



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 544**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05003596 .3**

96 Fecha de presentación : **18.02.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1704859**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2006**

54 Título: **Control de la expresión génica dependiente de receptores de andrógenos inhibiendo la actividad de amina oxidasa de la demetilasa lisina-específica (LSD1).**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.01.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.01.2011

73 Titular/es: **Universitätsklinikum Freiburg
Hugstetter Strasse 49
79106 Freiburg, DE**

72 Inventor/es: **Schule, Roland y
Metzger, Eric**

74 Agente: **Mir Playa, Mireia**

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

Control de la expresión génica dependiente de receptores de andrógenos inhibiendo la actividad de amina oxidasa de la demetilasa lisina-específica (LSD1).

La presente invención se refiere al uso de al menos un inhibidor de las amina oxidasas seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de pargilina, clorgilina y deprenil para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de próstata, donde el inhibidor de las amina oxidasas que es al menos uno inhibe a la LSD1 en complejo con AR y por consiguiente redundando en una disminución de la expresión génica AR-dependiente. La invención también se refiere a métodos de ensayo que permiten poner a prueba a los moduladores de la LSD1 con respecto a su capacidad para modular la función de LSD1, y preferiblemente para inhibirla.

El receptor de andrógenos (AR) es un miembro de la familia de receptores de hormonas esteroideas de factores de transcripción que regulan diversas funciones biológicas entre las cuales se incluyen el crecimiento y la diferenciación celular, el desarrollo, la homeostasis y varias funciones orgánicas en un mamífero, y en particular en un humano. Uniendo ligandos adecuados tales como andrógenos al dominio de unión de ligandos, son activadas funciones del AR que son esenciales para la diferenciación, el desarrollo y el mantenimiento de los órganos reproductores masculinos o femeninos y de órganos no reproductores, (tales como por ejemplo la próstata o las mamas).

La regulación transcripcional por medio de receptores nucleares tales como el receptor de andrógenos (AR) implica una interacción con múltiples factores que actúan de manera tanto secuencial como combinatoria para reorganizar la cromatina¹. Ocupa un lugar central en esta reorganización dinámica la modificación de las histonas nucleares. Las colas N-terminales de las histonas son sometidas a varias modificaciones covalentes tales como acetilación, fosforilación, ubiquitinación y metilación por específicas enzimas² modificadoras de la cromatina. La metilación de la histona en residuos de lisina específicos está vinculada tanto con la activación² como con la represión transcripcional. Al buscarse nuevas proteínas que interactúan con el AR, se comprobó que la demetilasa 1 lisina-específica (LSD1)³ es un ejemplo de las enzimas modificadoras de la cromatina.

La LSD1 contiene un dominio de SWIRM (dominio de SWIRM = dominio de las proteínas SWI3, RSC8 y MOI-RA) situado centralmente que funciona como un putativo motivo de interacción de proteína-proteína, y también contiene un dominio de amina oxidasa (AO) C-terminal que alberga la actividad de demetilasa³ (Fig. 1b). La LSD1 y el AR endógenos se asocian *in vivo* en tejidos sensibles a los andrógenos, tales como el testículo (Fig. 1a). Para mapear el dominio de interacción entre la LSD1 y el AR *in vitro*, fueron llevados a cabo análisis pull-down con LSD1 etiquetada y mutantes de la misma junto con proteínas de fusión de GST-AR. Como se muestra en la figura 1b, la LSD1 de longitud completa, así como el dominio de SWIRM (175-246 de LSD1) y el dominio de AO (247-852 de LSD1) se asocian con el terminal N (NTD), el dominio de unión de DNA (DBD), o el dominio de unión de ligandos (LBD) del AR. En contraste con ello, ni el terminal N de la LSD1 (1-174 de LSD1) ni el control de GST interactúan con el AR.

El documento WO-A 02/19.964 dio a conocer el uso del inhibidor de la MAO-B (MAO-B = monoaminoxidasa B) desmetil-selegilina para el tratamiento de enfermedades neoplásicas o estados que incluyen a una serie de tumores, incluyendo los tumores de próstata.

El documento "Y. Shi *et al.*, Histone Demethylation mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1, Cell 119 (2004), 941-953" se refiere a la evidencia de que la LSD1, que es un homólogo nuclear de amina oxidasas, funciona como una histona demetilasa y un correpresor transcripcional desmetilando LSD1-específicamente la histona H3 lisina 4, que está vinculada a la transcripción activa.

Las mismas revelaciones pueden encontrarse en los documentos "S. Kubicek *et al.*, A crack in Histone Lysine Methylation, Cell 119 (2004), 903 a 906" y "J. Couzin, Long-Sought Enzyme Found - Revealing New Gene Switch on Histones, Science 306 (2004), 2171".

Se ha descubierto ahora sorprendentemente que la enzima desmetilante LSD1 es expresada ubicuamente en tejidos fetales y adultos humanos y murinos (Figura 2a y datos no ilustrados). Además se detectó también que la LSD1 se encuentra en las mismas células (y en las mismas áreas subcelulares) donde está situado el AR (Figuras 2c, d). En el curso de la investigación que ha redundado en la presente invención, los anteriores (y adicionales) hallazgos llevaron a la conclusión de que la enzima desmetilante LSD1 puede ejercer una influencia controladora en la expresión génica andrógeno-dependiente.

El documento "Kubicek S. and Jenuwein T., A crack in histone lysine methylation, Cell 119 (2004), 903-6" comenta los hallazgos de Shi *et al.* a los que se ha aludido anteriormente y aporta adicional información de fondo.

El documento "Couzin J., Molecular biolog. Long-sought enzyme found, revealing new gene switch on histones, Science 306 (2004), 2171" resume los descubrimientos sobre enzimas que actúan como demetilasas en las histonas.

El documento "Chen D. *et al.*, Regulation of transcription by a protein methyltransferase, Science 284 (1999), 2174-7" da a conocer la CARM1 (CARM1 = arginina metiltransferasa 1 asociada a coactivador) y su función como coactivador secundario.

El documento “Heinlein C. and Chang C., Androgen receptor (AR) coregulators: an overview, *Endocr. Rev* 23 (2002), 175-200” da información sobre la regulación del receptor de andrógenos.

En la siguiente descripción se explica más ampliamente la invención haciendo referencia a las Figuras.

En las Figuras:

La Figura 1 muestra lo siguiente: (a) la LSD1 interactúa con AR y LSD1 *in vivo* e *in vitro*. (b) el AR coimmunoprecipita con LSD1. Extractos de testículo de ratón fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo α -LSD1 o IgG de conejo de control. El diez por ciento del extracto usado para la inmunoprecipitación fue cargado como entrada. Los Western-blots fueron decorados con anticuerpos α -AR y α -LSD1. a, Fueron llevados a cabo ensayos pull-down de GST con mutantes de LSD1 etiquetados y las correspondientes proteínas de fusión de GST-AR expresadas bacteriamente (KCl 150 mM/NP40 al 0,15%). Se usaron como control proteínas GST. (NTD; dominio N-terminal, DBD; dominio de unión de DNA, LBD; dominio de unión de ligandos).

