

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 924 903**

51 Int. Cl.:

A61K 38/07 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2018** **PCT/US2018/014595**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2018** **WO18136843**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2018** **E 18741702 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2022** **EP 3570863**

54 Título: **Péptidos macrocíclicos para uso en el tratamiento de un cáncer de próstata o mama**

30 Prioridad:

20.01.2017 US 201762448823 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.10.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF KANSAS (50.0%)
245 Strong Hall 1450 Jayhawk Boulevard
Lawrence, Kansas 66045, US y
UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALDRICH, JANE;
MUKHOPADHYAY, ARCHANA y
HANOLD, LAURA E.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 924 903 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos macrocíclicos para uso en el tratamiento de un cáncer de próstata o mama

5 CAMPO

La tecnología actual se refiere generalmente a medicamentos para uso en el tratamiento de cáncer de próstata y cáncer de mama.

10 El documento WO2016/061531 desvela métodos para prevenir o tratar el crecimiento tumoral, la metástasis tumoral y/o la proliferación anómala de células tumorales en un sujeto, en donde los métodos implican la administración de una composición farmacéutica que comprende metilnaltrexona. También se desvelan métodos para inhibir o retardar el crecimiento de un tumor en un sujeto, en donde los métodos incluyen seleccionar un sujeto que sea un candidato adecuado para tratamiento con metilnaltrexona, y administrar al sujeto una composición que comprende metilnaltrexona.

15 El artículo científico "Síntesis de CJ-15, 208, un nuevo antagonista de receptores μ -opioides" (Tetrahedron Letters, Elsevier Ltd., Amsterdam, vol. 51, n.º 38, 22 de septiembre de 2010, páginas 5020-5023, XP027225957) enseña que CJ-15,208 (*ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp]) es un antagonista de receptores opioides kappa. En lugar de ser útil para tratar el cáncer, este documento indica antagonistas de receptores opioides kappa para uso como "antidepresivos, ansiolíticos y agentes terapéuticos para abuso de cocaína y opiáceos".

SUMARIO

25 La presente invención, que cubre la tecnología actual, se define mediante las reivindicaciones. En un aspecto, la tecnología actual proporciona al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para uso en el tratamiento de cáncer de próstata o cáncer de mama en un sujeto. El medicamento puede incluir una cantidad eficaz de al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp].

30 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1D ilustran las estructuras peptídicas evaluadas para el efecto en c-Myc en los ejemplos de trabajo, donde la Figura 1A proporciona la estructura para el tetrapéptido macrocíclico *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] ("CJ-15,208"); la Figura 1B proporciona la estructura para el tetrapéptido macrocíclico *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] ("[D-Trp]CJ-15,208"); la Figura 1C ilustra dinorfina A-(1-13); y la Figura 1D ilustra *zyklophin*.

La Figura 1E ilustra el análisis de transferencia de Western de c-Myc celular tratado con DMSO al 0,5 % (carril 1), dinorfina 1 μ M (carril 2), *zyklophin* 10 μ M (carril 3), CJ-15,208 50 μ M (carril 4), y [D-Trp]CJ-15,208 50 μ M (carril 5), de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

La Figura 1F ilustra el análisis de transferencia de Western de niveles de proteína c-Myc en células PC-3 después de tratamiento con 10 μ M de naloxona y/o [D-Trp]CJ-15,208 10 μ M, de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

Las Figuras 2A y 2B ilustran el análisis de transferencia de Western que muestra niveles de proteína c-Myc después de tratamiento de 48 h de células PC-3 con 0 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M de CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208, respectivamente, donde la Figura 2A proporciona el análisis de transferencia de Western para CJ-15,208 y la Figura 2B proporciona el análisis de transferencia de Western para [D-Trp]CJ-15,208 así como un histograma de los datos, de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

La Figura 2C proporciona un gráfico que ilustra los resultados de una evaluación de proliferación celular usando WST-1 después de tratamiento con CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208 durante 48 h, de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

La Figura 2D proporciona un gráfico que muestra expresión de ARNm de c-Myc en células PC-3 después de tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 10 μ M durante 0-48 h, de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

Las Figuras 3A-3G representan datos de proliferación celular de líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3, LNCaP, DU145, 22Rv1, y C4-2), células prostáticas BPH-1 normales, y células HEK no prostáticas tratadas con [D-Trp]CJ-15,208 después de 48 h o 72 h, de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

La Figura 3H ilustra el análisis de transferencia de Western para niveles de proteína c-Myc en células PC-3, LNCaP, DU145, 22Rv1, C4-2, BPH-1, y HEK.

Las Figuras 4A-4D proporcionan gráficos que ilustran citotoxicidad en células de cáncer de próstata y células

prostáticas normales después de tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 durante 48 h o 72 h, donde la Figura 4A proporciona los datos de células PC-3, la Figura 4B los datos de células LNCaP, la Figura 4C los datos de 22Rv1, y la Figura 4D los datos de células BPH-1, de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

La Figura 5A ilustra la distribución de fases del ciclo celular después de tratamiento durante 24 h y 48 h de células PC-3 con [D-Trp]CJ-15,208 10 μ M, donde la Figura 5B proporciona un gráfico que ilustra el % de población celular en cada fase del ciclo celular, de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

La Figura 6A ilustra el análisis de citometría de flujo que muestra el grado de apoptosis para PC-3 después de tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 durante 48 h, y la Figura 6B representa gráficamente el % de población celular en apoptosis temprana y tardía, de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

La Figura 7A ilustra el análisis de citometría de flujo que muestra el grado de apoptosis de células PC-3 tratadas con ARNsi no dirigido o ARNsi de c-Myc después de tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 durante 48 h, la Figura 7B ilustra el % de población celular en apoptosis temprana y tardía en células PC-3, y la Figura 7C proporciona el análisis de transferencia de Western que muestra atenuación génica de c-Myc mediante el ARNsi de c-Myc, de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

La Figura 8A ilustra el análisis de citometría de flujo para mostrar el grado de apoptosis del plásmido de control de vector o el plásmido HA-HA-c-Myc que contiene células HEK-293 después de tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 durante 48 h, la Figura 8B representa gráficamente el % de población celular en apoptosis temprana y tardía, y la Figura 8C ilustra el análisis de transferencia de Western que muestra transfección de c-Myc en plásmido HA-HA-c-Myc que contiene células HEK-293.

Las Figuras 9A y 9B ilustran la ruta de fosforilación y degradación de c-Myc en células normales (Figura 9A) y células cancerosas (Figura 9B).

Las Figuras 10A-10C representan gráficamente y proporcionan análisis de transferencia de Western que ilustra niveles de proteína clave (Erk, Akt, y PP2A) después de tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 después de 48 h, donde la Figura 10A muestra niveles de proteína p-Erk/Erk total en células PC-3, la Figura 10B muestra niveles de proteína p-Akt/Akt total en células PC-3, y la Figura 10C muestra niveles de proteína p-PP2A/PP2A total en células PC-3, de acuerdo con los ejemplos de trabajo.

La Figura 10D ilustra los efectos del tratamiento de células PC-3 con [D-Trp]CJ-15,208.

La Figura 11 proporciona un gráfico del crecimiento tumoral a lo largo del tiempo en un modelo de xenoinjerto de ratón después del tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 o vehículo (DMSO al 50 %, PEG 400 al 45 %, y monoleato de polietoxileno sorbitán al 5 %).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los siguientes términos se usan completamente como se define a continuación.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, los artículos en singular tales como "un" y "uno" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de los elementos (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que en el presente documento se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente. En el presente documento, la enumeración de los intervalos de valores pretende simplemente servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que en el presente documento se indique lo contrario, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que en el presente documento se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o término o expresión a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en el presente documento, pretende aclarar simplemente mejor las realizaciones y no plantea una limitación al alcance de las reivindicaciones a menos que se indique lo contrario. En la memoria descriptiva, ningún término o expresión debería interpretarse como indicación de que cualquier elemento no reivindicado es esencial.

Como se usa en el presente documento, los expertos en la materia entenderán "aproximadamente" y variará hasta cierto punto dependiendo del contexto en el que se use. Si existen usos del término que no sean evidentes para los expertos en la materia, dado el contexto en el que se usa, "aproximadamente" significará hasta más o menos 10 % del término en particular.

Generalmente, la referencia a un determinado elemento, tal como hidrógeno o H, pretende incluir todos los isótopos de ese elemento. Por ejemplo, si se define que un grupo R incluye hidrógeno o H, también incluye deuterio y tritio. De ese modo, los compuestos que comprenden radioisótopos tales como tritio, C¹⁴, P³² y S³⁵ están dentro del

alcance de la tecnología actual. Los procedimientos para insertar tales etiquetas en los compuestos de la tecnología actual serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia basándose en la divulgación en el presente documento.

Como entenderá un experto en la materia, para todos y cada uno de los fines, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos desvelados en el presente documento también incluyen todos y cada uno de los subintervalos y combinaciones de subintervalos posibles de los mismos. Cualquier intervalo enumerado puede reconocerse fácilmente como una descripción suficiente y que permite que el mismo intervalo se divida en mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc., al menos iguales. Como ejemplo no limitante, cada intervalo discutido en el presente documento puede dividirse fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. Como también entenderá un experto en la materia, todo término o expresión tal como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que" y similares incluye el número mencionado y hace referencia a intervalos que pueden dividirse posteriormente en subintervalos como se discutió anteriormente. Finalmente, como entenderá un experto en la materia, un intervalo incluye cada miembro individual. De ese modo, por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 átomos se refiere a grupos que tienen 1, 2 o 3 átomos. Del mismo modo, un grupo que tiene 1-5 átomos se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4 o 5 átomos, etc.

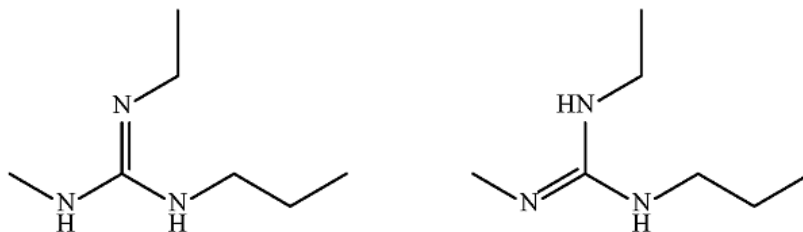
Las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos descritos en el presente documento están dentro del alcance de la tecnología actual e incluyen sales de adición de ácido o base que retienen la actividad farmacológica deseada y no son biológicamente indeseables (por ejemplo, la sal no es excesivamente tóxica, alergénica, o irritante, y está biodisponible). Cuando el compuesto de la tecnología actual tiene un grupo básico, tal como, por ejemplo, un grupo amino, pueden formarse sales farmacéuticamente aceptables con ácidos inorgánicos (tales como ácido clorhídrico, ácido hidrobórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, y ácido fosfórico), ácidos orgánicos (por ejemplo, alginato, ácido fórmico, ácido acético, ácido benzoico, ácido glucónico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido naftalenosulfónico, y ácido *p*-toluenosulfónico) o aminoácidos (tales como ácido aspártico y ácido glutámico). Cuando el compuesto de la tecnología actual tiene un grupo ácido, tal como, por ejemplo, un grupo ácido carboxílico, puede formar sales con metales, tales como metales alcalinos y alcalinotérreos (por ejemplo, Na⁺, Li⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺), amoníaco o aminas orgánicas (por ejemplo, dicitclohexilamina, trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina) o aminoácidos básicos (por ejemplo, arginina, lisina y ornitina). Tales sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación de los compuestos o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre o ácido libre con un ácido o base adecuados, respectivamente, y aislando la sal formada de ese modo.

Los expertos en la materia apreciarán que los compuestos de la tecnología actual pueden exhibir los fenómenos de tautomería, isomería conformacional, isomería geométrica y/o estereoisomería. Dado que los dibujos de la fórmula dentro de la memoria descriptiva y las reivindicaciones pueden representar solo una de las posibles formas tautoméricas, isoméricas conformacionales, estereoquímicas o isoméricas geométricas, debería entenderse que la tecnología actual incluye cualquier forma tautomérica, isomérica conformacional, estereoquímica e/o isomérica geométrica de los compuestos que tienen una o más de las utilidades descritas en el presente documento, así como mezclas de estas diversas formas diferentes.

"Tautómeros" se refiere a formas isoméricas de un compuesto que están en equilibrio entre sí. La presencia y las concentraciones de las formas isoméricas dependerán del entorno en el que se encuentre el compuesto y pueden ser diferentes dependiendo, por ejemplo, de si el compuesto es sólido o está en solución orgánica o acuosa. Por ejemplo, en solución acuosa, las quinazolinonas pueden exhibir las siguientes formas isoméricas, que se denominan tautómeros entre sí:



Como otro ejemplo, las guanidinas pueden exhibir las siguientes formas isoméricas en solución orgánica prótica, también denominadas tautómeros entre sí:



Debido a los límites de representación de compuestos mediante fórmulas estructurales, debe entenderse que todas las fórmulas químicas de los compuestos descritos en el presente documento representan todas las formas tautoméricas de compuestos y están dentro del alcance de la tecnología actual.

Los estereoisómeros de compuestos (también conocidos como isómeros ópticos) incluyen todas las formas quirales, diastereoméricas y racémicas de una estructura, a menos que se indique expresamente la estereoquímica específica. De ese modo, los compuestos usados en la tecnología actual incluyen isómeros ópticos enriquecidos o resueltos en cualquiera o todos los átomos asimétricos como es evidente a partir de las representaciones. Las mezclas tanto racémicas como diastereoméricas, así como los isómeros ópticos individuales, pueden aislarse o sintetizarse de modo que estén sustancialmente exentos de sus asociados enantioméricos o diastereoméricos, y todos estos estereoisómeros están dentro del alcance de la tecnología actual.

Los compuestos de la tecnología actual pueden existir como solvatos, especialmente hidratos. Pueden formarse hidratos durante la elaboración de los compuestos o composiciones que comprenden los compuestos, o pueden formarse hidratos con el tiempo debido a la naturaleza higroscópica de los compuestos. Los compuestos de la tecnología actual también pueden existir como solvatos orgánicos, incluyendo solvatos de DMF, éter y alcohol, entre otros. La identificación y preparación de cualquier solvato en particular está dentro de la habilidad del experto habitual en química orgánica sintética o química médica.

A lo largo de la presente divulgación, se hace referencia a diversas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas mediante una cita de identificación. También dentro de la presente divulgación hay números arábigos que se refieren a citas mencionadas, cuyos detalles bibliográficos completos se proporcionan inmediatamente antes de las reivindicaciones.

La tecnología actual

Las terapias actuales tales como terapia de privación androgénica o la aplicación de antagonistas de receptores androgénicos son eficaces inicialmente en el tratamiento del cáncer de próstata (CP), pero la enfermedad generalmente recurre con metástasis debido a la falta de respuesta a estos tratamientos.¹⁻³ Estas terapias reducen el nivel de los andrógenos testosterona y dihidrotestosterona o interfieren con la unión de ligandos androgénicos a receptores androgénicos (RA), respectivamente,⁴ pero la enfermedad progresa normalmente a pesar de la aplicación de estos tratamientos, y los RA se expresan normalmente en forma truncada o mutada.⁵ Aunque el mecanismo para la progresión del cáncer después de privación androgénica/tratamiento con antagonistas de RA no se comprende completamente, las posibles explicaciones incluyen: i) amplificación génica de RA, ii) activación constitutiva de RA, iii) mutación o truncamiento de RA, iv) activación de RA mediante factores de crecimiento, y/o v) activación de RA mediante rutas de señalización independiente de andrógenos alternativas.^{5,6}

La oncoproteína c-Myc es un factor de transcripción que está sobreexpresado en la mayoría de los tipos de cáncer.^{5,7-10} Se acumula y se estabiliza mediante fosforilación como fosfo-Ser62-c-Myc.¹¹⁻¹³ c-Myc está sobreexpresada tanto en receptores androgénicos positivos como en receptores androgénicos negativos, cánceres de próstata resistentes a la castración independientes de ligandos,^{5,14-16} y estudios recientes han mostrado que el receptor androgénico regula directamente los niveles de proteína c-Myc de manera independiente de andrógenos.^{5,14,17}

c-Myc está sobreexpresada en un 30-50 % de tumores de cáncer de mama de gran malignidad, y se ha informado la activación de c-Myc en la progresión del cáncer de mama. Las evidencias indican que la sobreexpresión de c-Myc contribuye al desarrollo de resistencia a terapia hormonal en tumores positivos para receptores estrogénicos (RE). La expresión de c-Myc también está elevada en el cáncer de mama triple negativo (CMTN) en comparación con tumores que expresan RE o HER2, y la sobreexpresión de c-Myc en CMTN está correlacionada con un mal pronóstico.

La tecnología actual proporciona al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] para uso en el tratamiento de cáncer de próstata y cáncer de mama. Como se proporciona en el presente documento, ambos péptidos macrocíclicos (también denominados "compuestos de la presente tecnología actual") indujeron sorprendentemente citotoxicidad y redujeron los niveles de proteína c-Myc en varias líneas celulares de cáncer,

poniendo en evidencia su viabilidad como tratamientos para cánceres de próstata y mama.

De ese modo, en un aspecto, se proporciona al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para uso en el tratamiento de un sujeto que padece cáncer de próstata o cáncer de mama. En cualquier realización en el presente documento, el compuesto o composición para uso puede incluir la administración de una cantidad eficaz de al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos al sujeto. En cualquier realización en el presente documento, puede que el cáncer de próstata exhiba niveles de c-Myc significativamente mayores que los niveles de c-Myc en células prostáticas normales. El cáncer de próstata de cualquier realización en el presente documento puede incluir al menos una mutación oncogénica encontrada en una línea celular PC-3, una línea celular LNCaP, una línea celular 22Rv1, una línea celular DU145, o una combinación de cualesquiera dos o más de las mismas (también indicado como "el cáncer de próstata comprende una línea celular PC-3, una línea celular LNCaP, una línea celular 22Rv1, una línea celular DU145, o una combinación de cualesquiera dos o más de las mismas"). El cáncer de próstata de cualquier realización en el presente documento puede incluir al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 75 %, o aproximadamente un 100 % de mutaciones oncogénicas encontradas en una línea celular PC-3, una línea celular LNCaP, una línea celular 22Rv1, una línea celular DU145, o una combinación de cualesquiera dos o más de las mismas. En cualquier realización en el presente documento, puede que el cáncer de mama exhiba niveles de c-Myc significativamente mayores que los niveles de c-Myc en células mamarias normales. El cáncer de mama de cualquier realización en el presente documento puede incluir cáncer de mama triple negativo. El cáncer de mama de cualquier realización en el presente documento puede incluir al menos una mutación oncogénica encontrada en una línea celular BT-20, una línea celular MDA-MB-468, una línea celular MDA-MB-231, una línea celular MCF-7, una línea celular SKBR-3, una línea celular BT-474, o una combinación de cualesquiera dos o más de las mismas. El cáncer de mama de cualquier realización en el presente documento puede incluir al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 75 %, o aproximadamente un 100 % de mutaciones oncogénicas encontradas en una línea celular BT-20, una línea celular MDA-MB-468, una línea celular MDA-MB-231, una línea celular MCF-7, una línea celular SKBR-3, una línea celular BT-474, o una combinación de cualesquiera dos o más de las mismas. La administración de al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos puede ocurrir múltiples veces por día, aproximadamente dos veces por día, una vez por día, aproximadamente cinco veces por semana, aproximadamente cuatro veces por semana, aproximadamente tres veces por semana, aproximadamente dos veces por semana, aproximadamente una vez por semana, aproximadamente dos veces por mes, o cualquier intervalo que incluya y/o esté entre cualesquiera dos de estos valores.

El compuesto o composición para uso de cualquier realización en el presente documento puede incluir la administración de una composición, donde la composición incluye al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] (o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos) y un vehículo farmacéuticamente aceptable; el método de cualquier realización en el presente documento puede incluir la administración de un medicamento que incluya al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] (o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos).

De ese modo, la tecnología actual también proporciona composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) y medicamentos que incluyen al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] (o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos) y un vehículo farmacéuticamente aceptable (tal como uno o más excipientes o cargas). Las composiciones pueden usarse en las composiciones para el uso descrito en el presente documento. La composición farmacéutica puede incluir una cantidad eficaz de al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] (o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos). En cualquier realización en el presente documento, la cantidad eficaz puede determinarse en relación a un sujeto. "Cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto o composición requeridos para producir un efecto deseado. Un ejemplo no limitante de una cantidad eficaz incluye cantidades o dosificaciones que proporcionan toxicidad y niveles de biodisponibilidad aceptables para uso terapéutico (farmacéutico) incluyendo, pero sin limitarse a, tratamiento de cáncer de próstata o cáncer de mama. Otro ejemplo de una cantidad eficaz incluye cantidades o dosificaciones que proporcionan toxicidad y niveles de biodisponibilidad aceptables para uso terapéutico (farmacéutico) incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de próstata o cáncer de mama. Otro ejemplo de una cantidad eficaz incluye cantidades o dosificaciones que pueden reducir síntomas asociados al cáncer de próstata o cáncer de mama, tales como, por ejemplo, reducción de la proliferación y/o metástasis del cáncer. La cantidad eficaz puede ser de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 mg del compuesto por gramo de la composición, y, preferentemente, de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 500 µg del compuesto por gramo de la composición. Como se usa en el presente documento, un "sujeto" o "paciente" es un mamífero, tal como un gato, perro, roedor o primate. Normalmente, el sujeto es un ser humano, y, preferentemente, un ser humano que padece o se sospecha que padece cáncer de próstata o cáncer de mama. Los términos "sujeto" y "paciente" pueden usarse indistintamente.

En cualquiera de las realizaciones de la tecnología actual descritas en el presente documento, la composición farmacéutica puede envasarse en forma de dosificación unitaria. La forma de dosificación unitaria es eficaz para tratar el cáncer de próstata o cáncer de mama. Generalmente, una dosificación unitaria que incluye al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] (o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos)

variará dependiendo de aspectos del paciente. Tales aspectos incluyen, por ejemplo, edad, protocolo, condición, sexo, alcance de la enfermedad, contraindicaciones, terapias simultáneas y similares. Basándose en estos aspectos, un experto en la materia también puede ajustar o modificar una forma de dosificación unitaria a modo de ejemplo. Por ejemplo, una forma de dosificación unitaria para un paciente que comprende al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] (o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos) puede variar de 1×10^{-4} g/kg a 1 g/kg, preferentemente, de 1×10^{-3} g/kg a 1,0 g/kg. La dosificación de un compuesto de la tecnología actual también puede variar de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg o, preferentemente, de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg. Por ejemplo, la dosificación puede ser de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 150 mg del al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] por kilogramo del sujeto; en cualquier realización de un compuesto o composición para uso de la tecnología actual, el compuesto o composición para uso puede incluir la administración al sujeto de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg del al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp]. De ese modo, la dosificación/administración de al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] puede ser aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg, aproximadamente 18 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 22 mg/kg, aproximadamente 24 mg/kg, aproximadamente 26 mg/kg, aproximadamente 28 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 32 mg/kg, aproximadamente 34 mg/kg, aproximadamente 36 mg/kg, aproximadamente 38 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 42 mg/kg, aproximadamente 44 mg/kg, aproximadamente 46 mg/kg, aproximadamente 48 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 110 mg/kg, aproximadamente 120 mg/kg, aproximadamente 130 mg/kg, aproximadamente 140 mg/kg, aproximadamente 150 mg/kg, o cualquier intervalo que incluya y/o esté entre cualesquiera dos de estos valores.

