para el análisis de un gran número de compuestos químicos tanto de origen natural como de estructuras sintéticas para los que se reivindican tanto la utilización de la estrategia como su diseño, y la identificación de aquellos compuestos con potencial utilización posterior en el ámbito de la terapéutica química. En los siguientes ejemplos, aunque sin limitar las posibilidades, se describen las características generales de ambos ensayos aunque pueden

30

existir variaciones de algunas de las partes de los mismos que permitirían mejoras cualitativas de los resultados obtenidos por ellos, y que forman parte de la presente invención. Entre estas variaciones se pueden incluir: 1) el uso de colina quinasa contenida en un extracto de células que produce esta proteína, 2) el uso de la HPLC de intercambio iónico como método alternativo de detección de los niveles de Pcho, 3) el uso de colina marcada radiactivamente o por métodos fluorimétricos en el análisis de la determinación de la actividad colina quinasa, 4) el uso de colina quinasa purificada parcial o totalmente, 5) los ensayos se realizan en fase líquida ó en fase sólida-líquida.

10 EJEMPLOS

Ejemplo 1.- Ensayo ex vivo de inhibidores de la colina quinasa.

En este ensayo se puede utilizar colina quinasa de levaduras, comercialmente disponible o de células de mamíferos, incluyendo humanos. El procedimiento experimental es como se describe a continuación:

- Se prepara el tampón de reacción 10X (1M Tris pH 8,0, 100 mM MgCl₂ y 2 mM (14C)-metil-Colina (20 µCi/ml), ATP 100 mM),
- Se prepara una solución de colina quinasa de levadura (50 mU/ml) a partir de una preparación comercial de 1U/ml,
- 20 - Se preparan las distintas concentraciones de los compuestos a analizar, con una concentración de 5X en agua,
- Se mezclan 20 ml (mililitros) de buffer + 10 µl del compuesto (o agua en los controles) + 10 µl agua + 10 µl colina quinasa,
- Se incuba durante 45 min. a 37°C,
- 25 - Se detiene la reacción añadiendo 10 µl EDTA 500 mM y se mantienen las muestras en hielo,
- Se resuelven alícuotas equivalentes (30 µl de cada muestra) por cromatografía en capa fina utilizando placas de gel de sílice como soporte y como fase móvil el tampón siguiente: 0,9% cloruro sódico:metanol:hidróxido amónico (50:70:1; 30 v:v:v). Se resuelven en paralelo estándares sintéticos de colina y fosforilcolina

radiactivos como indicadores,

- Se identifican las manchas radiactivas correspondientes a colina y PCho y se cuantifican mediante la técnica de centelleo líquido (se raspan las manchas correspondientes tras exposición de un film sensible a radiactividad) o mediante un sistema electrónico automático convencional,
- El efecto de cada compuesto analizado sobre la producción de PCho se determina mediante la normalización de los valores de radiactividad de este metabolito frente a los niveles de radiactividad totales (colina + PCho) en cada muestra.

10 **Ejemplo 2.- Ensayo in vitro de inhibidores de la colina quinasa.**

En este ensayo se pueden utilizar tanto células de ratón como células humanas disponibles como cultivos inmortalizados:

- Se siembran células de ratón ó humanas en placas de plástico de 6 pocillos en el medio adecuado (DMEM o equivalente suplementado con 10% suero fetal o de ternera recién nacida). Se añaden 200.000 células por pocillo. Se hacen crecer hasta que alcanzan confluencia en un incubador con 5% de CO₂, 95% aire y 90% humedad, a 37°C,
- Normalmente a las 48 horas se alcanza la confluencia. En este punto se lavan las placas con tampón TD (50 mM fosfato sódico, 150 mM cloruro sódico, 5 mM cloruro potásico, pH 7,4) y se añaden 2 ml/pocillo de medio DMEM suplementado con 0.5% de suero de ternera. Se añade a cada pocillo una cantidad creciente de los compuestos a analizar, disueltas en el mismo medio, de forma que se consiga una curva creciente que abarque un rango de al menos 1000 veces la concentración menor empleada, que estará en torno a 0,1 micromolar (μ M). Se incuba durante una hora en condiciones estándar,
- Se añaden 0,5 μ Ci/pocillo de (¹⁴C)metil-colina como precursor radiactivo. Se incuban en condiciones estándar de CO₂ y humedad durante 12-14 horas,
- Se lavan las células con tampón TD y se procesan para la determinación del contenido celular en PCho. Se añade 1 ml/pocillo de una solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 16%. Se deja 1 hora en cámara fría (4°C). Este