La Figura 2 muestra análisis de expresión de LSD1. La expresión de mRNA de LSD1 en tejidos humanos fue examinada mediante análisis Northern blot en un Conjunto de Expresión Tisular Múltiple Humana (a) y un Northern blot de testículo humano (b). (c): Coloración inmunohistoquímica de LSD1 y AR en próstata normal y tumoral humana. Se detecta inmunorreactividad para LSD1 (A, B) y AR (C, D) en el epitelio secretorio de células de próstata normales (A, C, flechas) y tumorales (B, D, flechas). Todas las secciones se tomaron de la misma muestra de prostatectomía radical. Ampliación: 250 aumentos. (d) Localización subcelular de la LSD1 y del AR endógenos en las células de tumor de próstata LNCaP humanas. El AR (rojo) se colocaliza con la LSD1 (verde) en el núcleo tras la adición del agonista de AR +R1881.

La Figura 3 muestra cómo la LSD1 interactúa con la cromatina: (a) La coloración con azul de Coomassie revela la interacción de GST-LSD1 expresada bacteriamente con histonas nucleares *in vitro* (KCl 600 mM/NP40 al 0,3%). (b): La LSD1 etiquetada interactúa con la cola N-terminal de histona H3 acoplada a sefaroza. Las células LNCaP fueron incubadas con o sin R1881 (c, d, e), tratadas con o sin pargilina (d) o transfectadas con siRNA (siRNA = ARN pequeño de interferencia) (e). Fueron llevadas a cabo ChIP (ChIP = inmunoprecipitación de cromatina) o Re-ChIP (Re-ChIP = inmunoprecipitación secuencial de cromatina) con los anticuerpos indicados. La cromatina precipitada fue amplificada mediante PCR (PCR = reacción cadena de la polimerasa) usando los cebadores que flanquean a la región promotora (ARE I+II), la región central (centro) o la región potenciadora (ARE III) del gen PSA regulado por AR. El silenciamiento (“knockdown”) de la LSD1 mediado por siRNA se verifica mediante análisis Western blot (e, cuadro inferior) usando anticuerpos α -AR y α -LSD1.

La Figura 4 muestra cómo la LSD1 controla la proliferación celular y la actividad transcripcional inducida por AR. Células 293 (a, b, d, e), CV-1 (c) y LNCaP (f, g) fueron transfectadas con los informadores AR-dependientes indicados en presencia de plásmido de expresión de AR (a-e). Las células fueron tratadas con o sin R1881, pargilina, deprenil o clorgilina. La activación de AR dependiente de ligandos e inducida por LSD1 (a, b, c) es mediada por el dominio de AO (247-852 de LSD1, d) y bloqueada por inhibidores de la monoamina oxidasa (e). En las células LNCaP, la pargilina (f) y el silenciamiento de la LSD1 mediado por siRNA bloquean la actividad del AR (g, cuadro izquierdo). El silenciamiento de la LSD1 inhibe la proliferación de células LNCaP inducida por R1881 (h, cuadro izquierdo). El silenciamiento de la LSD1 se verifica mediante análisis de inmunofluorescencia (g, cuadro derecho, flechas) y Western blot (h, cuadro derecho) usando anticuerpos α -AR y α -LSD1. Las barras representan la media +SD (SD = desviación característica) (n $\geq$ 5).

En un aspecto, la invención se refiere al uso de al menos de un inhibidor de las amina oxidasas seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de pargilina, clorgilina y deprenil para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de próstata, donde el inhibidor de las amina oxidasas, que es al menos uno, inhibe a la LSD1 en complejo con AR y redundante por consiguiente en una disminución de la expresión génica AR-dependiente.

Según la invención, se usa al menos uno de dichos inhibidores de las amina oxidasas. Puede usarse un inhibidor de las amina oxidasas, o bien pueden usarse varios inhibidores de las amina oxidasas. En realizaciones preferidas de la invención, el uso comprende a un inhibidor de las amina oxidasas. El inhibidor de las amina oxidasas que es al menos uno es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de pargilina, clorgilina y deprenil. Ventajosamente y por lo tanto con la máxima preferencia, el inhibidor de las amina oxidasas es pargilina.

La demetilasa lisina-específica se indica habitualmente de manera abreviada como “LSD1”. En el sentido en el que se le utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, el vocablo “modulando” significa un cambio ya sea en la dirección de mejorar la actividad o bien en la dirección de reducir la actividad. Según la invención, se prefiere un bloqueo de la actividad de LSD1.

En una realización preferida de los usos inventivos, la actividad de LSD1 que se modula es la actividad desmetilante de la LSD1. Esto significa que la LSD1 ejerce una influencia como catalizador en una reacción química donde son eliminados grupos metilo diana en una molécula de polímero, y con ello es efectuada toda influencia en la actividad de la molécula. Para dar tan sólo un ejemplo, un inhibidor de las amina oxidasas seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de pargilina, clorgilina y deprenil puede bloquear la desmetilación de mono- y dimetil H3-K9 durante la transcripción inducida por andrógenos. En una adicional realización preferida de la invención, cuando se

usa al menos un inhibidor de las amina oxidasas seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de pargilina, clorgilina y deprenil, la actividad de demetilasa de la LSD1 que se controla es la acción desmetilante de la LSD1 en las marcas de histona represoras en el residuo 9 de lisina en la histona H3 (H3-K9), y más preferiblemente en las marcas de histona represoras en mono- y dimetil H3-K9, incrementándose con ello la expresión génica regulada por el AR.

En una composición preferida según la invención, se usa un inhibidor de las amina oxidasas seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de pargilina, clorgilina y deprenil, si bien es posible y puede ser ventajoso el uso de más de un inhibidor de las amina oxidasas.

La invención también se refiere a un método de ensayo que permite poner a prueba a los inhibidores de la LSD1 con respecto a su capacidad para inhibir la función de LSD1, donde al menos una sustancia química que supuestamente ejerce inhibición de la función de LSD1 es sometida a una o varias reacciones de desmetilación de mono- y dimetil H3-K9 donde dicha LSD1 está implicada bajo condiciones que son similares o idénticas a las condiciones fisiológicas.

En el sentido en el que se la utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión “capacidad para modular la función de LSD1” significa la capacidad de una sustancia química que pretendida o supuestamente es un modulador de la enzima demetilasa lisina-específica (LSD1) para modular la función de dicha enzima. La modulación puede ser una modulación iniciadora y/o activadora, o bien puede ser una modulación desaceleradora o desactivadora o inhibidora o incluso bloqueadora. Según el método de ensayo de la presente invención, se prefiere una modulación inhibidora o bloqueadora.

Como sustancias químicas, pueden ser puestas a prueba por el método de ensayo de la presente invención básicamente todas las sustancias químicas que pretendida o supuestamente ejerzan una acción moduladora en la LSD1. En realizaciones preferidas de los métodos de ensayo de la presente invención, la reacción o las reacciones es o son una reacción o reacciones en las que la LSD1 está también implicada en su ambiente natural bajo condiciones naturales. En otras palabras: El método de ensayo de la presente invención hace uso de aquellas reacciones bioquímicas o reacciones fisiológicas en las que la LSD1 está implicada al ejercer su acción moduladora natural, p. ej. en el AR.