Las formas de dosificación unitaria adecuadas incluyen, pero no se limitan a, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas para chupar, supositorios, parches, pulverizaciones nasales, inyectables, formulaciones implantables de liberación sostenida, películas mucoadherentes, barnices tópicos, complejos lipídicos, etc. Por ejemplo, en cualquier realización en el presente documento de la tecnología actual, puede incluirse al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] en una formulación líquida (tal como una formulación inyectable, una formulación intravenosa, una formulación subcutánea, y/o una formulación líquida oral) que incluya de aproximadamente 0,1 mg/ml (es decir, 0,1 mg compuesto por 1 ml de formulación líquida) a aproximadamente 50 mg/ml del al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp]. De ese modo, la formulación líquida puede incluir el al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] a aproximadamente 0,1 mg/ml, aproximadamente 0,2 mg/ml, aproximadamente 0,3 mg/ml, aproximadamente 0,4 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 0,6 mg/ml, aproximadamente 0,7 mg/ml, aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,9 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 26 mg/ml, aproximadamente 28 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 32 mg/ml, aproximadamente 34 mg/ml, aproximadamente 36 mg/ml, aproximadamente 38 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 42 mg/ml, aproximadamente 44 mg/ml, aproximadamente 46 mg/ml, aproximadamente 48 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, o cualquier intervalo que incluya y/o esté entre cualesquiera dos de estos valores.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mezclando al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp], sales farmacéuticamente, tautómeros de los mismos, o solvatos de los mismos, aceptables de los mismos, con uno o más vehículos, excipientes, aglutinantes, diluyentes o similares farmacéuticamente aceptables para prevenir y tratar trastornos asociados al cáncer de próstata y/o cáncer de mama. Para preparar formulaciones y medicamentos que tratan el cáncer de próstata y/o cáncer de mama pueden usarse *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] (o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos). Tales composiciones pueden estar en forma de, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, cápsulas, jarabes, supositorios, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las presentes composiciones pueden formularse para diversas vías de administración, por ejemplo, mediante administración oral, parenteral, tópica, rectal, nasal, vaginal o mediante un reservorio implantado. La administración parenteral o sistémica incluye, pero no se limita a, inyecciones subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales e intramusculares. Las siguientes formas de dosificación se dan a modo de ejemplo y no deberían interpretarse como una limitación de la presente tecnología actual.

Para administración oral, bucal y sublingual, son aceptables, como formas farmacéuticas sólidas, polvos, suspensiones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, cápsulas de gel y comprimidos encapsulados. Estos pueden prepararse, por ejemplo, mezclando al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp], o sales o tautómeros de los mismos, farmacéuticamente aceptables, con al menos un aditivo tal como un almidón u otro aditivo. Algunos aditivos adecuados son sacarosa, lactosa, azúcar de celulosa, manitol, maltitol,

dextrano, almidón, agar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma de tragacanto, goma arábiga, gelatinas, colágenos, caseína, albúmina, polímeros sintéticos o semisintéticos o glicéridos. Opcionalmente, las formas de dosificación oral pueden contener otros ingredientes para ayudar en la administración, tales como un diluyente inactivo, o lubricantes tales como estearato de magnesio, o conservantes tales como parabeno o ácido sórbico, o antioxidantes tales como ácido ascórbico, tocoferol o cisteína, un agente disgregante, aglutinantes, espesantes, tampones, edulcorantes, agentes aromatizantes o agentes perfumantes. Comprimidos y píldoras pueden tratarse además con materiales de revestimiento adecuados conocidos en la técnica.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden estar en forma de emulsiones, jarabes, elixires, suspensiones y soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener un diluyente inactivo, tal como agua. Las formulaciones farmacéuticas y los medicamentos pueden prepararse como suspensiones o soluciones líquidas usando un líquido estéril, tal como, pero sin limitarse a, un aceite, agua, un alcohol y combinaciones de estos. Para administración oral o parenteral pueden añadirse tensioactivos, agentes de suspensión y/o agentes emulsionantes farmacéuticamente adecuados.

Como se indicó anteriormente, las suspensiones pueden incluir aceites. Tales aceites incluyen, pero no se limitan a, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. La preparación en suspensión también puede contener ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones en suspensión pueden incluir alcoholes, tales como, pero sin limitarse a, etanol, alcohol isopropílico, alcohol hexadecílico, glicerol y propilenglicol. En formulaciones de suspensión también pueden usarse éteres, tales como, pero sin limitarse a, poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo tales como aceite mineral y vaselina; y agua.

Las formas de dosificación inyectables incluyen generalmente suspensiones acuosas o suspensiones oleosas que pueden prepararse usando un agente dispersante o humectante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en fase de solución o en forma de suspensión, que se prepara con un disolvente o diluyente. Los disolventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, solución de Ringer o una solución salina acuosa isotónica. Como disolventes o agentes de suspensión pueden emplearse aceites estériles. Normalmente, el aceite o ácido graso es no volátil, incluyendo aceites naturales o sintéticos, ácidos grasos, mono, di o triglicéridos.

Para inyección, la formulación farmacéutica y/o medicamento pueden ser un polvo adecuado para reconstitución con una solución apropiada como se describió anteriormente. Algunos ejemplos de estos incluyen, pero no se limitan a, polvos, polvos amorfos, gránulos, precipitados o partículas criodesecados, secados por rotación o secados por pulverización. Para inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizantes, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de biodisponibilidad, y combinaciones de dos o más de los mismos. Los vehículos y estabilizantes pueden variar y pueden incluir uno o más tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic o polietilenglicol), proteínas inocuas tales como albúmina sérica, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alditos. Por ejemplo, en cualquier realización de la tecnología actual desvelada en el presente documento, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir uno o más de un polietilenglicol, un monoéster de ácido graso de polietilenglicol, un monoéster de polietoxileno sorbitán, o una combinación de cualesquiera dos o más de los mismos.

Los compuestos de la tecnología actual pueden administrarse a los pulmones por inhalación a través de la nariz o la boca. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inhalación incluyen soluciones, pulverizaciones, polvos secos o aerosoles que contengan cualquier disolvente apropiado y, opcionalmente, otros compuestos tales como, pero sin limitarse a, estabilizantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de biodisponibilidad y combinaciones de estos. Los vehículos y estabilizantes varían según los requisitos del compuesto en particular, pero normalmente incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic o polietilenglicol), proteínas inocuas tales como albúmina sérica, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alditos. Para la administración de compuestos de la tecnología actual mediante inhalación, normalmente se usan aerosoles acuosos y no acuosos (por ejemplo, en un propulsor de fluorocarbono).

Las formas de dosificación para la administración tópica (incluyendo bucal y sublingual) o transdérmica de compuestos de la tecnología actual incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones y parches. El componente activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante o tampón que pueda requerirse. Polvos y pulverizaciones pueden prepararse, por ejemplo, con excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Las pomadas, pastas, cremas y geles también pueden contener excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos. También pueden usarse potenciadores de absorción para aumentar el flujo de los compuestos de la tecnología actual a través de la piel. La velocidad de tal flujo puede controlarse proporcionando una membrana de control de velocidad (por ejemplo, como parte de un parche transdérmico) o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

Además de las formas de dosificación representativas descritas anteriormente, los expertos en la materia conocen generalmente excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables y, de ese modo, se incluyen en la presente tecnología actual. Tales excipientes y vehículos se describen, por ejemplo, en "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., Nueva Jersey (1991).

Las formulaciones de la tecnología actual pueden diseñarse para ser de acción corta, liberación rápida, acción prolongada y liberación sostenida, como se describe a continuación. De ese modo, las formulaciones farmacéuticas también pueden formularse para liberación controlada o para liberación lenta.

Las presentes composiciones también pueden incluir, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un efecto prolongado de almacenamiento y/o administración. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas y medicamentos pueden comprimirse en gránulos o cilindros e implantarse por vía intramuscular o subcutánea como inyecciones de depósito o como implantes tales como *stents*. Tales implantes pueden emplear materiales inertes conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables.

Las dosificaciones específicas pueden ajustarse dependiendo de las condiciones de la enfermedad, la edad, peso corporal, condiciones generales de salud, sexo y dieta del sujeto, intervalos de dosis, vías de administración, velocidad de excreción y combinaciones de fármacos. Cualquiera de las formas de dosificación anteriores que contengan cantidades eficaces está dentro de los límites de la experimentación rutinaria y, por tanto, dentro del alcance de la presente tecnología actual.

De acuerdo con la tecnología actual, pueden emplearse fácilmente diversos ensayos y sistemas modelo para determinar la eficacia terapéutica del tratamiento.

Para cada una de las condiciones indicadas descritas en el presente documento, los sujetos de ensayo exhibirán una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 50 % o mayor, hasta una reducción del 75-90 %, o 95 % o mayor, de uno o más síntomas causados por, o asociados a, el trastorno en el sujeto, en comparación con sujetos tratados con placebo u otros sujetos de control adecuados.

En el presente documento, los ejemplos se proporcionan para ilustrar ventajas de la tecnología actual y además para ayudar, a una persona con conocimientos ordinarios en la materia, en la preparación o uso de la tecnología actual. En el presente documento, los ejemplos también se presentan para ilustrar más completamente los aspectos preferentes de la tecnología actual. Los ejemplos no deberían interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la tecnología actual, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los ejemplos pueden incluir o incorporar cualquiera de las variaciones, aspectos o aspectos de la tecnología actual que entran dentro del alcance de las reivindicaciones. Además, las variaciones, realizaciones o aspectos descritos anteriormente pueden incluir o incorporar las variaciones de cualquiera o todas las demás variaciones, realizaciones o aspectos de la tecnología actual que entran dentro del alcance de las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Procedimientos sintéticos y caracterización a modo de ejemplo

Líneas celulares y condiciones de cultivo celular. Se cultivaron células PC-3 de cáncer de próstata humano y se mantuvieron en EMEM (ATCC), se cultivaron células HEK (riñón embrionario humano) no prostáticas en DMEM, se cultivaron células DU145, LNCaP, 22Rv1 de cáncer de próstata humano en RPMI 1640 (ATCC), y se cultivaron células prostáticas BPH-1 normales y la línea celular C4-2 de cáncer de próstata en RPMI 1640 (ATCC), conteniendo todas suero bovino fetal al 10 % (Atlanta Biologicals) y penicilina/estreptomycin al 1 % (Invitrogen). Las células se cultivaron a 37 °C en aire humidificado con CO₂ al 5 % y se pasaron cada cuarto o quinto día después de tripsinación con tripsina/EDTA (Invitrogen).¹⁶

Ensayo de proliferación celular. Se cultivaron células PC-3, LNCaP, DU 145, 22Rv1, C4-2, BPH-1 y HEK hasta una densidad de 2000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron con [D-Trp]CJ-15,208 u otros péptidos durante 24-72 h por duplicado. Los medios que contenían [D-Trp]CJ-15,208 se cambiaron cada 24 h. La proliferación de las células tratadas se determinó usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se comparó con las células de control tratadas en DMSO al 1 % en el medio. Después del tratamiento con compuesto, se añadieron 10 µl del reactivo al pocillo en 100 µl de medio de cultivo y las células se incubaron a 37 °C durante 30 min. La absorbancia de los medios en cada pocillo se midió a 410 nm usando un lector de placas (BioTek). El porcentaje de proliferación celular se normalizó con respecto a células de control tratadas con vehículo y se calculó como: (absorbancia media de la muestra/absorbancia media de las células de control) x 100.³⁸

Ensayo de viabilidad celular. La viabilidad de las células de cáncer de próstata se determinó usando azul de tripano (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta una

densidad de 1×10^5 células/pocillo hasta confluencia del 75 % y se trataron con compuesto en DMSO al 0,5 % a las concentraciones indicadas durante 24-72 h, con DMSO al 0,5 % como control de vehículo. Después del tratamiento, se recogió el medio celular de cada pocillo. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se tripsinaron y se recogieron. Las células, los medios combinados y los lavados se centrifugaron a $250 \times g$ durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 500 µl de PBS. Se añadió azul de tripano (10 µl) a 100 µl de células resuspendidas y la solución se incubó durante 10 min. A continuación, se hizo el recuento del número de células en 10 µl usando un hematocitómetro. Las células viables (sin teñir) se diferenciaron de las células muertas (color azul) y el % de células viables se calculó como sigue: $[(\text{Número de glóbulos blancos})/(\text{número de células totales (blancas + azul)})] \times 100$ y se comparó con células sin tratar.¹⁶

Análisis de transferencia de Western. Se sembraron células en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo y crecieron hasta confluencia del 75 %. Las células se trataron con [D-Trp]CJ-15,208 a las concentraciones indicadas. A continuación, las células se cosecharon como se describió anteriormente, y los sedimentos celulares se sometieron a lisis en tampón RIPA que consistía en Tris HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton-X-100 al 1 %, SDS al 0,1 %, desoxicolato sódico al 1 %, y un cóctel inhibidor de proteasas con n.º P8340 (Sigma). Los lisados celulares se centrifugaron a 13×1000 rpm durante 15 min y se recogieron los sobrenadantes. La concentración proteica total se midió en lisados celulares usando el ensayo estándar de Bradford. Se realizó electroforesis en gel de SDS usando gel de poliacrilamida al 4-20 % (BioRad). El análisis de transferencia de Western se realizó usando los siguientes anticuerpos: i) c-Myc n.º 5605 (monoclonal de conejo, dilución 1:2000, (Cell Signaling Technologies)); actina n.º A2228 (monoclonal de ratón, dilución 1:5000 (Sigma)), PP2A n.º 610555 (monoclonal de ratón, dilución 1:5000, BD Biosciences), p-PP2A n.º 1155-1 (policlonal de conejo, dilución 1:5000 (Epitomics)), Erk n.º 9107 (monoclonal de ratón, dilución 1:2000 (Cell Signaling Technologies) y p-Erk n.º 4376 (monoclonal de conejo, 1:2000 (Cell Signaling Technologies)); Akt n.º 2920 (monoclonal de ratón, dilución 1:2000 (Cell Signaling Technologies)), p-Akt n.º 4056 (monoclonal de conejo, 1:2000 (Cell Signaling Technologies)). Los anticuerpos secundarios, cabra-anti-ratón n.º 116-035-003 y cabra-anti-conejo n.º 111-035-003, se obtuvieron en Jackson ImmunoResearch Laboratory. Las densidades de las señales de las bandas proteicas se determinaron usando el *software* ImageJ (NIH) y se normalizaron con respecto al control de carga interno (actina).

Análisis del ciclo celular. Las células PC-3 se cultivaron en un matraz T-75 hasta confluencia del 75 % y se trataron con [D-Trp]CJ-15,208 $10 \mu\text{M}$ en DMSO al 0,5 % o DMSO al 0,5 % como control de vehículo durante 24-48 h. Después del tratamiento, el medio celular se recogió, las células se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo, y los lavados se recogieron con el medio. A continuación, las células se tripsinaron y las células y los medios combinados se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. El sedimento celular se resuspendió en PBS, el recuento celular se hizo usando un hematocitómetro y 1 millón de células se resuspendieron en 300 µl de PBS. Las células se fijaron con 700 µl de etanol al 100 % enfriado con hielo durante la noche y a continuación se centrifugaron a 1200 rpm. Tras la eliminación del etanol, las células se resuspendieron en 500 µl de PBS que contenía $100 \mu\text{g/ml}$ de ARNasa y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió solución de yoduro de propidio (IP) (Sigma, $100 \mu\text{g/ml}$) y, a continuación, la solución se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. El análisis del ciclo celular³⁸ se realizó con un citómetro de flujo MoFlo XDP de Beckman-Coulter y la distribución de fases del ciclo celular se analizó con FlowJo v10.1.

Ensayo de anexina V-APC/IP. El alcance de la apoptosis se analizó mediante detección de la expresión superficial de fosfatidilserina en células apoptóticas usando un kit I de detección de apoptosis de tinción doble con anexina V-APC/IP (BD Biosciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después del tratamiento de células PC-3 con [D-Trp]CJ-15,208 $10 \mu\text{M}$ o vehículo durante 24 h o 48 h, las células se recogieron, se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en tampón de unión 1X a una concentración de 1×10^6 células/ml. La suspensión celular (100 µl) se transfirió a un tubo de cultivo de 5 ml, y se añadieron 5 µl de Anexina V-APC y 25 µl de IP ($50 \mu\text{g/ml}$). Las células se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación vorticial, a continuación se añadieron 400 µl de tampón de unión 1X a cada muestra, y las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo MoFlo XDP de Beckman-Coulter en una hora. El número de células viables, apoptóticas y necróticas se cuantificó usando FlowJo v10.0.7. La fracción de apoptosis (%) se calculó como $(\text{número de células apoptóticas/número total de células observadas}) \times 100 \%$.³⁸

Medición de ARNm de c-Myc. Se cultivaron células PC-3 en placas de Petri de 10 cm hasta confluencia del 75 %, y a continuación se trataron con [D-Trp] CJ-15,208 ($10 \mu\text{M}$) durante 2-48 h. Se recogieron las células y se aisló el ARN total de cada muestra usando el mini kit de ARN total Aurum n.º 732-6820 (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN en la muestra se determinó usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Se usó ARN total (1 µg) de cada muestra para sintetizar ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad). Se realizó PCR en tiempo real con una mezcla maestra para PCR Power-SYBR Green (Applied Biosystems) usando los siguientes ciclos térmicos: activación inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. La fluorescencia se determinó a la temperatura de fusión del producto durante 20 s (sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). Se usaron los siguientes conjuntos de cebadores para amplificar regiones de c-Myc y GAPDH (control interno): c-Myc (directo: 5'-CTG GTG CTC CAT GAG GAG -3', inverso: 5'-AGG TGA TCC AGA CTC TGA C-3') y GAPDH (directo: 5'-CCA TGG AGA AGG CTG GGG-3', inverso: 5'-CAA ATG TGT CAT GGA TGA CC-3'). Los niveles de ARNm de c-Myc se normalizaron con respecto a los niveles de ARNm de GAPDH.³⁷

Atenuación génica de c-Myc. Se sembraron células PC-3 a una densidad de 2×10^6 células en placas de 10 cm y se cultivaron hasta confluencia del 75-85 % en EMEM suplementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina. A continuación, el medio se reemplazó con EMEM sin antibióticos que contenía FBS al 10 %, y las células se incubaron durante un mínimo de 12 h. Se prepararon soluciones que contenían ARNsi 500 nM frente a c-Myc n.º L-003292-02-0005, ARNsi 500 nM no dirigido n.º D-001810-10-05, o DharmaFECT 2 al 5 % (v/v) n.º T-2002-02 (Dharmacon) en optiMEM con Glutamax (Gibco) para obtener un volumen final de 1 ml cada una. Después de incubar 5 min a temperatura ambiente, las soluciones de ARNsi y DharmaFECT se combinaron y se incubaron durante un periodo adicional de 20 min a temperatura ambiente. A continuación, el complejo de transfección se añadió a las células en EMEM fresco sin antibióticos que contenía FBS al 10 %, y las células se incubaron durante 24 h. Las células se dividieron en dos placas de cultivo tisular de 10 cm en EMEM suplementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina, y se permitió la adherencia durante otras 24 h. Las células se trataron con [D-Trp]CJ-15,208 10 μ M o control de vehículo de DMSO al 0,5 % durante 48 h en total. A continuación, las células se recogieron y se prepararon para el ensayo de anexina V-APC/IP como se describió anteriormente. Las muestras se analizaron usando un analizador celular BD FACSCanto-II y se cuantificaron en FlowJo v10.2.

Sobreexpresión de c-Myc. La expresión forzada de c-Myc en células HEK 293 se realizó usando X-temeGENE HP n.º 6366244001 (Sigma). Las células se cultivaron en DMEM sin antibióticos suplementado con FBS al 10 % y se transfectaron con pcDNA3-HA-HA-c-Myc n.º 74164 (Addgene). Como control se usó el vector vacío pcDNA3-EV. Las células transfectadas se seleccionaron con 500 μ g/ml de G418 durante 2 semanas. A continuación, las células transfectadas se sembraron en placas de cultivo tisular de 10 cm y se dejaron crecer hasta confluencia del 75 % en DMEM suplementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina. Las células se trataron con [D-Trp]CJ-15,208 10 μ M o control de vehículo de DMSO al 0,5 % durante 48 h en total, tras lo cual, las células se recogieron y se prepararon para el ensayo de anexina V-APC/IP como se describió anteriormente. Las muestras se analizaron usando un analizador celular BD FACSCanto-II y se cuantificaron en FlowJo v10.2.

Análisis estadístico. Cada experimento se realizó por triplicado a menos que se indique lo contrario en la leyenda de la figura. Para determinar los valores de Cl_{50} se usó GraphPad Prism 5. Los datos representan el valor medio $\pm$ ETM. Se compararon células tratadas con compuesto frente a vehículo en la fase del ciclo celular y experimentos de apoptosis (Figuras 5-8) usando el ensayo t de Student, con un método para muestras no relacionadas, bilateral, usando el *software* Prism. Los efectos del tratamiento con el compuesto frente a vehículo en los niveles de proteína (Figura 10) se evaluaron mediante ANOVA unidireccional con el ensayo de Dunnett para comparaciones múltiples.

Resultados

Muchas células cancerosas, incluyendo células de cáncer de próstata, sobreexpresan c-Myc.^{9, 30} Se examinó el efecto de varios ligandos del receptor opioide kappa (KOR), incluyendo los tetrapéptidos macrocíclicos CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208 (Figuras 1 A y B), el agonista endógeno de KOR, dinorfina A (Din. A, Figura 1C),²⁸ y el antagonista de KOR, *zyklophin* (Figura 1D),³¹ en niveles celulares de proteína c-Myc. Los niveles celulares de proteína c-Myc disminuyeron 5 veces (Figura 1E, carriles 4 y 5) después de tratamiento con CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208, pero no disminuyeron por tratamiento con dinorfina A por su análogo antagonista *zyklophin* (Figura 1E, carriles 2 y 3). Un ensayo de unión de radioligandos para KOR, realizado en condiciones estándar usando [³H]diprenorfina (y Din. A-(1-13) amida para determinar la unión no específica³²), no mostró unión específica de KOR a células PC-3. Las células PC-3 se trataron con 10 μ M del antagonista opioide no selectivo naloxona durante 48 h, que no mostró efecto en los niveles de proteína c-Myc (Figura 1F, carril 3), y no alteró la disminución de los niveles de proteína c-Myc causada por [D-Trp]CJ-15,208 (carril 4 frente a carril 2). Estos resultados demuestran que el efecto que tienen estos tetrapéptidos cíclicos sobre c-Myc en las células de cáncer de próstata no está mediado por KOR.

Tanto [D-Trp]CJ-15,208 como CJ-15,208 redujeron los niveles de proteína c-Myc en células PC-3 de manera dependiente de la concentración después de tratamiento de 48 h (Figura 2A y 2B), causando una reducción de aproximadamente 50 % a 10 μ M (Figura 2A, carril 3, y Figura 2B, carril 4). CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208 demostraron proliferación celular reducida en células PC-3 después de 48 h, exhibiendo valores de Cl_{50} de $10,1 \pm 0,9 \mu$ M y $16,5 \pm 0,7 \mu$ M para CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208, respectivamente (Figura 2C). El tratamiento de células PC-3 con 10 μ M de [D-Trp]CJ-15,208 de 0 h a 48 h no afectó a la expresión del ARNm en ningún momento (Figura 2D). Estos resultados indican que [D-Trp]CJ-15,208 disminuye los niveles de proteína c-Myc en estas células cancerosas, pero no afecta a la transcripción génica de c-Myc.

Se realizaron ensayos de proliferación celular (Figuras 3A-3G) usando WST-1 (Roche) como se describe en el presente documento. [D-Trp]CJ-15,208 inhibió el crecimiento celular en la mayoría de las líneas celulares de cáncer de próstata (Tabla 1), con valores de Cl_{50} de $3,0 \pm 1,0 \mu$ M en células LNCaP después de tratamiento de 72 h, $1,2 \pm 0,2 \mu$ M en células DU145 después de tratamiento de 48 h, y $8,8 \pm 4,0 \mu$ M en células 22Rv1 después de tratamiento de 48 h. [D-Trp]CJ-15,208 no tuvo efecto en la proliferación celular de células C4-2, una línea celular de cáncer de próstata resistente a castración (CPRC). No se observó toxicidad de [D-Trp]CJ-15,208 en células BPH-1 o células HEK (Tabla 1). Los niveles de proteína c-Myc en las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata y células normales (Figura 3H) fueron coherentes con la citotoxicidad de [D-Trp]CJ-15,208. Todas las líneas celulares de cáncer de próstata, excepto las células C4-2 expresaron niveles altos de proteína c-Myc celular, mientras que las

células BPH-1 y las células C4-2 tenían niveles bajos de proteínas c-Myc.