procesamiento fija las células en los pocillos y extrae el material soluble en el TCA, conteniendo los metabolitos colina y Pcho,

- Se recogen los sobrenadantes en tubos de 15 ml resistentes a disolventes orgánicos. Se lavan los pocillos con 1 ml de TCA al 16% y se mezclan con las muestras anteriores,

- Las células fijadas por el TCA en los pocillos se disuelven en 0,5 ml de hidróxido sódico 0,5 N y se determina la radiactividad incorporada en el material insoluble en TCA (fundamentalmente fosfatidilcolina) por métodos estándares mediante contaje centelleo líquido en un contador de emisiones β ,

- Los extractos de TCA se lavan con cuatro volúmenes de éter saturado en agua. Al mezclar las muestras con el éter, se forman dos fases. Se agitan enérgicamente y se aspira la fase superior, que se deshecha. Se repite el proceso tres veces más,

- Las muestras se neutralizan con 50 μ l de tampón Tris Base (pH 10) y se agitan enérgicamente para uniformizar la solución,

- Se transfieren las muestras a tubos eppendorf o similares de 1.5 ml y se secan mediante liofilización en un sistema de centrifugación al vacío,

- Se resuspenden las muestras en 0,1 ml de agua destilada y se resuelven alícuotas equivalentes por cromatografía en capa fina utilizando placas de gel de sílice como soporte y como fase móvil 0,9% cloruro sódico:metanol:hidróxido amónico (50:70:1). Al mismo tiempo, se resuelven en paralelo estándares sintéticos de colina y fosfocolina radiactivos como indicadores,

- Se identifican las manchas radiactivas correspondientes a colina y PCho y se cuantifican mediante centelleo líquido (se raspan las manchas correspondientes tras exposición de un film sensible a radiactividad) o sistemas electrónicos automáticos convencionales (directamente),

- El efecto de cada compuesto analizado sobre la producción de PCho se determina mediante la normalización de los valores de radiactividad incorporados en el metabolito (colina o PCho) frente a los niveles de radiactividad incorporados en el material insoluble.

REIVINDICACIONES

- 1.- Método de identificación de nuevos compuestos antitumorales, antivirales, antiparasitarios y antifúngicos, caracterizado por la utilización de la actividad inhibitoria sobre la proteína colina quinasa como criterio identificativo.
- 5
- 2.- Método según la reivindicación 1 caracterizado porque la colina quinasa es de origen diverso, seleccionada entre el grupo siguiente: levadura, hongos, plantas, células de mamíferos, algas, insectos, anfibios y peces.
- 3.- Método según la reivindicación 2 caracterizado por ser un sistema de análisis ex vivo de la capacidad inhibitoria de dichos compuestos sobre la proteína colina quinasa y por estar
- 10
- constituido por las siguientes etapas:
- Se prepara el tampón de reacción 10X (1M Tris pH 8,0, 100 mM MgCl₂ y 2 mM (14C)-metil-Colina (20 µCi/ml), ATP 100 mM),
 - Se prepara una solución de colina quinasa de levadura (50 mU/ml) a partir de una

15

 - preparación comercial de 1U/ml,
 - Se preparan las distintas concentraciones de los compuestos a analizar, con una concentración de 5X en agua,
 - Se mezclan 20 ml (mililitros) de buffer + 10 µl del compuesto (o agua en los controles) + 10 µl agua + 10 µl colina quinasa,

