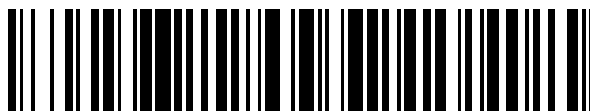


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 973**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2015 PCT/IB2015/002577**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16092378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2015 E 15834638 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3229831**

54 Título: **Métodos y composiciones para reducir el crecimiento, la migración y la invasividad de células madre de cáncer cerebral y mejorar la supervivencia de pacientes con tumores cerebrales**

30 Prioridad:

10.12.2014 US 201462090029 P

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

30.11.2020

73 Titular/es:

HYPERSTEM SA (100.0%)

Via Pretorio 13

6900 Lugano, CH

72 Inventor/es:

VESCOVI, ANGELO LUIGI y

BINDA, ELENA

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 796 973 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

Métodos y composiciones para reducir el crecimiento, la migración y la invasividad de células madre de cáncer cerebral y mejorar la supervivencia de pacientes con tumores cerebrales

Esta Solicitud reivindica el beneficio de prioridad con respecto a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 62/090 029 presentada el 10 de diciembre de 2014, titulada "METHODS AND COMPOSITIONS FOR REDUCING GROWTH, MIGRATION AND INVASIVENESS OF BRAIN CANCER STEM CELLS AND IMPROVING SURVIVAL OF PATIENTS WITH BRAIN TUMORS".

Campo de la invención

La invención descrita se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en un método para reducir el crecimiento, la migración, la invasión tumoral o una combinación de los mismos y mejorar la supervivencia del sujeto en relación con un control.

Antecedentes de la invenciónTumor maligno/cáncer

El cáncer es una enfermedad que implica un crecimiento celular anómalo en cuanto al número de células (proliferación) o al tamaño de las células con el potencial de invadir o diseminarse a otras partes del cuerpo (metástasis). La proliferación de células cancerosas es bien conocida, pero el(los) mecanismo(s) que conduce(n) a la metástasis no se conoce(n) bien. El cáncer es una enfermedad de alteraciones genómicas: los cambios en la secuencia de ADN, las aberraciones en el número de copias, los reordenamientos cromosómicos y la modificación en la metilación del ADN conducen conjuntamente al desarrollo y a la progresión de neoplasias malignas humanas. (The Cancer Genome Atlas Network (TCGA), Nature 2008, 455(23): 1061-68.)

Glioma

Un glioma es un tipo de tumor, que surge de las células gliales del cerebro o de la columna vertebral. El lugar más habitual donde se desarrollan los gliomas es el cerebro. Los gliomas representan aproximadamente el 30 % de todos los tumores cerebrales y del sistema nervioso central y el 80 % de todos los tumores cerebrales malignos.

Las células gliales, el tipo celular más abundante en el sistema nervioso central, son células de soporte que rodean a las neuronas y proporcionan soporte y aislamiento entre ellas. A diferencia de las neuronas, las células gliales no conducen impulsos eléctricos. Hay dos clases principales de células gliales en el sistema nervioso central: astrocitos y oligodendrocitos (Kandel ER, et al., Principles of Neural Science, 4ª Ed. McGraw- Hill Nueva York (2000), cap. 2, págs. 20-21).

Los gliomas se nombran según el tipo específico de célula con la que comparten características histológicas, pero no necesariamente de donde se originan. Los principales tipos de gliomas son: astrocitomas - que comparten características histológicas con los astrocitos (por ejemplo, el glioblastoma multiforme es un astrocitoma maligno y el tumor cerebral primario más común entre los adultos); oligodendrogliomas - que comparten características histológicas con los oligodendrocitos; glioma del tronco encefálico - un glioma que se desarrolla en el tronco encefálico; glioma del nervio óptico - un glioma que se desarrolla dentro o alrededor del nervio óptico; y gliomas mixtos, tales como oligoastrocitomas, que contienen células que comparten características histológicas con los oligodendrocitos y los astrocitos.

Además, los gliomas se clasifican según su grado, que se determina por la evaluación patológica del tumor. De los numerosos sistemas de clasificación en uso, el más común es el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el glioma, bajo el cual los tumores se clasifican de I a IV (Louis DN, et al., Acta Neuropathol, 2007, 114(2):97-109).

Los tumores de grado I son de crecimiento lento, no malignos y asociados a supervivencia prolongada (p. ej., astrocitoma pilocítico).

Los tumores de grado II son de crecimiento relativamente lento, pero a veces recurren como tumores de grado superior. Pueden ser no malignos o malignos (p. ej., astrocitoma difuso).

Los tumores de grado III son malignos y a menudo recurren como tumores de grado superior (p. ej., astrocitoma anaplásico).

Los tumores de grado IV se reproducen rápidamente y son tumores malignos muy agresivos (p. ej., glioblastoma, glioblastoma de células gigantes y gliosarcoma).

El meduloblastoma es el tipo más común de tumor cerebral primario que aparece en niños. El término "meduloblastoma" se refiere a una serie de tumores encontrados en el cerebelo de los niños. Originalmente clasificado como un glioma, el meduloblastoma (tumor de grado IV de la clasificación de la OMS) se conoce ahora como un tumor embrionario. Se cree que surge de la transformación maligna de la capa granular externa del cerebelo de los progenitores, este tumor representa aproximadamente el 7-8 % de todos los tumores intracraneales y el 30 % de los tumores cerebrales infantiles, y, en oposición a los tumores gliales, se caracteriza principalmente por la diferenciación neuronal.

Glioblastoma

El glioblastoma multiforme (GBM), un glioma maligno de grado IV de la clasificación de la OMS, nombre de clasificación "glioblastoma", es el tumor cerebral primario más común y más agresivo en adultos. El GBM surge de las células gliales y representa el 40 %-60 % de todos los tumores astrocíticos difusos y el 10 %-15 % de todas las lesiones neoplásicas intracraneales. Las características biológicas de este tumor se ilustran con una notable proliferación, invasividad activa y una rica angiogénesis. (Nakada, M. et al., Cancers, 2011, 3. 3242-3278). El GBM se compone de astrocitos neoplásicos poco diferenciados. La presencia de proliferación microvascular y/o necrosis es esencial para el diagnóstico histopatológico del GBM.

El GBM es uno de los cánceres humanos más agresivos y es muy difícil de tratar debido a diversos factores complicados: las células tumorales son muy resistentes a las terapias convencionales; el cerebro es susceptible al daño por la terapia convencional, el cerebro tiene una capacidad muy limitada de repararse a sí mismo; y muchos fármacos no pueden atravesar la barrera hematoencefálica para actuar sobre el tumor.

Aunque el tratamiento puede implicar radiación, cirugía y quimioterapia con temozolomida, que es un agente metilante (P.J. Noughton et al. Clin. Cancer Res. (2000) 6: 4110-4118), décadas de terapia quirúrgica, radioterapia y quimioterapia no han logrado cambiar drásticamente la supervivencia del GBM. La supervivencia media de los pacientes con GBM en poblaciones de ensayos clínicos tratados con estrategias de tratamiento multimodal es de aproximadamente 12-15 meses, sobreviviendo solo un 3 % - 5 % de los pacientes durante más de 36 meses. (McNamara. M.G. et al., Cancers, 2013, 5: 1103-1119).

Según la experiencia clínica, se han establecido dos subgrupos de GBM, glioblastoma primario y glioblastoma secundario, aunque desde el punto de vista histológico estos dos grupos son indiferenciables. El glioblastoma primario, que comprende más del 90 % de los casos biopsiados o resecaados, surge de nuevo sin antecedentes de enfermedad de grado bajo, mientras que el glioblastoma secundario progresa a partir de gliomas de grado bajo anteriormente diagnosticados.

Según una clasificación molecular basada en la expresión génica descrita por The Cancer Genome Atlas (TCGA) Network, El glioblastoma multiforme tiene cuatro subtipos moleculares distintos: Clásico, Proneural, Mesenquimal y Neural (TCGA Research Network, Nature, 2008, 455. 1061-1068).

Los tumores de GBM clásicos se caracterizan por una amplificación anómala y altos niveles de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, siglas del inglés *epidermal growth factor receptor*), que es una proteína que se encuentra en la superficie de algunas células que, cuando está unido por el factor de crecimiento epidérmico, envía señales para que la célula siga creciendo en número (proliferación). Las anomalías del EGFR se producen a una tasa mucho más baja en los otros tres subtipos de GBM. El gen *TP53* codifica la proteína tumoral p53 que normalmente suprime el crecimiento tumoral. El gen *TP53* rara vez está mutado en el subtipo de tumores de GBM clásico, pero es el gen mutado con mayor frecuencia en otros subtipos de GBM.

Los tumores de GBM Proneurales se caracterizan por alteraciones del receptor A del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA, *platelet derived growing factor receptor A*) y mutaciones puntuales en IDH1. El gen *IDH1* que codifica la isocitrato deshidrogenasa-1, cuando ha mutado, codifica una proteína que puede contribuir al crecimiento celular anómalo. También se descubrió, que el *PDGFRA*, que juega un papel importante en la proliferación celular, migración celular y angiogénesis, estaba mutado y expresado en cantidades excepcionalmente altas. La alteración del *PDGFRA* solo se produce en tumores Proneurales y no en ningún otro subtipo. Cuando el *PDGFRA* está alterado, se puede producir demasiada proteína, que conduce a un crecimiento tumoral incontrolado. Los pacientes de este subtipo tienden a ser más jóvenes y a sobrevivir más tiempo que en otros subtipos.

El subgrupo Mesenquimal contiene el número más frecuente de mutaciones en el gen supresor de tumores de la neurofibromatosis tipo 1 (*NF1*). En el subgrupo Mesenquimal también se encuentran frecuentes mutaciones en los genes supresores de tumores *PTEN* (homólogo de fosfatasa y tensina) y *TP53*. La proteína PTEN actúa como un supresor tumoral, ayudando a regular el ciclo de división celular.

Mientras que el subgrupo Neural tiene mutaciones en muchos de los mismos genes que los otros grupos, el grupo no se destaca de los otros por tener tasas de significativamente más altas o más bajas de mutaciones. El grupo Neural se caracteriza por la expresión de diversos marcadores que también son típicos del cerebro normal, células nerviosas, o neuronas, no cancerosas, tales como NEFL, GABRA1, SYT1 y SLC12A5.

Estos subtipos moleculares de glioblastoma multiforme parecen diferir en su evolución clínica y en sus respuestas terapéuticas. Por ejemplo, los diferentes subtipos muestran diversas respuestas a la quimioterapia y la radioterapia agresivas, con una diferencia de alrededor del 50 % entre los subtipos. Se ha sugerido que la patología de cada subtipo podría comenzar desde diferentes tipos de células, lo que podría explicar la variación en cuanto a la respuesta a la terapia. El mayor beneficio se observó en los subtipos Clásico y Mesenquimal, donde la terapia intensiva ha reducido significativamente la mortalidad; y hubo una sugerencia de eficacia en el subtipo Neural; pero el subtipo Proneural fue menos sensible a la terapia intensiva, incluida la quimioterapia convencional o la quimio-radioterapia. (Verhaak, RG, et al., Cancer Cell, 2010, 17(1):98-110.)

Tabla 1 Sumario de cuatro subtipos de glioblastoma según la clasificación TCGA (Bartek, J. Jr., et al., J. Neurol Neurosurg Psychiatry, 2012, 83:753- 760)

Phillips et al	Proneural	Proliferativo		Mesenquimal
Verhaak et al	Proneural	Neural	Clásico	Mesenquimal
Firma	Olig2/DLL3/SOX2	MBPZMAL	EGFR/AKT2	YKL40/CD44
Mutaciones	Mutaciones TP53 PI3K PDGFRA		ganancia de crom 7 pérdida de crom 10 PDGRR	NFkB NF1
Características clínicas	No responde a la quimioterapia		El resultado clínico mejoró con temozolomida/radiación	El resultado clínico mejoró con temozolomida/radiación

En cambio, un fenotipo mesenquimal es el sello distintivo de la agresividad tumoral en el glioma maligno humano. Las subclases Mesenquimal y Clásica muestran un peor pronóstico en comparación con los tumores Proneurales, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que un subconjunto de tumores Proneurales presenta mutaciones en el gen *IDH1* así como el fenotipo metilador de islas CpG de glioma (G-CIMP, por sus siglas en inglés *Glioma-CpG Island Methylator Phenotype*), ambos factores pronósticos favorables (Verhaak, RG, et al., Cancer Cell, 2010, 17(1):98-110).

Proliferación agresiva, invasividad activa y angiogénesis de GBM

La proliferación agresiva, la invasividad activa y la angiogénesis de GBM, se deben principalmente a rutas de señalización muy desreguladas en el tumor.

La actividad proliferativa con mitosis detectable mediante técnicas de histopatología, es notable en casi todos los casos de GBM. Dos de las cascadas de señalización de proliferación más importantes, frecuentemente desreguladas en el glioma, son las rutas PI3K/Akt/mTOR y Ras/MEK/MAPK que se comentarán más adelante.

La angiogénesis ubicua es una característica sobresaliente de los GBM. El grado de vascularización se correlaciona significativamente con neoplasia maligna de glioma, agresividad tumoral y pronóstico clínico. Las rutas proangiogénicas incluyen una secuencia de acontecimientos coordinados que se inicia mediante la expresión de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) con la posterior unión a sus receptores afines en las células endoteliales.

El GBM es muy invasivo. La invasión de un glioma es un proceso complejo que implica (1) desprendimiento del lugar original; (2) adhesión a la matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*); (3) remodelación de la ECM; y (4) migración celular. Las células migratorias de glioma tienden a desplazarse a lo largo de los vasos, dendritas y fibras de la sustancia blanca. Estas características sugieren que el GBM posee mecanismos biológicos específicos que median su naturaleza invasiva. La naturaleza enormemente infiltrativa de los gliomas humanos resume el comportamiento migratorio de los progenitores gliales durante el desarrollo del SNC, sugiriendo que los activadores, los receptores y las proteínas de señalización, que contribuyen a la migración de las células de la cresta neural pueden ser actores clave en la invasión del glioma. Los estudios acumulados han demostrado que la señalización de la invasión es inducida por varias clases de proteínas de tipo membrana, tales como la tirosina cinasa receptora (RTK, siglas del inglés *Receptor Tyrosine Kinase*), integrina, CD44 y receptor acoplado a proteína G (GPCR), así como moléculas de señalización intracelular, incluyendo PI3K/Akt y pequeñas GTPasas, tales como Rac1, cdc42 y RhoA. El antígeno CD44 es una glicoproteína de la superficie celular que participa en interacciones entre células, y en la adhesión y migración celular.

El EGFR y RTK Efa2 (receptor 2 de efrina tipo A) se expresan en GBM y se localizan en la superficie celular. La fosforilación de Efa2 depende de la actividad del EGFR, y la regulación negativa de Efa2 inhibe la fosforilación del EGFR, la señalización anterógrada (*downstream*) y la viabilidad celular inducida por EGF (Ramnarain, D.B.; Cancer Res. 2006, 66, 867-874).

Principales rutas de señalización de glioma.

Diversas rutas de señalización principales se han asociado al glioma (Nakada, M. et al., Cancers, 2011, 3: 3242-3278).

5 1. Ruta de la tirosina cinasa receptora (*Ruta RTK/PI3K/Akt/mTOR*).

La ruta RTK/PI3K/Akt, regula varios procesos celulares fundamentales tales como la proliferación, el crecimiento, la apoptosis y el reordenamiento del citoesqueleto. La ruta implica tirosina cinasas receptoras (RTK), por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), etc., así como la proteína fosfatasa supresora de tumores, por ejemplo, homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) y proteínas quinasas PI3K, Akt y mTOR. En la figura 1 se muestra la ruta de la Tirosina Cinasa Receptora (*Ruta RTK/PI3K/Akt/mTOR*).

En el GBM, la amplificación del gen *EGFR* es la alteración más frecuente (de aproximadamente 40 %). El EGFR es un miembro de glicoproteína transmembrana de la familia de receptores ErbB. En el GBM, el EGFR está desregulado a través de la sobreexpresión, que surge debido a la amplificación del gen EGFR o a la activación de mutaciones tales como EGFRvIII que conducen a la señalización independiente del ligando. Las aberraciones del EGFR se han correlacionado con un subtipo clásico de GBM (TCGA Research Network, Nature 455: 1061-68; Verhaak, R.G. et al., Cancer Cell, 2010, 17: 98-110). Aunque se ha sugerido que las alteraciones del EGFR pueden estar correlacionadas con un aumento de la agresividad del GBM (Nakada, M. et al., Cancers, 2011, 3: 3242-3278), los inhibidores del EGFR (p. ej., Gefinitib, Erlotinib) no han generado respuestas clínicas en pacientes con GBM (glioblastomas multiformes) en ensayos clínicos (Rich, J.N., et al., N. Engl. J. Med. 2004, 351, 1260-1261; Haas-Kogan, D.A. et al., J. Natl. Cancer Inst. 2005, 97, 880-887; van den Bent, M.J. et al., J. Clin. Oncol. 2009, 27, 1268-1274).

La sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*), especialmente PDGFR- α y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*) se ha observado en tumores astrocíticos de todos los grados, y su asociación se ha insinuado con progresión neoplásica (Nakada, M. et al., Cancers, 2011, 3: 3242-3278). La amplificación de PDGFRA (14 %), así como la mutación de *IDH1*, son características principales del subtipo Proneural del GBM según la clasificación del TCGA (TCGA Research Network, Nature 455: 1061-68; Verhaak, R.G. et al., Cancer Cell, 2010, 17: 98-110). A pesar de la honda asociación de esta molécula con el GBM, la terapia anti-PDGFR con Imatinib produjo solo respuestas clínicas limitadas (Reardon, D.A., et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 9359-9368; Reardon, D.A., et al., Br. J. Cancer 2009, 101, 1995-2004).

Las PI3K son cinasas lipídicas ampliamente expresadas que promueven diversas funciones biológicas. La unión de las proteínas PI3K y RTK da como resultado la activación de Akt a través del fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) y la proteína cinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositido (PDK1), que afecta a múltiples procesos celulares fundamentales, incluida la supervivencia, la proliferación y la motilidad celular. Según la clasificación genómica integrada del GBM, las mutaciones de PI3K (15 %) están asociadas al subtipo Proneural (TCGA Research Network, Nature, 2008, 455: 1061-68; Verhaak, R.G. et al., Cancer Cell, 2010, 17: 98-110).

La actividad reducida de PTEN puede activar la ruta de las RTK/PI3K/Akt ya que PTEN regula negativamente la ruta al antagonizar la función PI3K. La delección o mutación homocigota de PTEN es una característica genética común en el GBM (40 %), dando como resultado la activación constitutiva de la ruta de las RTK/PI3K/Akt. La pérdida de PTEN se asocia a los subtipos clásico y mesenquimal del GBM, según el estudio del TCGA (TCGA Research Network, Nature 455 (23): 1061-68).

La Akt es una STK (proteína cinasa específica de serina/treonina) que regula el crecimiento, la proliferación y la apoptosis celular. La activación de Akt se ha informado en aproximadamente el 80 % de los GBM humanos y se correlaciona con el hecho de que la señalización de las RTK/PI3K/Akt está alterada en el 88 % de los GBM (TCGA Research Network, Nature 455(23): 1061- 68). En el GBM no se han detectado mutaciones oncogénicas de *Akt*. La perifosina inhibidora de Akt se está sometiendo a evaluación clínica en gliomas malignos (Nakada, M. et al., Cancers, 2011, 3: 3242-3278).

2. Ruta p14^{ARF}/MDM2/p53.

El gen *p53* codifica una proteína que responde a diversas tensiones celulares para regular los genes diana que inducen la detención del ciclo celular, la muerte celular, la diferenciación celular, el envejecimiento, la reparación de ADN y la neovascularización. Después de producirse daños en el ADN, p53 se activa e induce la transcripción de genes (tales como p21Waf1/Cip1) que actúan como reguladores de la progresión del ciclo celular a la fase G1. El oncogén homólogo al doble minuto 2 murino (*MDM2*, *Mouse Double Minute 2*) inhibe la actividad transcripcional de *p53* al formar un complejo estrecho con el gen *p53*, y participa en la degradación de *p53*. El gen *p14^{ARF}* codifica una proteína que se une directamente a MDM2 e inhibe la degradación de *p53* mediada por MDM2. Después, *p53* regula negativamente la expresión de *p14^{ARF}*. Por tanto, la inactivación de *p14^{ARF}/MDM2/p53* está causada por la expresión alterada de cualquiera de los genes *p53*, *MDM2* o *p14^{ARF}*. La ruta de *p53* juega un papel crucial en el desarrollo de GBM secundarios. El gen *p53* es el gen de la ruta de *p53* más comúnmente mutado en el glioma; sin embargo, también

se han descrito anomalías moleculares que implican a otros genes de la ruta. (Nakada, M. et al., Cancers, 2011, 3: 3242-3278). En la figura 2 se muestra la ruta de p14^{ARF}/MDM2/p53.

3. Ruta de RB.

La ruta de RB (proteína supresora de tumores del retinoblastoma) suprime la entrada y la progresión del ciclo celular, así como la ruta de p53. La proteína RB1 de 107 kDa codificada por RB1 (en 13q14) controla la progresión a través de G1 hacia la fase S del ciclo celular (Serrano, M., et al., Nature, 1993, 366: 704-707). La proteína CDKN2A (es decir, p16^{INK4a} que es el inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina) se une a cinasas dependientes de ciclina 4 (CDK4) e inhibe el complejo CDK4/ciclina D1, inhibiendo así la transición del ciclo celular de la fase G1 a la S. Por tanto, la alteración de RB1, CDK4 o CDKN2A puede causar desregulación de la transición de fase G1-S. Sin embargo, la alteración de solo la ruta de RB es insuficiente para inducir la formación de tumores. La amplificación de EGFR mejora la ruta de pro-crecimiento PI3K y generalmente se asocia a deleciones de CDKN2A. La pérdida de CDKN2A está asociada al subtipo clásico de GBM, según el estudio del TCGA (por las siglas del inglés *The Cancer Genome Atlas*, El Atlas del genoma del cáncer). (Nakada, M. et al., Cancers, 2011, 3: 3242-3278). En la figura 2 se muestra la ruta de RB.

4. Ruta Ras/MEK/MAPK.

Las proteínas RAS (del inglés *Rat sarcoma*, sarcoma de rata) actúan como interruptores de encendido/apagado (RAS-GDP/RAS-GTP) controlados por las RTK y el gen supresor de tumores de la neurofibromatosis tipo 1 (NF-1). Después de activarse RAS (RAS-GTP), ésta activa a la serina/treonina cinasa RAF. RAF activa a la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPKK, *mitogen-activated protein kinase*), también denominada MEK, que a su vez activa a MAPK. La activación de MAPK da como resultado la activación de diversos factores de transcripción, tales como Elk1, c-myc, Ets, STAT1/3 y PPAR.

El gen supresor de tumores de la NF-1 codifica la neurofibromina, que funciona principalmente como un regulador negativo de RAS y juega un papel en las rutas mediadas por la adenilato ciclasa y Akt- mTOR. Cada vez hay más pruebas de que el gen *NF-1* está implicado en la tumorigénesis de gliomas no solo relacionados con NF-1, sino también de los que se producen esporádicamente. En el estudio piloto del TCGA, se identificaron mutaciones/deleciones homocigóticas de NF-1 en el 18 % de los GBM. Los GBM mesenquimales, que tienen inactivación frecuente de los genes NF-1 (37 %), p53 (32 %) y PTEN, responder a terapias agresivas de quimiorradiación adyuvante. (Nakada, M. et al., Cancers, 2011, 3: 3242-3278). En la figura 3 se muestra la ruta de Ras/MAPK. En la figura 4 se muestra una vista global de las rutas de señalización mencionadas anteriormente.

Además de las rutas de señalización mencionadas anteriormente, otras rutas de señalización pueden desempeñar un papel en el inicio, migración e invasión del GBM.

Rutas de señalización de Wnt (familia de proteínas *wingless* relacionada con la integración del virus de tumor mamario murino)

Las proteínas codificadas por los genes WNT juegan un papel en el desarrollo embrionario normal. Los procesos embrionarios que controlan incluyen patrones del eje corporal, especificación del destino celular, proliferación celular y migración celular. Estos procesos son necesarios para la formación adecuada de tejidos importantes, incluidos los huesos, corazón y músculo. Las rutas de señalización de Wnt, que son complejas, se activan de manera aberrante en una amplia gama de neoplasias malignas. Las proteínas Wnt también se han implicado en la tumorigénesis, y la activación inapropiada de la ruta de Wnt provoca la aparición de varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de próstata, glioblastoma y otros. (Camilli, T. C., Biochem. 2010, Pharmacol. 80(5): 702-711; Polakis P., Curr Opin Genet Dev 2007: 17(1):45-51).

Las rutas de señalización de Wnt son un grupo de rutas de transducción de señales de proteínas que transmiten señales desde el exterior de una célula a través de los receptores de la superficie celular al interior de la célula. La variedad de receptores y ligandos implicados en la señalización de Wnt conducen a una multitud de diversas cascadas de transducción de señales.

La familia de proteínas Wnt consta de 19 miembros humanos conocidos (Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt9A, Wnt9B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11, Wnt16). Estas glucoproteínas de señalización secretadas, modificadas por lípidos, tienen una longitud de 350-400 aminoácidos, comparten una identidad de aminoácidos del 20-85 % y tienen un patrón conservado de 23-24 restos de cisteína. El tipo de modificación lipídica que se produce en estas proteínas es la palmitoilación de la cisteína en el patrón conservado de 23-24 restos de cisteína. La palmitoilación inicia el direccionamiento de la proteína Wnt a la membrana plasmática para su secreción y permite que la proteína Wnt se una a su receptor debido a la unión covalente de los ácidos grasos. Después de su síntesis, las proteínas Wnt secretadas se modifican por glucosilación. En la señalización de Wnt, estas proteínas secretadas actúan como ligandos activando diferentes rutas de Wnt a través de las vías paracrinas y autocrinas.

Las rutas de señalización de Wnt se activan mediante la unión de un ligando de la proteína Wnt con un receptor de la familia Frizzled ("Fz"), que transfiere la señal biológica a la proteína Dishevelled que se encuentra dentro de la célula. Hasta ahora, se han identificado al menos diez miembros de receptores de la familia Frizzled, siendo todos ellos proteínas con siete dominios transmembrana caracterizadas por un dominio rico en cisteína (CRD, *cysteine-rich domain*) conservado N-terminal extracelular que interacciona con las proteínas Wnt. Sin embargo, para facilitar la señalización de Wnt, también pueden ser necesarios correceptores junto con la interacción entre la proteína Wnt y el receptor de Fz. Los ejemplos incluyen la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (Lrp5/6), la tirosina cinasa receptora (Ryk) y Ror2.

La interacción de las proteínas Wnt con sus receptores y correceptores se asocia a al menos tres rutas de señalización, en concreto, la ruta canónica de Wnt/ β -catenina, la ruta de polaridad celular planar (PCP, *planar cell polarity*) no canónica (o herética) y la ruta de Wnt/ Ca^{2+} no canónica (o herética). En la figura 5 se muestra estas tres rutas de señalización de Wnt representativas. Los receptores de Fz tienen la capacidad de discriminar entre diferentes ligandos de Wnt, y como tal, la activación de una de estas tres rutas está dictaminada por la naturaleza de la interacción entre ligando/receptor. (Camilli, T. C., Biochem. 2010, Pharmacol. 80(5): 702-711). La ruta de Wnt canónica conduce a la regulación de la transcripción génica, la ruta de polaridad celular planar no canónica regula el citoesqueleto que es responsable de la forma de la célula, y la ruta no canónica de Wnt/calcio regula el calcio dentro de la célula. Las rutas de señalización de Wnt utilizan la comunicación entre células cercanas (paracrina) o la comunicación de la misma célula (autocrina).

Ruta de señalización de Wnt canónica

La ruta de señalización de Wnt canónica es una ruta de señalización bien establecida, dependiente de β -catenina, que implica un mediador clave, la β -catenina. En ausencia de señalización de Wnt, la caseína cinasa 1 (CK1, *casein kinase 1*) y la glucógeno sintasa cinasa 3 beta (GSK3 β , *glycogen synthase kinase 3 beta*) fosforilan a la β -catenina dentro de un "complejo de destrucción" formado por varias proteínas, entre las que se incluye la proteína estructural Axina y el producto génico supresor de tumores APC (*Adenomatous Polyposis coli*, poliposis coli adenomatosa). La β -catenina fosforilada es reconocida después por la maquinaria de ubiquitinación y se envía para su degradación en el proteasoma. Cuando las Wnt se unen a sus receptores Fz y Lrp5/6, Lrp5/6 se fosforila y la proteína Dishevelled se activa, lo que conduce a la inactivación o al desensamblaje del "complejo de destrucción" de la β -catenina de tal manera que la fosforilación de la β -catenina se reduce y la β -catenina se estabiliza. La β -catenina estabilizada se transloca después al núcleo donde regula la expresión génica anterógrada al unirse a Lef (*Lymphoid enhanced transcription factor*, factor de transcripción potenciador linfóide) y a Tcf (*T-cell factor*, factor de linfocitos T), lo que conduce a la transcripción de genes diana Wnt implicados en la proliferación y la progresión tumoral. Varios miembros de la ruta pueden regularse independientemente de la señalización de Wnt. Por ejemplo, la ILK (*Integrin Linked Kinase*, cinasa ligada a integrina) puede inhibir a la GSK-3 β (glucógeno sintasa cinasa 3 beta), y está en la intersección de numerosas rutas que podrían regular su expresión. Las proteínas Wnt canónicas incluyen Wnt1, Wnt2, Wnt3a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a, Wnt10b (Jiar CH, J Oral Pathol. Med., 2012, 41 (4):332-339).

La ruta de Wnt canónica en cáncer

La estabilización de la β -catenina, la falta de degradación y, en última instancia, la acumulación nuclear, se han relacionado con una morfología pobremente diferenciada (Endo K, et al., Hum Pathol 2003, 31 (5): 558-565), alta actividad proliferativa (Inagawa S., et al., Clin Cancer Res 2002, 8(2):450-456), y mal pronóstico (Wang CM, et al., Cancer 2001, 92 (1): 136-145). El destino de la β -catenina, concretamente, su acumulación o degradación, está regulado por numerosas proteínas, que, si no está regulado o expresado adecuadamente, explicaría el aumento de la expresión de la β -catenina en el cáncer. Esta desregulación puede ocurrir debido a mutaciones en los diversos miembros de la ruta de señalización, o a sucesos epigenéticos. Las mutaciones en las Wnt son raras. Sin embargo, las mutaciones que afectan a dianas anterógradas, son bastante frecuentes en el cáncer.

El primer papel descrito, y quizás el mejor conocido sobre la señalización de Wnt/ β -catenina, es en el cáncer de colon, donde casi el 90 % de estos tumores albergan mutaciones que producen mutación de β -catenina.

Diversas terapias de Wnt que se dirigen a las rutas de la β -catenina han sido objeto de ensayos clínicos en seres humanos. El documento WO 2011/088127 hace referencia al uso de un agente de unión a Wnt o a un anticuerpo para reducir el crecimiento, la tumorigenicidad y la invasividad de los tumores

Ruta de señalización no canónica

La ruta de señalización no canónica es un término general para todas las rutas de señalización celular activadas por Wnt que no promueven la transcripción mediada por β -catenina, y se han identificado numerosas rutas de este tipo. A diferencia de las rutas de Wnt canónicas, las rutas no canónicas no pueden transformar las células epiteliales mamarias y se cree que están implicadas principalmente en el movimiento celular y la polaridad (Veeman MT, et al., Curr Biol 2003, 13 (8): 680-685; Kikuchi A, et al., Cancer Sci 2008, 99 (2):202-208). Hay al menos dos rutas principales de Wnt no canónicas, la ruta de polaridad celular planar (PCP) y la ruta Wnt/ Ca^{2+} . Sin embargo, dado que en ambas intervienen moléculas clave tales como Wnt5A y ROR2, es bastante difícil discernir las rutas de Wnt/PCP y Wnt/ Ca^{2+}

en el cáncer humano.

La ruta de Wnt/PCP se ha descrito mejor en el desarrollo, donde coordina la polarización de las células a lo largo de los ejes embrionarios. Esto implica la activación de STAT3 y la señalización JAK/STAT (Miyagi C, et al., J Cell Biol 2004, 166 (7): 975-981). Las Wnt que juegan un papel en la señalización de Wnt/PCP incluyen Wnt5A, Wnt11 y Wnt 7a (Wang Y., Mol Cancer Ther, 2009; 8(8): 2103-2109). Durante la señalización de Wnt/PCP, las interacciones entre Wnt/Fz/Ror2 reclutan proteínas *Disheveled* (Dsh/Dvl) a la membrana, desencadenan el reclutamiento de las proteínas vang y prickle en la membrana de células adyacentes, y el equilibrio entre estas regula la polaridad. La señalización de Wnt/PCP dependiente de proteínas *Disheveled* transduce después las señales a través de JNK, Jun, Daam, RhoA, Rac, Cdc42 y Profilina, y estas tienen efectos citoesqueléticos que finalmente controlan tanto la polaridad como la motilidad (Carreira-Barbosa F, et al., Development 2003, 130(17):4037-4046, Takeuchi M, et al., Curr Biol 2003; 13(8):674-679; Qian D, et al., Dev Biol 2007, 306 (1): 121-133). Dado que estas características (es decir, polaridad y motilidad) son críticas para la progresión del tumor, la señalización de Wnt/PCP se ha implicado en el cáncer. (Camilli, T. C., Biochem. 2010, Pharmacol. 80(5): 702-711).

La ruta de Wnt/Ca²⁺ implica la liberación de calcio intracelular de la señalización anterógrada de Wnt. Los miembros de la familia de Wnt implicados en la ruta de señalización Wnt/Ca²⁺ incluyen Wnt5a, Wnt11 y Wnt4, y se demostró que la activación de los receptores de Fz por estos miembros de Wnt da como resultado la activación de moléculas de señalización dependientes de calcio, tales como la proteína cinasa II dependiente de calmodulina (CAMKII, *calmodulin-dependent protein kinase II*) y la proteína quinasa C (PKC, *protein kinase C*). Estas moléculas pueden tener una gran variedad de efectos sobre la señalización anterógrada que a menudo depende del contexto celular. (Camilli, T. C., Biochem. 2010, Pharmacol. 80(5): 702-711).