El tratamiento de varias líneas celulares de cáncer de próstata con [D-Trp]CJ-15,208 dio como resultado disminución del crecimiento celular y muerte celular: i) las células PC-3 independientes de andrógenos y altamente metastásicas, ii) células mCRPC 22Rv1, y iii) células LNCaP dependientes de andrógenos, poco metastásicas, con valores de Cl_{50} que variaban de 2 a 12 μM después de tratamiento de 48-72 h (Figuras 3A-3H, Tabla 1). Todas estas líneas celulares donde [D-Trp]CJ-15,208 disminuyó el crecimiento celular exhibían altos niveles de proteína c-Myc independientemente de si eran células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos (LNCaP) o metastásicas independientes (PC-3)/resistentes a la castración (22Rv1). El tratamiento con el péptido durante 48 h disminuyó los niveles de proteína c-Myc de manera dependiente de la concentración en células de cáncer de próstata (Figuras 2A-2D). El tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 no previno la proliferación celular en células C4-2 de cáncer de próstata donde los niveles de proteína c-Myc no eran elevados, ni en células normales (células BPH-1 o HEK). El tratamiento con el péptido tampoco alteró los niveles de ARNm de *cmyc*. Estos resultados muestran que [D-Trp]CJ-15,208 inhibe el crecimiento de células cancerosas mediante sus efectos en los niveles de proteína c-Myc.

Tabla 1. Efecto de [D-Trp]CJ-15,208 en el crecimiento celular.

Línea celular	¿Línea de célula cancerosa?	¿Responde a andrógenos?	¿Sobreexpresión de receptor androgénico?	48 h * Cl_{50} (μM)	72 h * Cl_{50} (μM)
^a PC-3 ⁴⁶	Sí	No, independiente	Muy baja	16,5 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 1,0
^b LNCaP ⁴⁶	Sí	Sí, dependiente	Sí	>50	3,0 $\pm$ 1,1
^c DU145 ⁴⁶	Sí	No, independiente	Muy baja	1,2 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1
^{a, d} C4-2 ⁴⁶	Sí	No, independiente	Sí, mutada, truncada	Sin efecto	Sin efecto
^{a, d} 22Rv1 ⁴⁶	Sí	No, independiente	Sí, mutada, truncada	8,8 $\pm$ 4,0	4,0 $\pm$ 0,8
^e BPH-1 ⁴⁶	No	No	No, normal	Sin efecto	Sin efecto
^f HEK	No	No	No	Sin efecto	Sin efecto
*Los valores de Cl_{50} son $\pm$ E.T.M promedio de la medición por triplicado de dos experimentos independientes; ^a altamente metastásico; ^b poco metastásico; ^c moderadamente metastásico; ^d resistente a castración; ^e células prostáticas normales; ^f células no prostáticas.					

Las Figuras 4A-D muestran que el tratamiento de células de cáncer de próstata (PC-3, LNCaP, y 22Rv1) durante 48 h y 72 h con [D-Trp]CJ-15,208 dio como resultado muerte celular usando el ensayo de azul de tripano descrito en el presente documento. Por el contrario, no se observó evidencia de muerte celular con células BPH-1 después de tratamiento con 1-40 μM de [D-Trp]CJ-15,208 durante 48 h.

Las Figuras 5A y 5B muestran el efecto en la progresión del ciclo celular en células PC-3 después de tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 de acuerdo con la tecnología actual. Después del tratamiento con 10 μM de [D-Trp]CJ-15,208 durante 24 h o 48 h, se acumuló un mayor número de células (al menos 8 veces mayor) en la fase G2 en comparación con las células de control tratadas con vehículo (5 $\pm$ 1,5 % para control, 42 $\pm$ 4 % después de 24 h, y 58 $\pm$ 4 % después de 48 h de tratamiento). La población celular media en la fase G1 fue 53 $\pm$ 6 % para control, 32 $\pm$ 1 % para 24 h, y 31 $\pm$ 6 % para 48 h de tratamiento. La distribución celular media en la fase S fue 45 $\pm$ 4 % para control, 26 $\pm$ 4 % después de 24 h, y 12 $\pm$ 0,6 % después de 48 h de tratamiento.

El tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 indujo apoptosis en células PC-3 de manera dependiente del tiempo y causó la parada del ciclo celular (Figuras 5A y 5B). Se observó un aumento de apoptosis temprana y tardía después de 48 h de tratamiento, pero no se encontró inducción de apoptosis significativa después de 24 h de tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208. La distribución del ciclo celular es un proceso complicado, controlando c-Myc estrictamente las proteínas clave del punto de control del ciclo celular en las fases G1 a M, incluyendo ciclinas, CDK, p21 y p53.³⁸ Varios estudios han demostrado que la parada del ciclo celular mediante supresión de c-Myc puede ocurrir mediante dos mecanismos: i) expresión descontrolada de genes de puntos de control dependientes de c-Myc, tales como CDK o CDK1 (p21), o ii) cambios en la expresión génica en rutas metabólicas celulares específicas que están directamente reguladas por c-Myc.⁴¹⁻⁴³ El tratamiento de células PC-3 con [D-Trp]CJ-15,208 durante 24 h o 48 h dio como resultado la parada del ciclo celular en la fase G2, previniendo la entrada en mitosis y división celular de las células cancerosas. Estos resultados indican que [D-Trp]CJ-15,208 induce una parada del crecimiento de manera significativa en la fase G2 en la progresión del ciclo celular en células PC-3 (Figura 5B).

Las Figuras 6A y 6B demuestran inducción de apoptosis en células PC-3. En la Figura 6A, el cuadrante superior izquierdo (Q1) mostró la presencia de células en apoptosis temprana teñidas positivamente por anexina V pero no teñidas por IP, el cuadrante superior derecho (Q2) mostró las células apoptóticas tardías que tanto IP como anexina V tiñeron positivamente, el cuadrante inferior derecho (Q3) mostró las células muertas teñidas positivamente solo IP pero no con anexina V, y el cuadrante inferior izquierdo (Q4) mostró las células viables que no se tiñeron ni con IP ni con anexina V. Como se muestra en la Figura 6B, después de 48 h de tratamiento con 10 μ M de [D-Trp]CJ-15,208, el número de células en apoptosis temprana y tardía aumentó 10 y 3 veces, respectivamente, en comparación con células de control tratadas con vehículo. No se observaron cambios significativos en el número de células en apoptosis temprana y tardía después de 24 h de tratamiento con 10 μ M de [D-Trp]CJ-15,208 (Figura 6B).

Se realizaron experimentos de atenuación génica y sobreexpresión de c-Myc para mostrar los efectos de la regulación negativa de c-Myc de [D-Trp]CJ-15,208. La Figura 7A muestra los experimentos de atenuación génica para células PC-3 transfectadas con ARNsi frente a c-Myc o un ARNsi no dirigido y tratadas posteriormente con [D-Trp]CJ-15,208 10 μ M durante 48 h. Se analizó la apoptosis de las células. La Figura 7B muestra que el tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 aumentó de forma significativa la apoptosis temprana en células transfectadas con ARNsi no dirigido, pero no afectó significativamente al porcentaje de células transfectadas con el ARNsi frente a c-Myc que experimentó apoptosis temprana. La Figura 7C muestra el análisis de transferencia de Western para la atenuación génica de c-Myc en las células transfectadas con ARNsi frente a c-Myc. De ese modo, los datos ilustran que las células PC-3, en las que c-Myc está regulado negativamente ya no exhiben un aumento de apoptosis temprana después de tratamiento con el péptido.

Las células HEK-293 transfectadas con un pcDNA que contenía un inserto de c-Myc humano marcado con HA para sobreexpresar la proteína o un control de vector también se trataron con [D-Trp]CJ-15,208 10 μ M durante 48 h y se analizó la apoptosis de las células. La Figura 8B muestra que las células que sobreexpresaban c-Myc y tratadas con [D-Trp]CJ-15,208 mostraron un aumento significativo de apoptosis temprana, coherente con lo observado en células PC-3. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en células transfectadas con el vector vacío. La Figura 8C proporciona el análisis de transferencia de Western que muestra la sobreexpresión de c-Myc en las células transfectadas con el plásmido que contenía c-Myc. En experimentos complementarios de aumento de función, las células HEK que sobreexpresaban c-Myc se volvieron sensibles al tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208, mostrando un aumento significativo de apoptosis temprana después de tratamiento con el péptido (Figuras 8A-8C).

La estabilidad de la proteína c-Myc celular se determinó mediante la regulación estricta de su estado de fosforilación^{11, 13, 33}. La degradación de la proteína c-Myc es importante para mantener las funciones celulares normales, mientras que se han encontrado altos niveles de proteína c-Myc en diversas células cancerosas, incluyendo cáncer de próstata^{13, 16}. Los diagramas esquemáticos en las Figuras 9A y 9B ilustran la ruta que determina la estabilidad de c-Myc en células normales (Figura 9A) frente a células cancerosas (Figura 9B). Una serie de enzimas clave, principalmente Erk, PI3K/Akt, y PP2A, están implicadas en la regulación de la fosforilación de c-Myc y su degradación a través de esta ruta.

El estado de fosforilación de c-Myc desempeña un papel importante en la determinación de la estabilidad y acumulación de c-Myc en células. En condiciones celulares normales (Figura 9A), la activación de Ras en la fase G1 temprana del ciclo celular desencadena fosforilación y degradación de c-Myc mediante una cascada orquestada de reacciones enzimáticas. A diferencia de las células normales, Ras activa tanto Erk como Akt mediante fosforilación en la fase G1 tardía y temprana en células malignas, mejorando la estabilidad de c-Myc (Figura 9B). p-Erk fosforila a c-Myc en Ser62 y p-Akt inhibe la fosforilación de GSK-3 β de c-Myc en Thr58. Estos episodios de fosforilación impiden el resto de las etapas en la ruta de degradación de c-Myc, aumentando la estabilidad de c-Myc en las células^{11, 13} (Figura 9B).

Las Figuras 10A, 10B, y 10C muestran el estado de fosforilación celular y niveles de proteína total de tres enzimas clave, Erk, Akt, y PP2A después de tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 a las concentraciones indicadas durante 48 h. Los niveles celulares de p-Erk y p-Akt, que son las formas activadas de estas enzimas, no cambiaron significativamente después del tratamiento con concentraciones crecientes de [D-Trp]CJ-15,208 (Figuras 10A y 10B). Los niveles de proteína Erk total tampoco disminuyeron significativamente. Se observó una disminución significativa de los niveles de proteína Akt total cuando las células se trataron con la mayor concentración (50 μ M) de [D-Trp]CJ-15,208 (Figura 10B). Sin quedar ligado a la teoría, se cree que PP2A desfosforila a fosfo-Ser62 c-Myc, conduciendo a degradación de c-Myc en células^{11,34}. Estudios previos han encontrado un vínculo entre fosforilación de la tirosina 307 C-terminal de PP2A, dando como resultado inactivación de su actividad fosfatasa^{16, 35, 36, 37}. El nivel de pTyr307-PP2A en células PC-3 fue alto en células tratadas con vehículo. El tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 a concentraciones $\geq$ 10 μ M redujo significativamente los niveles de p-PP2A en células (Figura 10C). Los niveles de proteína PP2A no fueron significativamente diferentes a los de las células tratadas con vehículo. Tomados en conjunto, los resultados muestran que el tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208, de acuerdo con la tecnología actual, reduce el nivel de p-PP2A en células PC-3, aumenta la degradación de c-Myc, y reduce el crecimiento de células cancerosas (Figura 10D). [D-Trp]CJ-15,208 no tuvo efectos significativos en los niveles de p-Erk o p-Akt, pero redujo significativamente los niveles de p-PP2A de manera dependiente de la concentración, conduciendo a degradación de c-Myc y reducción del crecimiento de células cancerosas (Figuras 10A-10D). De ese modo, los resultados demuestran que [D-Trp]CJ, 15-208 regula una proteína implicada en la degradación de c-Myc, dando como resultado

una disminución de los niveles de proteína c-Myc en células de cáncer de próstata y disminución del crecimiento celular.

Modelo *in vivo* para cáncer de próstata

Se realizó un estudio *in vivo* para determinar la inhibición del crecimiento tumoral por [D-Trp]CJ-15,208 en un modelo de xenoinjerto de ratón. Se inyectaron células PC-3 por vía subcutánea en ambos costados traseros de ratones lampiños. Una vez establecidos los tumores, los ratones se trataron por vía intraperitoneal tres veces por semana con cualquiera de vehículo (DMSO al 50 %, PEG 400 al 45 %, y monooleato de sorbitán (20) polioxietilenado al 5 % (Tween 80); 3 ratones, 6 tumores) o [D-Trp]CJ-15,208 (30 mg/kg en vehículo; 2 ratones, 3 tumores). El volumen tumoral se midió usando calibradores.

Resultados: Los ratones inyectados con células PC-3 recibieron tratamiento con [D-Trp]CJ-15,208 o con vehículo como se describe en el presente documento. Como se ilustra en la Figura 10, los ratones tratados con [D-Trp]CJ-15,208 exhibieron una disminución del crecimiento tumoral en comparación con ratones tratados con control tratado con vehículo.

CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208 poseen varias ventajas con respecto a la actividad anticáncer. Son activos después de administración oral y no mostraron evidencias de toxicidad en ratones a una dosis de 60 mg/kg en ratones^{24, 25}. Una ventaja adicional es que parece que estos tetrapéptidos macrocíclicos atraviesan la barrera hematoencefálica en ratones después de administración sistémica,^{24, 25} haciendo que estos compuestos sean particularmente útiles para cánceres de próstata que metastatizan en el cerebro.

Tomados en conjunto, los datos ilustran que CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208 son útiles en el tratamiento de cáncer de próstata (tal como el cáncer de próstata avanzado).

Actividad anticáncer de mama

Como se discutió anteriormente en el presente documento, c-Myc está sobreexpresada en un 30-50 % de tumores de cáncer de mama de gran malignidad, y se ha informado la activación de c-Myc en la progresión del cáncer de mama (Fallah, Y.; Brundage, J.; Allegakoen, P.; Shajahan-Haq, A. N. Rutas dirigidas por MYC en subtipos de cáncer de mama. *Biomolecules* 2017, 7). Las evidencias indican que la sobreexpresión de c-Myc contribuye al desarrollo de resistencia a terapia hormonal en tumores positivos para receptores estrogénicos (RE) (McNeil, C. M.; Sergio, C. M.; Anderson, L. R.; Inman, C. K.; Eggleton, S. A.; Murphy, N. C.; Millar, E. K.; Crea, P.; Kench, J. G.; Alles, M. C.; Gardiner-Garden, M.; Ormandy, C. J.; Butt, A. J.; Henshall, S. M.; Musgrove, E. A.; Sutherland, R. L. Sobreexpresión de c-Myc y resistencia endocrina en cáncer de mama. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006, 102, 147-155; Shajahan-Haq, A. N.; Cook, K. L.; Schwartz-Roberts, J. L.; Eltayeb, A. E.; Demas, D. M.; Warri, A. M.; Facey, C. O.; Hilakivi-Clarke, L. A.; Clarke, R. MYC regula la respuesta de proteína no plegada y glucosa y captación de glutamina en cáncer de mama de resistencia endocrina. *Mol Cancer* 2014, 13, 239). La expresión de c-Myc también es elevada en el cáncer de mama triple negativo (CMTN) en comparación con tumores que expresan RE o HER2, y la sobreexpresión de c-Myc en CMTN se correlaciona con un mal pronóstico (Horiuchi, D.; Kusdra, L.; Huskey, N. E.; Chandriani, S.; Lenburg, M. E.; Gonzalez-Angulo, A. M.; Creasman, K. J.; Bazarov, A. V.; Smyth, J. W.; Davis, S. E.; Yaswen, P.; Mills, G. B.; Esserman, L. J.; Goga, A. La activación de la ruta de MYC en cáncer de mama triple negativo es letal sintética con inhibición de CDK. *J Exp Med* 2012, 209, 679-696). De ese modo, basándose en los datos presentados anteriormente, se espera que CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208 disminuyan la proliferación de células cancerosas al disminuir la expresión de c-Myc en estos tumores y, por tanto, sean útiles para tratar estos tipos de cáncer de mama.

Modelo *in vitro* para cáncer de mama

Se evaluará la actividad antiproliferativa y efectos en los niveles de c-Myc de CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208 en varias líneas celulares de CMTN (BT-20, MDA-MB-468 y MDA-MB-231) así como otras líneas celulares de cáncer de mama con diferentes patrones de expresión de receptores (MCF-7 (RE+/RP+/HER2-), SKBR-3 (RE-/RP-/HER2+), y BT-474 (RE+/RP+/HER2+)). Las células se tratarán por triplicado con concentraciones del tetrapéptido macrocíclico entre 0,1 y 50 μ M o vehículo (control). El reactivo WST-1 se añadirá 0-72 horas después del tratamiento y se medirá la absorbancia para determinar efectos del compuesto en la proliferación celular. Las células se tratarán por duplicado con vehículo (control) o el tetrapéptido macrocíclico a las concentraciones y un período de tiempo elegidos basándose en los estudios de antiproliferación, las células sometidas a lisis y los niveles de proteína c-Myc se determinarán mediante análisis de transferencia de Western. Se espera que tanto CJ-15,208 como [D-Trp]CJ-15,208 disminuyan la proliferación de células cancerosas en las líneas celulares que exhiben niveles altos de c-Myc (es decir, niveles de c-Myc significativamente mayores que los niveles de c-Myc en células mamarias normales).

Modelo *in vivo* para cáncer de mama

La actividad antiproliferativa *in vivo* de CJ-15,208 y [D-Trp]CJ-15,208 se evaluará en modelos de xenoinjerto tumoral en ratones inmunocomprometidos utilizando líneas celulares de cáncer de mama humano elegidas basándose en los

resultados de los estudios *in vitro* descritos en el presente documento. Una vez establecidos los tumores, los ratones se tratarán por vía intraperitoneal tres veces por semana con vehículo (DMSO al 50 %, PEG 400 al 45 %, y Tween 80 al 5 %; 3 ratones, 6 tumores) o [D-Trp]CJ-15,208 (30-60 mg/kg en vehículo; 2 ratones, 3 tumores). El volumen tumoral se medirá usando calibradores para determinar la reducción de la proliferación tumoral en comparación con ratones de control que reciben vehículo. Se espera que tanto CJ-15,208 como [D-Trp]CJ-15,208 proporcionen una reducción significativa de la proliferación tumoral en comparación con los ratones de control.

REFERENCIAS:

1. Karanika S, Karantanos T, Kurosaka S, Wang J, Hirayama T, Yang G, Park S, Golstov AA, Tanimoto R, Li L, *et al.* GLIPR1-DeltaTM actúa como agente de sinergia con docetaxel en muerte celular y suprime la resistencia al docetaxel en células de cáncer de próstata. *Mol Cancer* 2015; 14:122.
2. Amaral TM, Macedo D, Fernandes I, Costa L. Cáncer de próstata resistente a castración: mecanismos, dianas, y tratamiento. *Prostate Cancer* 2012; 2012:327253.
3. Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS, Molina A, Logothetis CJ, de Souza P, Fizazi K, Mainwaring P, Piulats JM, Ng S, *et al.* Abiraterona en cáncer de próstata metastásico sin quimioterapia previa. *N. Engl J Med* 2013; 368:138-48.
4. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN, Shore ND, *et al.* Aumento de supervivencia con enzalutamida en cáncer de próstata después de quimioterapia. *N Engl J Med* 2012; 367:1187-97.
5. Gao L, Schwartzman J, Gibbs A, Lisac R, Kleinschmidt R, Wilmot B, Bottomly D, Coleman I, Nelson P, McWeeney *et al.* El receptor androgénico promueve la progresión del cáncer de próstata independiente de ligandos mediante regulación a la alza de c-Myc. *PLoS One* 2013; 8:e63563.
6. Zhang X, Morrissey C, Sun S, Ketchandji M, Nelson PS, True LD, Vakar-Lopez F, Vessella RL, Plymate SR. Con frecuencia ocurren variantes de receptores androgénicos en metástasis de cáncer de próstata resistente a castración. *PloS one* 2011; 6:e27970.
7. Vander Griend DJ, Litvinov IV, Isaacs JT. La conversión de la señalización de receptores androgénicos de un supresor de crecimiento en células epiteliales prostáticas normales a un oncogén en células de cáncer de próstata implica un aumento de la función de la regulación de c-Myc. *Int J Biol Sci* 2014; 10:627-42.
8. Meyer N, Penn LZ. Reflexionando sobre 25 años con MYC. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:976-90.
9. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc y metabolismo del cáncer. *Clin Cancer Res* 2012; 18:5546-53.
10. Westermarck J, Hahn WC. Múltiples rutas reguladas por el supresor tumoral PP2A en transformación. *Trends Mol Med* 2008; 14:152-60.
11. Sears RC. El ciclo de vida de C-myc: de la síntesis a la degradación. *Cell Cycle* 2004; 3:1133-7.
12. Tibbitts DC, Escamilla-Powers JR, Zhang X, Sears RC. Estudio de la fosforilación de serina 62 de c-Myc en células de leucemia: preocupación por la reactividad cruzada de anticuerpos. *Blood* 2012; 119:5334-5.
13. Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. Múltiples rutas de fosforilación dependientes de Ras regulan la estabilidad de la proteína Myc. *Genes Dev* 2000; 14:2501-14.
14. Bernard D, Pourtier-Manzanedo A, Gil J, Beach DH. Myc confiere crecimiento de células de cáncer de próstata independiente de andrógenos. *J Clin Invest* 2003; 112:1724-31.
15. Ryan CJ, Molina A, Griffin T. Abiraterona en cáncer de próstata metastásico. *N Engl J Med* 2013; 368:1458-9.
16. Mukhopadhyay A, Tabanor K, Chaguturu R, Aldrich JV. Inhibidor 2 de direccionamiento de fosfatasa 2A proteica como estrategia terapéutica para tratamiento del cáncer de próstata. *Cancer Biol Ther* 2013; 14:962-72.
17. Nadiminty N, Tummala R, Liu C, Lou W, Evans CP, Gao AC. La ruta de NF-kappaB2/p52:c-Myc:hnRNPA1 regula la expresión de variantes de corte y empalme de receptores androgénicos y sensibilidad enzalutamida en cáncer de próstata. *Mol Cancer Ther* 2015; 14:1884-95.
18. Sivertsen A, Torfoss V, Isaksson J, Ausbacher D, Anderssen T, Brandsdal BO, Havelkova M, Skjorholm AE, Strom MB. Potencia anticáncer de tetrapéptidos lineales y cíclicos pequeños e investigaciones farmacocinéticas

de la unión peptídica a albúmina sérica humana. J Peptide Sci 2014; 20:279-91.

19. Murray BC, Peterson MT, Fecik RA. Química y biología de las tubulinas: tetrapéptidos antimitóticos con actividad frente a cánceres resistentes a fármacos. Nat Prod Rep 2015; 32:654-62.

20. Neviani P, Perrotti D. OP449 dirigido a SET en la familia farmacológica que activa PP2A. Clin Cancer Res 2014; 20:2026-8.

21. Saito T, Hirai H, Kim YJ, Kojima Y, Matsunaga Y, Nishida H, Sakakibara T, Suga O, Sujaku T, Kojima N. CJ-15,208, un nuevo antagonista de receptor opioide kappa de un hongo, *Ctenomyces serratus* ATCC15502. J Antibiot (Tokio) 2002; 55:847-54.

22. Ross NC, Kulkarni SS, McLaughlin JP, Aldrich JV. Síntesis de CJ-15,208, un nuevo antagonista de receptor opioide kappa. Tetrahedron Lett 2010; 51:5020-3.

23. Ross NC, Reilley KJ, Murray TF, Aldrich JV, McLaughlin JP. Nuevos tetrapéptidos cíclicos opioides: los isómeros Trp de CJ-15,208 exhiben agonismo del receptor opioide y antagonismo del receptor opioide kappa de acción corta distintos. Br J Pharmacol 2012; 165:1097-108.