En el sentido en el que se la utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, se entiende que la expresión “condiciones fisiológicas” significa unas condiciones que le permiten a un mamífero, o específicamente a un humano, existir y estar en aceptables condiciones de vida sin carga indebida alguna relativa a la temperatura, a la presión, a la acidez/basicidad, a las condiciones acuosas/de humedad de sistemas líquidos, al contenido de oxígeno del ambiente gaseoso, etc. Tales condiciones se aplican al método de ensayo de la presente invención durante la fase de prueba. Según realizaciones preferidas de la presente invención, dichas condiciones fisiológicas son condiciones que se establecen al aplicar dicho método de ensayo y que son similares o idénticas a las condiciones que están presentes en una o en más de una reacción donde la LSD1 actúa bajo condiciones fisiológicas.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a un método de ensayo en el que la reacción a la que se somete la sustancia química que es al menos una, con la finalidad de modular dicha reacción, y preferiblemente de bloquearla, es la reacción de desmetilación, realizada por la LSD1, en las marcas de histona represoras de mono- y dimetil H3-K9.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a un método de ensayo en el que la reacción a la que se somete la sustancia química que es al menos una, con la finalidad de modular dicha reacción, y preferiblemente de bloquearla, es la reacción de superacción ligando-dependiente e inducida por LSD1 de AR en las células 293 o CV-1, modulando así la actividad de AR ligando-dependiente, y preferiblemente bloqueándola.

Una adicional realización preferida de la presente invención se refiere a un método de ensayo en el que la reacción a la que es sometida la sustancia química que es al menos una, con la finalidad de modular dicha reacción, y preferiblemente de bloquearla, es la reacción de proliferación andrógeno-dependiente de las células LNCaP o MCF-7, modulando así dicha proliferación celular andrógeno-dependiente, y preferiblemente bloqueándola.

Se describe a continuación más detalladamente la invención.

Para examinar el patrón de expresión de la LSD1, se llevaron a cabo análisis Northern blot. El mRNA de *LSD1* es expresado ubicuamente en tejidos fetales y adultos humanos y murinos (Fig. 2a y datos no ilustrados) como un transcrito de 3,3 kb (Fig. 2b). Para investigar la localización de la LSD1 en la próstata, se usaron análisis inmunohistoquímicos. Como se muestra en la figura 2c, la LSD1 es detectada en el epitelio de la próstata normal y en células tumorales. Como aspecto importante, estas células también expresan AR (Fig. 2c), indicando que la LSD1 y el AR están colocalizados.

A continuación fue estudiada por inmunofluorescencia (Fig. 2d) la localización subcelular de la LSD1 y del AR endógenos en células LNCaP de cáncer de próstata humano. La LSD1 está presente en el núcleo en ausencia y en presencia del agonista de AR R1881. La adición de R1881 redundante en una colocalización nuclear de AR y LSD1. Tomados juntamente, los datos demuestran que la LSD1 es una proteína nuclear que se colocaliza con el AR en tejidos sensibles a los andrógenos tales como la próstata.

Puesto que se descubrió que la LSD1 se asocia con la cromatina y desmetila la H3-K4 *in vitro*³, se examinó si la LSD1 interactúa directamente con las histonas nucleares. Los análisis de interacción demostraron una asociación física con histonas nucleares *in vitro* (Fig. 3a). Además, los análisis demuestran que la LSD1 interactúa con la cola N-terminal de la histona H3 (Fig. 3b).

Para determinar si la LSD1 y el AR se asocian con la cromatina *in vivo*, células LNCaP tratadas con R1881 fueron sometidas a inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Como se muestra en la figura 3c, DNA genómico correspondiente a los elementos de respuesta a andrógenos (ARE I + II y ARE III) que están situados en el promotor y el potenciador del gen del antígeno específico de la próstata (PSA), fue respectivamente inmunoprecipitado de manera ligando-dependiente con anticuerpos α -AR. El DNA genómico derivado de una región entre el potenciador y el promotor no fue enriquecido, demostrando así especificidad (Fig. 3c). La LSD1 se asocia con la cromatina tanto en presencia como en ausencia de ligando (Fig. 3c).

Para demostrar que la LSD1 y el AR forman complejos ligando-dependientes sobre AREs cromatinizados, células LNCaP tratadas con agonistas fueron sometidas a inmunoprecipitación secuencial de cromatina (Re-ChIP), primero con un anticuerpo α -AR y a continuación con anticuerpos α -LSD1 o IgG α de conejo de control. Es importante señalar que ambas regiones con contenido de ARE fueron enriquecidas, demostrando que la LSD1 y el AR forman un complejo ligando-dependiente sobre cromatina (Fig. 3c).

Puesto que la expresión del gen del PSA es inducida por el AR de manera agonista-dependiente, fueron analizados los niveles de metilación de marcas de histona represoras tales como la histona 3 en la lisina 9 (H3-K9), la histona 3 en la lisina 27 (H3-K27) y la histona 4 en la lisina 20 (H4-K20). La transcripción inducida por andrógenos va acompañada por una fuerte disminución de mono-, di- y trimetil H3-K9 en el promotor del PSA (Fig. 3d). Puesto que la LSD1 es una AO que cataliza la desmetilación, fue llevada a cabo una prueba para determinar si inhibidores de las monoamina oxidasas tales como la pargilina (N-metil-N-2-propinil-bencilamina), la clorgilina (N-metil-N-propargil-3-(2,4-diclorofenoxi)-propilamina) o el deprenil (= seregelina; (R)-(-)-N,2-dimetil-N-2-propinilfenetilamina) podrían interferir en la función de LSD1. Como aspecto importante, la pargilina bloquea la desmetilación de mono- y dimetil H3-K9 durante la transcripción inducida por andrógenos, mientras que permanecen sin variación los niveles de metilación de trimetil H3-K9 y el estado de metilación de H3-K27 y de H4-K20 (Fig. 3 y datos no ilustrados). Como aspecto interesante, la metilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3-K4) no es alterada *in vivo* (datos no ilustrados).

Para demostrar que la desmetilación ligando-dependiente de mono- y dimetil H3-K9 es ejecutada por LSD1, células LNCaP fueron transfectadas con siRNAs dirigidos contra LSD1 o un control no relacionado con la misma. Esto conduce a una eficiente y específica regulación a menos de la LSD1 endógena, pero no afecta al nivel de AR endógeno (Fig. 3e, cuadro inferior). Como aspecto importante, el silenciamiento de la LSD1 bloquea la desmetilación ligando-dependiente de mono- y dimetil H3-K9 (Fig. 3e). La cantidad de H3 total no se ve influenciada por el silenciamiento de la LSD1 (Fig. 3e). Tomados juntamente, estos datos demuestran la asociación ligando-dependiente de LSD1 y AR sobre AREs cromatinizados en el promotor del gen del PSA. Esto conduce a la desmetilación específica de las marcas de histona represoras mono- y dimetil H3-K9.

A continuación se llevaron a cabo ensayos de transfección transitoria para poner a prueba si la LSD1 modula la actividad transcripcional del AR. La coexpresión de LSD1 y AR redundante en una fuerte activación ligando-dependiente de un informador MMTV-luciferasa (Fig. 4a), lo cual no se observa en ausencia ya sea de ligando o bien de AR (datos no ilustrados). La estimulación de la actividad de AR por parte de la LSD1 es potente en distintas líneas celulares, y tanto promotores mínimos AR-responsivos sintéticos como complejos fueron activados por la LSD1 de manera ligando-dependiente (Fig. 4b, c). La estimulación de la actividad de AR es selectiva puesto que la LSD1 no afecta a la actividad transcripcional de los correspondientes receptores de hormonas esteroides (datos no ilustrados).