Se han sugerido más cascadas de Wnt no canónicas (rutas) incluyendo la señalización de RAP1-Wnt; la señalización del receptor 2 huérfano similar al receptor de tirosina cinasa (Ror2) - Wnt; la señalización de la proteína cinasa A-Wnt; la señalización de microtúbulos GSK-3-Wnt; la señalización de la proteína cinasa C (PKC) atípica- Wnt; la señalización de la tirosina cinasa similar al receptor-Wnt; y la señalización de la diana de rapamicina de mamífero-Wnt. Estas clasificaciones no son rígidas ya que las ruta se superponen y se cruzan entre sí y están evolucionando. (Semenov, M. V.; Cell 2007, 131: 1378).

Antagonistas de Wnt endógenos

La activación de la ruta de Wnt está regulada por inhibidores de Wnt secretados (Miller JR, et al., Oncogene 1999, 18 (55): 7860-72). Estos inhibidores influyen en la unión de los ligandos Wnt con a sus receptores o correceptores. Estos antagonistas de Wnt incluyen los miembros de las proteínas secretadas relacionadas con *frizzled* (sFRP, *secreted frizzled related proteins*) que se unen a las proteínas Wnt directamente, y los miembros de la familia *Dkkopf* (Dkk) que se unen a las LRP correceptoras de Wnt. La inactividad transcripcional de las sFRP se ha detectado en diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal (Suzuki H, et al., 2002, 31 (2):141- 9). También se ha demostrado que los miembros de la familia Dkk tienen un efecto inhibitorio sobre la señalización de Wnt (Wu, W, et al., Curr Biol 2000, 10(24):611-1614).

Papel y función de Wnt5a

Se ha demostrado que Wnt5a, según sus diferentes efectos en presencia de diferentes receptores, tiene una función supresora tumoral o una función oncogénica, dependiendo del tipo de cáncer. Por ejemplo, su expresión está regulada negativamente en el cáncer colorrectal, cáncer de mama ductal, leucemia y neuroblastoma. (Blanc, E. et al., Oncol Rep., 2005 14(6): 1583-1588). En cambio, se demostró que Wnt5a se sobreexpresa en cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de próstata. Se descubrió que la expresión del gen Wnt5a aumentaba en células de melanoma más metastásicas y que el aumento de la expresión conducía a una mayor motilidad. (Weeraratna AT et al., Cancer Cell, 2002, 1(3). 279-288).

La pérdida de la expresión de la proteína Wnt5a se asocia a una supervivencia sin recurrencia más corta en pacientes con carcinoma de mama y a un aumento de la motilidad en las líneas celulares mamarias. Basándose en el análisis de secuencias de Wnt5a, Se han identificado 14 fragmentos peptídicos y una variedad de derivados peptídicos y se ha informado sobre su capacidad para imitar los efectos de Wnt5a sobre la adhesión de células mamarias y el deterioro de la migración en una línea celular de cáncer de mama. Foxy-5, un hexapéptido (formil-Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu), procedente del fragmento peptídico 175 de 12 aminoácidos de longitud (Asn-Lys-Thr-Ser-Glu-Gly-Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu) de Wnt5a, que actúa como un agonista de Wnt5a, se desarrolló para su uso en cáncer de mama. Se comunicó que el péptido Foxy-5 restableció la adhesión y redujo la motilidad de las células tumorales mediante un mecanismo dependiente del receptor de Frizzled 5. Este ligando hexapeptídico formulado indujo una rápida señal de calcio citosólico, pero no afectó a los niveles celulares de β -catenina no fosforilada o JNK activa. Foxy-5 activa específicamente a los receptores 1 y 4 activados por la proteasa acoplada a la proteína G. En células de mamífero, la secuencia hexapeptídica Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu está presente únicamente en las proteínas Wnt-5. La N-formilación del hexapéptido no puede encontrarse en las células de mamíferos. Análisis *in vitro* revelaron que tanto la proteína Wnt5a recombinante como el péptido Wnt5a, procedente de Wnt5a, alteraban la migración y la invasión sin afectar a la apoptosis o a la proliferación de células de cáncer de mama 4T1. Experimentos *in vivo* mostraron que inyecciones

i.p. de Foxy-5 inhibieron la metástasis de las células de cáncer de mama 4T1 inoculadas desde el pániculo adiposo mamario hasta los pulmones y el hígado un 70 % a un 90 % (Safholm, A, et al., Clin Cancer Res, 2008, 14(20):6556-6563).

En melanoma, la expresión elevada de Wnt5a promueve la motilidad celular y conduce a la metástasis. Se exploraron dos enfoques para contrarrestar estos efectos: la inhibición de la expresión de Wnt5a o el bloqueo directo de la señalización de Wnt5a. Box5, un hexapéptido (t-butoxicarbonil-Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu), modificado de Foxy-5, desarrollado para su uso en melanoma, es un fuerte antagonista selectivo de la migración y la invasión de células de melanoma mediada por Wnt5a, las cuales son componentes esenciales del proceso metastásico en el melanoma (Jenei, V. et al., PNAS, 2009, 106 (46). 19473- 19478).

El perfil de expresión génica ha indicado que Wnt5a puede ser un marcador de agresividad en melanomas (Bittner M, et al., Nature, 2000, 406: 536-540), donde la sobreexpresión de Wnt5a se correlaciona significativamente con la supervivencia y el desarrollo de metástasis.

Aunque se ha implicado en procesos metastásicos de cánceres no cerebrales, Wnt5a no se ha estudiado generalizadamente en gliomas.

Cáncer cerebral (glioma y meduloblastoma) y rutas de Wnt5a

Los análisis inmunohistoquímicos revelaron que la expresión de Wnt5a fue mayor en GBM humano que en el tejido cerebral normal y en el astrocitoma de grado bajo. La sobreexpresión de Wnt5a aumentó la proliferación de células GBM-05 y U87MG *in vitro*. Por el contrario, la regulación negativa de la expresión de Wnt5a como resultado de la interferencia de ARN redujo la proliferación de células GBM-05 y U87MG *in vitro* y redujo la tumorigenicidad de estas células *in vivo*. Los datos sugieren que la señalización de Wnt5a es un regulador importante en la proliferación de células de glioma humano (Yu, J. M., et al., Cancer Lett, 2007, 257(2): 172-181).

Los gliomas muestran una progresión asociada a infiltración generalizada en los tejidos neuronales circundantes. Se realizó un estudio independiente sobre el papel de la señalización de Wnt5a en el glioma humano para desentrañar el mecanismo que estimula esta invasividad. Los resultados mostraron que Wnt5a se sobreexpresaba predominante y comúnmente entre las 19 familias de Wnt en líneas celulares procedentes de glioma, Fz- 2, -6 y -7 se expresaban predominantemente entre los 10 miembros de Fz en líneas celulares derivadas de glioma; y la expresión de Ror2, un receptor de Wnt5a, fue muy baja. Estos hallazgos sugieren que las rutas de señalización podrían activarse en las células de glioma a través de la sobreexpresión de la Wnt o Fz. Un estudio inmunohistoquímico también reveló una alta expresión de Wnt-5a en 26 (79 %) de 33 casos de glioma humano. La positividad de la expresión de Wnt-5a se correlacionó con el grado clínico. La disminución de la expresión de Wnt-5a suprimió la migración, la invasión y la expresión de la matriz de metaloproteínasa 2 de células de glioma. Recíprocamente, el tratamiento con ligando Wnt5a purificado dio como resultado la estimulación de la migración e invasión celular. El inhibidor de MMP-2 suprimió la invasión dependiente de Wnt5a de células U251 (Kamino, M., et al., Cancer Sci, 2011, 102(3): 540-548).

No se han identificado a los receptores de Wnt5a que actúan como mediadores en las respuestas celulares del glioma. Se ha notificado que la disminución de la tirosina cinasa de tipo receptor (Ryk), pero no de Ror2, suprimió la actividad de MMP-2 y la actividad invasiva dependiente de Wnt5a en células de glioma. Estos resultados sugieren que Ryk es importante para la inducción dependiente de Wnt5a de MMP-2 y la actividad invasiva en células procedentes de glioma, y que Ryk podría tener una nueva función fisiopatológica en la invasión del cáncer en adultos (Habu, M., et al., J. Biochem, 2014, 156(1). 29-38).

El meduloblastoma (MB), el tipo más común de tumor cerebral primario que aparece en los niños, es el tumor neuroectodérmico primitivo (PNET, *primitive neuroectodermal tumor*) infratentorial más habitual que se origina en el cerebro y es un tumor cerebral primario muy maligno. La ruta de señalización canónica es muy conocida en el MB. Por el contrario, se han realizado muy pocas investigaciones sobre las rutas de señalización de Wnt no canónicas en MB. Estudios recientes en MB demuestran que *Wnt5a* y *Ror2* son mecanismos adicionales que contribuyen a la desregulación de la ruta de señalización de Wnt no canónica, y que *Ror2* puede desempeñar un papel como oncosupresor (Lee, S. E., et al., Brain Pathology, 2013, 23: 445-453).

En cada caso, los estudios mencionados anteriormente se dirigieron a la ruta de señalización de Wnt5a en células tumorales de glioma cerebral en bruto.

Células madre de cáncer cerebral (o células madre de cáncer del SNC)

Tradicionalmente, se pensaba que las células madre se encontraban solo en tejidos donde las células diferenciadas eran más susceptibles a la pérdida y a la necesidad de un reemplazo excelente, tales como la piel (Huelsen et al., Cell 105: 533-45, 2001), epitelios intestinales (Potten et al., Development 110: 1001-20, 1990) y la sangre (Morrison et al., Annu Rev Cell Dev Biol 11: 3-71, 1995). De hecho, el ejemplo más conocido de una célula madre adulta es la célula madre hematopoyética (CMH), que se encuentra en la médula ósea y es en última instancia responsable de la generación de todos los tipos de células sanguíneas a lo largo de la vida del animal (Morrison et al., citados

anteriormente.; Weissman, Cell 100: 157-68, 2000; Weissman, Science 287: 1442-6, 2000). Dado que se pensaba que el sistema nervioso central (SNC) adulto no presentaba una cantidad significativa de muerte neuronal y no tenía capacidad regenerativa, la existencia de células madre neuronales parecía improbable e innecesaria. Sin embargo, en 1992, dos grupos independientes demostraron con éxito la existencia de células precursoras en el SNC de mamíferos adultos con la capacidad de dar lugar a nuevas neuronas (Reynolds y Weiss, Science 255: 1707-10, 1992; Richards et al., Proc Natl Acad Sci USA 89: 8591-5, 1992). La fuente de las nuevas neuronas se identificó como células madre que recubren todo el eje neuronal ventricular del SNC de mamíferos adultos (Reynolds y Weiss, 1992).

Al igual que las células madre que se encuentran en otros tejidos, se ha demostrado que las células madre del SNC (o células madre neuronales (CMN)) demuestran las características definitorias de las células madre *in vitro* (Hall et al., Development 106: 619-33, 1989; Potten et al, citados anteriormente) de proliferación, amplia autorrenovación, generación de una gran cantidad de descendencia, potencial de diferenciación de múltiples linajes y las características de regenerar tejido *in vivo* después de una lesión.

Una función de las células madre es dividir y dar lugar a células precursoras más comprometidas con la capacidad de proliferar y generar una gran cantidad de células no diferenciadas. Finalmente, es la descendencia de estos tipos de células precursoras más comprometidas la que da lugar a la descendencia diferenciada. Por tanto, las células madre pueden considerarse como un depósito relativamente inactivo de células no comprometidas con la capacidad de dividirse a durante toda la vida útil del animal y con un amplio potencial de proliferación, mientras que las células progenitoras están más comprometidas y se dividen con mayor frecuencia, pero tienen un potencial de proliferación más limitado con el tiempo. Tanto durante el desarrollo, como en el adulto, la proliferación de células madre y progenitoras respalda la génesis celular.

El concepto de tumores que surgen de una pequeña población de células con características de células madre que contribuyen al crecimiento y a la propagación del tumor no es nuevo en el campo de la biología del cáncer. La idea fue propuesta a principios de los años 70 y confirmada experimentalmente en estudios sobre leucemia mielógena aguda (LMA), donde se demostró que las células iniciadoras de tumores de baja frecuencia se asemejaban a células madre hematopoyéticas (CMH) normales. Estos estudios sugirieron que las células madre de leucemia eran descendientes directos de CMH o el producto de una célula más diferenciada que había adquirido características de CMH. El descubrimiento de células madre fuera del sistema sanguíneo aumentó la posibilidad de que los cánceres de tejidos sólidos también puedan contener células madre. La existencia y el aislamiento de células madre iniciadoras de tumores en tumores sólidos, se demostró por primera vez en tejido de cáncer de mama humano, un enfoque que también se ha aplicado a los tumores del SNC.

Varios grupos han informado sobre la capacidad de las células procedentes de tejido de glioma humano para generar en cultivo células similares a neuroesferas, sugiriendo la presencia de las CMN en tumores del SNC. Basándose en el aislamiento de células de "población lateral", mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, *fluorescence activated cell sorting*), se ha demostrado que la línea celular de glioma U87MG bien establecida, contiene una pequeña población de células formadoras de neuroesferas que conservan la malignidad *in vivo* (C. Hirschmann-Jax, Proc Natl Acad Sci 2004, 101 (39): 14228-233). Galli y colaboradores (Galli et al., Cancer Research (2004) 64: 7011-7021) informaron sobre el aislamiento, la propagación y el trasplante en serie de células madre neuronales tumorales (CMNt) de glioblastoma multiforme (GBM) humano que presentan propiedades funcionales casi idénticas a de las CMN procedentes del SNC embrionario y adulto. Estas CMNt de GBM son precursores positivos destacados, que muestran las características críticas de las células madre neuronales *in vitro*, pueden expandirse de manera estable y, a través de ciclos de cultivo de trasplantes en serie, reproducir las características originales del inicio del tumor. En conjunto, estos estudios confirman contundentemente la hipótesis de que los tumores del SNC contienen una población de células madre que pueden ser responsables de la iniciación del tumor y de neoplasia maligna. Las CMNt pueden clasificarse de otras células de GBM utilizando FACS en virtud de la expresión de CD133 en las CMNt (Singh et al., Nature (2004) 532: 396-401).

La hipótesis de las células madre cancerosas (CMC) sugiere que los cánceres se organizan en jerarquías celulares aberrantes en las que las células hijas "diferenciadas" que tienen una capacidad limitada para proliferar, son producidas por un subconjunto de CMC precursoras que se replica indefinidamente, es decir, solo las CMC tienen la capacidad de sostener el crecimiento tumoral y son responsables de la recidiva después de que fracase la terapia (Gilbertson, Nature, 2012, 488(7412): 462-463). Hasta 2012, las pruebas de la existencia de células madre cancerosas habían sido controvertidas. Driessens (Driessens, G., Nature, 2012, 742: 527-530) y Chen (Chen, J, Nature, 2012, 7412: 522-526) proporcionaron pruebas atractivas para confirmar la existencia de CMC, que ofrecen un cambio radical en la forma en que pensamos y tratamos los cánceres.

Marcadores de células madre de cáncer

CD133 se considera un marcador de células madre en diversos tejidos normales y tipos de cáncer. Con respecto a los tumores cerebrales, Singh et al. fueron los primeros en describir una población de células tumorales positivas a CD133, con características de células madre, con capacidad de autorrenovación y recapitulación exacta del tumor original cuando se trasplanta en cerebros de ratón inmunodeficientes (Singh SK, et al., Nature 2004, 432: 396-401, Singh SK, et al., Cancer Res 2003, 63: 5821-5828). Otros supuestos marcadores de las CMCG incluyen L1CAM,

CD44, CD15, Integrina $\alpha 6$ (Brescia P., J Carcinogene Mutagene 2011, S1) y EfA2 (Binda E., et al., Cancer Cell 2012, 22 (6): 765-780). La molécula de adhesión celular neuronal L1CAM (L1, CD171) es necesaria para mantener el crecimiento y la supervivencia de las células de glioma positivas a CD 133 con propiedades similares a las células madre. Varios informes han demostrado la utilidad del marcador de superficie celular CD44 en la identificación de células madre cancerosas en diferentes tipos de tumores, incluyendo un ejemplo del uso de CD44 como marcador de células madre en el glioblastoma (Anido J, et al., Cancer Cell 2010, 18: 656-668). CD15 es una proteína de la superficie celular expresada selectivamente en células con capacidad de iniciación tumoral. La integrina $\alpha 6$, importante para la interacción con células endoteliales que expresan laminina en el microambiente, es un componente de la matriz extracelular cuyo contacto es importante para el mantenimiento de las células madre del glioma. Se ha notificado que la interacción entre la integrina $\alpha 6$ y la laminina, juega un papel importante en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales en el cerebro adulto. La tirosina cinasa receptora EfA2 se sobreexpresa en las TPC de GBMh e impulsa la autorrenovación y la tumorigenicidad en las TPC de GBMh (Binda E., et al., Cancer Cell 2012, 22 (6): 765-780).