20

 - Se incuba 45 min. a 37°C,
 - Se detiene la reacción añadiendo 10 µl EDTA 500 mM y se mantienen las muestras en hielo,
 - Se resuelven alícuotas equivalentes (30 µl de cada muestra) por cromatografía en capa fina utilizando placas de gel de sílice como soporte y como fase móvil el

25

 - tampón siguiente: 0,9% cloruro sódico:metanol:hidróxido amónico (50:70:1; v:v:v). Se resuelven en paralelo estándares sintéticos de colina y fosforilcolina radiactivos como indicadores,
 - Se identifican las manchas radiactivas correspondientes a colina y PCho y se cuantifican mediante la técnica de centelleo líquido (se raspan las manchas

30

 - correspondientes tras exposición de un film sensible a radiactividad) o mediante

un sistema electrónico automático convencional,

- El efecto de cada compuesto analizado sobre la producción de PCho se determina mediante la normalización de los valores de radiactividad de este metabolito frente a los niveles de radiactividad totales (colina + PCho) en cada muestra.

5 4.- Método según la reivindicación 2 caracterizado por ser un sistema de análisis in vitro de la capacidad inhibitoria de dichos compuestos sobre la enzima colina quinasa y por estar constituido por las siguientes etapas:

- Se siembran células de ratón ó humanas en placas de plástico de 6 pocillos en el medio adecuado (DMEM o equivalente suplementado con 10% suero fetal o de ternera recién nacida). Se añaden 200.000 células por pocillo. Se hacen crecer hasta que alcanzan confluencia en un incubador con 5% de CO₂, 95% aire y 90% humedad, a 37°C,
10
- Normalmente a las 48 horas se alcanza la confluencia. En este punto se lavan las placas con tampón TD (50 mM fosfato sódico, 150 mM cloruro sódico, 5 mM cloruro potásico, pH 7,4) y se añaden 2 ml/pocillo de medio DMEM suplementado con 0.5% de suero de ternera. Se añade a cada pocillo una cantidad creciente de los compuestos a analizar, disueltas en el mismo medio, de forma que se consiga una curva creciente que abarque un rango de al menos 1000 veces la concentración menor empleada, que estará en torno a 0,1 micromolar (μ M). Se incuba durante una hora en condiciones estándar,
15
- Se añaden 0,5 μ Ci/pocillo de (¹⁴C)metil-colina como precursor radiactivo. Se incuban en condiciones estándar de CO₂ y humedad durante 12-14 horas,
20
- Se lavan las células con tampón TD y se procesan para la determinación del contenido celular en PCho. Se añade 1 ml/pocillo de una solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 16%. Se deja 1 hora en cámara fría (4°C). Este procesamiento fija las células en los pocillos y extrae el material soluble en el TCA, conteniendo los metabolitos colina y Pcho,
25
- Se recogen los sobrenadantes en tubos de 15 ml resistentes a disolventes orgánicos. Se lavan los pocillos con 1 ml de TCA al 16% y se mezclan con las muestras anteriores,
30