Además, queda demostrado que el dominio de AO (247-852 de LSD1) de la LSD1 es suficiente para estimular la actividad del gen informador AR- y ligando-dependiente, mientras que el terminal N (1-175 de LSD1) y el dominio de SWIRM (176-246 de LSD1) no lo hacen (Fig. 4d). Todos los mutantes de LSD1 están presentes en el núcleo y son expresados a niveles similares (datos no ilustrados).

Para investigar si el desplazamiento de las marcas de histona represoras por parte de la LSD1 redundante en una incrementada expresión génica regulada por el AR, fueron usados en transfecciones transitorias inhibidores de las monoamina oxidasas tales como pargilina, clorgilina y deprenil. Estos inhibidores perjudican severamente la inactivación del AR inducida por la LSD1 (Fig. 4e). Como aspecto importante, en las células LNCaP de tumor de próstata, que expresan AR endógeno, solamente informadores andrógeno-dependientes pero no informadores no afines tales como el TK-LUC son inhibidos por la pargilina, demostrando así especificidad (Fig. 4f).

A continuación, LSD1 expresada endógenamente fue eficientemente usada en células LNCaP por RNAi mediado por vector (pSUPER-LSD1) (Fig. 4g, cuadro derecho). Paralelamente al silenciamiento de la LSD1, se observó una significativa disminución ligando-dependiente de la expresión del gen informador PSA-LUC, indicando una deteriorada actividad transcripcional del AR como consecuencia del silenciamiento de la LSD1 (Fig. 4g, cuadro izquierdo). Puesto que la LSD1 gobierna la actividad transcripcional de AR, podrían ser reguladas por la LSD1 otras funciones controladas por andrógenos tales como el crecimiento celular andrógeno-dependiente.

Para abordar esta cuestión, células LNCaP fueron infectadas con un lentivirus (pLV-THM-LSD1) que expresa siRNA dirigido contra LSD1. La infección con pLV-THM-LSD1 ocasiona una eficiente y específica regulación a menos de la LSD1 endógena, pero no afecta al nivel de AR endógeno (Fig. 4h, cuadro derecho). Como aspecto importante, en comparación con células transducidas con el virus pLV-THM-control, la proliferación andrógeno-inducida de células LNCaP es espectacularmente inhibida por el silenciamiento de la LSD1 mediado por pLV-THM-LSD1 (Fig. 4h, cuadro izquierdo). Estos datos demuestran la importancia fisiológica de la LSD1 en el control de la proliferación celular y la regulación génica inducida por andrógenos.

En resumen, los datos anteriormente expuestos demuestran que la función de AR es controlada por la demetilasa LSD1. La LSD1 y el AR se asocian en AREs cromatinizados de genes AR diana de una manera ligando-dependiente, lo cual redundante en una concomitante desmetilación de las marcas de histonas represoras mono- y dimetil H3-K9. La LSD1 ha sido descrita como un componente de complejos correpresores⁴⁻⁷, y un modelo reciente propone que la LSD1 reprime la transcripción de genes silenciados por Co-REST debido a la desmetilación de las marcas de histona activadoras en H3-K4³. Sin embargo, cuando está formando complejo con AR, la LSD1 desmetila las marcas de histona represoras mono- y dimetil H3-K9 y promueve con ello la activación génica. Así, en dependencia de los específicos consortes que interactúen, la acción de LSD1 puede redundar en un silenciamiento o bien en una activación génica(a). Es de importancia nuestra observación de que inhibidores tales como la pargilina controlan la actividad de demetilasa de la LSD1 y con ello regulan al AR. Así, la modulación específica de la actividad de LSD1 podría ser un prometedor objetivo terapéutico en tejidos tales como el cerebro, el testículo y la próstata, donde el AR desempeña un fundamental papel fisiológico.

Métodos

Plásmidos

Han sido anteriormente descritos los plásmidos siguientes: pSG5-AR, CMX-Flag, GST-AR-NTD, GST-AR-DBD, GST-AR-LBD, MMTV-LUC, y TK-LUC⁸; ARE_{2x}-TATA-LUC, ARE_{2x}-TK-LUC⁹; Slp-ARU-TATA-LUC¹⁰; PSA-LUC¹¹; pLV-THM (<http://www.tronolab.unige.ch/>); pSUPER¹². Para construir CMX-Flag-LSD1, 1-174 de CMX-Flag-LSD1, 175-246 de CMX-Flag-LSD1 y 247-854 de CMX-Flag-LSD1, los correspondientes fragmentos fueron amplificados por PCR e insertados en el sitio NcoI/NheI de CMX-Flag. pSUPER-control, pSUPER-LSD1 y pLV-THM-LSD1 fueron contruidos según (<http://www.tronolab.unige.ch/>) y según lo publicado¹². Las secuencias pueden ser facilitadas a petición.

Inmunohistoquímica

El anticuerpo policlonal α -LSD1 de conejo fue generado según procedimientos estándar. Las coloraciones fueron llevadas a cabo usando un protocolo¹³ para la recuperación de antígenos e inmunoperoxidasa indirecta. Se usaron α -AR 441 (Santa Cruz) y α -LSD1 en una dilución de 1:75 y 1:500, se usaron como anticuerpos secundarios IgG de conejo e IgG de ratón (1:500; Dako), y las inmunorreacciones fueron visualizadas con el complejo ABC diluido a 1:50 en PBS (PBS = solución salina tamponada con fosfato) (Vectastain, Vector).

Cultivo celular y transfecciones

Células 293 y CV-1 fueron cultivadas y transfectadas como está descrito¹³. Células LNCaP fueron cultivadas en RPMI1640 exento de rojo de fenol y suplementado con un 10% de suero bovino fetal de doble extracción (dsFCS) y transfectadas con Effectene (Qiagen). Se usaron las cantidades siguientes por pocillo: de NMTV-LUC, ARE_{2x}-TATA-LUC, ARE_{2x}-TK-LUC, TK-LUC, PSA-LUC, Slp-ARU-TATA-LUC, 500 ng de cada uno, y se transfectaron por pocillo 25 ng de plásmidos de expresión para AR; 500 ng de plásmidos de expresión para 1-174 de LSD1, 175-246 de LSD1, 247-852 de LSD1, pSUPER-control y pSUPER-LSD1; y de 100 a 500 ng de plásmidos de expresión para LSD1. Las sustancias químicas fueron obtenidas como se indica a continuación: pargilina (Sigma); deprenil y clorgilina (ICN Biomedicals Inc.); R1881 (Schering AG, Berlín). Las células fueron tratadas con o sin R1881 10⁻¹⁰M, 3 x pargilina 10⁻³M, 1 x deprenil 10⁻³M o 1 x clorgilina 10⁻⁴M por espacio de 18 horas como se indica. La actividad de luciferasa fue sometida a ensayo como está descrito¹⁴. Todos los experimentos fueron repetidos al menos cinco veces por duplicado.