15 Tratamiento dirigido a células madre de cáncer de glioma (CMCG)

Las CMCG se distinguen por la capacidad de autorrenovarse, la capacidad de iniciar tumores cerebrales, la expresión de marcadores de células madre neuronales y multipotencia, que es la capacidad de diferenciarse en células con un fenotipo neuronal, astrocítico u oligodendroglial. Las CMCG expresan antígenos específicos para células madre neuronales y progenitoras: Nestina, CD133 (prominina-1), Musashi-1 y Bmi-1. El homólogo Sonic hedgehog (HSH) y Notch son reguladores clave de progenitores neuronales y se ha descubierto que están alterados o sobreexpresados en las CMCG (Nakada, M. et al., Cancers, 2011, 3. 3242- 3278). En la figura 6 se muestra rutas de células madre de cáncer de glioma.

Las CMCG son radiorresistentes y quimiorresistentes, lo que finalmente produce recurrencia tumoral. El direccionamiento de las CMCG para el tratamiento es fundamental. Se han propuesto cinco métodos generales para el direccionamiento de las CMG: (1) desarrollar nuevos agentes terapéuticos para dirigir rutas de señalización de las CMG; (2) utilizar un radiosensibilizador para mejorar el efecto de la radioterapia en las CMG; (3) utilizar células inmunitarias para atacar a las CMG; (4) utilizar un agente de diferenciación para promover que las CMG se diferencien en células normales, y (5) terapia génica (Cho, et al., Cell Transplant. 2013, 22(4):731-9).

Se han utilizado agentes terapéuticos para dirigirse a rutas de señalización para tratar el GBM, incluyendo las rutas de Wnt, sonic hedgehog (shh), Notch, familia homeobox (HOX), homólogo 1 de la región de inserción del VLM-Mo de linfoma B (Bmi-1), PTEN, telomerasa, transportadores de eflujo, EGF, micro-ARN y receptores de VEGF (Cho, et al., Cell Transplant. 2013, 22(4):731-9).

La señalización de Wnt canónica activa la translocación de β -catenina al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción de genes diana específicos, y la señalización de Wnt- β -catenina tiene funciones comprobadas tanto en células madre normales como en CMCG. La señalización de Wnt- β -catenina puede contribuir a la radiorresistencia en CMCG y puede ser una diana terapéutica para las CMCG en tumores cerebrales, ya que esta ruta sustenta la motilidad/invasividad de los gliomas e impulsa cambios que se asemejan a la transición epitelial a mesenquimal. (Cruceu, M.L., et al., J. of Cellular & Molecular Medicine, 2013, 17(10): 1218-1235).

Hasta ahora, se desconocen las rutas/mecanismos que hay detrás de la migración, la invasión y la metástasis de los gliomas cerebrales. Ahora se acepta que las células madre cancerosas son responsables de la resistencia a la quimioterapia y radioterapia y de la reaparición de las células tumorales, pero hasta ahora, no se ha informado de ninguna investigación dirigida a las rutas de señalización no canónicas de Wnt5a para reducir la invasividad de las células madre de cáncer de glioma, y no se ha identificado ningún agente terapéutico que se dirija específicamente a la ruta de señalización no canónica de Wnt5a en las células madre de cáncer cerebral. La invención descrita aborda estos problemas y proporciona derivados peptídicos de Wnt5a que reducen la invasividad de las células madre de cáncer de glioma, al menos en parte al afectar directa o indirectamente a la señalización de Wnt5a.

Sumario

La materia objeto de la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral en un sujeto, que comprende una población de células propagadoras de tumores (TPC, *tumor-propagating cells*) con características similares a células madre, comprendiendo dicha composición farmacéutica una cantidad terapéutica de un agente terapéutico y un transportador farmacéuticamente aceptable, en donde el agente terapéutico es un derivado peptídico de Wnt5a, en donde la cantidad terapéutica del agente terapéutico es eficaz (1) para reducir el crecimiento, la migración y la invasión tumoral, o una combinación de los mismos, en relación con un control, afectando a un nivel de expresión de Wnt5a; y (2) para aumentar la supervivencia del sujeto en relación con un control.

Adicionalmente, se desvela un método para tratar un tumor sólido en un sujeto, que comprende una población de células propagadoras de tumores (TPC) con características similares a células madre, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica de un agente terapéutico y un

transportador farmacéuticamente aceptable, en donde el agente terapéutico es un derivado peptídico de Wnt5a, en donde la cantidad terapéutica del agente terapéutico es eficaz (1) para reducir el crecimiento, la migración y la invasión tumoral, o una combinación de los mismos, en relación con un control, afectando a un nivel de expresión de Wnt5a; y (2) para aumentar la supervivencia del sujeto en relación con un control.

5 Según otro aspecto, la invención descrita proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral en un sujeto, que comprende una población de células propagadoras de tumores (TPC) con características similares a células madre, comprendiendo dicha composición farmacéutica una cantidad de un agente terapéutico y un transportador farmacéuticamente aceptable, en donde el agente terapéutico es un derivado peptídico de Wnt5a, en donde la cantidad terapéutica del agente terapéutico es eficaz (1) para reducir el crecimiento, la migración y la invasión tumoral, o una combinación de los mismos, en relación con un control, afectando a un nivel de expresión de Wnt5a; y (2) para aumentar la supervivencia del sujeto en relación con un control.

15 Además, se desvela el uso de una composición farmacéutica en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto, que comprende una población de células propagadoras de tumores (TPC) con características similares a células madre, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica de un agente terapéutico y un transportador farmacéuticamente aceptable, en donde el agente terapéutico es un derivado peptídico de Wnt5a, en donde la cantidad terapéutica del agente terapéutico es eficaz (1) para reducir el crecimiento, la migración y la invasión tumoral, o una combinación de los mismos, en relación con un control, afectando a un nivel de expresión de Wnt5a; y (2) para aumentar la supervivencia del sujeto en relación con un control.

25 Según una realización, el tumor cerebral es un glioma. Según otra realización, el glioma se selecciona del grupo que consiste en un astrocitoma, un oligodendroglioma y un ependimoma. Según otra realización, el astrocitoma oligodendroglioma y el ependimoma son anaplásicos. Según otra realización, el astrocitoma es un glioblastoma multiforme. Según otra realización, el tumor cerebral se selecciona del grupo que consiste en un meduloblastoma, un meningioma, un schwannoma, un craneofaringioma, un tumor de células germinales y un tumor de la región pineal.

30 Según una realización, el péptido es un antagonista de Wnt5a. Según otra realización, el péptido es sintético. Según otra realización, el péptido se selecciona del grupo que consiste en un hexapéptido, un pentapéptido y una combinación de los mismos. Según otra realización, el derivado peptídico de Wnt5a es un derivado de Box 5 (SEQ ID NO: 1). Según otra realización, el hexapéptido consiste en la secuencia de aminoácidos MDGCEL (SEQ ID NO: 1). Según otra realización, el hexapéptido consiste en la secuencia de aminoácidos LECGDM (SEQ ID NO: 2). Según otra realización, el pentapéptido consiste en la secuencia de aminoácidos LEGDM (SEQ ID NO: 3).

35 Según una realización, el control es un sujeto no tratado con la composición farmacéutica.

40 Según una realización, el glioma comprende tejido mesenquimatoso, tejido proneural, tejido clásico o una combinación de los mismos. Según otra realización, el tejido mesenquimal y el tejido proneural se caracterizan por un nivel de expresión del ligando de Wnt5a aumentado en relación con el tejido clásico. Según otra realización, el aumento del nivel de expresión del ligando Wnt5a es indicativo de migración celular.

45 Según una realización, la población de células propagadoras de tumores (TPC) con características similares a células madre, tiene un fenotipo invasivo.

Según una realización, la modulación de la expresión y/o actividad de Wnt5a por el derivado peptídico, es eficaz para disminuir la invasividad de las TPC GFI (*growth factor independent*, independientes del factor de crecimiento) de una manera dependiente de la dosis.

50 Según una realización, el glioma comprende células positivas al ligando de Wnt5a. Según otra realización, las células positivas al ligando de Wnt5a expresan conjuntamente el supuesto marcador de neuroblastos, PSA-NCAM, siendo hasta el 60 % de las células inmunorreactivas a PSA-NCAM, positivas a Wnt5a y Dlx2. Según otra realización, las células positivas al ligando de Wnt5a se caracterizan por un nivel de expresión de CD44 aumentado en relación con un control. Según otra realización, las células positivas al ligando de Wnt5a no expresan conjuntamente el supuesto marcador Efa2 de células propagadoras de tumor (TPC) similares a células madre.

55 Según una realización, el fenotipo invasivo comprende la expresión del marcador de invasión, la proteína 2 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1 (Frem2, *FRAS1-related extracellular matrix protein 2*).

60 Según una realización, el derivado peptídico es eficaz para reducir la invasión del tumor que comprende la población de células propagadoras de tumores (TPC) con características similares a células madre a través del parénquima cerebral en comparación con un control no tratado.

65 La invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral, comprendiendo dicho método además la etapa de medir al menos una de las características seleccionadas del grupo que consiste en crecimiento tumoral, migración e invasión como se ha indicado anteriormente. Según otra realización,

el método comprende además la etapa de administrar un segundo agente terapéutico. Según otra realización, el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico. Según otra realización, el segundo agente terapéutico es un antagonista de Wnt5a. Según otra realización, el antagonista de Wnt5a es un anticuerpo. Según otra realización, el antagonista de Wnt5a es Wnt3a. Según otra realización, el antagonista de Wnt5a es una proteína relacionada con frizzled.

Según una realización, la composición se administra por vía oral, bucal, parenteral, intranasal, rectal o tópica.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se muestra la ruta de la Tirosina Cinasa Receptora (ruta RTK/PI3K/Akt/mTOR).

En la figura 2 se muestra la ruta de p14ARF/MDM2/p53 y la ruta de RB.

En la figura 3 se muestra la ruta de Ras/MEK/MAPK

En la figura 4 se muestran las rutas de señalización globales implicadas en GBM.

En la figura 5 se muestran tres rutas de señalización de Wnt representativas.

En la figura 6 se muestran rutas de células madre de cáncer de glioma.

En la figura 7 se muestra que la expresión de Wnt5a se correlaciona con la histología de pacientes con glioma y con la supervivencia de pacientes con glioma basándose en conjuntos de datos disponibles al público.

En la figura 8 se muestra el nivel de ARNm de Wnt5a, detectado mediante el perfil de expresión informático, en astrocitomas anaplásicos (ANA) y GBMh (GBM H-TEX) frente a ependimoma (EP), tejidos de glioma de grado bajo (BAJO) y meduloblastoma (MDB).

En la figura 9 se muestra el inmunomarcado de especímenes de cirugía para Wnt5a y el receptor 2 de efrina tipo A (EfA2) en tejidos de GBMh, MDB, de grado bajo (GB) y de ganglioglioma.

En la figura 10 se muestra la inmunofluorescencia de Wnt5a en células propagadoras de tumores con características de células madre derivadas de GBMh (TPC derivadas de GBMh) mesenquimales y proneurales frente al subtipo clásico y en TPC dependientes de factor de crecimiento (GFD, *growth factor dependent*) frente a TPC independientes de factor de crecimiento (GFI, *growth factor independent*).

En la figura 11 se muestra un análisis de citometría de flujo cuantitativo de Wnt5a, EfA2 y CD44, así como la cuantificación de niveles de ARNm de Wnt5a y Dlx2 o Wnt5a y Wnt3a por PCRC en las TPC GFD frente a GFI.

En la figura 12 se muestra un análisis bioinformático en especímenes de GBMh teñidos, seleccionados y clasificados por FACS según la expresión de Wnt5a, así como que la firma/activación del gen Wnt5a se correlaciona con un fenotipo más invasivo y angiogénico.

En la figura 13 se muestra la correlación de Wnt5a, EfA2 y DIX2 en tejidos de GBM humano y la supervivencia de pacientes con glioma.

En la figura 14 se muestra la expresión conjunta de Wnt5a y del supuesto marcador de células C amplificadoras de tránsito y Dlx2 de neuroblastos en GBMh y MDB frente a especímenes primarios de grado bajo.

En la figura 15 se muestra la expresión de los genes Wnt5A, EPHA2, DLX2 y de la molécula 1 de adhesión de células neuronales (NCAM1) en tumores cerebrales humanos a lo largo de la escala de neoplasia maligna.

En la figura 16 se muestra el ensayo de migración e invasión *in vitro* de las TPC GFI que sobreexpresan Wnt5a frente a las TPC GFD homólogas preestablecidas.

En la figura 17 se muestra un desarrollo tumoral y una invasividad significativamente mejoradas por células U87MG que sobreexpresan Wnt5a mediado por lentivirus (U87-5A) en comparación con células de control (U87-ts).

En la figura 18 se muestra que la perturbación de Wnt5a afecta a la capacidad tumorigénica e invasividad *in vivo* de las células propagadoras de tumores (TPC) con características similares a células madre de GBMh.

En la figura 19 se muestra un cromatograma de HPLC (*high performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alta eficacia) del péptido A.

En la figura 20 se muestra un espectro Maldi-Tof (desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz, acoplada a

un analizador TOF (tiempo de vuelo)) del Péptido A.

En la figura 21 se muestra un cromatograma de HPLC del péptido B.

5 En la figura 22 muestra un espectro Maldi-Tof del Péptido B.

En la figura 23 se muestra un gráfico de expresión del gen Wnt5 (eje y) frente a la expresión del gen del receptor de EfA2 (eje x) de tres subclases de células de glioblastoma multiforme: (i) clásicas (círculos); (ii) mesenquimales (triángulos); y (iii) proneuronales (cuadrados). Los números debajo de las formas representan números de

10 identificación de células.

Descripción detallada de la invención

15 Los términos "administrar" o "administración", tal como se utilizan en el presente documento, se utilizan indistintamente para designar el suministro o la aplicación de una sustancia e incluyen la administración *in vivo*, así como la administración directamente al tejido *ex vivo*.

El término "agonista", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia química capaz de activar a un receptor para inducir una respuesta farmacológica completa o parcial. Los receptores pueden activarse o inactivarse a través de agonistas y antagonistas endógenos o exógenos, dando como resultado la estimulación o inhibición de una respuesta biológica. Un agonista fisiológico es una sustancia que crea las mismas respuestas corporales, pero que no se une al mismo receptor. Un agonista endógeno para un receptor particular es un compuesto producido de manera natural por el organismo que se une y activa ese receptor. Un superagonista es un compuesto que es capaz de producir una respuesta máxima mayor que la del agonista endógeno para el receptor diana y, por lo tanto, una eficiencia superior al 100 %. Esto no significa necesariamente que sea más fuerte que el agonista endógeno, sino que es más bien una comparación de la respuesta máxima posible que puede producirse en el interior de una célula después de la unión con el receptor. Los agonistas completos se unen a un receptor y lo activan, mostrando plena eficacia en ese receptor. Los agonistas parciales también se unen a un receptor determinado y lo activan, pero solo tienen eficacia parcial en el receptor en relación con un agonista completo. Un agonista inverso es un agente que se une al mismo sitio de unión del receptor que un agonista para ese receptor e invierte la actividad constitutiva de los receptores. Los agonistas inversos ejercen el efecto farmacológico opuesto de un agonista receptor. Un agonista irreversible es un tipo de agonista que se une permanentemente a un receptor de tal manera que el receptor se activa permanentemente. Es distinto de un simple agonista en que la asociación de un agonista con un receptor es reversible, mientras que la unión de un agonista irreversible con un receptor se cree que es irreversible. Esto hace que el compuesto produzca un breve estallido de actividad agonista, seguido de desensibilización e internalización del receptor, que con el tratamiento prolongado produce un efecto más parecido al de un antagonista. Un agonista selectivo es específico para un cierto tipo de receptor.

40 Las expresiones "resto de aminoácido" o "aminoácido o resto" se utilizan indistintamente para referirse a un aminoácido que se incorpora a una proteína, un polipéptido o un péptido, incluyendo, pero sin limitación, un aminoácido de origen natural y análogos conocidos de aminoácidos de origen natural que pueden funcionar de manera similar a la de los aminoácidos de origen natural.

Las abreviaturas de los aminoácidos utilizadas en el presente documento son las que se utilizan de manera convencional: A=Ala=Alanina; R=Arg=Arginina; N=Asn=Asparagina; D=Asp=Ácido aspártico; C=Cys=Cisteína; Q=Gln=Glutamina; E=Glu=Ácidos glutámico; G=Gly=Glicina; H=His=Histidina; I=Ile=Isoleucina; L=Leu=Leucina; K=Lys=Lisina; M=Met=Metionina; F=Phe=Fenilalanina; P=Pro=Prolina; S=Ser=Serine; T=Thr=Treonina; W=Trp=Triptófano, Y=Tyr=Tirosina; V=Val=Valina. Los aminoácidos pueden ser L o D aminoácidos. Un aminoácido puede reemplazarse por un aminoácido sintético que se altera para aumentar la semivida del péptido o para aumentar la fuerza del péptido o para aumentar la biodisponibilidad del péptido.