24. Aldrich JV, Senadheera SN, Ross NC, Ganno ML, Eans SO, McLaughlin JP. El producto natural peptídico macrocíclico CJ-15,208 es activo por vía oral y previene el restablecimiento del comportamiento extinguido de búsqueda de cocaína. J Nat Prod 2013; 76:433-8.

25. Eans SO, Ganno ML, Reilley KJ, Patkar KA, Senadheera SN, Aldrich JV, McLaughlin JP. El tetrapéptido macrocíclico [D-Trp]CJ-15,208 produce antagonismo de receptor opioide kappa de acción corta en el SNC después de administración oral. Br J Pharmacol 2013; 169:426-36.

26. Fichna J, Janecka A. Péptidos opioides en cáncer. Cancer Metastasis Rev 2004; 23:351-66.

27. Gach K, Wyrebska A, Fichna J, Janecka A. Papel de la morfina en la regulación del crecimiento de células cancerosas. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2011; 384:221-30.

28. Moon TD. Efecto de los opiáceos en el crecimiento de células de carcinoma de próstata. Biochem Biophys Res Commun 1988; 153:722-7.

29. Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita H, Nagase H, Okada Y, *et al.* Efecto del agonista de receptor opioide kappa en el crecimiento de células de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Br J Cancer 2012; 106:1148-52.

30. Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn WC, Stukenberg PT, Shenolikar S, Uchida T, *et al.* Una ruta de señalización que controla la degradación de c-Myc que afecta a la transformación oncogénica de células humanas. Nat Cell Biol 2004; 6:308-18.

31. Patkar KA, Yan X, Murray TF, Aldrich JV. [Na-bencilTyr1,ciclo(D-Asp5,Dap8)]-dinorfina A-(1-11)NH₂ ciclada en el dominio de "dirección" es un nuevo antagonista de receptor opioide kappa. J Med Chem 2005; 48:4500-3.

32. Arttamangkul S, Ishmael JE, Murray TF, Grandy DK, DeLander GE, Kieffer BL, Aldrich JV. Síntesis y actividad opioide de análogos de dinorfina A restringidos conformacionalmente. 2. Restricción conformacional en la secuencia de "dirección". J Med Chem 1997; 40:1211-8.

33. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: más que una simple cuestión de vida o muerte. Nat Rev Cancer 2002; 2:764-76.

34. Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, Roof S, Harb JG, Ferencak G, Eisfeld AK, Van Brocklyn JR, Briesewitz R, Saddoughi SA, *et al.* Actividades antagónicas del inmunomodulador y el fármaco FTY720 activador de PP2A (Fingolimod, Gileña) en neoplasias malignas hematológicas impulsadas por Jak2. Blood 2013; 122:1923-34.

35. Chen J, Martin BL, Brautigan DL. Regulación de la proteína serina-treonina fosfatasa de tipo 2A por fosforilación de tirosina. Science 1992; 257:1261-4.

36. Neviani P, Santhanam R, Trotta R, Notari M, Blaser BW, Liu S, Mao H, Chang JS, Galletta A, Uttam A, *et al.* El supresor tumoral PP2A se inactiva funcionalmente en LMC de crisis blástica mediante la actividad inhibitoria de la proteína SET regulada por BCR/ABL. Cancer Cell 2005; 8:355-68.

37. Lu JJ, Meng LH, Shankavaram UT, Zhu CH, Tong LJ, Chen G, Lin LP, Weinstein JN, Ding J. La dihidroartemisinina acelera la degradación de la oncoproteína c-MYC e induce apoptosis en células tumorales

que sobreexpresan c-MYC. *Biochem Pharmacol* 2010; 80:22-30.

38. Zhang JY, Tao LY, Liang YJ, Yan YY, Dai CL, Xia XK, She ZG, Lin YC, Fu LW. El ácido secalónico D indujo apoptosis de células leucémicas y parada del ciclo celular de G(1) con participación de la ruta de GSK-3beta/beta-catenina/c-Myc. *Cell Cycle* 2009; 8:2444-50.

39. Thamilselvan V, Menon M, Thamilselvan S. Eficacia anticáncer de deguelina en células humanas de cáncer de próstata dirigidas a la ruta de la glicógeno sintasa quinasa-3 beta/beta-catenina. *Int J Cancer* 2011; 129:2916-27.

40. Huang HL, Weng HY, Wang LQ, Yu CH, Huang QJ, Zhao PP, Wen JZ, Zhou H, Qu LH. El desencadenamiento de la degradación proteosómica mediada por Fbw7 de c-Myc por oridonina induce inhibición del crecimiento y apoptosis celulares. *Mol Cancer Ther* 2012; 11:1155-65.

41. Zhang Y, Guo Z, Xu L. La tributiltina induce una parada del ciclo celular de G2/M en células amnióticas humanas mediante inactivación de las cascadas de ERK1/2 mediada por inhibición de PP2A. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 37:812-8.

42. Song A, Ye J, Zhang K, Sun L, Zhao Y, Yu H. Atenuación génica de ARNsi de c-MYC mediada por vector lentiviral: inhibición del crecimiento celular y parada del ciclo celular en la fase G2/M en células Jijoye. *Biochem Genet* 2013; 51:603-17.

43. Lin HP, Lin CY, Huo C, Hsiao PH, Su LC, Jiang SS, Chan TM, Chang CH, Chen LT, Kung HJ, *et al.* El éster fenetílico del ácido cafeico indujo parada del ciclo celular e inhibición del crecimiento en células de cáncer de próstata independientes de andrógenos mediante la regulación de Skp2, p53, p21Cip1 y p27Kip1. *Oncotarget* 2015; 6:6684-707.

44. Jingushi K, Nakamura T, Takahashi-Yanaga F, Matsuzaki E, Watanabe Y, Yoshihara T, Morimoto S, Sasaguri T. El factor 1 inductor de diferenciación suprime la expresión de c-Myc en las líneas celulares de cáncer humano. *J Pharmacol Sci* 2013; 121:103-9.

45. Akinyeke TO, Stewart LV. La troglitazona suprime los niveles de c-Myc en células de cáncer de próstata humano mediante un mecanismo independiente de PPAR-gamma. *Cancer Biol Ther* 2011; 11:1046-58.

46. Sampson N, Neuwirt H, Pühr M, Klocker H, Eder IE. Sistemas modelo *in vitro* para estudiar la señalización de receptores androgénicos en cáncer de próstata. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20:R49-64.

Como entenderá un experto en la materia, para todos y cada uno de los fines, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos desvelados en el presente documento también incluyen todos y cada uno de los subintervalos y combinaciones de subintervalos posibles de los mismos. Cualquier intervalo enumerado puede reconocerse fácilmente como una descripción suficiente y que permite que el mismo intervalo se divida en mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc., al menos iguales. Como ejemplo no limitante, cada intervalo discutido en el presente documento puede dividirse fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. Como también entenderá un experto en la materia, todo término o expresión tal como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que", y similares, incluye el número mencionado y hace referencia a intervalos que pueden dividirse posteriormente en subintervalos como se discutió anteriormente. Finalmente, como entenderá un experto en la materia, un intervalo incluye cada miembro individual.

REIVINDICACIONES

1. Al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para uso en el tratamiento de un sujeto que padece cáncer de próstata o cáncer de mama.
2. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 1, que comprende la administración de una cantidad eficaz de al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos al sujeto.
3. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el cáncer de próstata comprende al menos una mutación oncogénica encontrada en una línea celular PC-3, una línea celular LNCaP, una línea celular 22Rv1, una línea celular DU145, o una combinación de cualesquiera dos o más de las mismas.
4. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el cáncer de mama comprende cáncer de mama triple negativo.
5. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el cáncer de mama comprende al menos una mutación oncogénica encontrada en una línea celular BT-20, una línea celular MDA-MB-468, una línea celular MDA-MB-231, una línea celular MCF-7, una línea celular SKBR-3, una línea celular BT-474, o una combinación de cualesquiera dos o más de las mismas.
6. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la administración comprende al menos una de administración oral y administración parenteral, de manera apropiada en donde la administración comprende administración subcutánea, o administración intravenosa.
7. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 1 o 2, que comprende la administración de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
8. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 1 o 2, que comprende la administración de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
9. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 1 o 2, que comprende la administración de una composición que comprende al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 9, en donde la composición se formula para administración oral o administración parenteral, de manera apropiada en donde la formulación se formula para administración subcutánea o administración intravenosa.
11. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 9, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende polietilenglicol, un monoéster de ácido graso de polietilenglicol, un éster de polietoxileno sorbitán, o una combinación de cualesquiera dos o más de los mismos, o comprende solución salina.
12. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 9, en donde la composición es una formulación líquida que comprende de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml del al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
13. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 9, en donde la composición es una composición farmacéutica.
14. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 1 o 2, que comprende la administración al sujeto de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 150 mg del al menos uno de *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-Trp] y *ciclo*[Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] por kilogramo del sujeto.
15. El compuesto o composición para uso de la reivindicación 1 o 2, que comprende la administración al sujeto de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 veces por semana.

FIG. 1A

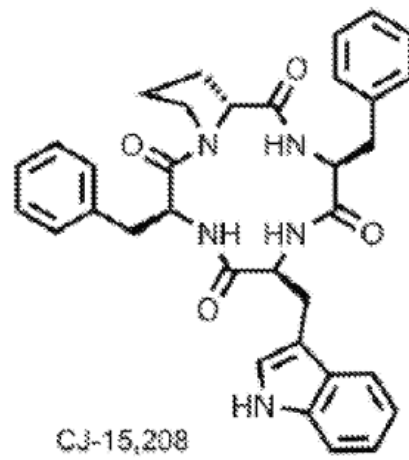


FIG. 1B

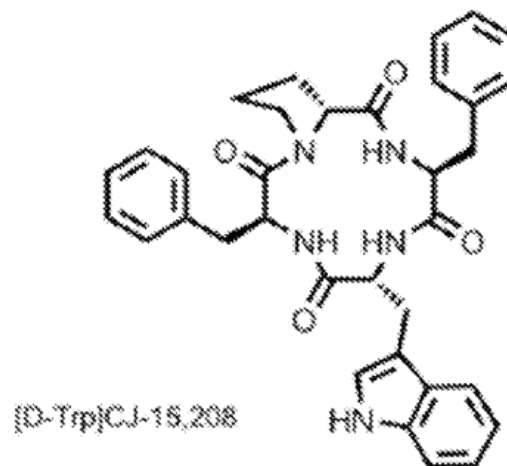


FIG. 1C

H₂N-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Pro
Dinorfina A (1-13)