- Las células fijadas por el TCA en los pocillos se disuelven en 0,5 ml de hidróxido sódico 0,5 N y se determina la radiactividad incorporada en el material insoluble en TCA (fundamentalmente fosfatidilcolina) por métodos estándares mediante contaje centelleo líquido en un contador de emisiones β ,
 - 5 - Los extractos de TCA se lavan con cuatro volúmenes de éter saturado en agua. Al mezclar las muestras con el éter, se forman dos fases. Se agitan enérgicamente y se aspira la fase superior, que se deshecha. Se repite el proceso tres veces más,
 - Las muestras se neutralizan con 50 μ l de tampón Tris Base (pH 10) y se agitan enérgicamente para uniformizar la solución,
 - 10 - Se transfieren las muestras a tubos eppendorf o similares de 1.5 ml y se secan mediante liofilización en un sistema de centrifugación al vacío,
 - Se resuspenden las muestras en 0,1 ml de agua destilada y se resuelven alícuotas equivalentes por cromatografía en capa fina utilizando placas de gel de sílice como soporte y como fase móvil 0,9% cloruro sódico:metanol:hidróxido amónico (50:70:1). Al mismo tiempo, se resuelven en paralelo estándares sintéticos de colina y fosfocolina radiactivos como indicadores,
 - 15 - Se identifican las manchas radiactivas correspondientes a colina y PCho y se cuantifican mediante centelleo líquido (se raspan las manchas correspondientes tras exposición de un film sensible a radiactividad) o sistemas electrónicos automáticos convencionales (directamente),
 - 20 - El efecto de cada compuesto analizado sobre la producción de PCho se determina mediante la normalización de los valores de radiactividad incorporados en el metabolito (colina o PCho) frente a los niveles de radiactividad incorporados en el material insoluble.
- 25 5.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 caracterizado porque la colino quinasa está contenida en un extracto de células que produce la proteína colina quinasa.
- 6.- Método según la reivindicación 5 caracterizado porque la producción de la proteína colina quinasa es natural o inducida por ingeniería genética.

7.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 caracterizado porque el método de detección de los niveles de Pcho se realiza por HPLC de intercambio iónico.

8.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 caracterizado porque la determinación de la actividad colino quinasa se analiza mediante colina marcada

5 radiactivamente o por métodos fluorimétricos.

9.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 caracterizado porque la colino quinasa utilizada ha sido al menos purificada parcialmente o totalmente.

10.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 caracterizado porque se realiza en fase líquida para formar un producto de la reacción que se separa de la mezcla de

10 reacción tras completar ésta.

11.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 caracterizado porque se realiza con la colina quinasa inmovilizada antes de la reacción de manera que la reacción se realiza en una fase sólida-líquida.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 99/00275

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6 : C12Q 1/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 : C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
CIBEPAT, EPODOC, WPI, CA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/05644 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 12 February 1998 (12.02.98), pages 2-10	1-6, 8-10
X	HERNÁNDEZ-ALCOCEBA, R. et al. : « Choline Kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design », 1997, Oncogene, 15, pp. :2289-2301, see the whole document, in particular see pages 2289, abstract and 2299, « Ex vivo assays of choline kinase activity » and « Analysis of Pcho production in cells -in vitro assay- »	1-6, 8-10
P, X	HERNÁNDEZ-ALCOCEBA, R et al. : »In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors : a novel target for anticancer drug discovery », 1 July 1999 (01.07.99), Cancer Res., 59, pp. : 3112-3118, see the whole document	1,2,4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
“E” earlier document but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 21 December 1999 (21.12.99)	Date of mailing of the international search report 28 December 1999 (28.12.99)	
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O.	Authorized officer Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/ES 99/00275

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 98/05644 A1	12.02.1998	ES 2117950 AB	16.08.1998

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 99/00275

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD CIP ⁶ C12Q 1/48 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación) CIP ⁶ C12Q Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) CIBEPAT, EPODOC, WPI,CA		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 98/05644 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 12.02.1998, páginas 2-10	1-6, 8-10
X	HERNÁNDEZ-ALCOCEBA, R. et al.: "Choline Kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design", 1997, Oncogene, 15, pp.: 2289-2301, todo el documento, en particular ver páginas 2289, resumen y 2299, "Ex vivo assays of choline kinase activity" y "Analysis of PCho production in cells -in vitro assay-"	1-6, 8-10
P,X	HERNÁNDEZ-ALCOCEBA, R. et al.: "In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anticancer drug discovery", 1 de julio de 1999, Cancer Res., 59, pp.: 3112-3118, todo el documento	1,2,4
<input type="checkbox"/> En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo		
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada. "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 21 Diciembre 1999 (21.12.1999)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 28 DIC 1999 28. 12. 99	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. n° de fax +34 91 3495304	Funcionario autorizado Alfonso Maquedano n° de teléfono + 34 91 3495474	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 99/00275

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 98/05644 A1	12.02.1998	ES 2117950 AB	16.08.1998