Inmunoprecipitación de Cromatina

Los experimentos de CHIP fueron llevados a cabo esencialmente como está descrito¹⁵. Células LNCaP fueron tratadas por espacio de 18 horas con o sin pargilina y por espacio de 120 min. con o sin R1881 10⁻⁸M como se indica. Las células LNCaP fueron transfectadas durante tres días antes de la recolección para CHIP con o sin siRNA (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La inmunoprecipitación fue llevada a cabo con anticuerpos específicos (α -monoMeK9H3, α -diMeK9H3, α -triMeK9H3, α -monoMeK4H3, α -diMeK4H3, α -triMeK4H3, α -H3 (abcam), α -LSD1 y α -AR PG21 (Upstate Biotechnology) sobre GammaBind^{MF}-Sepharose 4B (GE-Healthcare). Se usaron para PCR 1-5 μ l de 50 μ l de extracto de DNA. Para los ensayos Re-CHIP, las inmunoprecipitaciones fueron lavadas secuencialmente con TSE I, TSE II, tampón III y TE¹⁵. Los complejos fueron eluidos mediante incubación con DTT (DTT = ditiotreitól) 10 mM a 37°C por espacio de 30 min., y fueron diluidos 50 veces con tampón de dilución¹⁵, efectuándose a continuación una segunda inmunoprecipitación con el anticuerpo indicado. Las secuencias cebadoras fueron las siguientes: central; PSA (-2223/-1951) 5'-TGGGTTGGGTCAGGTTTGGTT-3' y 5'-TCTTCCCTGTTTCTAGTT

GAGTG-3'; y los cebadores de la PCR para ARE I+II (PSA (-459/121)) y ARE III (PSA (-4288/3922)) han sido descritos anteriormente¹⁶.

Immunofluorescencia

Las células fueron analizadas esencialmente como está descrito¹⁴. La coloración de anticuerpos primarios fue llevada a cabo con las diluciones que se indican: α -AR 441 (1:500) y α -LSD1 (1:5000). La localización subcelular fue visualizada usando anticuerpos secundarios etiquetados con Alexa Fluor 488 y 546 (1:6000; Molecular Probes). Los núcleos fueron coloreados con 1 μ g ml⁻¹ de DAPI (Roche).

Ensayos de coimmunoprecipitación y análisis Western blot

Los experimentos fueron llevados a cabo esencialmente como está descrito⁸. Las inmunoprecipitaciones desde extractos de testículo murino fueron llevadas a cabo con anticuerpo α -LSD1 o con IgG de conejo de control. Los Western blots fueron decorados como se indica. El diez por ciento de extracto de testículo fue cargado como entrada.

Ensayos pull-down *in vitro*

Los ensayos pull-down con GST fueron llevados a cabo con cantidades iguales de GST o de proteínas de fusión con GST como está descrito⁸ usando tampón que contenía KCl 150 mM y un 0,15% de NP40 (Fig. b) o KCl 600 mM y un 0,3% de NP40 (Fig. 3a). Los Pull-downs con cola de histona H3 acoplada a sefarsa fueron llevados a cabo como está descrito¹⁷ en Tris 20 mM pH 8,5, NaCl 150 mM, 0,5% de NP40. El diez por ciento de las proteínas traducidas *in vitro* fue cargado como entrada.

Análisis de mRNA

Fueron llevados a cabo análisis Northern blot con un Conjunto de Expresión Tisular Múltiple Humana y un Northern Blot Tisular Múltiple Humano (BD Biosciences Clontech) con una sonda LSD1-específica que abarcaba ya sea los pares de bases 1-741 o bien los pares de bases 1-2556, etiquetada con Stripes (Ambion) e hibridizada como se recomienda.

Ensayo de proliferación celular

Se usaron pLV-THM-control y pLV-THM-LSD1 para producir lentivirus recombinantes para infectar células LNCaP como está descrito¹⁸. Las células infectadas fueron cultivadas por espacio de 72 horas en medio suplementado con un 10% de dsFCS. 0,3 x 10⁴ células fueron cultivadas en una placa de 96 pocillos con o sin R1881 10⁻⁷M. El Ensayo Colorimétrico de proliferación celular ELISA con incorporación de BrDU (Roche) fue llevado a cabo según las instrucciones del fabricante. Los experimentos fueron repetidos tres veces por cuadruplicado.

Sistemas de Ensayo

La invención describe los siguientes ensayos para poner a prueba a inhibidores de la LSD1 en cuanto a su capacidad para bloquear la función de LSD1 y con ello de AR.

1) El primer ensayo para poner a prueba a inhibidores que bloquean las funciones de LSD1 y AR puede llevarse a cabo como se muestra en la Figura 3d. El inhibidor bloquea la desmetilación de LSD1 en marcas de histona represoras en la histona H3, preferiblemente en marcas de histona represoras en el residuo 9 de lisina en la histona H3 (H3-K9), y más preferiblemente en las marcas de histona represoras en mono- y dimetil H3-K9.

2) El segundo ensayo para poner a prueba a inhibidores que bloquean las funciones de LSD1 y AR puede ser llevado a cabo como se muestra en las Figuras 4e y 4f. Un inhibidor de LSD1 bloquea la superacción ligando-dependiente inducida por LSD1 de AR en células 293 o CV-1. Un inhibidor de LSD1 bloquea la actividad de AR ligando-dependiente.

3) El segundo ensayo para poner a prueba inhibidores que bloquean las funciones de LSD1 y AR puede ser llevado a cabo en células que crecen de una manera andrógeno-dependiente, tales como las células LNCaP o las células MCF-7. Análogamente al silenciamiento de LSD1 mediado por siRNA (Figura 4h), un inhibidor de este tipo bloquea la proliferación celular inducida por andrógenos.

Literatura

1. Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. The coregulator exchange in transcriptional function of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121-141 (2000).

2. Strahl, B.D. & Allis, C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45 (2000).

3. Shi, Y. *et al.* Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953 (2004).

4. **Shi, Y. et al.** Coordinated histone modifications mediated by a CtBP corepressor complex. *Nature* 422, 735-738 (2003).
5. **Hakimi, M.A. et al.** A candidate X-linked mental retardation gene is a component of a new family of histone deacetylase-containing complexes. *J. Biol. Chem.* 278, 7234-7239 (2003).
6. **Hakimi, M.A. et al.** A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 99, 7420-7425 (2002).
- 10 7. **Eimer, S. et al.** Loss of spr-5 bypasses the requirement for the *C. elegans* presenilin sel-12 by derepressing hop-1. *EMBO J.* 21, 5787-5796 (2002).
8. **Metzger, E. et al.** A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor: implications for PRK in prostate cancer. *EMBO J.* 22, 270-280 (2003).
- 15 9. **Schüle, R. et al.** Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-1226 (1990).
10. **Verrijdt, G. et al.** Functional interplay between two response elements with distinct binding characteristics dictates androgen specificity of the mouse sex-limited protein enhancer. *J. Biol. Chem.* 277, 35191-35201 (2002).
- 20 11. **Sun, Z., Pan, J. & Balk, S.P.** Androgen receptor-associated protein complex binds upstream of the androgen-responsive elements in the promoters of human prostate-specific antigen and kallikrein 2 genes. *Nucleic Acids Res.* 25, 3318-3325 (1997).
- 25 12. **Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R.** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553 (2002).
13. **Müller, J.M. et al.** FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J.* 19, 359-369 (2000).
- 30 14. **Müller, J.M. et al.** The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *EMBO J.* 21, 736-748 (2002).
15. **Shang, Y., Myers, M. & Brown, M.** Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol. Cell.* 9, 601-610 (2002).
- 35 16. **Shatkina, L. et al.** The cochaperone Bag-1 L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7189-7197 (2003).
- 40 17. **Schneider, R. et al.** Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications. *J. Biol. Chem.* 279, 23859-23862 (2004).
18. **Wiznerowicz, M. & Trono, D.** Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol.* 77, 8957-8961 (2003).
- 45