Los siguientes grupos, representan grupos de aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);

Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);

Asparagina (N), Glutamina (Q);

Arginina (R), Lisina (K);

Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y

Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

El término "antagonista", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia que contrarresta los

efectos de otra sustancia. La expresión "antagonistas de Wnt5a", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un péptido, proteína o anticuerpo que puede unirse a Wnt5a, a un receptor de Wnt5a o a un correceptor de Wnt5a, de manera competitiva o no competitiva, a través de un enlace covalente, iónico, de hidrógeno, una interacción hidrófoba o una combinación de los mismos y desactivar directa o indirectamente una ruta de señalización de Wnt5a.

5 Los antagonistas de Wnt5a pueden formularse tal cual o en forma de sal.

Las expresiones "cáncer" o "neoplasia maligna", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a enfermedades en las que células anómalas se dividen sin control y pueden invadir los tejidos cercanos. Las células de cáncer también pueden propagarse a otras partes del cuerpo a través de los sistemas sanguíneo y linfático. Los

10 cánceres del sistema nervioso central son cánceres que comienzan en los tejidos del cerebro y la médula espinal.

La expresión "células madre cancerosas", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una población de células capaces de autorrenovarse y de recapitular con exactitud el tumor original cuando se trasplantan en cerebros de ratones inmunodeficientes.

15 El término "transportador", tal como se utiliza en el presente documento, describe un material que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto activo de la composición para su uso en la invención descrita. Los transportadores deben tener una pureza suficientemente elevada y una toxicidad suficientemente baja como para que puedan administrarse adecuadamente al mamífero que se va a tratar.

20 El transportador puede ser inerte o puede poseer beneficios farmacéuticos, beneficios cosméticos o ambos. Los términos "excipiente", "transportador o "vehículo", se utilizan indistintamente para referirse a materiales transportadores adecuados para la formulación y administración de las composiciones farmacéuticamente aceptables descritas en el presente documento. Los transportadores y vehículos útiles en el presente documento incluyen cualquier material conocido en la materia que sea no tóxico y que no interaccione con otros componentes.

25 En el presente documento el término "célula" se utiliza para referirse a la unidad estructural y funcional de los organismos vivos y es la unidad más pequeña de un organismo clasificada como viva.

30 La expresión "línea celular", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula inmortalizada, que ha experimentado una transformación y que puede someterse a pases indefinidamente en cultivo.

La expresión "agente quimioterapéutico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a productos químicos útiles en el tratamiento o control de una enfermedad.

35 El término "quimioterapia", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ciclo de tratamiento con uno o más agentes quimioterapéuticos.

40 La expresión "régimen de quimioterapia" ("quimioterapia combinada"), significa quimioterapia con más de un fármaco para beneficiarse de las diferentes toxicidades de más de un fármaco. Un principio de la terapia combinada contra el cáncer es que los diferentes fármacos actúan a través de diferentes mecanismos citotóxicos; dado que tienen diferentes efectos adversos que limitan la dosis, pueden suministrarse juntos en dosis completas.

45 El término "compatible", tal como se utiliza en el presente documento, significa que los componentes de una composición pueden combinarse entre sí de tal manera que no haya interacción que reduzca sustancialmente la eficacia de la composición en condiciones de uso habituales.

El término "composición", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una mezcla de principios, o a un material formado por dos o más sustancias.

50 El término "derivado", tal como se utiliza en el presente documento, significa un compuesto que puede producirse a partir de otro compuesto de estructura similar en una o más etapas. Un "derivado" o "derivados" de un péptido o un compuesto conserva al menos un grado de la función deseada del péptido o compuesto. Por consiguiente, un término alternativo para "derivado" puede ser "derivado funcional". Los derivados pueden incluir modificaciones químicas del péptido, tal como alquilación, acilación, carbamilación, yodación o cualquier modificación que derivatice el péptido.

55 Dichas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que los grupos amino libres se han derivatizado para formar clorhidratos de amina, grupos p-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formales. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres, amidas o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados de O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno imidazol de la histidina se puede derivatizar para formar N-im-benzilhistidina. También se incluyen como derivados o análogos aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar, por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metilhistidina, homoserina, ornitina o carboxiglutamato y pueden incluirse aminoácidos que no están unidos por enlaces peptídicos. Dichos derivados peptídicos pueden incorporarse durante la síntesis de un péptido, o un péptido puede modificarse mediante métodos de modificación química bien conocidos (véase, por ejemplo, Glazer et al., Chemical Modification of Proteins, Selected Methods and Analytical Procedures, Elsevier Biomedical Press, Nueva York (1975)). La expresión "derivado peptídico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos producida a partir

de un péptido derivado de Wnt5a, ya sea directamente o por modificación o sustitución parcial del péptido Wnt5a. Por ejemplo, y sin limitación, los derivados peptídicos de Wnt5a incluyen productos de Wnt5a truncados y de fusión. Los derivados peptídicos de Wnt5a pueden formularse tal cual o en forma de sal.

- 5 La expresión "cantidad eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado.

El término "formulación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una mezcla preparada según un procedimiento, fórmula, preparado según una fórmula, receta o regla particular.

- 10 La expresión "citometría de flujo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una herramienta para averiguar el fenotipo y las características de las células. La citometría de flujo es un sistema para detectar células o partículas a medida que se mueven en una corriente líquida a través de un rayo láser (amplificación de la luz por emisión estimulada de radiación)/lumínico que pasa por una zona de detección. Se mide la dispersión relativa de la luz y la fluorescencia discriminada por el color de las partículas microscópicas. El análisis y la diferenciación de las células se basa en el tamaño, la granularidad, y si en las células llevan moléculas fluorescentes en forma de anticuerpos o colorantes. A medida que la célula atraviesa el rayo láser, la luz se dispersa en todas las direcciones, y la luz dispersa en la dirección hacia adelante en ángulos bajos ($0,5-10^\circ$) desde el eje es proporcional al cuadrado del radio de una esfera y, por lo tanto, al tamaño de la célula o partícula. Por tanto, la luz puede entrar en la célula; la dispersión lumínica de 90° (en ángulo recto, lateral) se puede aplicar con anticuerpos unidos a fluorocromos o teñidos con colorantes fluorescentes de membrana, citoplasmáticos o nucleares. Por tanto, la diferenciación de los tipos de células, la presencia de receptores de membrana y antígenos, el potencial de membrana, el pH, la actividad enzimática y el contenido de ADN, pueden facilitarse. Los citómetros de flujo son multiparamétricos, ya que registran varias mediciones en cada célula; por lo tanto, es posible identificar una subpoblación homogénea dentro de una población heterogénea (Marion G. Macey, Flow cytometry: principles and applications, Humana Press, 2007).

El término "fragmento" o la expresión "fragmento de péptido", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una pequeña parte derivada, cortada, o fracturada, de un péptido, polipéptido o proteína, más grande, que conserva la actividad biológica deseada del péptido, polipéptido o proteína, más grande.

- 30 El término "glioma", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un tipo de tumor, que surge de las células gliales del cerebro o de la columna vertebral.

- 35 El término "crecimiento", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un proceso de hacerse más grande, más largo o más numeroso, o a un aumento de tamaño, número o volumen.

- 40 El término "interferir" o la expresión "interferir con", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a obstaculizar, impedir, amortiguar, entorpecer, obstruir, bloquear, reducir o prevenir una acción u suceso. Como ejemplo, un antagonista de receptor interfiere (por ejemplo, bloquea o amortigua) con una respuesta mediada por agonista en lugar de provocar de por sí una respuesta biológica.

El término "invasión" o "invasividad", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un proceso en células neoplásicas que incluye la entrada de y el movimiento a través de tejidos circundantes.

- 45 La expresión "gráfico de Kaplan Meier" o "curva de supervivencia de Kaplan Meier", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al gráfico de probabilidad de que los sujetos de un estudio clínico sobrevivan en un período de tiempo determinado teniendo en cuenta el tiempo en muchos intervalos pequeños. El gráfico de Kaplan Meier supone que: (i) en cualquier momento, los sujetos objeto de censura estadística (es decir, perdidos) tienen las mismas perspectivas de supervivencia que los sujetos objeto de seguimiento; (ii) las probabilidades de supervivencia son las mismas para los sujetos inscritos inicialmente y después en el estudio, y (iii) el suceso (por ejemplo, muerte) se produce en el momento especificado. Las probabilidades de aparición de sucesos se calculan en un punto temporal determinado multiplicando las probabilidades sucesivas por cualquier probabilidad calculada anteriormente para obtener una estimación final. La probabilidad de supervivencia en cualquier momento particular se calcula como el número de sujetos que sobreviven dividido entre el número de sujetos en riesgo. Los sujetos que han muerto, que han abandonado el estudio, o que han sido objeto de censura estadística, no se cuentan como sujetos en riesgo.

- 60 El término "ligando", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que puede unirse selectivamente a una molécula, de tal manera que la interacción de unión entre el ligando y su compañero de unión es detectable sobre interacciones inespecíficas mediante un ensayo cuantificable. En la definición de este término pretenden incluirse derivados, análogos y compuestos miméticos.

- 65 En el presente documento, el término "marcador" y la expresión "marcador de superficie celular", se utilizan indistintamente para referirse a un receptor, una combinación de receptores, o un determinante antigénico o epítipo que se encuentra en la superficie de una célula que permite distinguir un tipo de célula de otros tipos de células. Los receptores de proteínas (marcadores) especializados que tienen la capacidad de unirse o adherirse selectivamente a otras moléculas de señalización recubren la superficie de cada célula del cuerpo. Las células utilizan estos receptores

y las moléculas que se unen a ellos como una forma de comunicarse con otras células y de llevar a cabo su función adecuada en el organismo. Las técnicas de clasificación celular se basan en biomarcadores celulares en donde para la selección positiva o negativa puede utilizarse uno o más marcadores de la superficie celular, es decir, para la inclusión o exclusión, de una población celular.

El término "migración", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un movimiento de una población de células de un lugar a otro.

La expresión "índice mitótico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la relación del número de células que experimentan mitosis (división celular) con respecto al número de células que no experimentan mitosis en una población de células.

En el presente documento, el término "péptido" se utiliza para referirse a dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

En el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se utiliza para referirse a una composición que se emplea para prevenir, reducir en intensidad, curar o tratar de otro modo una afección o enfermedad diana.

El término "polipéptido" se utiliza en el presente documento en su sentido más amplio para referirse a una secuencia de aminoácidos subunitarios, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos, en donde las subunidades están unidas por enlaces peptídicos.

En el presente documento, el término "proteína" se utiliza para referirse a una molécula o polipéptido complejo grande compuesto por aminoácidos. La secuencia de los aminoácidos en la proteína se determina por la secuencia de las bases en la secuencia de ácido nucleico que la codifica.

Los términos "péptido", "péptido" y "proteína", también se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácido son un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como polímeros de aminoácidos de origen natural. La naturaleza esencial de dichos análogos de aminoácidos de origen natural es que, cuando se incorporan en una proteína, dicha proteína reacciona específicamente con anticuerpos generados contra la misma proteína pero que consiste completamente en aminoácidos de origen natural. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" también incluyen modificaciones que incluyen, pero sin limitación, glucosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación. Se apreciará, como es de sobra conocido y como se ha indicado anteriormente, que los polipéptidos pueden no ser completamente lineales. Por ejemplo, los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de la ubiquitinación y pueden ser circulares, con o sin ramificación, generalmente como resultado de sucesos postraduccionales, incluyendo sucesos de procesamiento natural y sucesos provocados por la manipulación humana que no se producen de manera natural. También pueden sintetizarse polipéptidos circulares, ramificados y circulares ramificados mediante procesos naturales no traduccionales y también mediante métodos completamente sintéticos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en el presente documento, se refiere a aquellas sales que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebida y similares y son proporcionales a una relación razonable entre beneficio/riesgo. Cuando se utilizan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden utilizarse convenientemente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Dichas sales incluyen, pero sin limitación, los preparados a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, tartárico, cítrico, metano sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Además, dichas sales pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico. Por "sal farmacéuticamente aceptable" se entiende aquellas sales que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebida y similares y son proporcionales a una relación razonable entre beneficio/riesgo. Las sales farmacéuticamente aceptables son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, P. H. Stahl, et al., describen con detalle sales farmacéuticamente aceptables en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" (Wiley VCH, Zurich, Suiza: 2002). Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos descritos en la invención descrita o por separado haciendo reaccionar una función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen, pero sin limitación, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato (isetionato), lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; dialquil sulfatos como dimetil, dietil, dibutil y diamil sulfatos; haluros de cadena larga tales cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De este modo se obtienen productos solubles o

dispersables en agua o aceite. Los ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico. Las sales de adición de bases pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos descritos en la invención haciendo reaccionar un residuo que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoníaco o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, cationes basados en metales alcalinos o metales alcalinotérreos tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares y amonio cuaternario no tóxico y cationes amina incluyendo amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares. También pueden obtenerse sales farmacéuticamente aceptables utilizando procedimientos estándar muy conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También pueden fabricarse sales alcalinas metálicas (por ejemplo, de sodio, potasio o litio) o alcalinotérreas (por ejemplo, de calcio o magnesio) de ácidos carboxílicos.

En el presente documento, la expresión "factor de crecimiento inductor de proliferación" se utiliza para referirse al Factor de Crecimiento Epidérmico [EGF, *Epidermal Growth Factor*], al Factor de crecimiento de fibroblastos básico [bFGF, *basic Fibroblastic Growth Factor*] etc.

El término "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, incluye especies animales de origen mamífero, incluyendo seres humanos. Incluye además células y tejidos procedentes de estas especies.

La frase "sujeto que lo necesite", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un paciente al cual (i) se le administrará al menos un análogo peptídico de la invención descrita, (ii) está recibiendo al menos un análogo peptídico de la invención descrita; o (iii) ha recibido al menos un análogo peptídico de la invención descrita, a menos que el contexto y el uso de la frase indiquen lo contrario.

El término "diana", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una entidad biológica, tal como, por ejemplo, pero sin limitación, una proteína, una célula, un órgano, o ácido nucleico, cuya actividad puede modificarse mediante un estímulo externo. Dependiendo de la naturaleza del estímulo, puede que no haya ningún cambio directo en la diana objetivo, o puede inducirse un cambio conformacional en la misma.

La expresión "agente terapéutico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un fármaco, molécula, ácido nucleico, péptido, proteína, composición u otra sustancia que proporcione un efecto terapéutico. El término "activo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al principio, componente o constituyente de las composiciones para su uso en la invención descrita, que es responsable del efecto terapéutico que se pretende conseguir. En el presente documento, las expresiones "agente terapéutico" y "agente activo", se utilizan indistintamente.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz", una "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" de uno o más de los agentes activos, se utilizan indistintamente para referirse a una cantidad que es suficiente para proporcionar el beneficio del tratamiento que se desea conseguir. Una cantidad eficaz de los agentes activos que puede emplearse según la invención descrita, generalmente varía de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 g/kg de peso corporal. Sin embargo, los niveles de la dosis se basan en una variedad de factores, incluido el tipo de lesión, la edad, el peso, el sexo, la afección médica del paciente, la gravedad de la afección, la vía de administración y el agente activo particular empleado. Por tanto, la pauta posológica puede variar mucho, pero un médico puede determinarla de manera habitual utilizando métodos estándar. Además, las expresiones "cantidades terapéuticamente eficaces" y "cantidades farmacéuticamente eficaces" incluyen cantidades profilácticas o preventivas de las composiciones para su uso en la invención descrita. En aplicaciones profilácticas o preventivas de la invención descrita, las composiciones farmacéuticas o los medicamentos, se administran a un paciente susceptible a, o de otro modo, en riesgo de padecer una enfermedad, un trastorno o una afección resultante de la acumulación de un péptido amiloide en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, el trastorno o la afección, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, el trastorno o la afección, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad, el trastorno o la afección.

El término "tratar" o "tratamiento" incluye anular, inhibir, retrasar o invertir sustancialmente la progresión de una enfermedad, afección o trastorno, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección, prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una enfermedad, afección o trastorno y proteger contra síntomas dañinos o molestos. Adicionalmente, tratamiento se refiere a conseguir uno o más de lo siguiente: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar el desarrollo de síntomas característicos del trastorno (o trastornos) que se vaya a tratar; (c) limitar el empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno (o trastornos) que se vaya a tratar; (d) limitar la recidiva del trastorno (o trastornos) en pacientes que han tenido previamente el trastorno (o trastornos); y (e) limitar la recidiva de los síntomas en pacientes que eran previamente asintomáticos para el trastorno

(o trastornos).

El término "truncado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al acortamiento mediante el corte de restos que se van a cortar.

5 El término "tumor", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a enfermedades que implican un crecimiento celular anómalo en cuanto al número (proliferación) o al tamaño, con posibilidad de invadir otras partes del cuerpo o propagarse a otras partes del cuerpo (metástasis).

10 Adicionalmente se desvela una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico es un péptido, y en donde el agente terapéutico es eficaz (1) para reducir el crecimiento tumoral, la migración, la invasión o una combinación de los mismos y (2) para mejorar la supervivencia del sujeto en relación con un control.

15 Según una realización, el péptido es un derivado peptídico de Box5. Dichos derivados peptídicos incluyen, pero sin limitación, un péptido de secuencia de aminoácidos Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu (MDGCEL) [SEQ ID NO: 1], un péptido de secuencia Leu-Glu-Cys-Gly-Asp-Met (LECGDM) [SEQ ID NO: 2, un péptido de secuencia Leu-Glu-Gly-Asp-Met (LEGDM) [SEQ ID NO: 3], y sus productos truncados y de fusión.