FIG. 1D

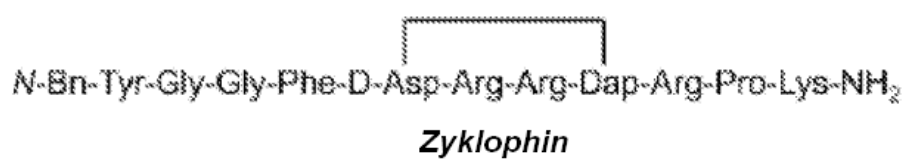


FIG. 1E

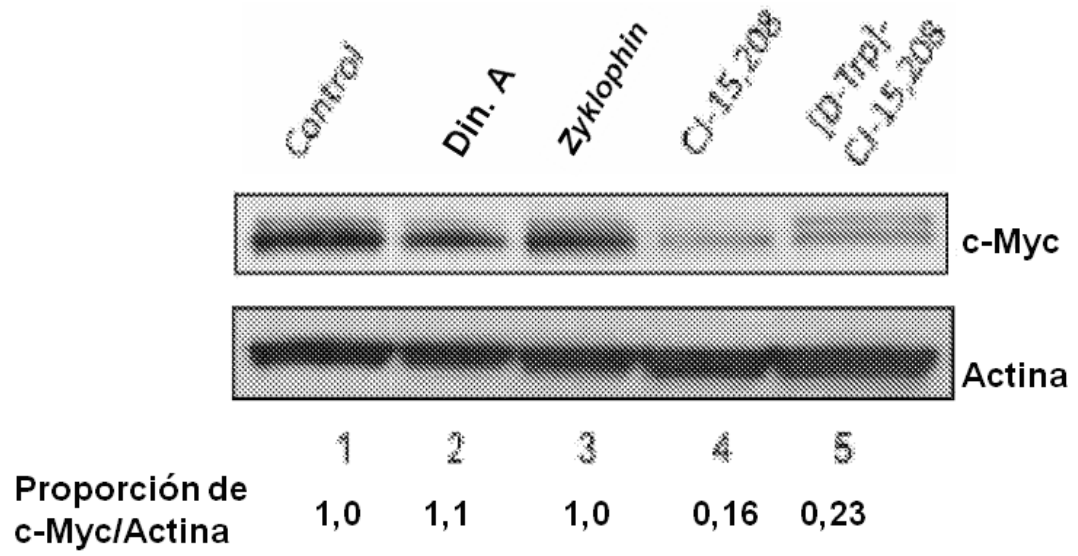


FIG. 1F

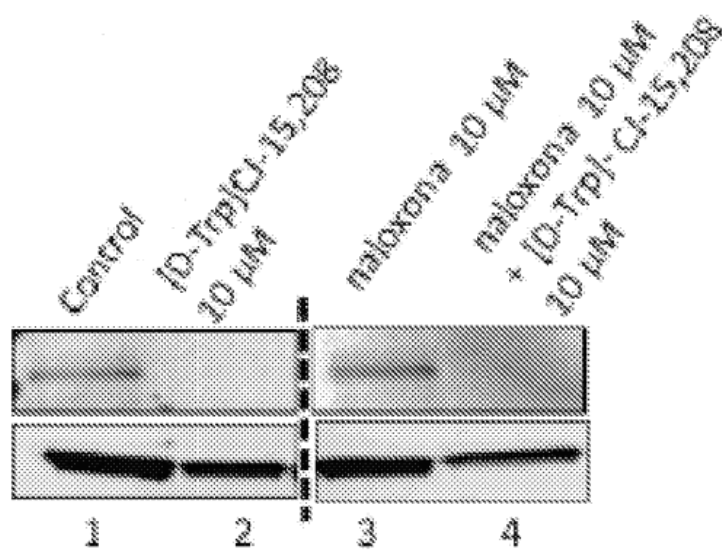


FIG. 2A

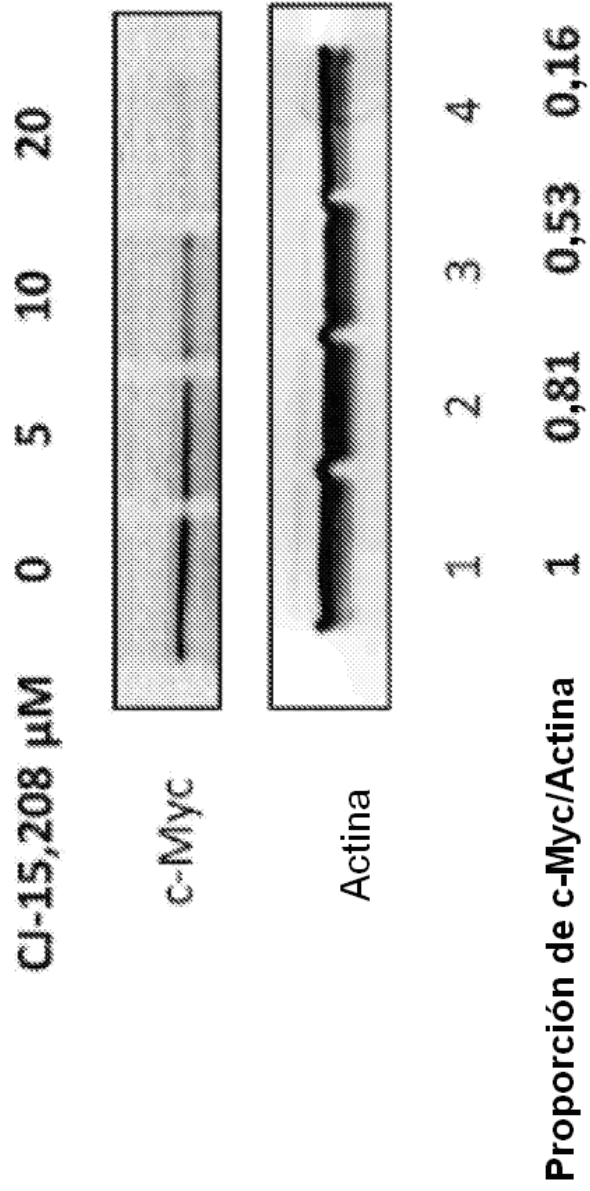


FIG. 2B

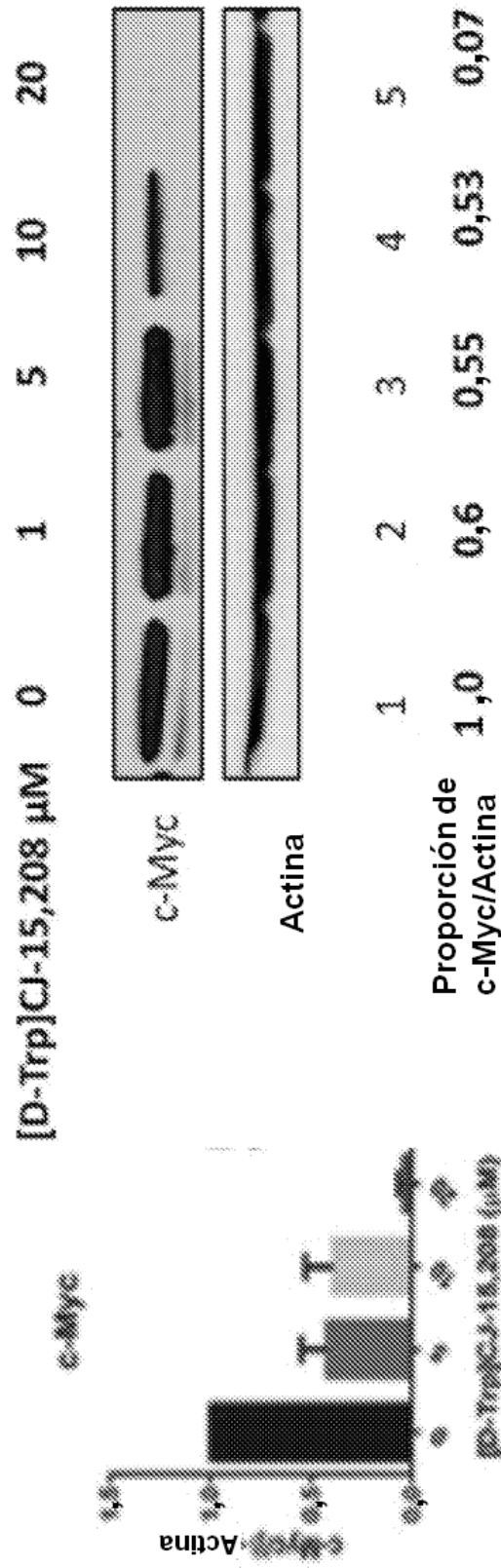


FIG. 2C

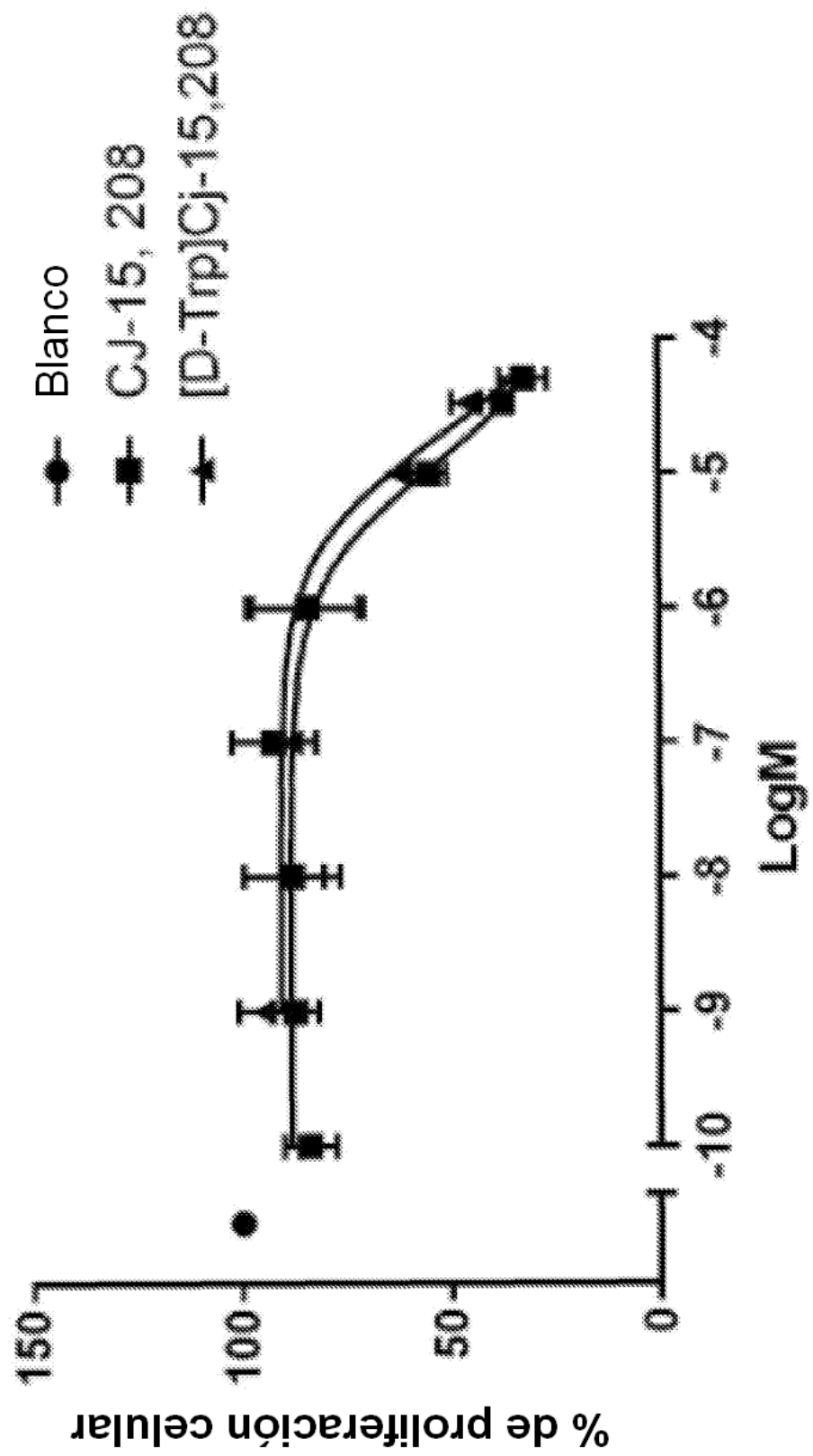


FIG. 2D

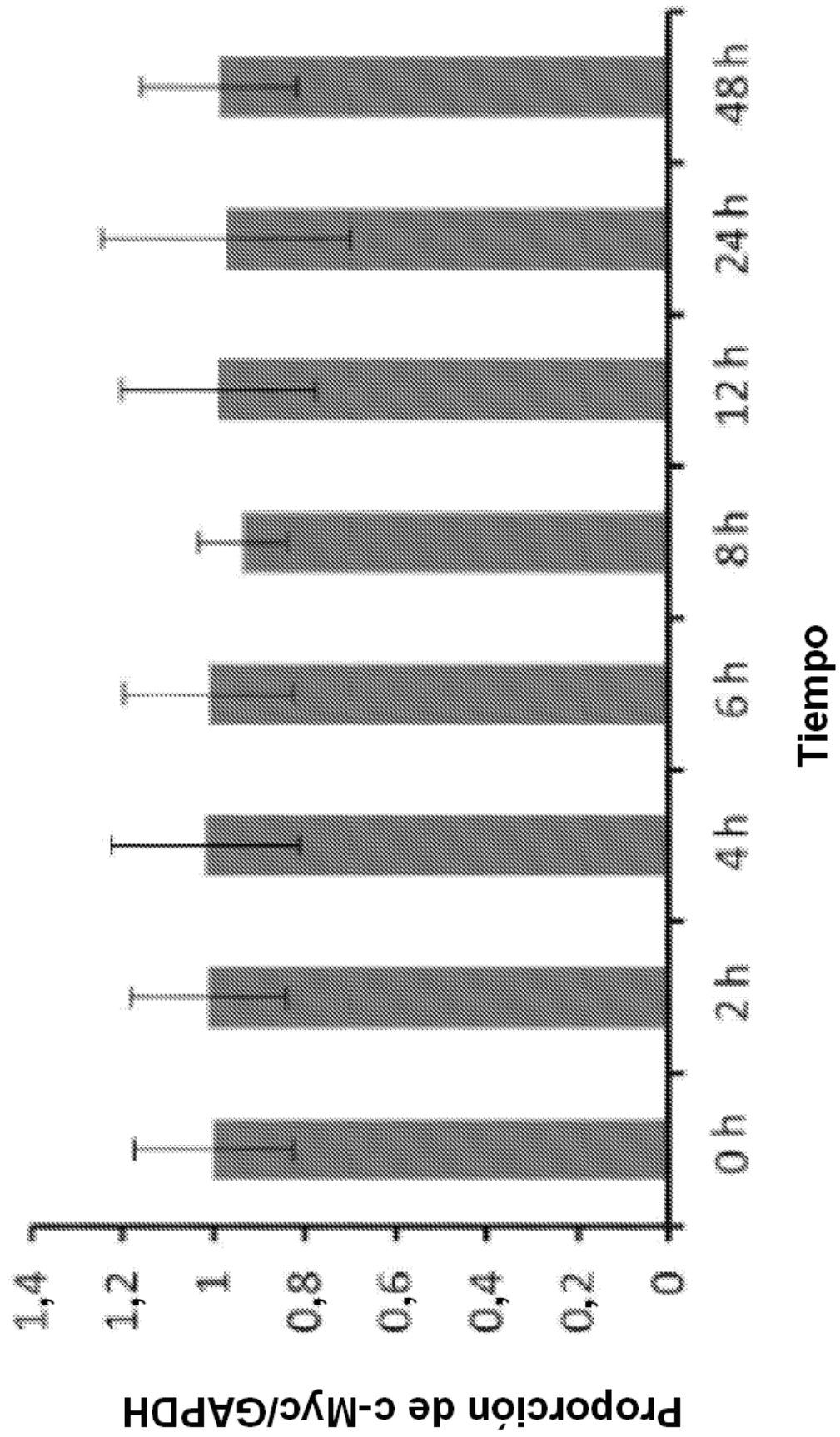


FIG. 3A

PC-3

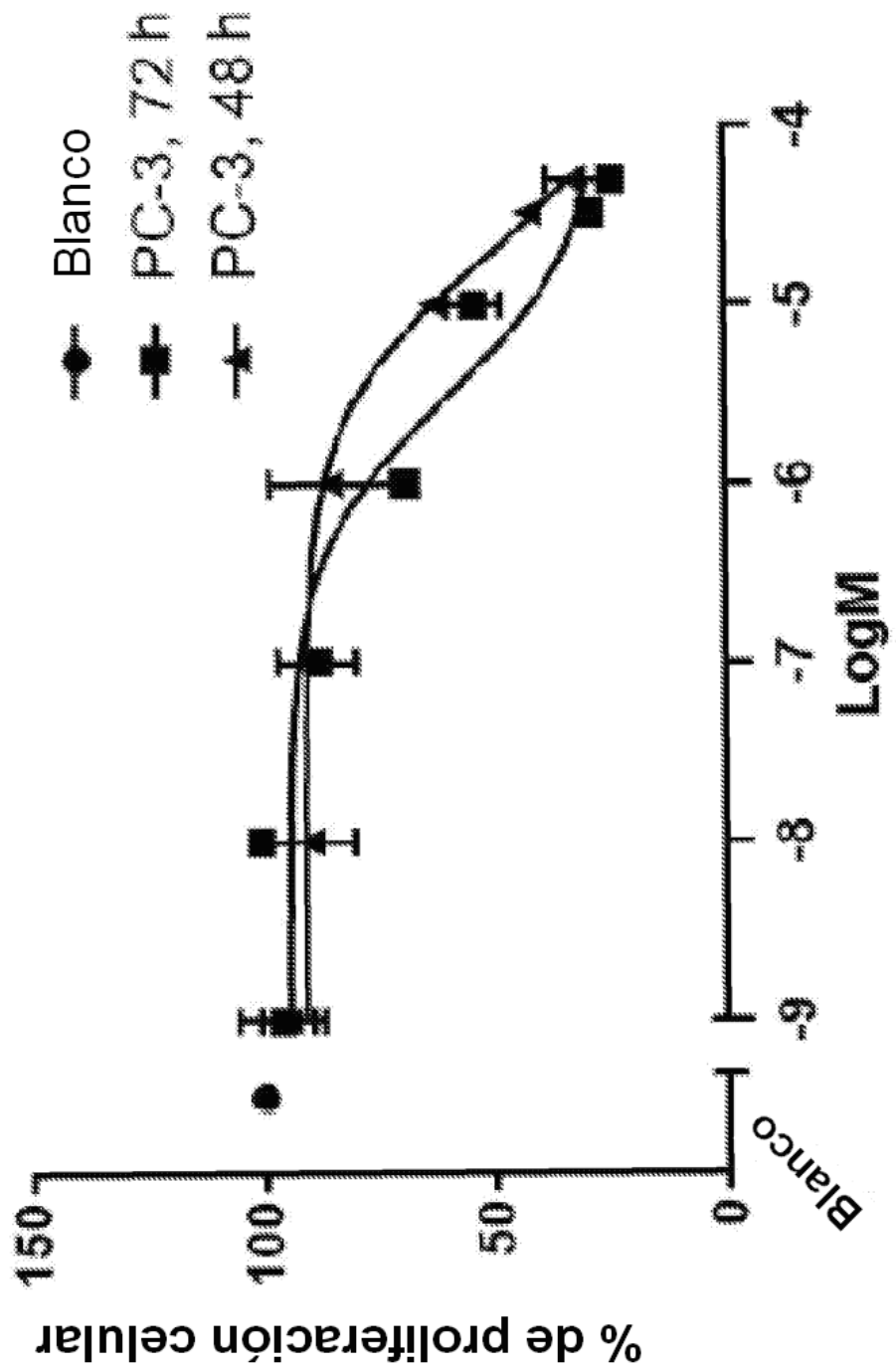


FIG. 3B

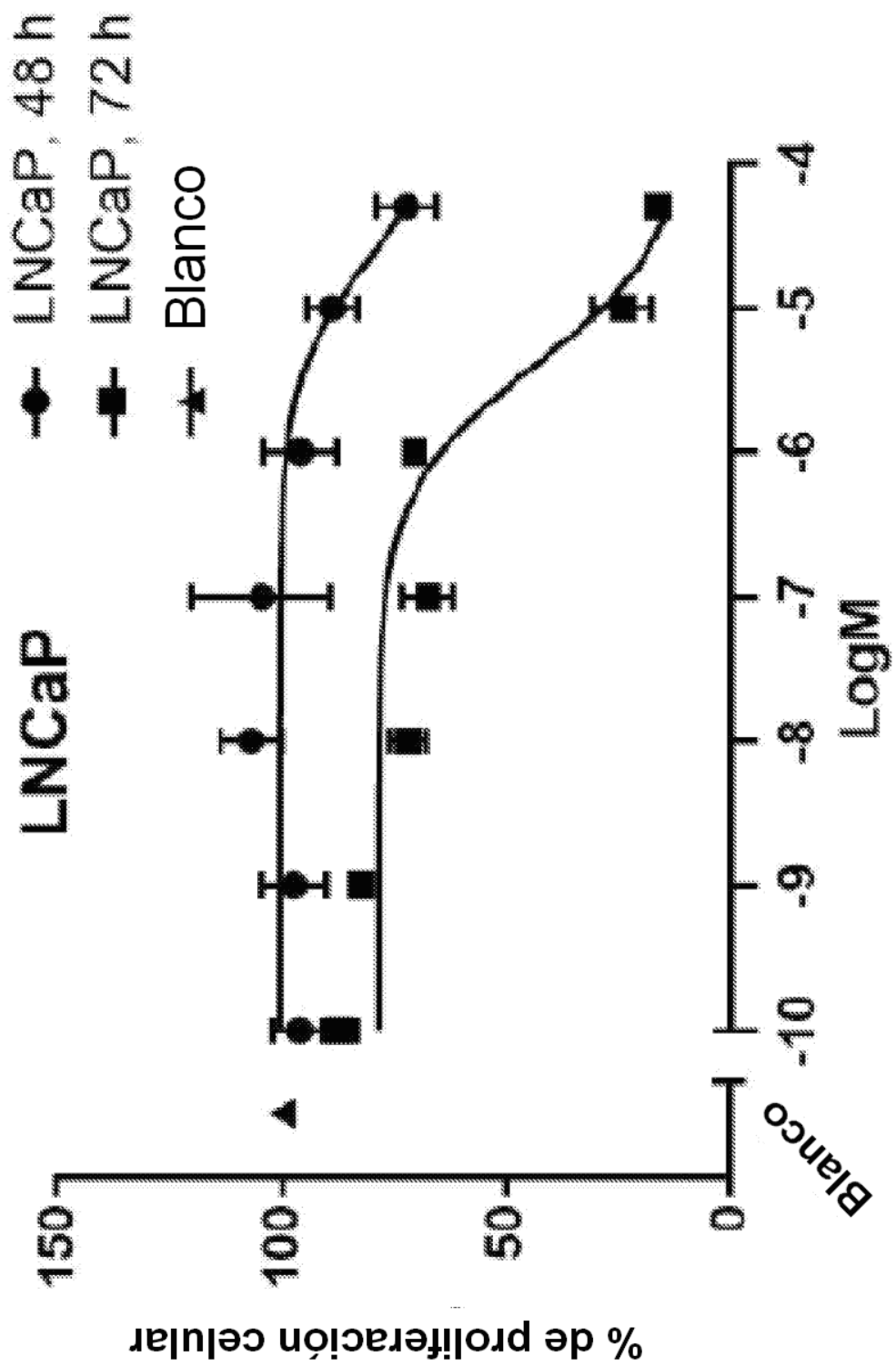


FIG. 3C

DU145

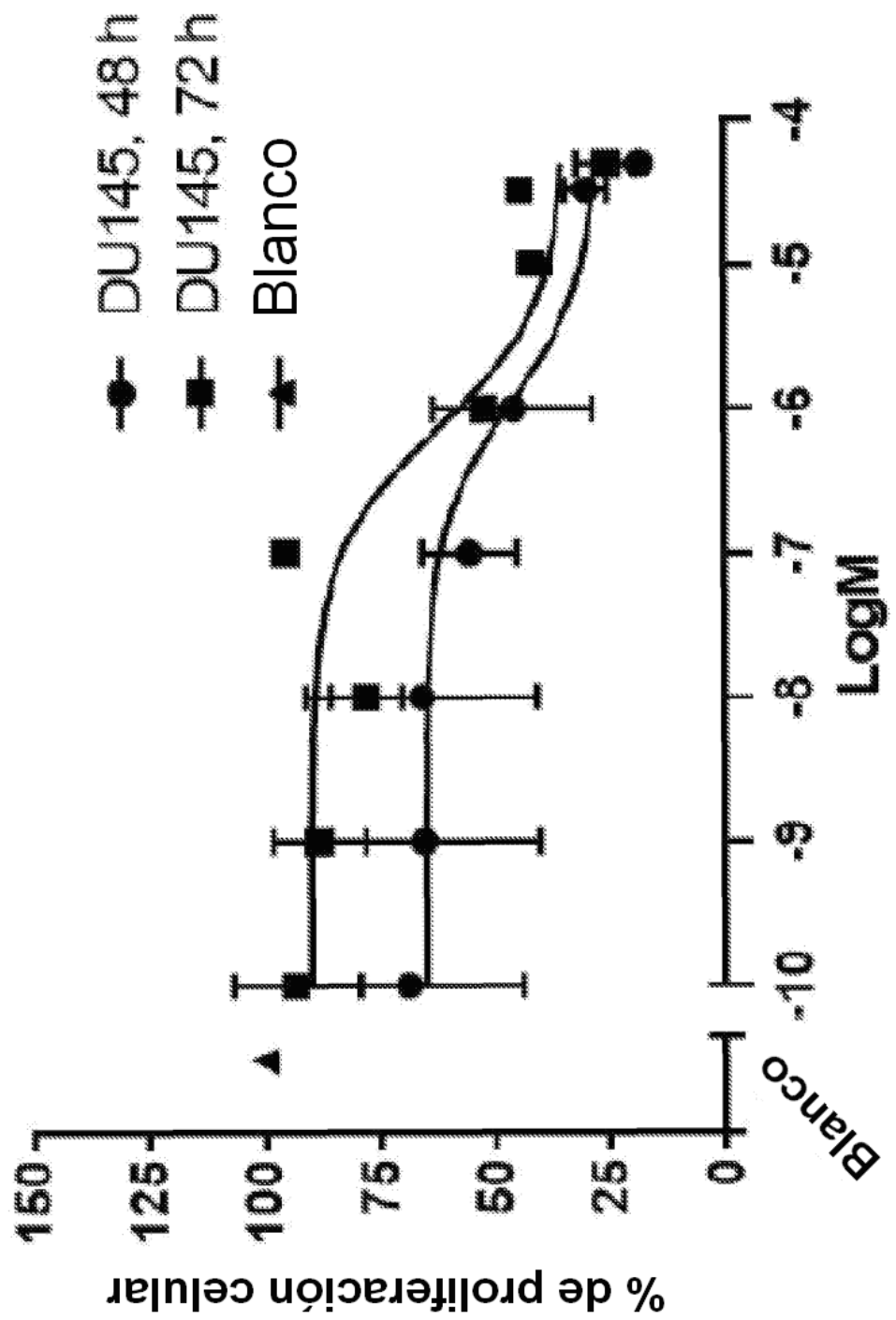


FIG. 3D

22Rv1

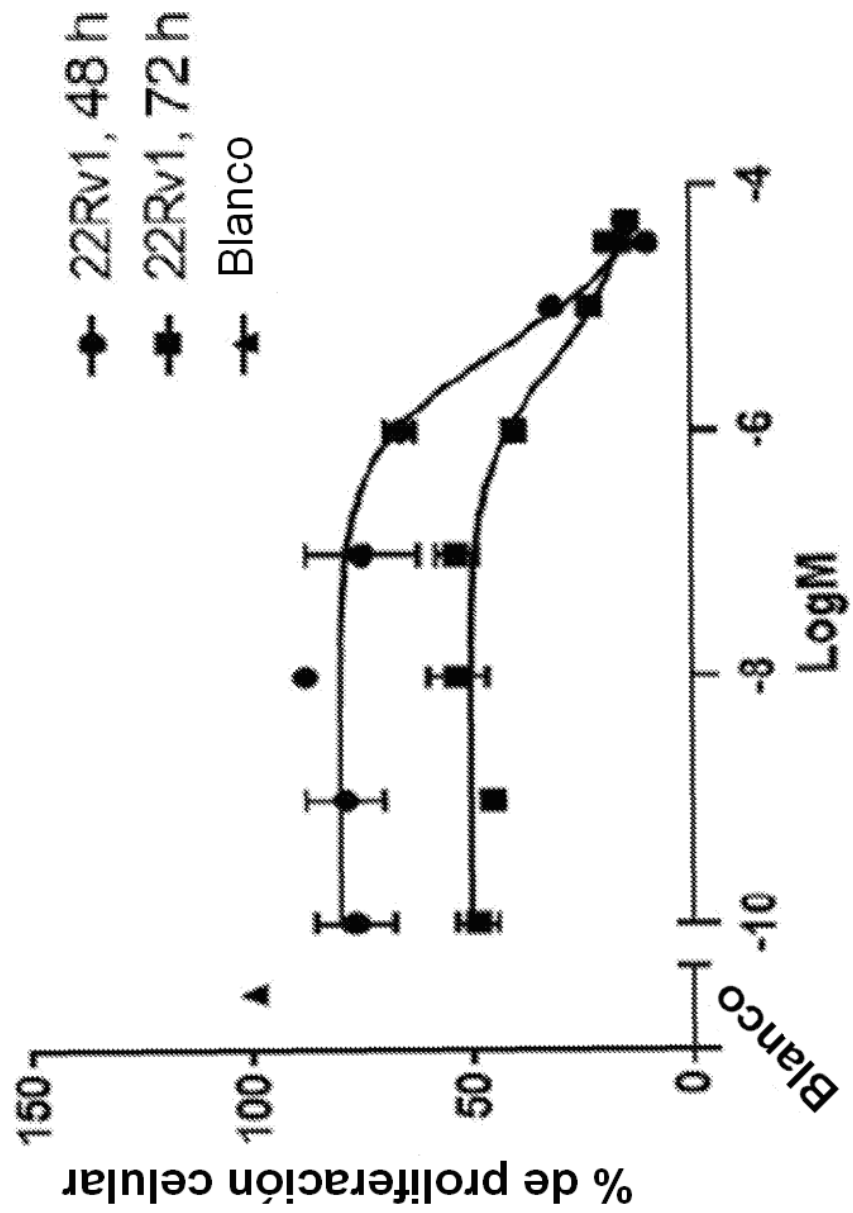


FIG. 3E

C4-2

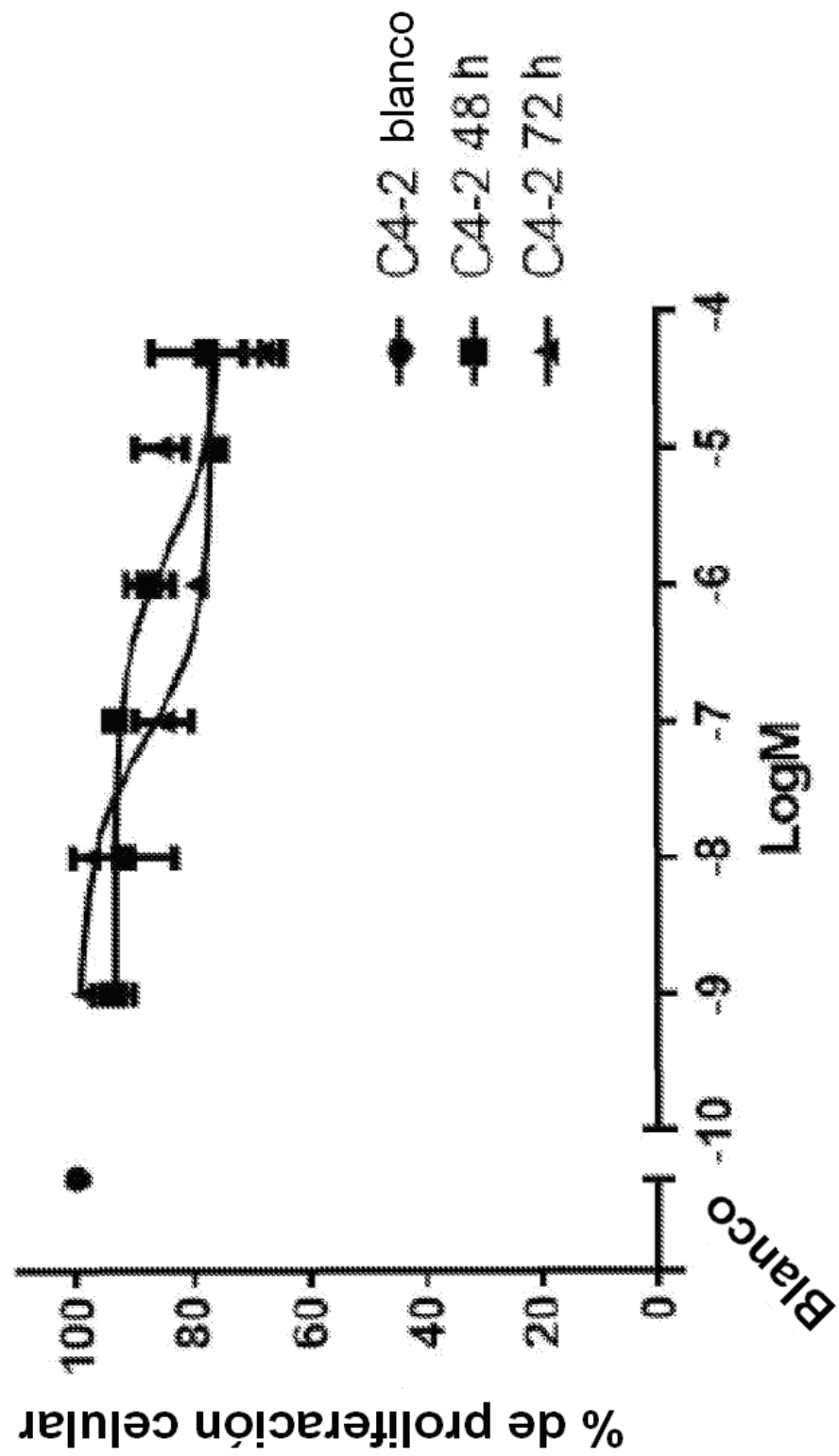
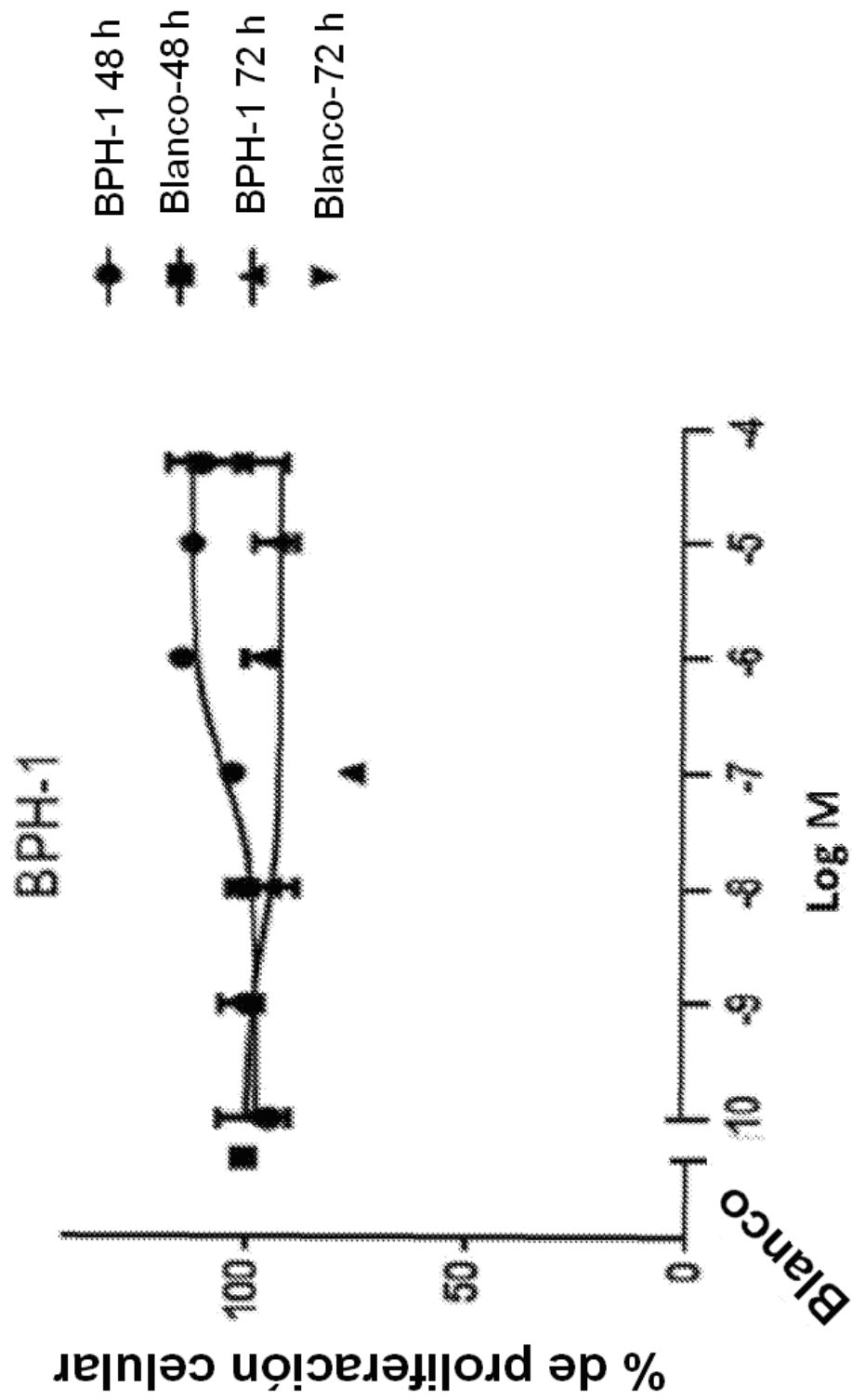


