

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 148 092**

②① Número de solicitud: 009801828

⑤① Int. Cl.⁷: C12Q 1/48

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **28.08.1998**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2000**

Fecha de concesión: **19.03.2001**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.04.2001**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.04.2001

⑦③ Titular/es: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑦② Inventor/es: **Lacal Sanjuan, Juan Carlos**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Sistema de identificación ("Screening") de compuestos con actividad antitumoral, antiviral, antiparasitaria y antifúngica.**

⑤⑦ Resumen:

Sistema de identificación ("Screening") de compuestos con actividad antitumoral, antiviral, antiparasitaria y antifúngica.

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 ex vivo (en tubo de ensayo, libre de células) o la determinación de los niveles intracelulares de PCho, análisis in vitro (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.

ES 2 148 092 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Sistema de identificación ("Screening") de compuestos con actividad antitumoral, antiviral, antiparasitaria y antifúngica.

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.

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.

Estado anterior de la técnica

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.

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 (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 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 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 proliferación celular la constituye el metabolismo de fosfolípidos, en particular de fosfatidil-inositoles (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 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: 241-243.) 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 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-Viciano, 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 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., 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 (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. 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 intracelulares de señalización. Este efecto de inhibición de la proliferación celular se revierte por adición de PCho, remarcándose con ello la especificidad del sistema.

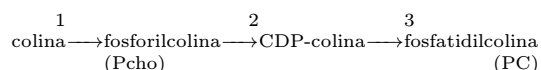
En resumen, todos estos resultados previos demuestran una alta especificidad de la inhibición

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 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 invención

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:



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 inhi-

biendo directamente la colina quinasa, responsable directa de la producción de PCho.

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*).

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.

Exposición detallada de la metodología de la invención

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 (1 M Tris pH 8,0, 100 mM MgCl₂ y 2mM (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.
- Se preparan las distintas concentraciones de los compuestos a analizar, con una concentración de 5X en agua.
- Se mezclan 20 ml del buffer de reacción + 10 μl del compuesto (o agua en los controles) + 10 μl agua + 10 μl colina quinasa.
- 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 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 correspondientes

tras exposición de un film sensible a radiactividad) o mediante un sistema electrónico automático convencional.

- 5 - 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.

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:

- 20 - Se siembran células de ratón 6 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.
- 25 - 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 (μM). Se incuba durante una hora en condiciones estándar.
- 30 - Se añaden 0,5 μCi/pocillo de (¹⁴C)metilcolina como precursor radiactivo. Se incuban en condiciones estándar de CO₂ y humedad durante 12-14 horas.
- 35 - 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.
- 40 - 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.
- 45 - 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
- 50 - contaje centelleo líquido en un contador de emisiones β.
- 55
- 60
- 65

- 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: me-

tanol: 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 $\overline{\text{P}}\text{Cho}$ 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 $\overline{\text{P}}\text{Cho}$ se determina mediante la normalización de los valores de radiactividad incorporados en el metabolito (colina o $\overline{\text{P}}\text{Cho}$) frente a los niveles de radiactividad incorporados en el material insoluble.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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.

2. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la colina quinasa es de origen diverso, seleccionada entre el grupo siguiente: levaduras, comercialmente disponibles, o células de mamíferos.

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 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 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,
- 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 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 correspondientes tras exposición de un film sensible a radiactividad) o mediante un sistema electrónico automático convencional,
- El efecto de cada compuesto analizado sobre (a 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.

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,
- Normalmente a las 48 horas se alcanza la confluencia. En este punto se lavan las placas con tampón TD (50 mM fósforo, 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 (µM). Se incuba durante una hora en condiciones estándar,
- Se añaden 0,5 µCi/pocillo de (14C) metilcolina 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 desecha. Se repite el proceso tres veces más,
- Las muestras se neutralizan con 50 µl 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.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

① ES 2 148 092

② N.º solicitud: 009801828

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.08.1998

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/48

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9805644 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 12.02.1998, páginas 2-10.	1-4
X	HERNANDEZ-ALCOCEBA, R. et al.: "Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design", 1997, Oncogene, 15, páginas 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-".	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

28.08.2000

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1