20 Según una realización, el péptido es un antagonista de Wnt5a. Los antagonistas de Wnt5a pueden actuar interfiriendo, directa o indirectamente, con una ruta de señalización activada por Wnt5a, por ejemplo, uniéndose a Wnt5a, uniéndose a un receptor de Wnt5a, impidiendo o reduciendo la expresión de un gen Wnt5a, impidiendo o reduciendo la expresión de un gen Wnt5a diana y similares. Las rutas de señalización activadas por Wnt5a incluyen, pero sin limitación, rutas
25 vías de señalización asociadas al crecimiento, la migración, la invasión o una combinación de las mismas, rutas vías de señalización que comprenden Wnt5a, rutas canónicas, rutas no canónicas, y similares. Según una realización, el antagonista de Wnt5a interfiere con una vía de señalización asociada al crecimiento, la migración, la invasión o una combinación de los mismos de una célula madre cancerosa (CMC). Según otra realización, el antagonista de Wnt5a interfiere con una ruta de señalización asociada al crecimiento de una célula madre cancerosa (CMC). Según otra
30 realización, el antagonista de Wnt5a interfiere con una ruta de señalización asociada a la migración de una célula madre cancerosa (CMC). Según otra realización, el antagonista de Wnt5a interfiere con una ruta de señalización asociada a la invasión de una célula madre cancerosa (CMC).

Según una realización de la invención descrita, la ruta de señalización es una ruta de señalización celular activada por Wnt que no promueve la transcripción mediada por β -catenina. Según una realización, la ruta de señalización celular
35 activada por Wnt que no promueve la transcripción mediada por β -catenina es una ruta de señalización de Wnt no canónica. Según otra realización, la ruta de señalización de Wnt no canónica implica Wnt5a.

Los péptidos de la invención descrita pueden expresarse de manera recombinante o sintetizarse químicamente. En la técnica se conocen bien métodos para producir péptidos expresados de manera recombinante o sintetizados
40 químicamente.

Según una realización, la invención descrita proporciona péptidos sintéticos. Se describen ejemplos de métodos de preparación de péptidos sintéticos, por ejemplo, en Peptide Synthesis Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 35, Pennington, MW and Dunn, BM, 1995, XII, Humana Press, Inc. Totowa, Nueva Jersey y en Peptides: Synthesis,
45 Structures and Applications, Gutte, B, 1995, Academic Press, Inc., San Diego, California). Los péptidos sintéticos, preparados utilizando las técnicas de fase sólida, fase líquida o las técnicas de condensación de péptidos, o cualquier combinación de las mismas, pueden incluir aminoácidos naturales y no naturales. Los aminoácidos utilizados para la síntesis de péptidos pueden ser la resina estándar del aminoácido Boc (N- α -t-butiloxycarbonilo protegido con N- α -amino) con los protocolos de desprotección, neutralización, acoplamiento y lavado estándar del procedimiento original en fase sólida de Merrifield (1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154), o los aminoácidos 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) lábiles a bases protegidos con N- α -amino, descritos por primera vez por Carpino y Han (1972, J. Org. Chem. 37:3403-3409). Ambos aminoácidos, Fmoc y Boc, protegidos con N- α -amino, pueden obtenerse en el comercio, por
50 ejemplo, en Sigma, Cambridge Research Biochemical, u otras compañías químicas similares. Como alternativa, el péptido puede sintetizarse con cualquier otro grupo N- α protector.

La síntesis de péptidos en fase sólida puede llevarse a cabo según se proporciona, por ejemplo, en Stewart y Young, 1984, Solid Phase Synthesis, Segunda Edición, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.; Fields and Noble, 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:161-214, o utilizando sintetizadores automáticos. Los péptidos de la invención pueden comprender D aminoácidos (que son resistentes a proteasas específicas de L-aminoácidos *in vivo*), una combinación
60 de D y L aminoácidos, y varios aminoácidos "de diseño" (p. ej., β -metil aminoácidos, C- α -metil aminoácidos y N- α -metil aminoácidos, etc.) para transmitir propiedades especiales. Los aminoácidos sintéticos incluyen ornitina para lisina y norleucina para leucina o isoleucina.

Además, los péptidos pueden tener enlaces peptidomiméticos, tales como enlaces éster, para preparar péptidos con nuevas propiedades. Por ejemplo, se puede generar un péptido que incorpore un enlace peptídico reducido, es decir, R1-CH₂-NH-R2, donde R1 y R2 son restos o secuencias de aminoácidos. Se puede introducir un enlace peptídico

reducido como una subunidad dipeptídica. Dicho péptido sería resistente a la actividad proteasa y poseería una semivida prolongada. *in vivo*.

Se entiende que los péptidos sintéticos pueden tener una longitud de aproximadamente dos (2) a aproximadamente treinta (30) aminoácidos. Según una realización, la invención descrita proporciona el péptido sintético expuesto en SEQ ID NO: 1 y sus variantes. Según una realización, la invención descrita proporciona el péptido sintético expuesto en SEQ ID NO: 2 y sus variantes. Según una realización, la invención descrita proporciona el péptido sintético expuesto en SEQ ID NO: 3 y sus variantes. Las variantes de péptidos sintéticos pueden contener una sustitución, delección o adición de un aminoácido. La sustitución puede incluir una sustitución de aminoácidos conservativa. La delección o adición puede incluir un solo aminoácido o varios aminoácidos.

La invención descrita contempla formas de péptidos tanto lineales como cíclicos. Se pueden formar péptidos cíclicos, por ejemplo, mediante un enlace amida o un puente disulfuro. Se puede formar un puente disulfuro entre dos restos del aminoácido cisteína.

La invención descrita contempla un segundo agente terapéutico además de los péptidos descritos. Los ejemplos no limitantes del segundo agente terapéutico incluyen un agente quimioterapéutico, un antagonista de Wnt5a y similares. Los ejemplos no limitantes de antagonistas de Wnt5a incluyen anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo bloqueante de Wnt5a), proteínas o análogos de proteínas relacionadas con frizzled, o proteínas o análogos de proteínas Wnt3a. Los antagonistas de Wnt5a pueden actuar interfiriendo, directa o indirectamente, con una ruta de señalización activada por Wnt5a, por ejemplo, al unirse a Wnt5a, al unirse a receptores de Wnt5a, impidiendo o reduciendo la expresión de un gen Wnt5a, impidiendo o reduciendo la expresión de un gen Wnt5a diana y similares. Las rutas de señalización activadas por Wnt5a incluyen, pero sin limitación, rutas de señalización asociadas al crecimiento, la migración, la invasión o una combinación de los mismos, rutas de señalización que comprenden rutas canónicas y rutas no canónicas de Wnt5a, y similares. Según una realización, el antagonista de Wnt5a interfiere con una ruta de señalización asociada al crecimiento, la migración, la invasión o una combinación de los mismos de una célula madre cancerosa (CMC). Según una realización, el antagonista de Wnt5a interfiere con una ruta de señalización asociada al crecimiento de una célula madre cancerosa (CMC). Según una realización, el antagonista de Wnt5a interfiere con una ruta de señalización asociada a la migración de una célula madre cancerosa (CMC). Según una realización, el antagonista de Wnt5a interfiere con una ruta de señalización asociada a la invasión de una célula madre cancerosa (CMC).

Según una realización de la invención descrita, la ruta de señalización es una ruta de señalización celular activada por Wnt que no promueve la transcripción mediada por β -catenina. Según una realización, la ruta de señalización celular activada por Wnt que no promueve la transcripción mediada por β -catenina, es una ruta de señalización de Wnt no canónica. Según otra realización, la ruta de señalización de Wnt no canónica implica Wnt5a.

Como ejemplos no limitantes de tumores cerebrales se incluyen un meduloblastoma, un meningioma, un schwannoma, un craneofaringioma, un tumor de células germinales, un tumor de la región pineal y un glioma. Como ejemplos de gliomas se incluyen astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma y similares. Un ejemplo no limitante de un astrocitoma es un glioblastoma multiforme.

Según una realización, el glioma comprende células tumorales. Según otra realización, las células tumorales comprenden células madre cancerosas.

Según una realización, el tumor comprende una población de células tumorales vivas. Según otra realización, la población de células tumorales vivas comprende una población de células madre cancerosas.

Según una realización, la población de células madre cancerosas se caracteriza por un fenotipo invasivo. El fenotipo invasivo puede caracterizarse por la expresión de un marcador de Ki67, un marcador de CD147, un marcador de Frem2 o una combinación de los mismos. Según otra realización, la población de células madre cancerosas muestra la expresión conjunta poco frecuente de Wnt5a y Ef2.

Según una realización, el fenotipo invasivo de células madre cancerosas muestra un alto nivel de expresión de Wnt5a.

Según otra realización, la población de células tumorales se caracteriza por al menos uno de (1) un alto nivel de expresión de Wnt5a y CD44, (2) un alto nivel de expresión de Wnt5a o EfA2 o (3) un alto nivel de expresión de Wnt5a y Dlx2. Según otra realización, la población de células tumorales se caracteriza por la presencia de tres (3) tipos de células que sobreexpresan Wnt5a: (1) astrocito de la zona subventricular (SVZ, *subventricular zone*), Tipo B: Proteína ácida fibrilar glial (GFAP+, *glial fibrillary acidic protein*); (2) progenitor amplificador transitorio, Tipo C: GFAP-, Dlx2+, PSA-NCAM- y (3) neuroblastos, Tipo A: GFAP-, Dlx2+, PSA-NCAM+,

Según una realización, la población de células madre cancerosas se cultiva sin exposición a un factor de crecimiento. Según otra realización, la población de células madre cancerosas cultivadas sin exposición a un factor de crecimiento, muestra un alto nivel de expresión de Wnt5a cuando se compara con una población de células madre cancerosas cultivadas con exposición a un factor de crecimiento (control).

Según una realización, la invención descrita proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral, comprendiendo dicha composición farmacéutica un agente terapéutico que reduce la invasión de las células madre cancerosas.

5 Según una realización, la invención descrita proporciona un agente terapéutico que reduce un nivel de expresión de Wnt5a.

10 La composición farmacéutica para su uso en la invención descrita, comprende un transportador farmacéuticamente aceptable. Según otra realización, la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral comprende además un agente quimioterapéutico.

15 Según una realización, la composición farmacéutica para su uso en la invención descrita, es eficaz para interferir con una o más etapas en una ruta de señalización asociada al crecimiento, la migración y la invasión de tumores. Según otra realización, la composición farmacéutica para su uso en la invención descrita, es eficaz para interferir con una etapa en una ruta de señalización de Wnt5a.

20 Además se desvela un método para reducir el crecimiento, la migración, la invasión de tumores, o una combinación de los mismos, en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método (1) administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprenda una cantidad terapéutica de un péptido, en donde la cantidad terapéutica es eficaz para interferir con una etapa en una ruta de señalización asociada al crecimiento, la migración, la invasión de tumores, o una combinación de los mismos.

25 Además se desvela un método para el tratamiento de un sujeto con un tumor sólido del SNC, comprendiendo el método: (1) proporcionar una composición farmacéutica que comprenda una cantidad terapéutica de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico es un péptido, cuya cantidad terapéutica es eficaz para reducir el crecimiento, la migración, la invasión de tumores, o una combinación de los mismos; y (2) administrar la composición a un sujeto que lo necesite.

30 Según una realización, el método anterior comprende administrar una composición a un sujeto, en donde la composición comprende (1) una cantidad terapéutica de un derivado peptídico de Box5, un anticuerpo bloqueante de Wnt5a, un antagonista de Wnt5a, una proteína que se une al receptor de Wnt5a, una proteína que se une al correceptor de Wnt5a, o Wnt3a y (2) transportadores farmacéuticamente aceptables.

35 Según una divulgación, la invención descrita proporciona un método para tratar a un sujeto con un tumor que comprende una población de células madre cancerosas de un fenotipo invasivo, comprendiendo el método administrar una composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite; en donde las células madre cancerosas del fenotipo invasivo tienen un alto nivel de expresión de Wnt5a.

40 Según una realización, la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un derivado peptídico de Box5, en donde el derivado se selecciona de péptido A (SEQ ID NO: 2), péptido B (SEQ ID NO: 3), o una combinación de los mismos.

45 Según una realización, la invención descrita proporciona una vía para administrar la composición farmacéutica. Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, la vía oral, bucal, parenteral, intranasal, rectal y tópica.

50 Las composiciones farmacéuticas para su uso en la invención descrita pueden estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleaginosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas o jarabes o elixires. Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "oral" o "por vía oral", se refieren a la introducción en el organismo a través de la boca, mediante la cual se produce la absorción en una o más de las siguientes zonas del cuerpo: la boca, el estómago, el intestino delgado, los pulmones (también conocida específicamente como inhalación) y los pequeños vasos sanguíneos que hay debajo de la lengua (también conocida específicamente como sublingual). Las composiciones destinadas para uso oral pueden prepararse según cualquier método conocido, y dichas composiciones pueden
55 contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes para proporcionar preparaciones atractivas desde un punto de vista farmacéutico y de sabor agradable. Los comprimidos pueden contener uno o más principios activos mezclados con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes granulantes y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no recubrirse o recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y la absorción en el tubo gastrointestinal y proporcionar de esta forma una acción sostenida durante un periodo de tiempo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material con tiempo de retardo
60 tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También pueden recubrirse para una liberación controlada.

Las composiciones para su uso en la invención descrita también pueden formularse para uso oral como cápsulas de gelatina dura, donde el principio o los principios activos se mezclan con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o cápsulas de gelatina blanda donde el principio o los principios activos se mezclan con agua o con un medio oleaginoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las composiciones para su uso en la invención descrita pueden formularse como suspensiones acuosas donde el principio o los principios activos se mezclan con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido natural, tal como lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileño con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietilenado, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán polietilenado. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

La composición para su uso en la invención descrita, puede formularse como suspensiones oleaginosas suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de maní, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral, tal como parafina líquida. Las suspensiones oleaginosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Para proporcionar una preparación oral agradable al paladar pueden añadirse agentes edulcorantes, tales como los indicados anteriormente, así agentes saborizantes. Estas composiciones pueden conservarse añadiendo un antioxidante tal como ácido ascórbico.

La composición para su uso en la invención descrita, puede formularse en forma de polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua. El ingrediente activo en dichos polvos y gránulos se proporciona mezclado con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los ejemplos de agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados ya se han mencionado anteriormente. También puede haber agentes excipientes adicionales, o por ejemplo, agentes saborizantes y colorantes.

Las composiciones para su uso en la invención descrita, también pueden estar en forma de una emulsión. Una emulsión es un sistema bifásico preparado combinando dos transportadores líquidos inmiscibles, uno de los cuales se dispersa uniformemente a través del otro y consiste en glóbulos que tienen diámetros iguales o mayores que los de las partículas coloidales más grandes. El tamaño del glóbulo es fundamental y debe ser tal que el sistema obtenga la máxima estabilidad. Normalmente, la separación de las dos fases no se producirá a menos que se incorpore un agente emulsionante como tercera sustancia. Por tanto, una emulsión básica contiene al menos tres componentes, los dos transportadores líquidos inmiscibles y el agente emulsionante, así como el principio activo. La mayoría de las emulsiones incorporan una fase acuosa en una fase no acuosa (o viceversa). Sin embargo, es posible preparar emulsiones que sean básicamente no acuosas, por ejemplo, tensioactivos aniónicos y catiónicos del sistema inmiscible no acuoso, glicerina y aceite de oliva. Por tanto, la composición para su uso en la invención, puede estar en forma de una emulsión de aceite en agua. La fase oleaginoso puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de maní, o un aceite mineral, por ejemplo una parafina líquida, o una mezcla de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma arábiga o goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán y productos de condensación de los ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitano. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y saborizantes.

La composición para su uso en la invención descrita, también puede formularse como jarabes y elixires. Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante y agentes saborizantes y colorantes. Los emolientes son agentes protectores empleados principalmente para aliviar la irritación, particularmente membranas mucosas o tejidos desgastados (es decir, desgarrados o cortados). Diversas sustancias químicas poseen propiedades emolientes. Estas sustancias incluyen alginatos, mucílagos, gomas, dextrinas, almidones, determinados azúcares y glicoles polihídricos poliméricos. Otras incluyen goma arábiga, agar, benzoína, carbómero, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, propilenglicol, alginato de sodio, tragacanto, hidrogeles y similares.

Para la administración bucal, las composiciones para su uso en la invención descrita, pueden tener forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

La composición para su uso en la invención descrita, puede estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. El término "parenteral", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la introducción en

el organismo a través de una inyección (es decir, administración por inyección), incluyendo, por ejemplo, por vía subcutánea (es decir, una inyección por debajo de la piel), por vía intramuscular (es decir, una inyección en un músculo); por vía intravenosa (es decir, una inyección en una vena), por vía intratecal (es decir, una inyección en el espacio alrededor de la médula espinal), inyección intraesternal o técnicas de infusión. Una composición de la invención descrita, administrada por vía parenteral, se administra utilizando una aguja, por ejemplo, una aguja quirúrgica. La expresión "aguja quirúrgica", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier aguja adaptada para el suministro de composiciones líquidas (es decir, capaces de fluir) para su uso en la invención descrita en una estructura anatómica seleccionada. Las preparaciones inyectables, tales como suspensiones acuosas u oleaginosas, estériles, inyectables, pueden formularse según la técnica conocida utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados.