FIG. 3F



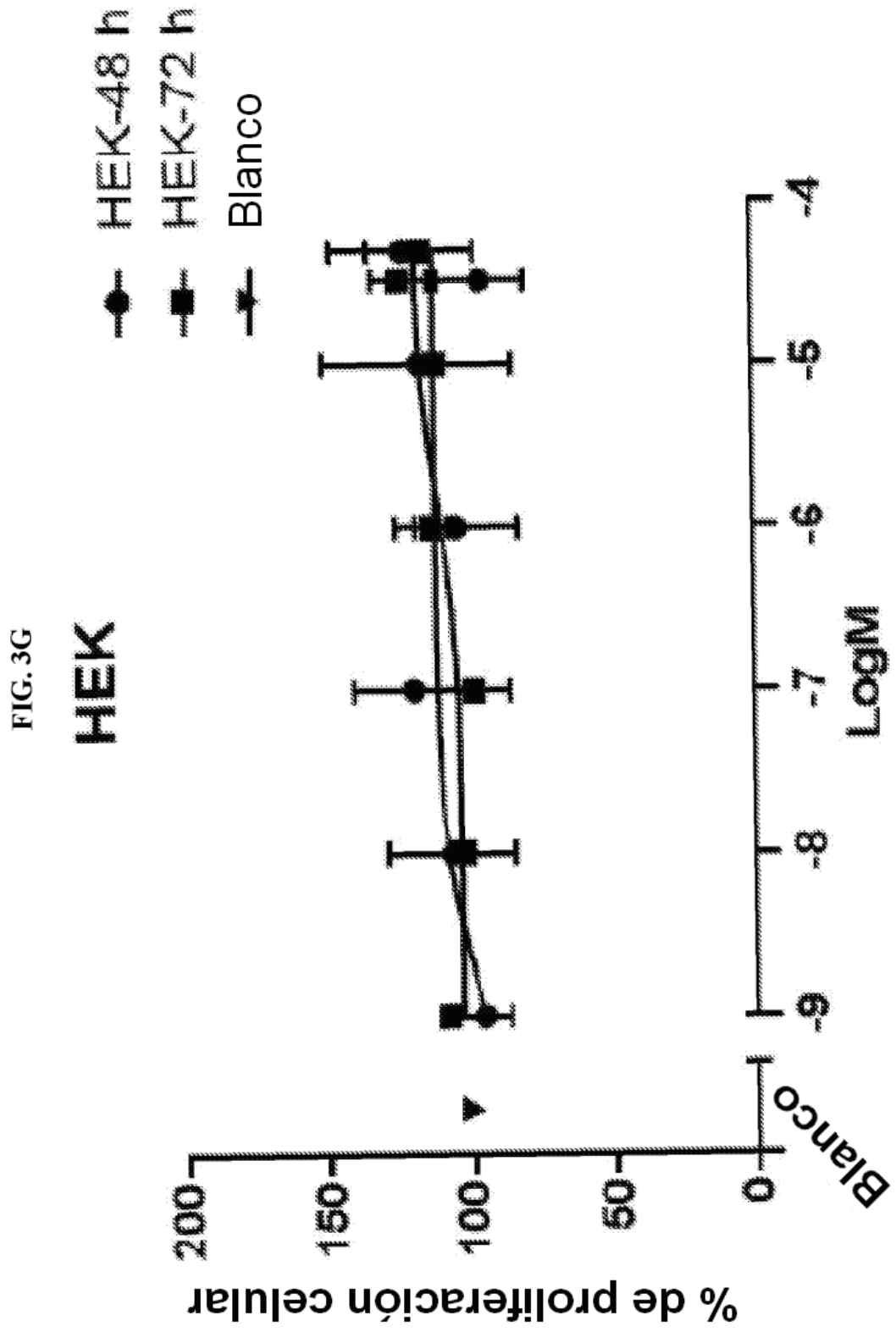


FIG. 3H

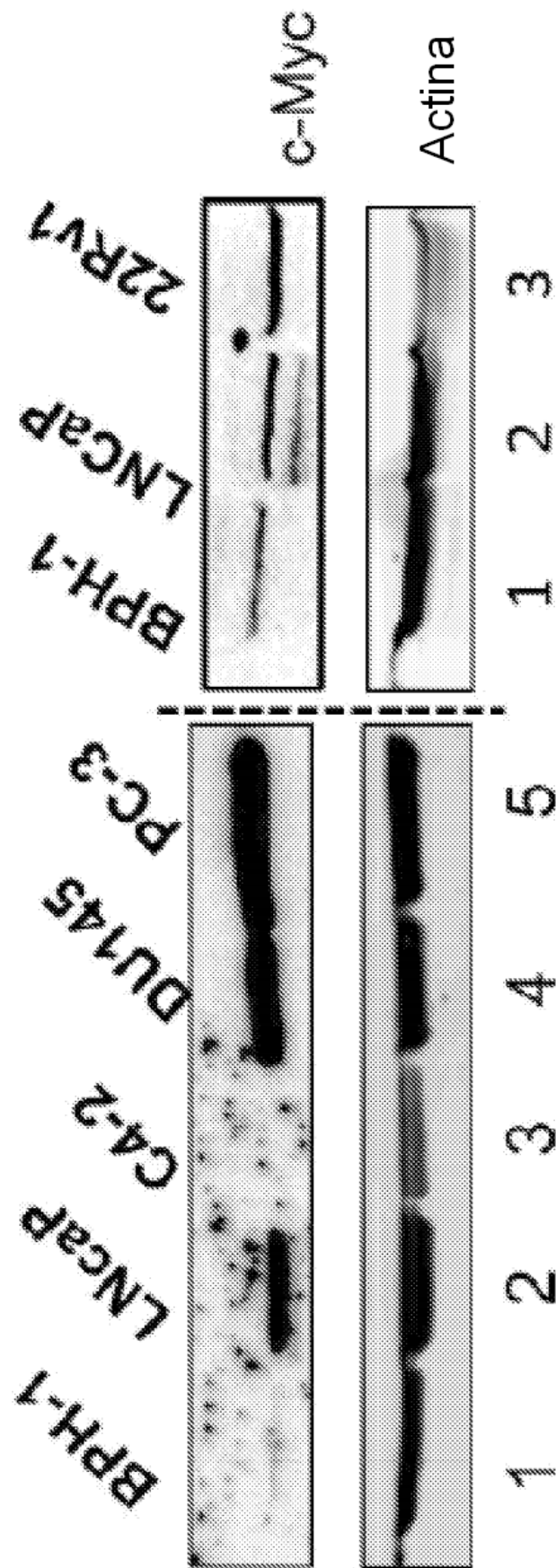


FIG. 4A

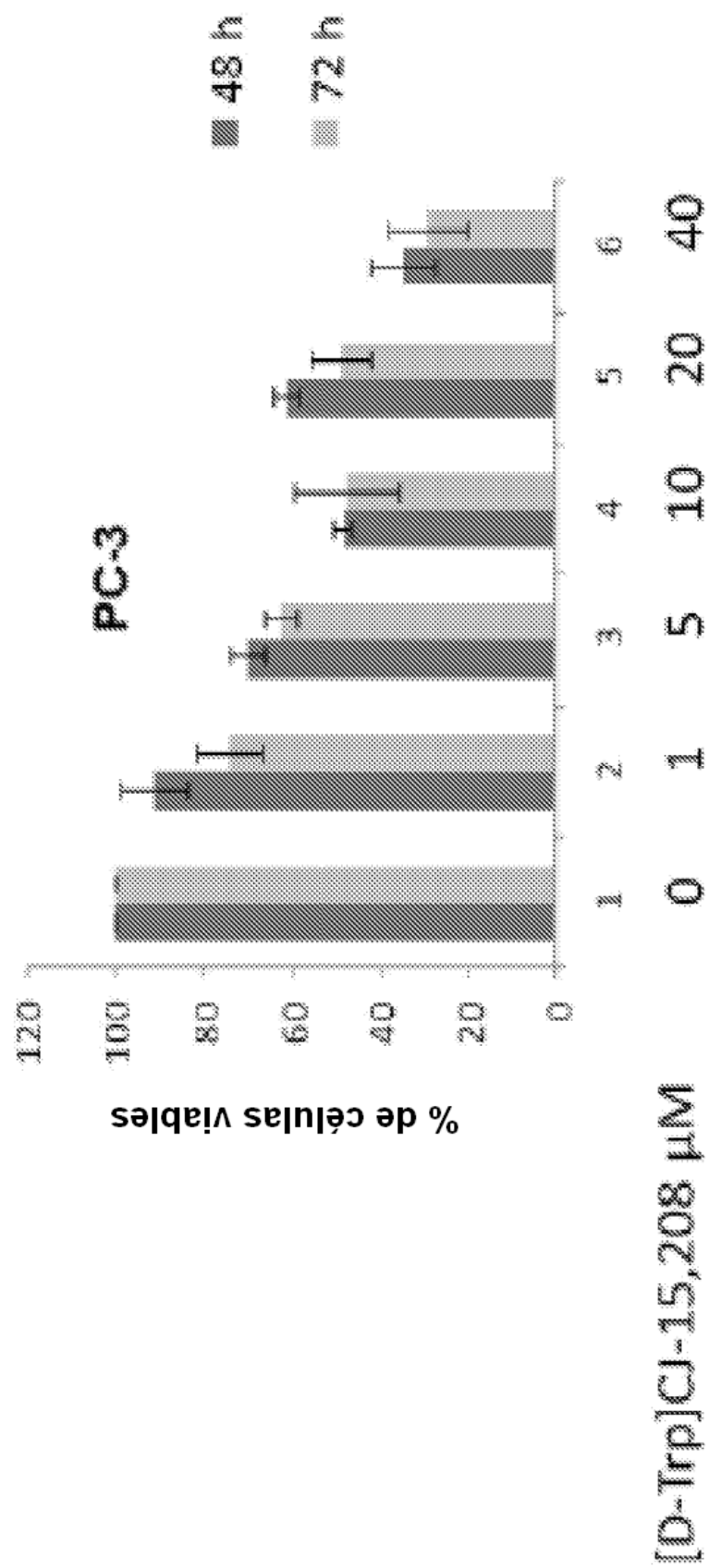


FIG. 4B

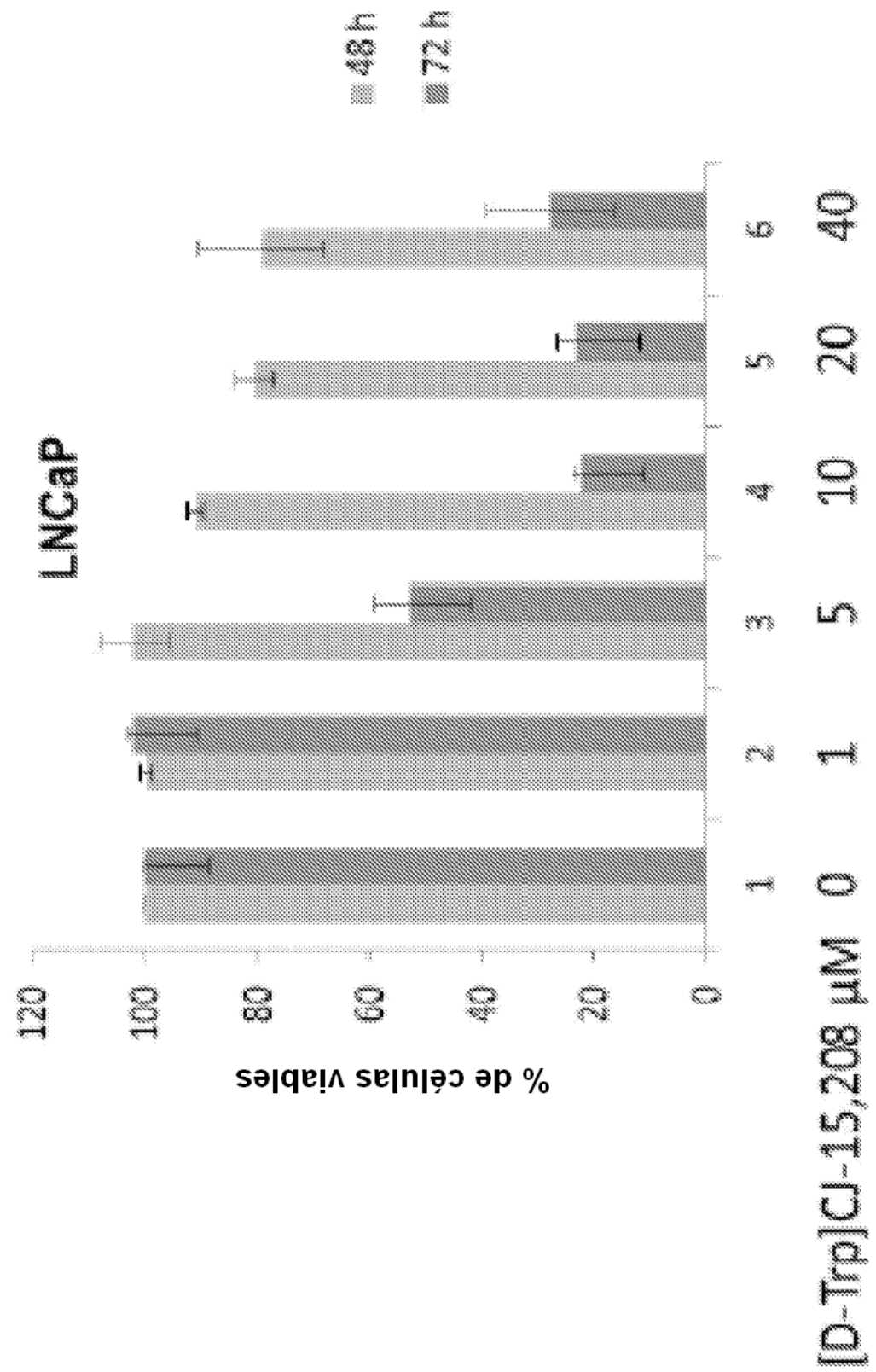


FIG. 4C

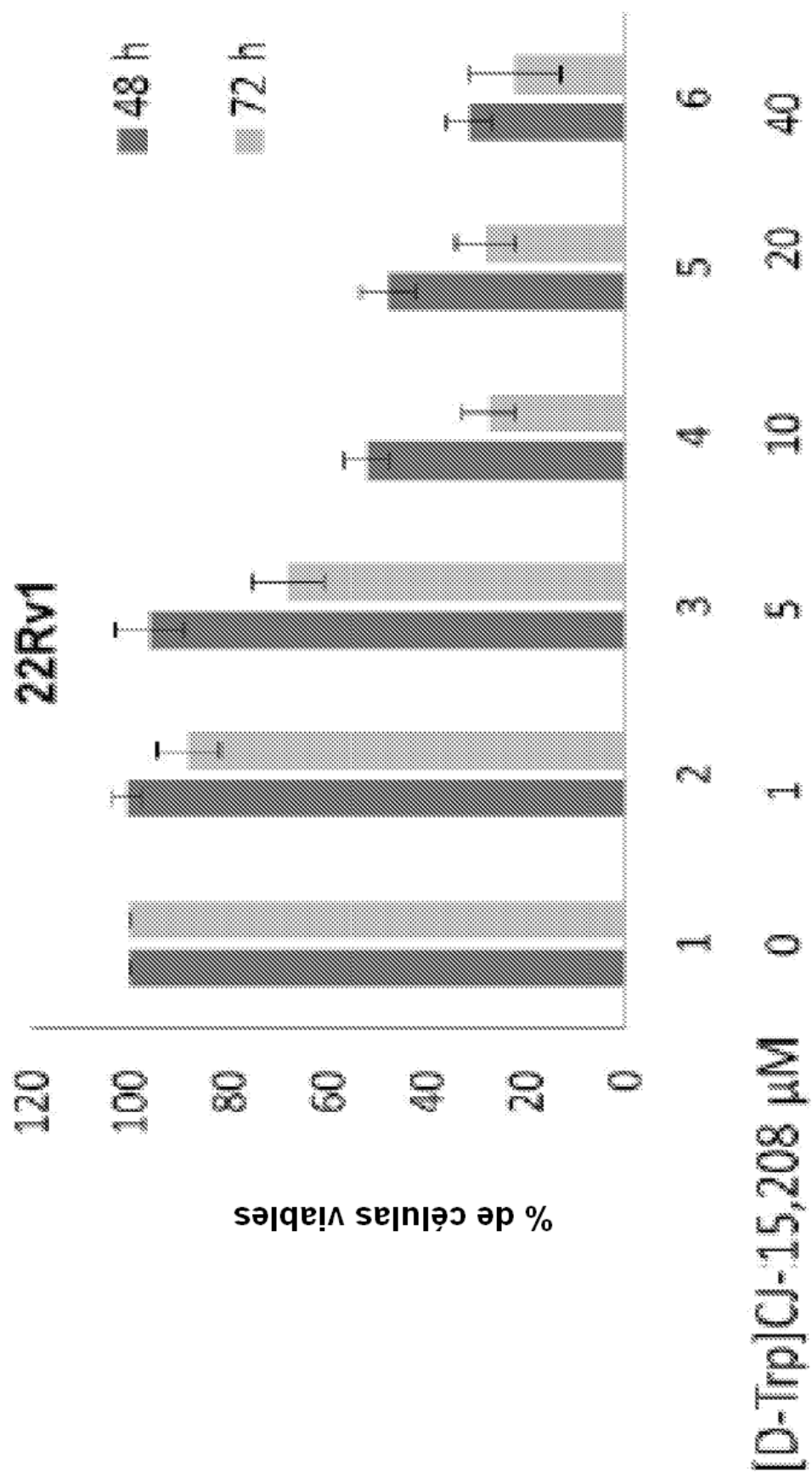


FIG. 4D

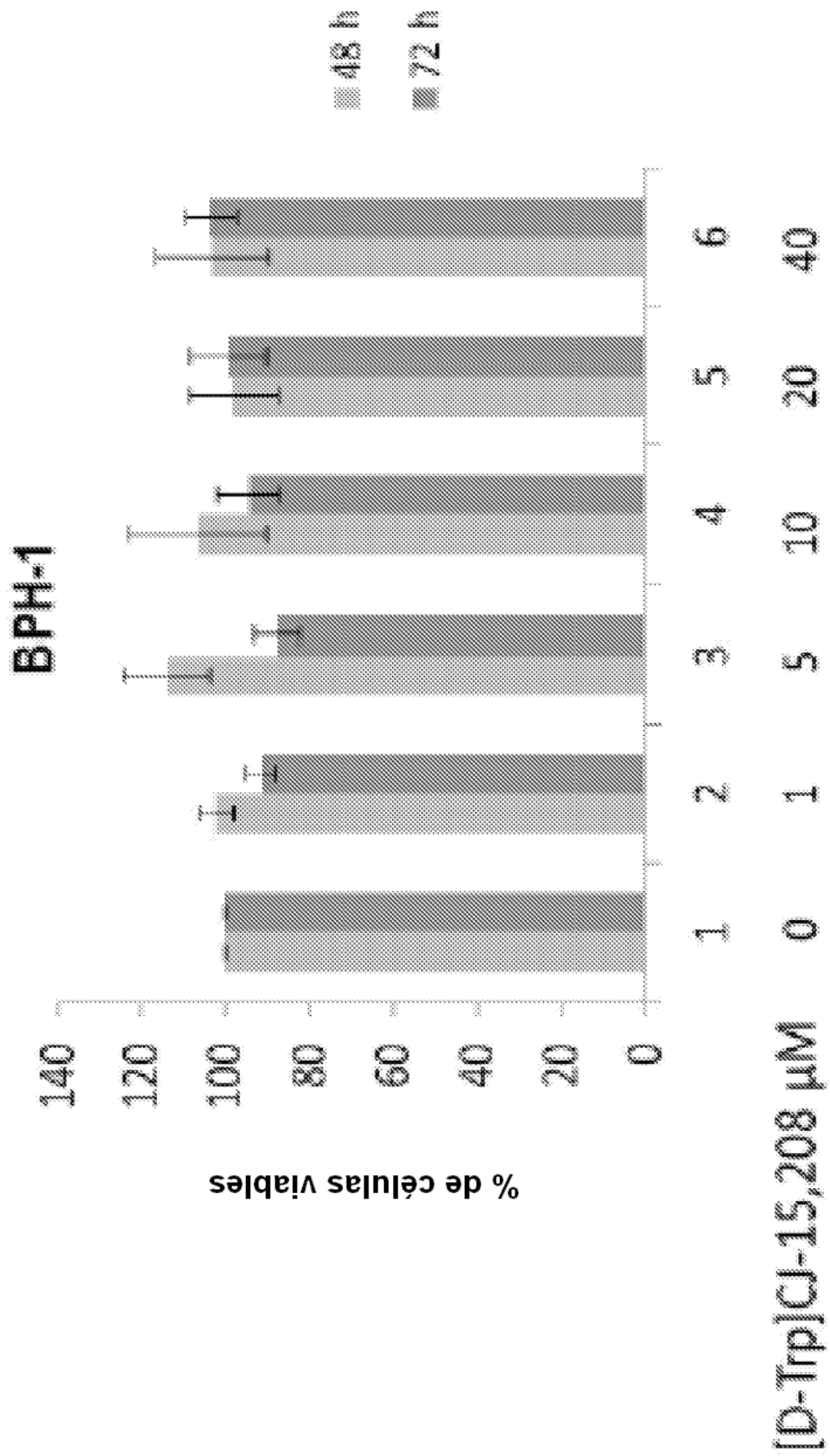


FIG. 5A

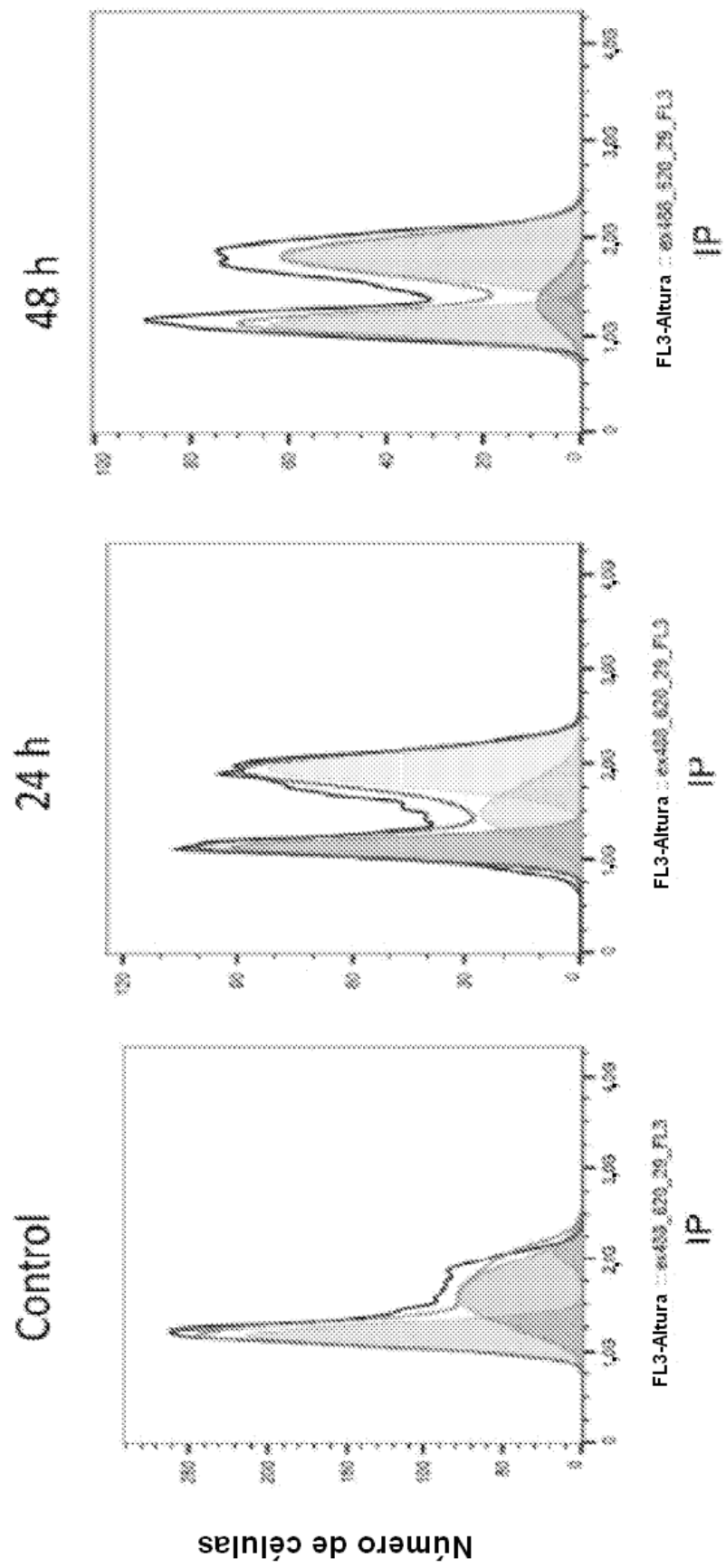