Referencias citadas en la descripción

50 *Esta lista de referencias que cita el solicitante se aporta solamente en calidad de información para el lector y no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que se ha procedido con gran esmero al compilar las referencias, no puede excluirse la posibilidad de que se hayan producido errores u omisiones, y la OEP se exime de toda responsabilidad a este respecto.*

55 Documentos de patente citados en la descripción

- WO 0219964 A [0005]
- EP 0500359632107 A [0052]

Literatura no de patentes citados en la descripción

- 60 • **Y. Shi et al.** Histone Demethylation mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell*, 2004, vol. 119, 941-953 [0006]
- **S. Kubicek et al.** A crack in Histone Lysine Methylation. *Cell*, 2004, vol. 119, 903-906 [0007]
- 65 • **J. Couzin.** Long-Sought Enzyme Found - Revealing New Gene Switch on Histones. *Science*, 2004, vol. 306, 2171 [0007]

- **Kubicek S.; Jenuwein T.** A crack in histone lysine methylation. *Cell*, 2004, vol. 119, 903-6 [0009]
- **Couzin J.** Molecular biolog. Long-sought enzyme found, revealing new gene switch on histones. *Science*, 2004, vol. 306, 2171 [0010]
- **Chen D. et al.** Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, 1999, vol. 284, 2174-7 [0011]
- **Heinlein C.; Chang C.** Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr. Rev.*, 2002, vol. 23, 175-200 [0012]
- **Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G.** The coregulator exchange in transcriptional function of nuclear receptors. *Genes Dev.*, 2000, vol. 14, 121-141 [0051]
- **Strahl, B.D.; Allis, C.D.** The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, vol. 403, 41-45 [0051]
- **Shi, Y. et al.** Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell*, 2004, vol. 119, 941-953 [0051]
- **Shi, Y. et al.** Coordinated histone modifications mediated by a CtBP corepressor complex. *Nature*, 2003, vol. 422, 735-738 [0051]
- **Hakimi, M.A. et al.** A candidate X-linked mental retardation gene is a component of a new family of histone deacetylase-containing complexes. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, 7234-7239 [0051]
- **Hakimi, M.A. et al.** A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 2002, vol. 99, 7420-7425 [0051]
- **Eimer, S. et al.** Loss of spr-5 bypasses the requirement for the *C. elegans* presenilin sel-12 by derepressing hop-1. *EMBO J*, 2002, vol. 21, 5787-5796 [0051]
- **Metzger, E. et al.** A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor: implications for PRK in prostate cancer. *EMBO J*, 2003, vol. 22, 270-280 [0051]
- **Schüle, R. et al.** Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*, 1990, vol. 62, 1217-1226 [0051]
- **Verrijdt, G. et al.** Functional interplay between two response elements with distinct binding characteristics dictates androgen specificity of the mouse sex-limited protein enhancer. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 35191-35201 [0051]
- **Sun, Z.; Pan, J.; Balk, S.P.** Androgen receptor-associated protein complex binds upstream of the androgen-responsive elements in the promoters of human prostate-specific antigen and kallikrein 2 genes. *Nucleic Acids Res*, 1997, vol. 25, 3318-3325 [0051]
- **Brummelkamp, T.R.; Bernards, R.; Agami, R.** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, vol. 296, 550-553 [0051]
- **Müller, J.M. et al.** FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J*, 2000, vol. 19, 359-369 [0051]
- **Müller, J.M. et al.** The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *EMBO J*, 2002, vol. 21, 736-748 [0051]
- **Shang, Y.; Myers, M.; Brown, M.** Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol. Cell*, 2002, vol. 9, 601-610 [0051]
- **Shatkina, L. et al.** The cochaperone Bag-1 L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor. *Mol. Cell. Biol.*, 2003, vol. 23, 7189-7197 [0051]
- **Schneider, R. et al.** Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, 23859-23862 [0051]
- **Wiznerowicz, M.; Trono, D.** Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, 8957-8961 [0051]

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un inhibidor de las amina oxidasas seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de pargilina, clorgilina y deprenil para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de próstata, donde el inhibidor de las amina oxidasas que es al menos uno inhibe a la LSD1 en complejo con AR y por consiguiente redunda en una disminución de la expresión génica AR-dependiente.

2. Uso según la reivindicación 1, donde el inhibidor de las amina oxidasas es pargilina.

3. Método de ensayo que permite poner a prueba a los moduladores de la LSD1 con respecto a su capacidad para modular la función de LSD1, donde al menos una sustancia química que supuestamente ejerce modulación de dicha función de LSD1 es sometida a una o varias reacciones de desmetilación de mono- y dimetil H3-K9, donde dicha LSD1 está implicada bajo condiciones que son similares o idénticas a las condiciones fisiológicas.

4. Método de ensayo que permite poner a prueba a los moduladores de la LSD1 con respecto a su capacidad para modular la función de LSD1, donde al menos una sustancia química que supuestamente ejerce modulación de dicha función de LSD1 es sometida a la reacción de superacción ligando-dependiente inducida por LSD1 de AR en células 293 o CV-1, modulando así la actividad de AR ligando-dependiente, y preferiblemente bloqueándola.

5. Método de ensayo que permite poner a prueba a los moduladores de la LSD1 con respecto a su capacidad para modular la función de LSD1, donde al menos una sustancia química que supuestamente ejerce modulación de dicha función de LSD1 es sometida a la reacción de proliferación de células LNCaP o MCF-7 andrógeno-dependiente, modulando así dicha proliferación celular andrógeno-dependiente, y preferiblemente bloqueándola.