La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable, no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Generalmente, una solución se considera como una mezcla homogénea de dos o más sustancias; siendo esta, con frecuencia, aunque no necesariamente, un líquido. En una solución, las moléculas del soluto (o sustancia disuelta) se distribuyen uniformemente entre las del disolvente. Una suspensión es una dispersión (mezcla) en la cual una especie finamente dividida se combina con otra especie, estando la primera tan finamente dividida y mezclada que no sedimenta rápidamente. En la vida cotidiana, las suspensiones más frecuentes son las de los sólidos en agua líquida. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se incluyen agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente, como disolvente o medio de suspensión, se emplean aceites no volátiles, estériles. Para aplicación parenteral, los vehículos particularmente adecuados consisten en soluciones, preferentemente soluciones oleaginosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes. Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores.

Las composiciones para su uso en la invención descrita, pueden estar en forma de un polvo seco dispersable para el suministro por inhalación o insuflación (ya sea por la boca o por la nariz). Las composiciones en forma de polvo seco pueden prepararse mediante procesos conocidos en la técnica, tales como liofilización y molienda por chorro, como se desvela en la publicación de patente internacional N.º WO 91/16038 así como en la patente de Estados Unidos N.º 6 921 527. El secado por pulverización, por ejemplo, es un proceso en el que se introduce una mezcla acuosa homogénea de fármaco y el transportador a través de una tobera (por ejemplo, una tobera para dos líquidos), un disco giratorio o un dispositivo equivalente en una corriente de gas caliente para atomizar la solución y formar pequeñas gotículas. La mezcla acuosa puede ser una solución, suspensión, lechada o similar, pero debe ser homogénea para garantizar una distribución uniforme de los componentes en la mezcla y, en última instancia, la composición en polvo. El disolvente, generalmente agua, se evapora rápidamente de las gotículas produciendo un polvo seco y fino que tiene partículas de un diámetro de aproximadamente 1 µm a 5 µm. El secado por pulverización se realiza en condiciones que dan como resultado un polvo sustancialmente amorfo de constitución homogénea que tiene un tamaño de partícula respirable, un bajo contenido de humedad y características de flujo que permiten facilitar la aerosolización. Preferentemente, el tamaño de partícula del polvo resultante es tal que más de aproximadamente el 98 % de la masa está en partículas que tienen un diámetro de aproximadamente 10 µm o inferior, estando aproximadamente el 90 % de la masa en partículas que tienen un diámetro inferior a 5 µm. Como alternativa, aproximadamente el 95 % de la masa tendrá partículas con un diámetro inferior a 10 µm teniendo aproximadamente el 80 % de la masa de las partículas un diámetro inferior a 5 µm. Las composiciones en forma de polvo seco también pueden prepararse por liofilización y molienda por chorro, como se desvela en la publicación de patente internacional N.º WO 91/16038.

El término "dispersabilidad" o "dispersable" significa un polvo seco con un contenido de humedad inferior a aproximadamente el 10 % en peso (% p) de agua, normalmente por debajo de aproximadamente 5 % en peso y preferentemente inferior a aproximadamente 3 % en peso; un tamaño de partícula de aproximadamente 1,0-5,0 µm de diámetro mediano de masa (MMD, *Mass Median Diameter*), normalmente un MMD de 1,0-4,0 µm y preferentemente un MMD de 1,0-3,0 µm; una dosis suministrada de aproximadamente > 30 %, normalmente > 40 %, preferentemente > 50 %, siendo lo más preferido > 60 %; y una distribución de tamaño de partícula de aerosol de aproximadamente 1,0-5,0 µm de diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD, *Mass Median Aerodynamic Diameter*), normalmente un MMAD de 1,5-4,5 µm y preferentemente un MMAD de 1,5-4,0 µm. Los métodos y composiciones para mejorar la dispersabilidad se desvelan en la solicitud de Estados Unidos N.º 08/423 568, presentada el 14 de abril de 1995.

El término "polvo" significa una composición que consiste en partículas sólidas finamente dispersas que fluyen libremente y que pueden dispersarse fácilmente en un dispositivo de inhalación y posteriormente pueden ser inhaladas por un sujeto para que las partículas lleguen a los pulmones y permitir su entrada en los alvéolos. Por tanto, se dice que el polvo es "respirable". Preferentemente, el tamaño promedio de partícula es inferior a aproximadamente 10 micrómetros (µm) de diámetro con una distribución de forma esferoidal relativamente uniforme. Más preferentemente, el diámetro es inferior a aproximadamente 7,5 µm y lo más preferentemente inferior a aproximadamente 5,0 µm. Normalmente, la distribución del tamaño de partícula varía entre aproximadamente 0,1 µm y aproximadamente 5 µm de diámetro, particularmente de aproximadamente 0,3 µm a aproximadamente 5 µm.

El término "seco" significa que la composición tiene un contenido de humedad tal que las partículas son fácilmente

dispersables en un dispositivo de inhalación para formar un aerosol. Este contenido de humedad es generalmente inferior al 10 % en peso (% p) de agua, normalmente por debajo de aproximadamente 5 % en peso y preferentemente inferior a aproximadamente 3 % en peso.

- 5 La cantidad del transportador farmacéuticamente aceptable es la cantidad necesaria para proporcionar las características de estabilidad, dispersabilidad, consistencia y volumen necesarias para garantizar un suministro pulmonar uniforme de la composición a un sujeto que lo necesite. Numéricamente, la cantidad puede variar de aproximadamente 0,05 % en peso a aproximadamente 99,95 % en peso, dependiendo de la actividad del fármaco a emplear. Preferentemente se utilizará aproximadamente del 5 % en peso a aproximadamente el 95 % en peso. El
- 10 transportador puede ser un excipiente farmacéutico, o una combinación de dos o más excipientes farmacéuticos, pero generalmente carecerá sustancialmente de "potenciadores de penetración". Los potenciadores de penetración son compuestos tensioactivos que promueven la penetración de un fármaco a través de una membrana o revestimiento mucoso y se proponen para su uso en formulaciones de fármacos por vía intranasal, intrarrectal e intravaginal. Como
- 15 ejemplos de potenciadores de penetración se incluyen sales biliares, por ejemplo, taurocolato, glicocolato y desoxicolato; fusidatos, por ejemplo, taurodeshidrofusidato; y detergentes biocompatibles, por ejemplo, Tweens, Laureth-9, y similares. Sin embargo, el uso de potenciadores de penetración en formulaciones para suministro en los pulmones, generalmente no es deseable, ya que la barrera sanguínea epitelial en el pulmón puede verse afectada negativamente por dichos compuestos tensioactivos. Las composiciones en forma de polvo seco para su uso en la invención descrita, se absorben fácilmente en los pulmones sin la necesidad de emplear potenciadores de penetración.

20 Los tipos de excipientes farmacéuticos que son útiles como transportadores para el suministro pulmonar incluyen estabilizadores tales como seroalbúmina humana (HSA, *human serum albumin*), agentes de formadores de volumen tales como hidratos de carbono, aminoácidos y polipéptidos; ajustadores de pH o tampones; sales tales como cloruro de sodio; y similares. Estos transportadores pueden estar en forma cristalina o amorfa o pueden ser una mezcla de las dos.

Como agentes formadores de volumen, que son particularmente valiosos para el suministro pulmonar, se incluyen hidratos de carbono, polipéptidos, aminoácidos, o combinaciones de los mismos, que sean compatibles. Los hidratos de carbono adecuados incluyen monosacáridos tales como galactosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, trehalosa y similares, ciclodextrinas, tal como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; y polisacáridos, tales como rafinosa, maltodextrinas, dextranos y similares; alditoles, tales como manitol, xilitol y similares. Un grupo preferido de hidratos de carbono incluye lactosa, trehalosa, rafinosa, maltodextrinas y manitol. Como un polipéptido adecuado se incluye el aspartamo. Como aminoácidos se incluyen la alanina y la glicina, prefiriéndose la glicina.

35 Para la estabilidad conformacional durante el secado por pulverización y para mejorar la dispersabilidad del polvo para el suministro pulmonar, pueden incluirse aditivos que son componentes minoritarios de la composición. Estos aditivos incluyen aminoácidos hidrófobos, tales como triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina y similares.

Para el suministro por inhalación o insuflación, la composición para su uso en la invención descrita, se coloca en un

40 receptáculo dosificador adecuado en una cantidad suficiente para proporcionar a un sujeto un tratamiento de dosificación unitaria. El receptáculo dosificador es uno que se ajusta dentro de un dispositivo de inhalación adecuado para permitir la aerosolización de la composición en forma de polvo seco mediante dispersión en una corriente de gas para formar un aerosol y después capturar el aerosol así producido en una cámara que tenga una boquilla conectada para la inhalación posterior por parte de un sujeto que necesite tratamiento. Dicho receptáculo dosificador incluye

45 cualquier recipiente que contenga la composición conocida en la técnica, tal como cápsulas de gelatina o de plástico con una parte extraíble que permita que una corriente de gas (por ejemplo, aire) se dirija al interior del recipiente para dispersar la composición en forma de polvo seco. Dichos recipientes se ilustran en las patentes de Estados Unidos N.º 4 227 522; 4 192 309 y 4 105 027. Como recipientes adecuados también se incluyen los utilizados junto con el inhalador en polvo de la marca Rotohaler Ventolin® de Glaxo o el inhalador de polvo de la marca Spinhaler® de Fison.

50 Otro envase de dosis unitaria adecuado que proporciona una barrera superior contra la humedad está formado por un laminado de plástico con papel de aluminio. El polvo de base farmacéutica se introduce en peso o en volumen en la depresión de la lámina moldeable y se sella herméticamente con un laminado de cobertura de plástico y aluminio. Dicho recipiente para su uso con un dispositivo de inhalación de polvo, se describe en la patente de Estados Unidos N.º 4 778 054 y se utiliza con el Diskhaler® de Glaxo (patentes de Estados Unidos N.º 4,627,432, 4 811 731 y

55 5 035 237).

Las composiciones para su uso en la invención descrita, pueden utilizarse en forma de gotas o pulverizadores (por ejemplo, un pulverizador nasal, un pulverizador con aerosol o con bomba) u otros vehículos para administración nasal (suministro intranasal). Las preparaciones de pulverizador con aerosol pueden estar incluidas en un recipiente presurizado con un propulsor adecuado, tal como un propulsor de hidrocarburo. Los dispensadores de pulverización con bomba pueden dispensar una dosis medida o una dosis que tenga un tamaño de partícula o gotícula específico. Cualquier dispositivo dispensador puede adaptarse para dispensar una sola o varias dosis. Más generalmente, las composiciones para su uso en la invención, especialmente las formuladas para administración intranasal, también pueden proporcionar como soluciones, suspensiones o composiciones viscosas (p. ej., geles, lociones, cremas o pomadas).

La composición para su uso en la invención descrita, puede estar en forma de supositorios para la administración rectal de la composición. "Rectal o por vía rectal", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la introducción en el cuerpo a través del recto, donde la absorción se produce a través de las paredes del recto. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado, tal como manteca de cacao y polietilenglicoles, que son sólidos a temperaturas normales pero líquidos a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirán en el recto y liberarán el fármaco. Cuando se formulan como un supositorio, las composiciones para su uso en la invención, pueden formularse con aglutinantes y transportadores tradicionales, tales como triglicéridos.

El término "tópico" se refiere a la administración de una composición en el punto de aplicación o inmediatamente debajo del mismo. La frase "aplicación tópica" describe la aplicación sobre una o más superficies, incluyendo superficies epiteliales. Aunque a diferencia de la administración transdérmica, la administración tópica generalmente proporciona un efecto local en lugar de sistémico, tal como se utiliza en el presente documento, a menos que se indique o implique lo contrario, las expresiones administración tópica y administración transdérmica, se utilizan indistintamente. Para el propósito de esta solicitud, las aplicaciones tópicas incluirán enjuagues bucales y gárgaras.

La administración tópica también puede implicar el uso de administración transdérmica, tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis, que se preparan según técnicas y procedimientos muy conocidos en la materia. Las expresiones "sistema de suministro transdérmico" "parche transdérmico" o "parche", se refieren a un sistema adhesivo colocado en la piel para suministrar una dosis de liberación prolongada de uno o más fármacos que pasan desde la forma de dosificación a través de la piel para que estén disponibles para su distribución a través de la circulación sistémica. Los parches transdérmicos son una tecnología bien aceptada que se utiliza para suministrar una amplia variedad de productos farmacéuticos, incluyendo, pero sin limitación, escopolamina para el mareo, nitroglicerina para el tratamiento de la angina de pecho, clonidina para la hipertensión, estradiol para indicaciones posmenopáusicas y nicotina para dejar de fumar.

Los parches adecuados para su uso en la invención descrita incluyen, pero sin limitación, (1) el parche de matriz; (2) el parche de depósito; (3) el parche adhesivo de fármaco en láminas múltiples; y (4) el parche adhesivo de fármaco monolítico; TRANSDERMAL AND TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, págs. 249-297 (Tapash K. Ghosh et al. eds., 1997). Estos parches son muy conocidos en la técnica y generalmente están disponibles en el comercio.

En algunas realizaciones, las composiciones para su uso en la invención descrita, pueden formularse con un excipiente, vehículo o transportador seleccionado de disolventes, agentes de suspensión, agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes, y agentes humectantes/tensioactivos/solubilizantes. Los términos "excipiente", "vehículo" o "transportador", se refieren a sustancias que facilitan el uso de uno o más compuestos activos, pero que no reaccionan perjudicialmente con ellos cuando se mezclan. El término "activo" se refiere al principio, componente o constituyente de las composiciones para su uso en la invención descrita, que es responsable del efecto terapéutico que se pretende conseguir. Los transportadores deben tener una pureza suficientemente elevada y una toxicidad suficientemente baja como para que puedan administrarse adecuadamente al sujeto que se va a tratar. El transportador puede ser inerte o puede poseer beneficios farmacéuticos.

El transportador puede ser líquido o sólido, y se selecciona teniendo en cuenta la forma de administración prevista para proporcionar el volumen, la consistencia etc., deseados, cuando se combina con un principio activo y con el resto de componentes de una composición determinada. Los transportadores típicos incluyen, pero sin limitación, agentes aglutinantes (incluidos, pero sin limitación, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (incluidas, pero sin limitación, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (incluidos, pero sin limitación, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio); disgregantes (incluidos, pero sin limitación, almidón, almidón glicolato sódico) y agentes humectantes (incluidos, pero sin limitación, laurilsulfato sódico). Como transportadores adicionales adecuados para las composiciones para su uso en la invención descrita, se incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume; monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petrotrales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, sustancias saborizantes y/o aromáticas y similares que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos.

La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier transportador sustancialmente no tóxico convencionalmente útil para la administración de productos farmacéuticos en los que el componente activo permanecerá estable y biodisponible. En algunas realizaciones, el transportador farmacéuticamente aceptable de las composiciones para su uso en la invención descrita, incluye un agente de liberación, tal como un transportador de liberación sostenida o de liberación retardada. En dichas realizaciones, el transportador puede ser cualquier material capaz de liberar de manera sostenida o retardada la cantidad terapéutica del agente terapéutico para proporcionar una administración más eficaz, dando como resultado una dosis menos frecuente y/o reducida del principio activo, una facilidad de manipulación y efectos prolongados o

retardados. Como ejemplos no limitantes de dichos transportadores se incluyen liposomas, microesponjas, microesferas o microcápsulas de polímeros naturales y sintéticos, y similares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos tales como colesterol, estearilaminas o fosfatidilcolinas.

- 5 Los péptidos terapéuticamente activos de la invención descrita, pueden formularse tal cual o en forma de sal. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales no tóxicas de los péptidos de la invención descrita. Las sales peptídicas que pueden utilizarse en la invención, son sales farmacéuticamente aceptables de ácidos orgánicos o sales farmacéuticamente aceptables de ácidos inorgánicos. Como ejemplos de dichas sales peptídicas farmacéuticamente aceptables se incluyen, pero sin limitación, las formadas con grupos amino libres, tales como las
- 10 derivadas de los ácidos clorhídrico, fosfórico, sulfúrico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres, tales como las derivadas de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

- 15 La composición adicional para su uso en la invención descrita, puede prepararse fácilmente utilizando tecnología conocida en la materia, tal como la que se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª o 19ª ediciones, publicadas por la Mack Publishing Company of Easton, Pa.

- 20 Según algunas realizaciones, las composiciones para su uso en la invención descrita, pueden incluir además uno o más principios activos compatibles destinados a proporcionar a la composición otro efecto farmacéutico además del proporcionado por un péptido derivado de Wnt5a, un peptidomimético de Wnt5a, un antagonista de Wnt5a o un anticuerpo bloqueante de Wnt5a. "Compatible", tal como se utiliza en el presente documento, significa que los principios activos de dicha composición pueden combinarse entre sí de tal manera que no haya interacción que reduzca sustancialmente la eficacia de cada principio activo o composición en condiciones normales de uso.