FIG. 5B

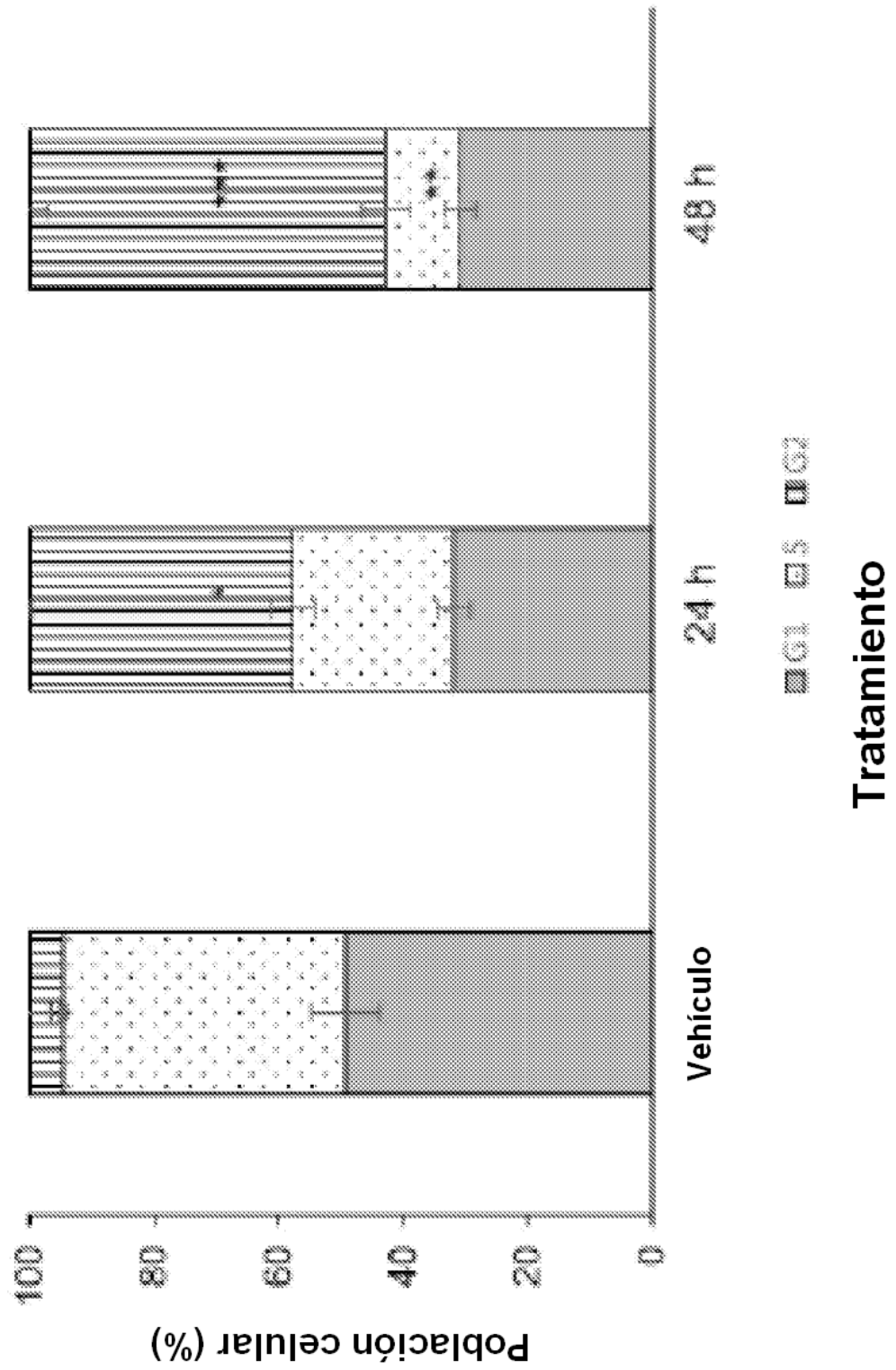


FIG. 6A

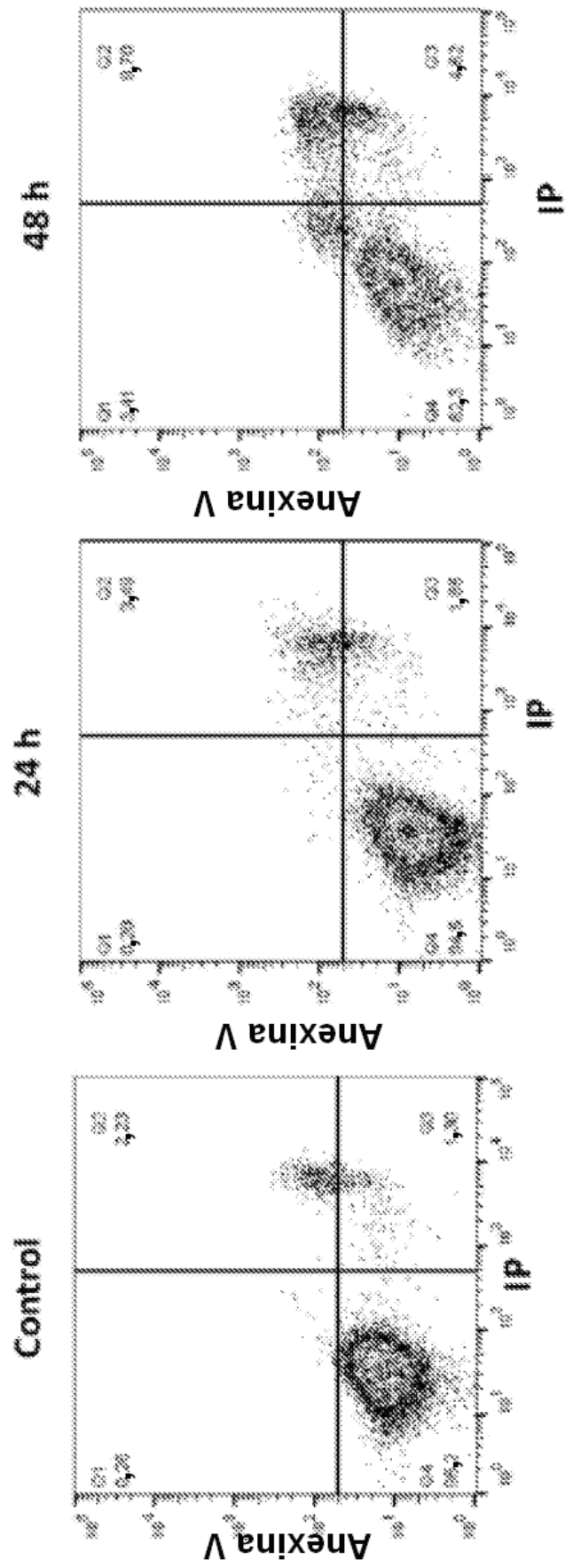


FIG. 6B

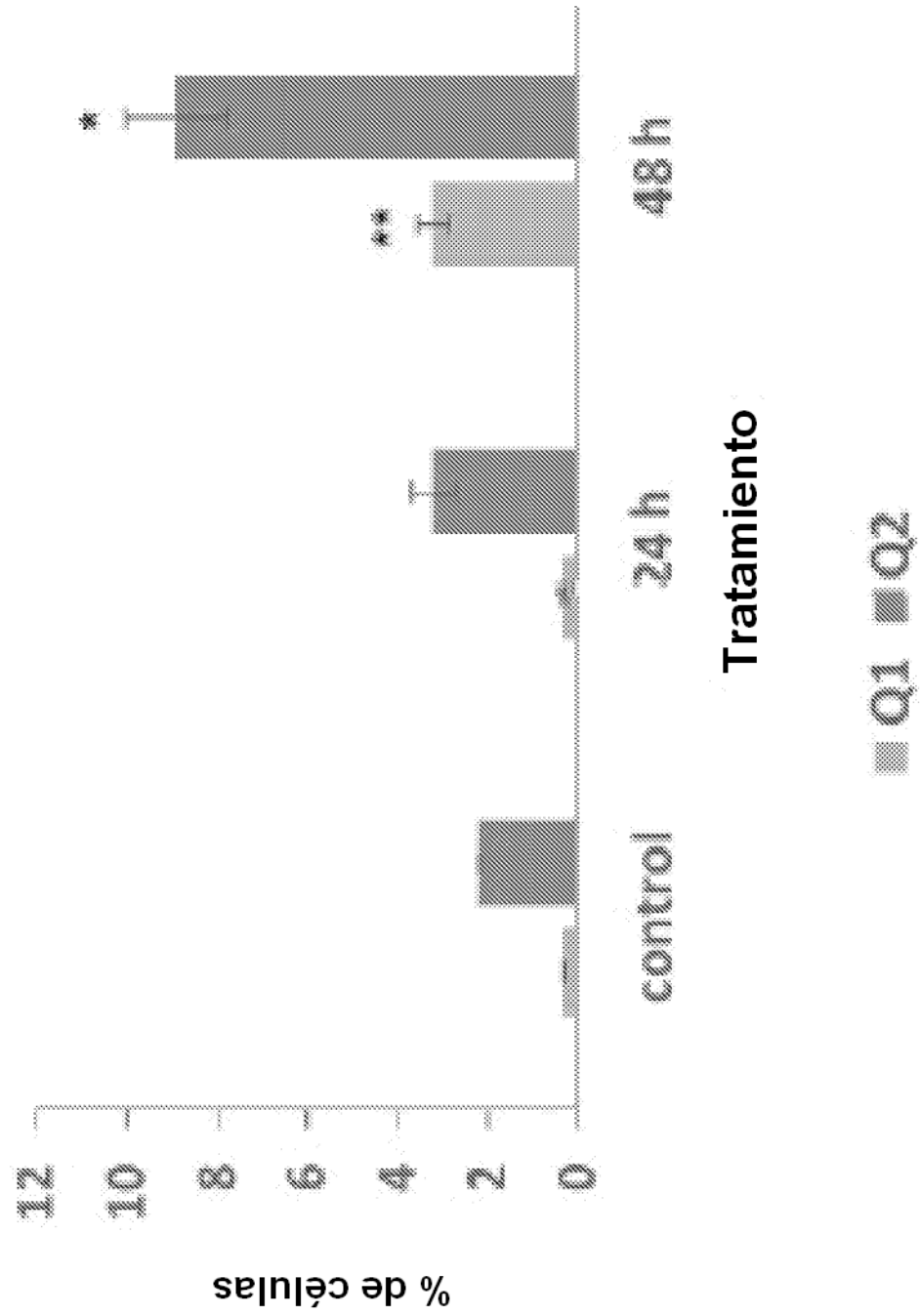


FIG. 7A

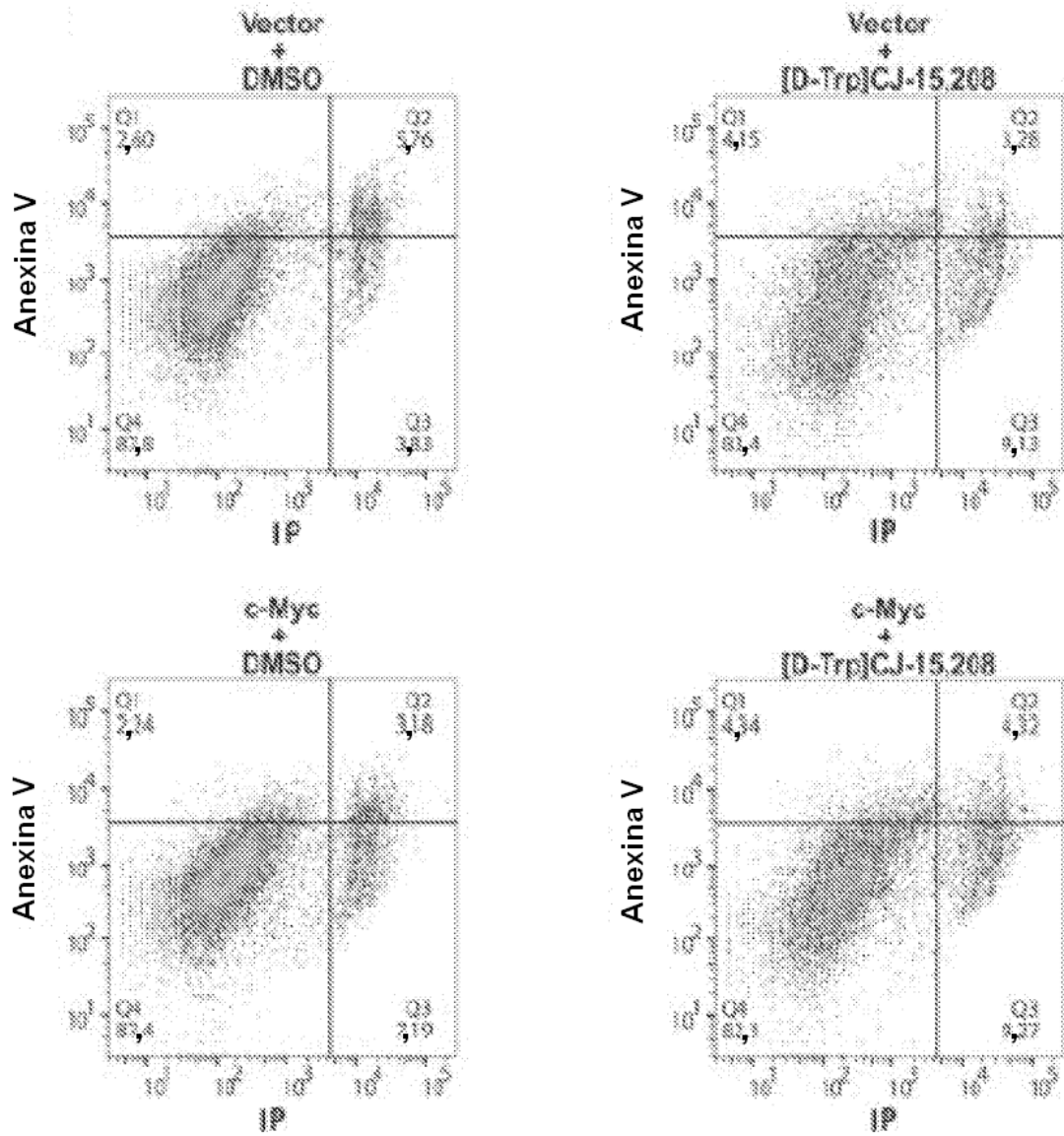


FIG. 7B

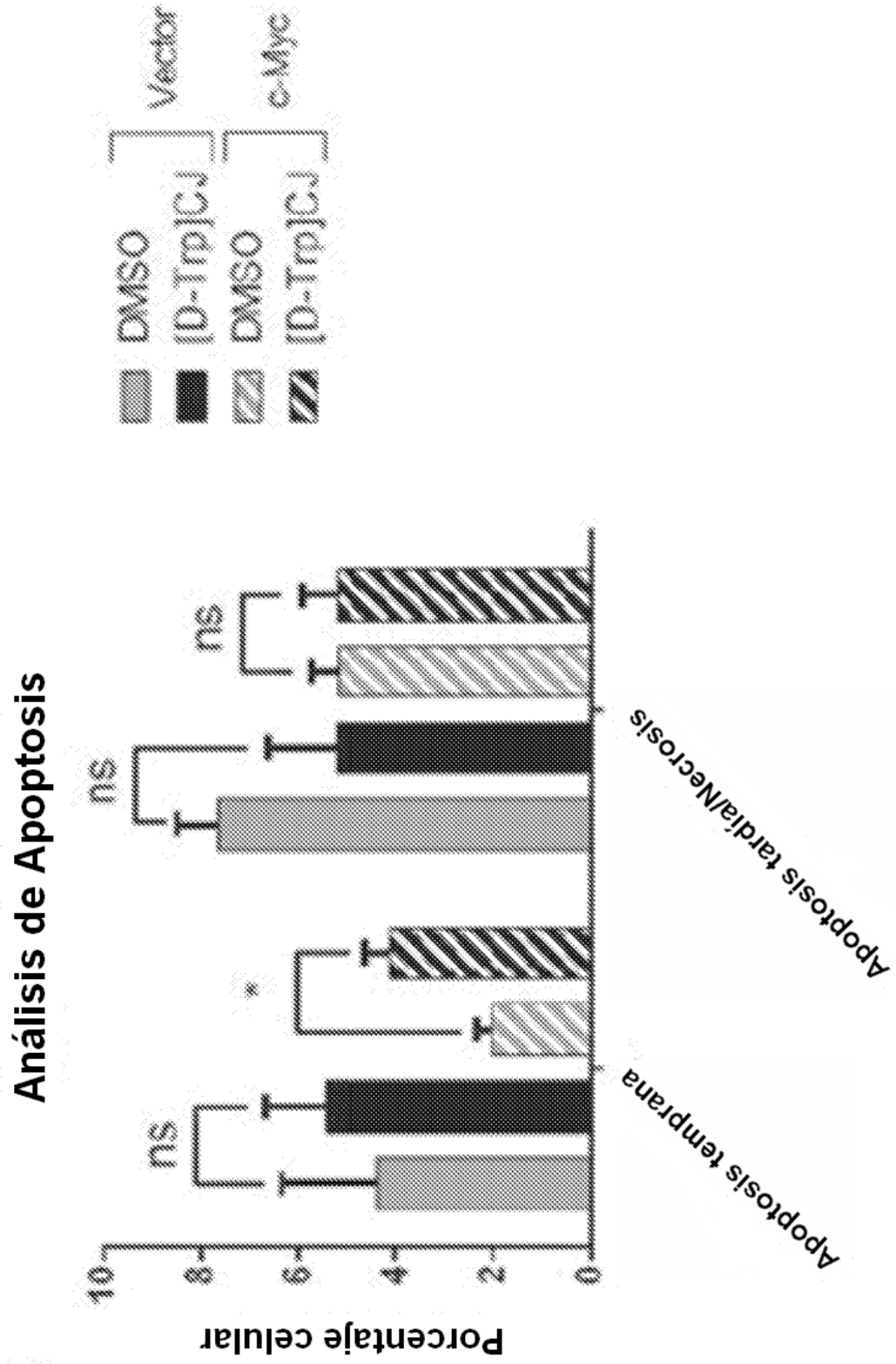


FIG. 7C

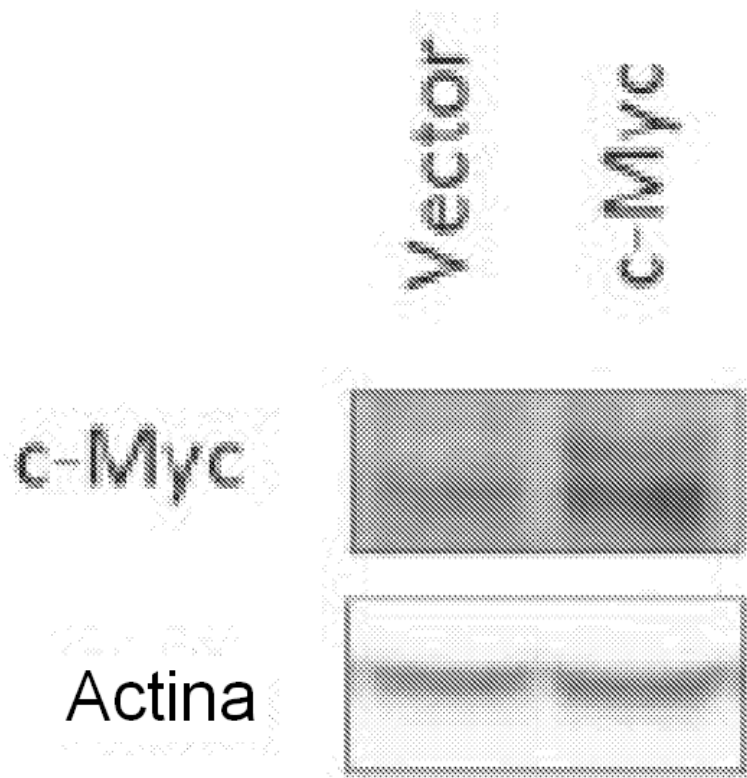


FIG. 8A

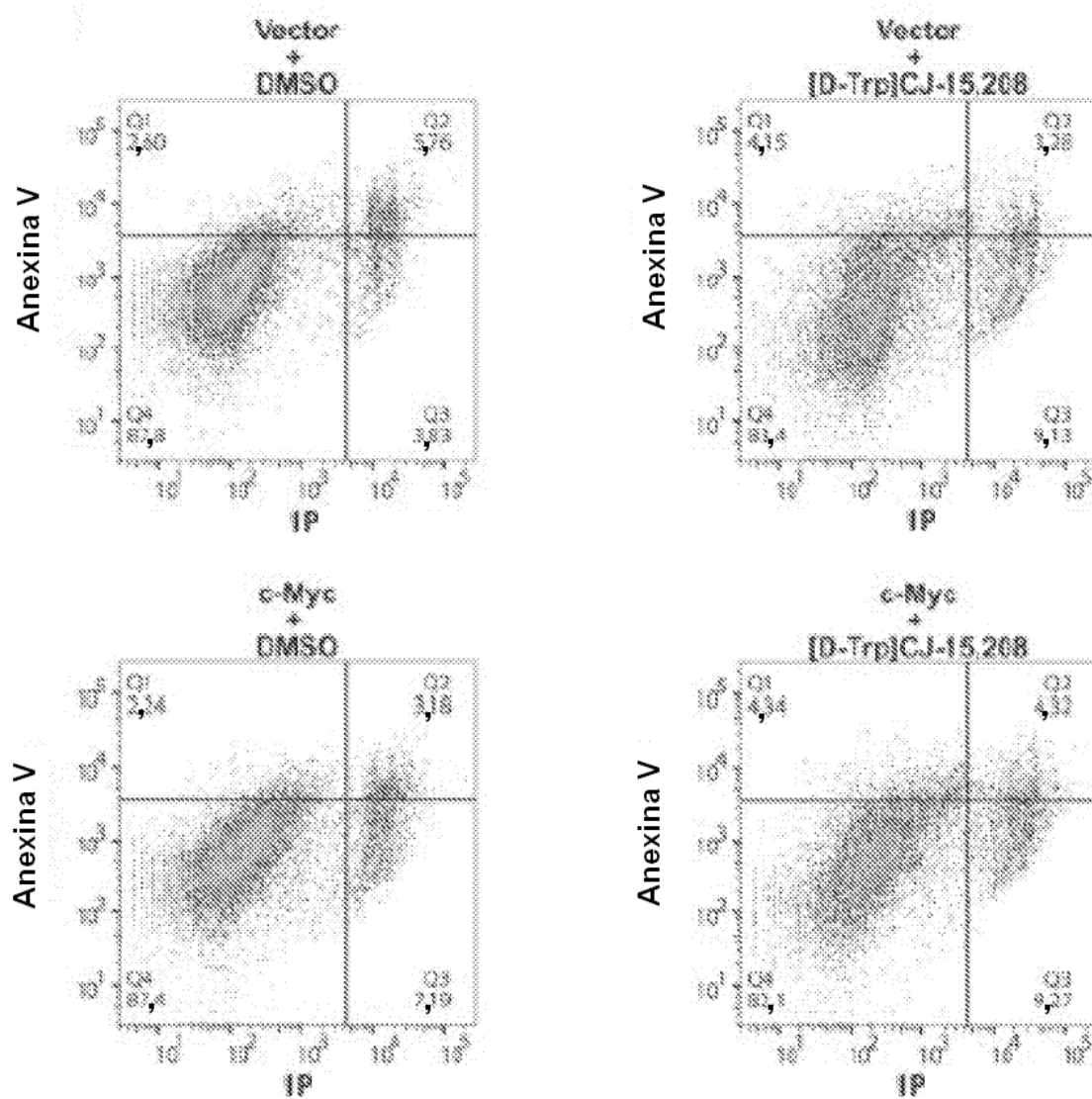