a



b

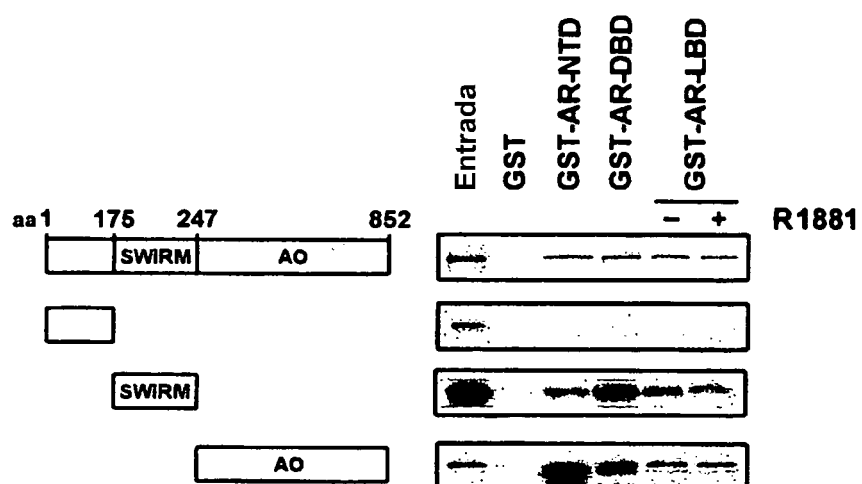


FIGURA 1

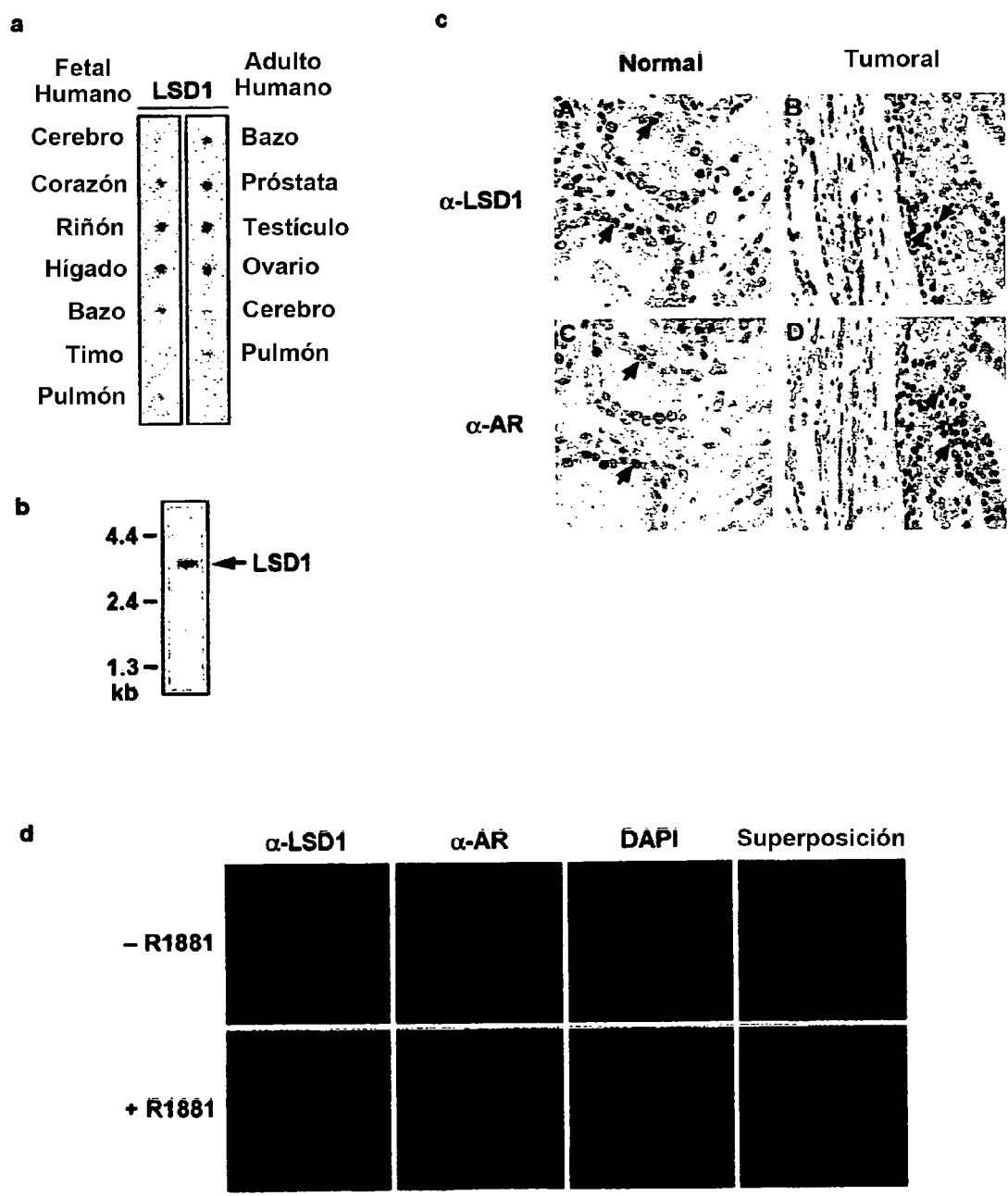


FIGURA 2

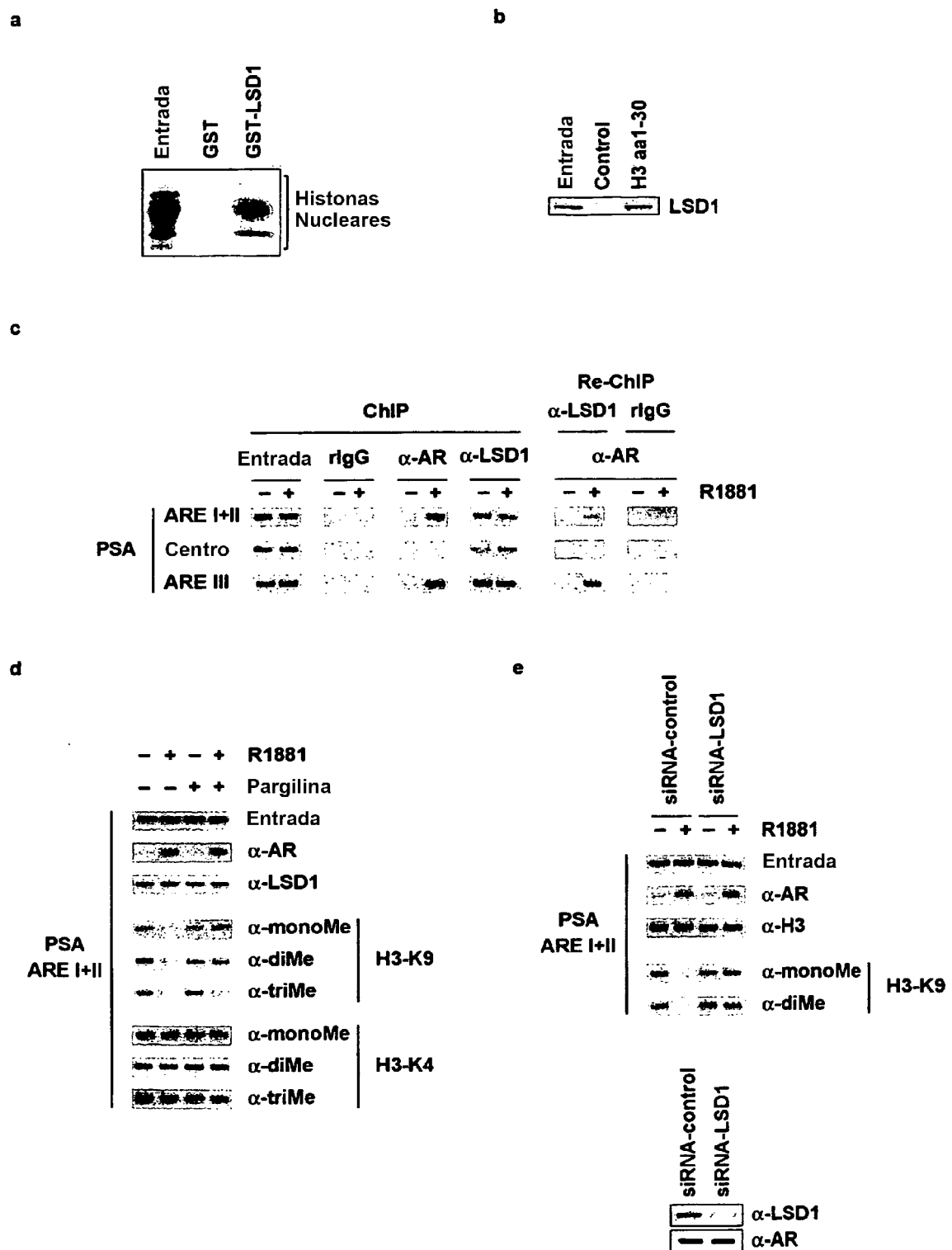


FIGURA 3

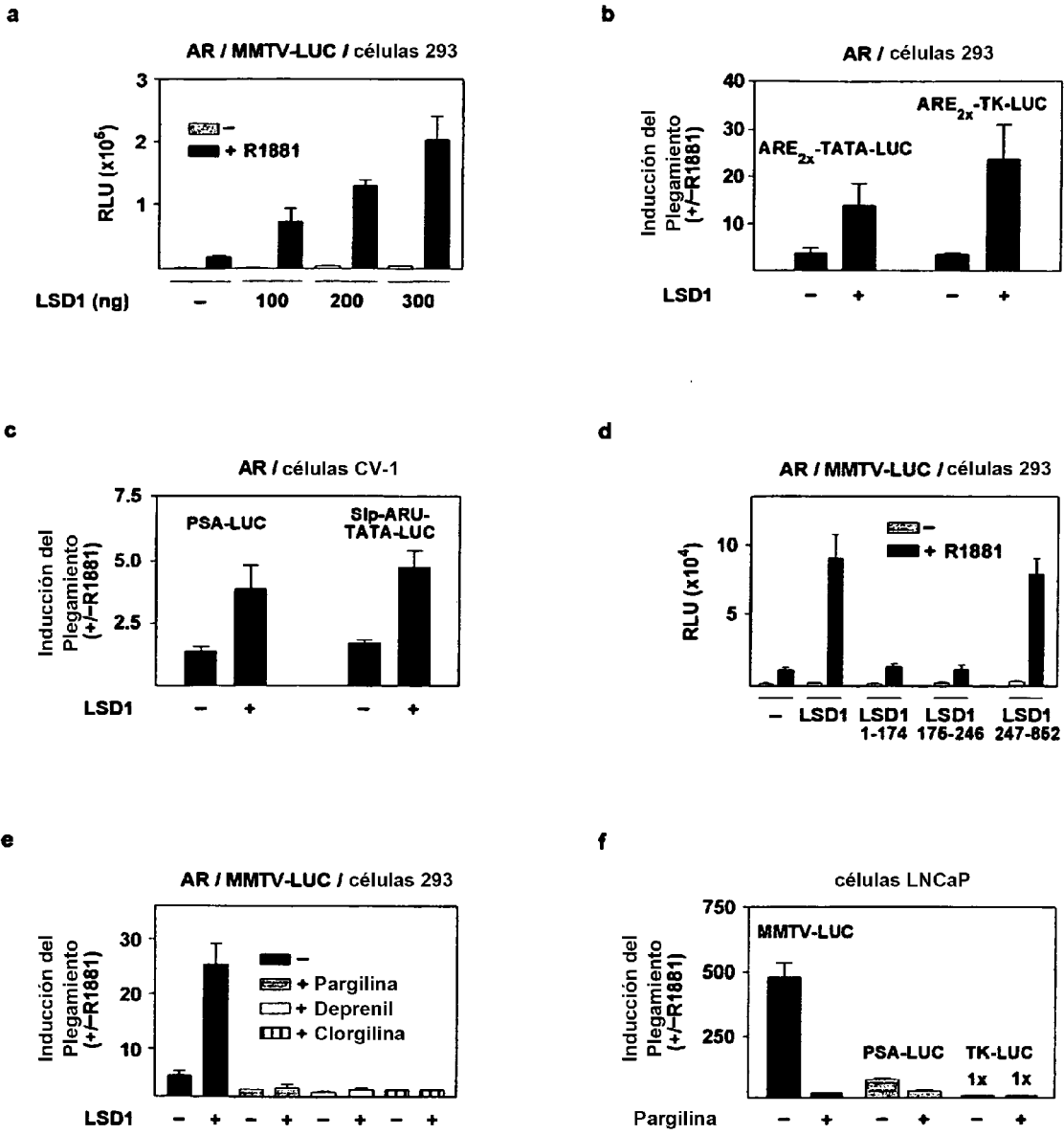
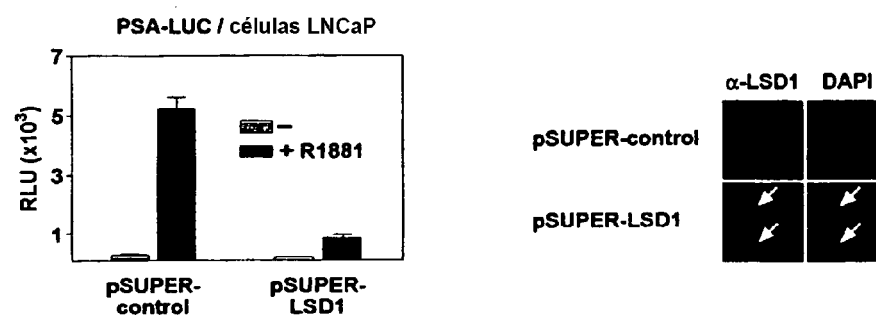


FIGURA 4

g



h

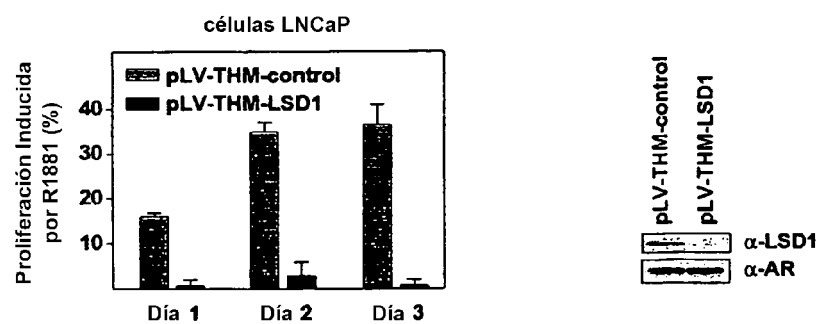


FIGURA 4

ES 2 349 544 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Universitätsklinikum Freiburg	
5	<120> Control de la Expresión Génica Dependiente de los Receptores de Andrógenos	
	<130> P 1719 EP	
10	<140> EP 05 003 596.3-2107	
	<141> 2005-02-05	
	<160> 2	
15	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
20	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Polinucleótido	
	<400> 1	
30	tggttggtggt caggttttgg tt	22
	<210> 2	
35	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Polinucleótido	
	<400> 2	
45	tcttcccctg ttctagtg agtg	24
50		
55		
60		
65		