FIG. 8B

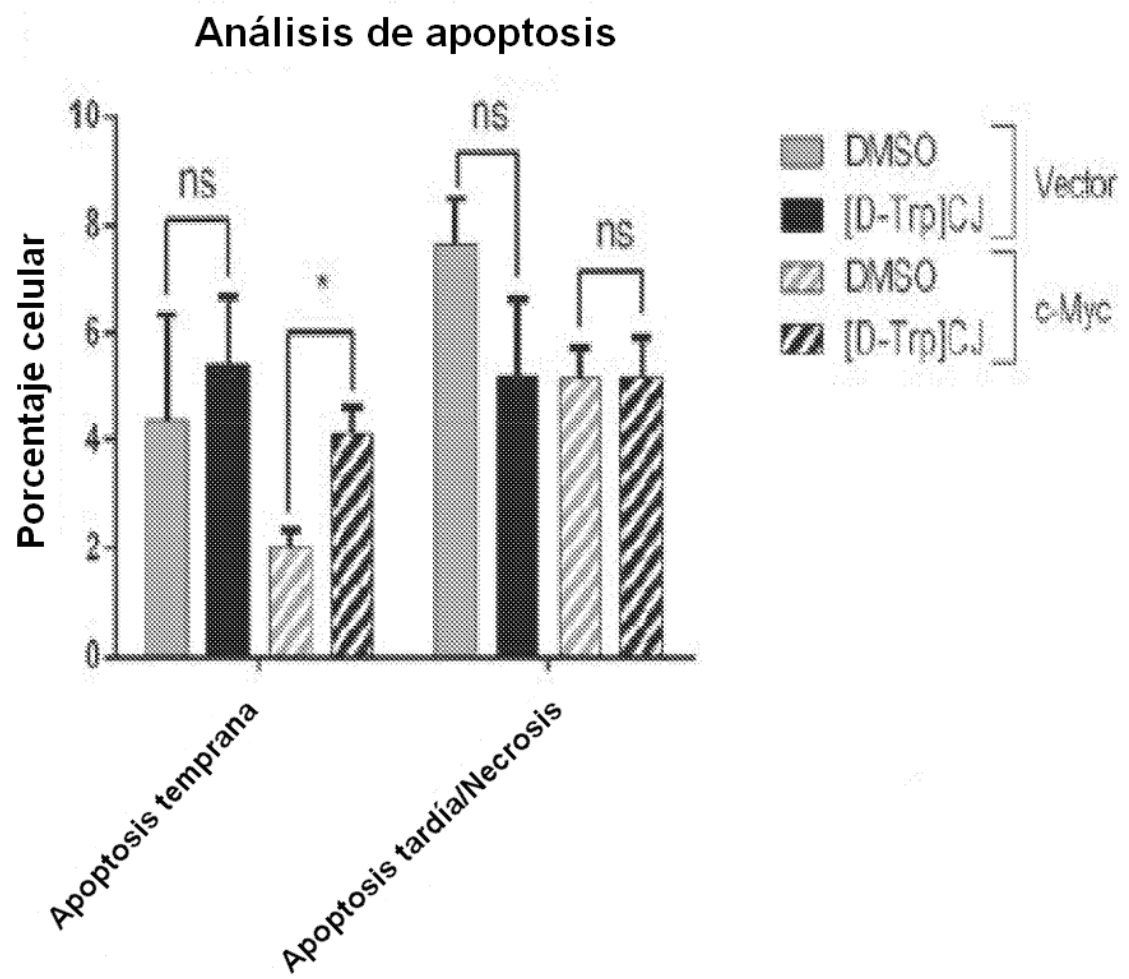


FIG. 8C

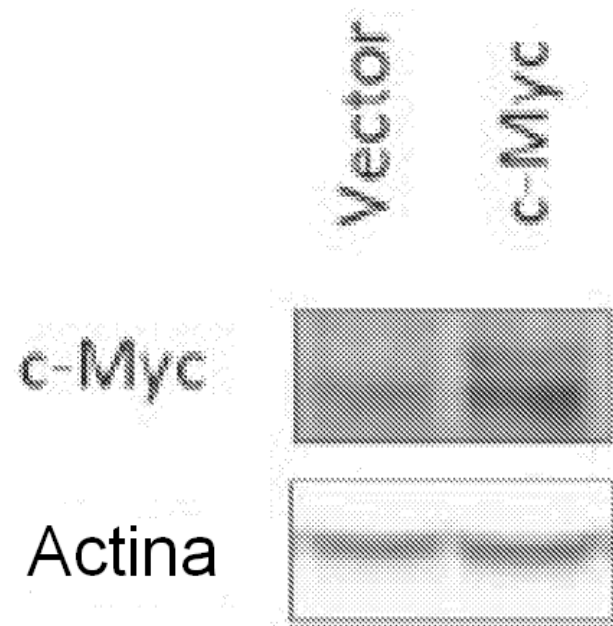


FIG. 10A

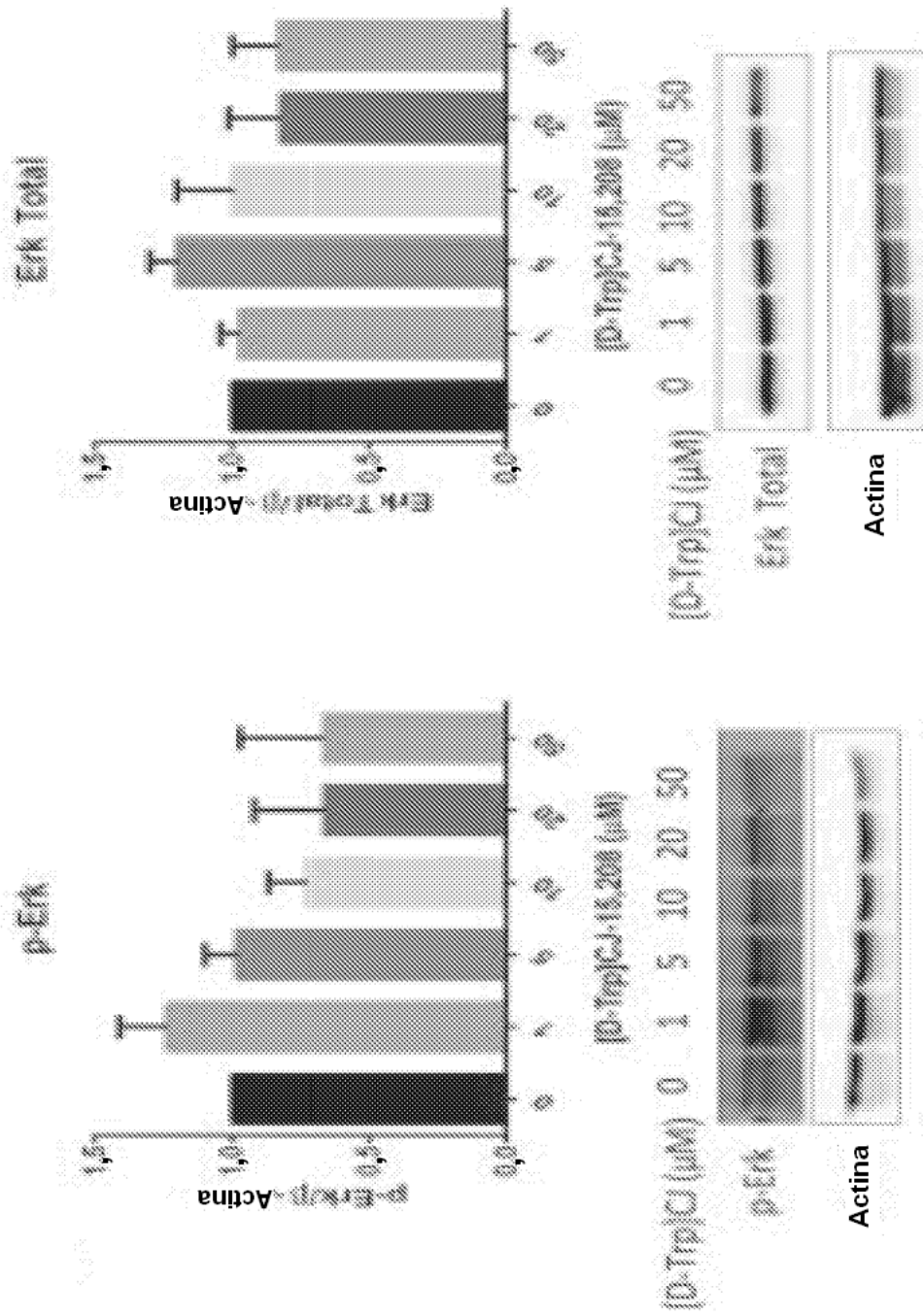
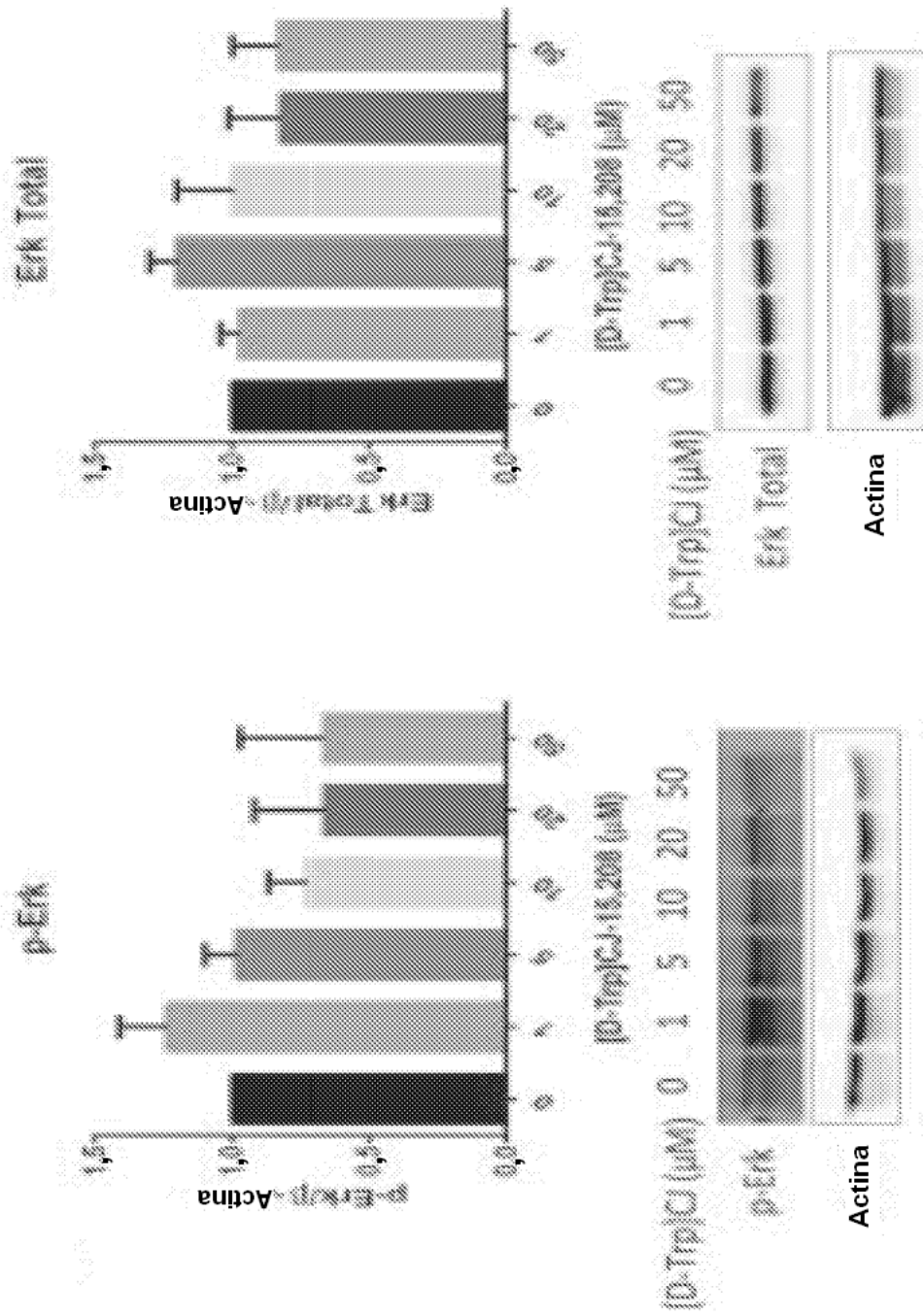


FIG. 10B



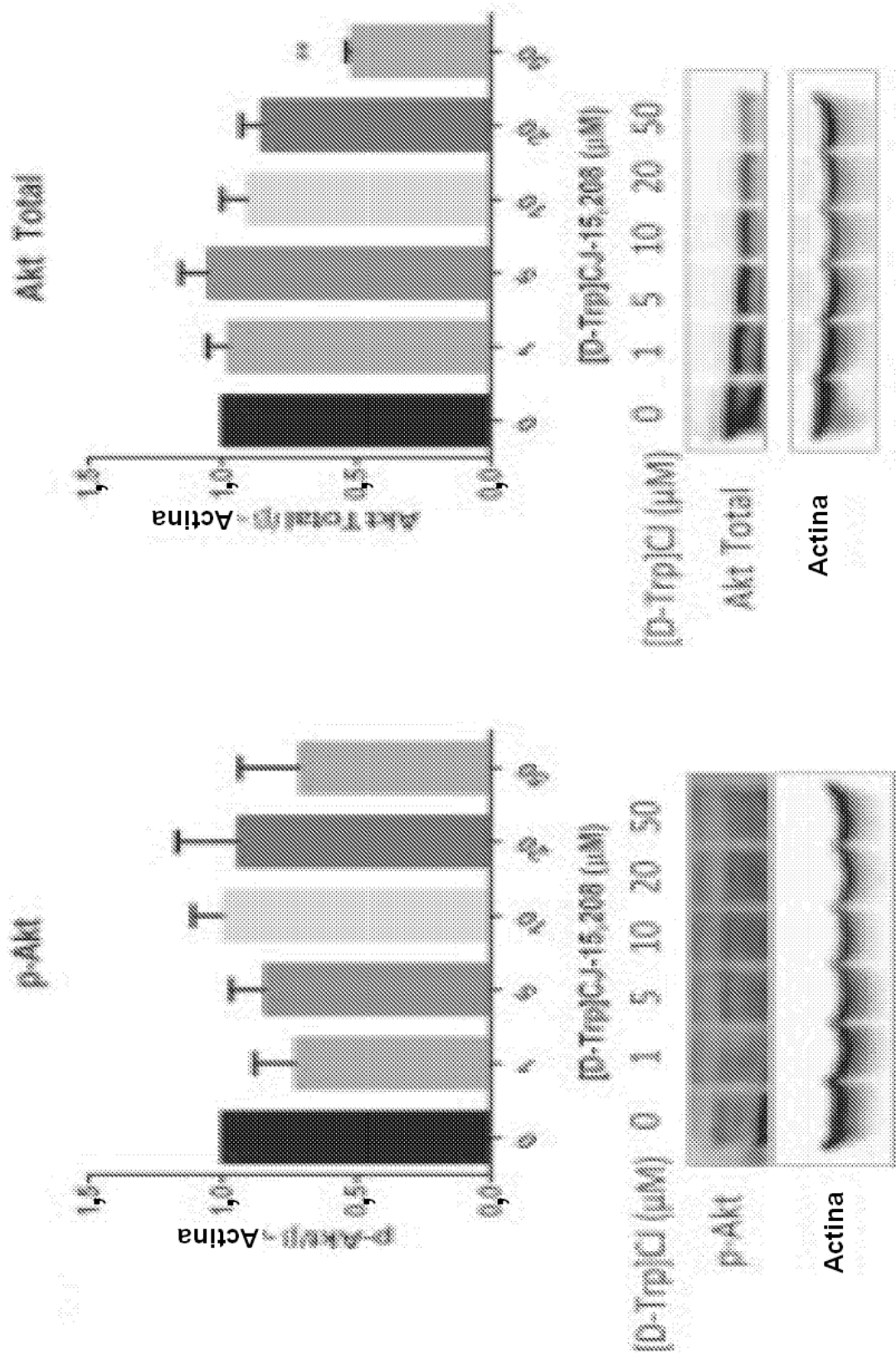


FIG. 10C

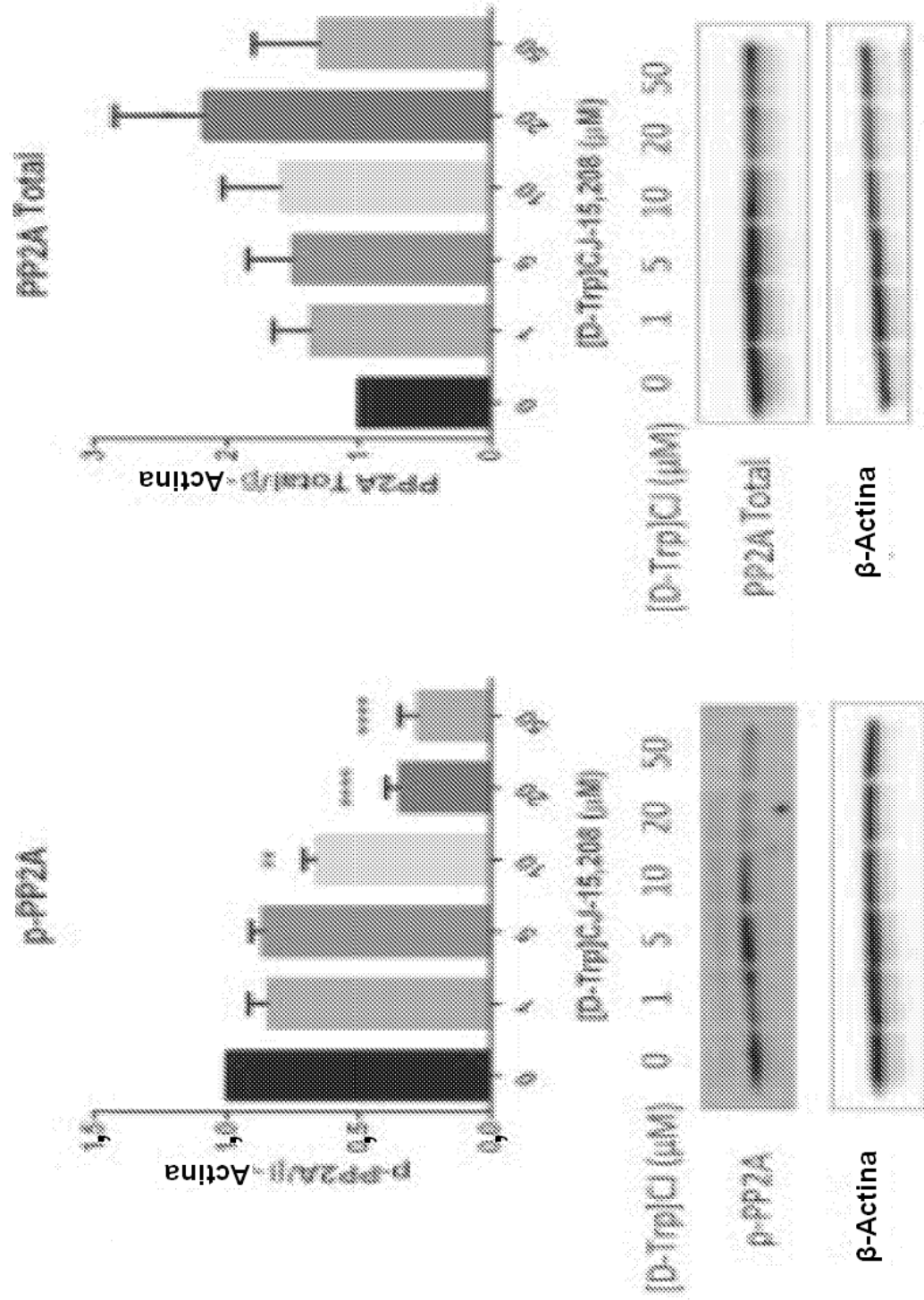


FIG. 10D

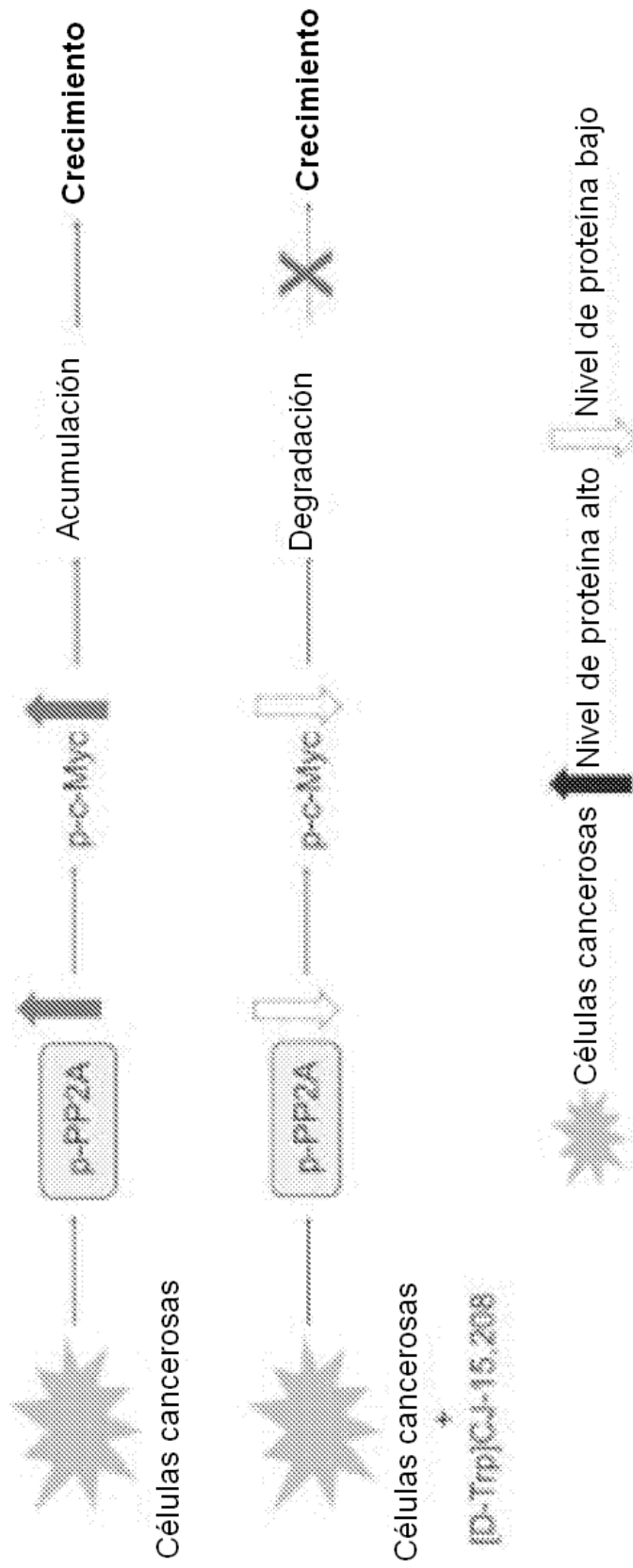


FIG. 11