- 25 La composición para su uso en la invención descrita, también puede administrarse en serie o en combinación con otras composiciones para el tratamiento de tumores cerebrales. Por ejemplo, sin limitación, dichas otras composiciones pueden incluir la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4, *bone morphogenetic protein 4*); y compuestos antiinflamatorios (incluidos, pero sin limitación, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como ibuprofeno, indometacina y flurbiprofeno).

- 30 La composición para su uso en la invención descrita, sola o en combinación con otros principios activos, puede administrarse a un sujeto en una sola dosis o en dosis múltiples durante un período de tiempo. Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "cantidades terapéuticamente eficaces" "cantidad terapéutica" y "cantidades farmacéuticamente eficaces", se utilizan indistintamente para referirse a la cantidad de la composición para su uso en la invención, que da como resultado un efecto terapéutico o beneficioso después de su administración a un sujeto. Además, las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad terapéutica" y "cantidad farmacéuticamente eficaz", incluyen cantidades profilácticas o preventivas de la composición para su uso en la invención descrita. En aplicaciones profilácticas o preventivas de la invención descrita, las composiciones farmacéuticas o los medicamentos,
- 35 se administran a un paciente susceptible de padecer tumores, o de otro modo, que corre el riesgo de padecer tumores, que comprenden una población de células madre cancerosas con un fenotipo invasivo en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retrasar la aparición de los tumores, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de los tumores, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de los tumores.

- 45 La concentración de la sustancia activa se selecciona de manera que ejerza su efecto terapéutico, pero que sea lo suficientemente baja como para impedir que se produzcan efectos secundarios significativos dentro del alcance y buen criterio del experto en la técnica. La cantidad eficaz de la composición puede variar en función de la edad y el estado físico del sujeto biológico que se está tratando, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea, el compuesto específico, la composición u otro principio activo empleado, con el transportador particular utilizado, y factores similares. Los expertos en la materia pueden evaluar fácilmente dichos factores y,
- 50 basándose en esta información, determinar la concentración eficaz particular de una composición para su uso en la invención descrita, para utilizarse con un fin determinado. Además, en aplicaciones terapéuticas de la invención descrita, las composiciones o los medicamentos se administran a un paciente del que se sospecha que padece, tiene o ya padece dicha enfermedad, trastorno o afección en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad, el trastorno o la afección, incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad, el trastorno o la afección. La administración de la composición para su uso en la invención descrita, reduce o elimina el deterioro cognitivo en pacientes que aún no han desarrollado la patología característica de la enfermedad, el trastorno o la afección.

- 60 En el presente documento una cantidad adecuada para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente eficaz. En regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, una cantidad de las composiciones para su uso en la invención descrita, se administra normalmente en varias dosis hasta que se obtenga una respuesta beneficiosa suficiente. Normalmente, si la respuesta comienza a disminuir, la respuesta se controla y se administran dosis repetidas. Un experto en la materia puede determinar una cantidad farmacéuticamente eficaz de las composiciones de la invención determinando la dosis en una unidad de dosificación (es decir, la unidad de uso) que provoca una intensidad de efecto determinada, denominada en lo sucesivo "dosis unitaria". La expresión "relación
- 65

dosis-intensidad" se refiere a la manera en la cual la intensidad del efecto en un receptor individual se relaciona con la dosis. La intensidad de efecto generalmente designada es el 50 % de intensidad máxima. La dosis correspondiente se denomina dosis eficaz del 50 % o DE50 individual. El uso del término "individual" distingue la DE50 basada en la intensidad del efecto tal como se utiliza en el presente documento a partir de la mediana de la dosis eficaz, también abreviada ED50, determinada a partir de la frecuencia de los datos de respuesta en una población. "Eficacia", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la propiedad de las composiciones para su uso en la invención descrita, para conseguir la respuesta deseada, y "eficacia máxima" se refiere al efecto máximo alcanzable. La cantidad de compuestos en las composiciones para su uso en la invención descrita que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular, dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. (Véase, por ejemplo, Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Joel G. Harman, Lee E. Limbird, Eds.; McGraw Hill, N.Y., 2001; THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, Medical Economics Company, Inc., Oradell, N.J., 1995; y DRUG FACTS AND COMPARISONS, FACTS AND COMPARISONS, INC., St. Louis, Mo., 1993). La dosis exacta que se va a emplear en la formulación, también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno y se decidirá según el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Diversos patrones de administración serán obvios para los expertos en la materia.

Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones para su uso en la invención descrita, son suficientemente grandes como para producir el efecto terapéutico deseado. La cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones para su uso en la invención descrita, puede administrarse una o más veces al día de forma regular. Una dosis típica administrada a un sujeto varía entre aproximadamente 0,01 mg de la composición por kg (de peso corporal) al día y aproximadamente 0,5 mg de la composición por kg (de peso corporal) al día. Por ejemplo, sin limitación, la dosis mínima de la composición se contempla en aproximadamente 0,01 mg/kg/día, aproximadamente 0,025 mg/kg/día, aproximadamente 0,05 mg/kg/día, aproximadamente 0,075 mg/kg/día, aproximadamente 0,08 mg/kg/día, aproximadamente 0,1 mg/kg/día, aproximadamente 0,125 mg/kg/día, aproximadamente 0,15 mg/kg/día, aproximadamente 0,175 mg/kg/día, aproximadamente 0,2 mg/kg/día, aproximadamente 0,225 mg/kg/día, aproximadamente 0,25 mg/kg/día, aproximadamente 0,275 mg/kg/día, aproximadamente 0,3 mg/kg/día, aproximadamente 0,325 mg/kg/día, aproximadamente 0,35 mg/kg/día, aproximadamente 0,375 mg/kg/día, aproximadamente 0,4 mg/kg/día, aproximadamente 0,45 mg/kg/día, aproximadamente 0,475 mg/kg/día o aproximadamente 0,5 mg/kg/día y la dosis máxima se contempla en aproximadamente 0,5 mg/kg/día, aproximadamente 0,475 mg/kg/día, aproximadamente 0,45 mg/kg/día, aproximadamente 0,4 mg/kg/día, aproximadamente 0,375 mg/kg/día, aproximadamente 0,35 mg/kg/día, aproximadamente 0,325 mg/kg/día, aproximadamente 0,3 mg/kg/día, aproximadamente 0,275 mg/kg/día, aproximadamente 0,25 mg/kg/día, aproximadamente 0,225 mg/kg/día, aproximadamente 0,2 mg/kg/día, aproximadamente 0,175 mg/kg/día, aproximadamente 0,15 mg/kg/día, aproximadamente 0,125 mg/kg/día, aproximadamente 0,1 mg/kg/día, aproximadamente 0,08 mg/kg/día, aproximadamente 0,075 mg/kg/día, aproximadamente 0,05 mg/kg/día, aproximadamente 0,025 mg/kg/día o aproximadamente 0,01 mg/kg/día. En algunas representaciones de la invención en seres humanos, la dosis puede ser de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 0,3 mg de la composición por kg (de peso corporal) al día, y en otras realizaciones en seres humanos, entre 0,01 y 0,08 mg de la composición por kg (de peso corporal) al día.

Los expertos en la materia reconocerán que las indicaciones iniciales de la dosis terapéutica apropiada de las composiciones para su uso en la invención descrita, pueden determinarse en sistemas de modelos animales realizados *in vitro* e *in vivo*, y en ensayos clínicos en seres humanos. El objetivo de dichos estudios es identificar una dosis que pueda administrarse de manera segura sin generar toxicidad u otros efectos secundarios. Para tratamientos de corta duración, la dosis terapéutica será parecida a la dosis máxima tolerada. Para el tratamiento crónico, puede ser conveniente reducir la dosis debido a cuestiones sobre efectos tóxicos prolongados.

El efecto terapéutico, es decir, de reducir el crecimiento, la migración, la invasión de los tumores, o una combinación de los mismos, en un sujeto humano, puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica. El crecimiento tumoral puede determinarse mediante técnicas, incluyendo, sin limitación, tiempo de duplicación (TD) (es decir, el tiempo que tarda un tumor en duplicar su volumen), tasa de crecimiento específica (es decir, el porcentaje diario de crecimiento tumoral), criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (CERTS) y similares. Dichas técnicas implican normalmente una o más técnicas de obtención de imágenes conocidas en la materia. Las técnicas de obtención de imágenes ejemplares incluyen tomografía computarizada (TC) o tomografía axial computarizada (TAC), tomografía de emisión de positrones (TEP), obtención de imágenes por resonancia magnética (RM), obtención de imágenes ópticas y similares. Las técnicas de obtención de imágenes ópticas incluyen, sin limitación, obtención de imágenes de bioluminiscencia (IBL) y obtención de imágenes de fluorescencia (IFL). La migración tumoral puede determinarse mediante técnicas, incluyendo, sin limitación, sistema de Transwell o cámara de Boyden, cicatrización de heridas, ensayo de durotaxis, micropipetado, matriz extracelular (MEC) 3D, microestampado, obtención de imágenes microfluídica e intravital. La obtención de imágenes intravital incluye técnicas de obtención de imágenes utilizadas habitualmente en la materia, incluyendo, pero sin limitación, microscopía multifotónica. La invasión tumoral puede determinarse mediante técnicas, incluyendo sin limitación, Matrigel™ (preparación de membrana basal solubilizada extraída de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm), ensayos con Laminina I, Colágeno I y Colágeno IV.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, está incluido en la invención. En la invención también se incluyen los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños, que pueden incluirse independientemente en intervalos más pequeños, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, en la invención también se incluyen los intervalos que excluyen cualquiera de estos límites.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la puesta en práctica o ensayo de la invención descrita, también pueden utilizarse cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas, divulgan y describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

Cabe destacar que, tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno(a)", "el" y "la", incluyen referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado.

Las publicaciones citadas en el presente documento, se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo expuesto en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la invención descrita no tenga derecho a antedatar dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que tal vez deban ser confirmadas independientemente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completas de cómo efectuar y utilizar la invención descrita y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni se pretende que representen que los siguientes experimentos sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a esta.

Métodos

Inmunomarcaje/marcaje mediante inmunofluorescencia

El inmunomarcaje/marcaje mediante inmunofluorescencia, son procesos bioquímicos que permiten la detección y localización de un antígeno en un lugar concreto dentro de una célula, tejido u órgano. La tinción celular se puede dividir en cuatro etapas: preparación celular, fijación, aplicación de anticuerpos y evaluación.

En primer lugar, las células están unidas a un soporte sólido para poder manipularlas fácilmente en los procedimientos posteriores. Esto se puede realizar mediante diversos métodos, por ejemplo, las células adherentes pueden crecer en portaobjetos y cubreobjetos de microscopio, o en un soporte de plástico ópticamente adecuado. Las células en suspensión pueden centrifugarse en portaobjetos de vidrio, unirse a un soporte sólido utilizando enlazadores químicos, o en algunos casos, manipularse en suspensión. Después, las células se fijan y se permeabilizan para garantizar el acceso del anticuerpo a su antígeno. Se encuentran disponibles una amplia gama de fijadores, y la elección correcta del método dependerá de la naturaleza del antígeno que se examine y de las propiedades del anticuerpo utilizado. Los métodos de fijación generalmente se dividen en dos clases: disolventes orgánicos y reactivos reticulantes. Los solventes orgánicos como los alcoholes y la acetona eliminan los lípidos y deshidratan las células, mientras precipitan las proteínas en la arquitectura celular. Los reactivos reticulantes (como el paraformaldehído) forman puentes intermoleculares, normalmente a través de grupos amino libres, creando así una red de antígenos unidos. Los reticulantes preservan la estructura celular mejor que los disolventes orgánicos, pero puede reducir la antigenicidad de algunos componentes celulares y requerir la adición de una etapa de permeabilización para permitir el acceso del anticuerpo al espécimen. La fijación con ambos métodos puede desnaturalizar los antígenos proteicos y, por esta razón, los anticuerpos preparados contra proteínas desnaturalizadas pueden ser más útiles para la tinción celular. El método de fijación apropiado se puede elegir según la aplicación correspondiente. Lo siguiente es un protocolo ejemplar de inmunofluorescencia y marcaje.

Las células se sacan de una incubadora y se aclaran en PBS. Se elimina el exceso de solución y las células se fijan en paraformaldehído al 3-4 % durante 10-20 minutos y después se aclaran brevemente con PBS. A continuación, las células se permeabilizan con Triton X-100 al 0,5 % durante 2-20 minutos y después se lavan tres veces (al menos 5 minutos cada una) con PBS. El anticuerpo primario se diluye en PBS a una dilución apropiada, se le aplica un

cubreobjetos y se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavan tres veces (al menos 5 minutos cada una) con PBS. El anticuerpo secundario marcado con fluorescencia se diluye en PBS a una dilución apropiada, se le aplica un cubreobjetos y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavan tres veces (al menos 5 minutos cada una) con PBS. Se elimina el exceso de PBS, se montan en cubreobjetos con medio de montaje e se invierten en portaobjetos de vidrio.

Ensayo con Neuroesferas (NA) - para identificar, propagar y enumerar células madre neuronales (CMN) *in vitro*

Debido a la falta de una firma morfológica, molecular o antigénica específica, las células madre se han identificado basándose en un criterio funcional. Para identificar, propagar y enumerar CMN *in vitro*, puede utilizarse una metodología de cultivo denominada ensayo de neuroesferas (NA, *Neurosphere Assay*) (Renolds y Weiss, Science, 1992, 225: 1707-1710). En resumen, el NA implica la microdissección de tejido del SNC (p. ej., embrionario a adulto), la interrupción de contactos entre células y la generación de una suspensión de células individuales. Las células se colocan en placas (normalmente a baja densidad) en material de cultivo de tisular en un medio asérico definido en presencia de al menos un factor de crecimiento inductor de proliferación (es decir, Factor de Crecimiento Epidérmico [EGF], factor de crecimiento de fibroblastos básico [bFGF] etc.). En estas condiciones, al cabo de 2-5 días, una población de CMN multipotentes comienza a dividirse dando lugar a un grupo de células indiferenciadas obtenidas clonalmente, denominadas neuroesferas. En presencia continua del factor inductor de proliferación, las células de la neuroesfera continúan dividiéndose, dando como resultado un aumento del número de células que comprenden la neuroesfera y, en consecuencia, del tamaño de la neuroesfera. Se recogen las neuroesferas, se alteran en una suspensión de células individuales, y las células vuelven a sembrarse en placas de cultivo para generar nuevas neuroesferas. El pase de CMN de esta manera da como resultado un aumento aritmético de células precursoras viables del SNC. El ensayo de NA permite que las CMN se aislen y expandan en condiciones definidas para que pueda estudiarse el comportamiento de las supuestas células madre en diferentes condiciones experimentales.

Ensayos de invasión - Ensayos de invasión de Matrigel

Un ensayo de invasión es un sistema *in vitro* para estudiar la capacidad de invasión de células neoplásicas y normales. Las aplicaciones específicas incluyen la evaluación del potencial metastásico de las células tumorales, la inhibición de la metástasis por componentes de la matriz extracelular o fármacos antineoplásicos, la expresión alterada de proteínas de la superficie celular o metaloproteinasas de matriz en células metastásicas; y la invasión de células normales, tales como células madre embrionarias, citotrofoblastos, células endoteliales y fibroblastos.

Según una realización, el siguiente protocolo de ensayo de invasión de Matrigel es un ejemplo de un ensayo de invasión. Se prepara un tampón de recubrimiento y se descongela una parte alícuota de matriz de Matrigel a 4 °C. Después, se prepara una solución de recubrimiento mezclando matriz de Matrigel con el tampón de recubrimiento. Se transfieren diversos soportes permeables a los pocillos de una placa de 24 pocillos y se colocan 100 µl del Matrigel diluido en cada pocillo de la placa de 24 pocillos. Después, para la gelificación, la placa se incuba durante 2 horas y a 37 °C con el soporte permeable recubierto. Las células se cultivan y se preparan para el ensayo de invasión, por ejemplo, células propagadoras de tumores con características similares a células madre de GBMh dependientes de factor de crecimiento (TPC GFD, *tumor-propagating cells growth factor dependent*) se tratan previamente con concentraciones saturantes de proteína Wnt5a recombinante (GFD+R5); células GFD de sobreexpresión editada por lentivirus (GFD+LV5); las TPC independientes del factor de crecimiento (GFI) se tratan con concentraciones saturantes de un anticuerpo (Ab, *antibody*) bloqueante de Wnt5a (AbW5) o de una proteína Wnt3a recombinante (R3) o de una proteína 1 relacionada con frizzled secretada recombinante (SFRP1), o las TPC GFI se exponen a péptidos procedentes de Wnt5a denominados Box5 (SEQ ID NO: 1), Se preparan suspensiones celulares de Péptido A (SEQ ID NO: 2) y Péptido B (SEQ ID NO: 3) en medio de cultivo que contiene 5×10^4 células/ml para las cámaras de invasión de 24 pocillos. Después, a cada cámara de invasión de 24 pocillos, se la añade una parte alícuota de 0,5 ml de suspensión celular ($2,5 \times 10^4$ células). Se incorpora un quimioatrayente a los pocillos de la placa (tal como fibronectina como sustrato adhesivo). Después, las cámaras de invasión celular se incuban durante la noche en una incubadora de cultivo tisular humidificada y a una temperatura de 37 °C, con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las células no invadidas en la parte superior del soporte permeable recubierto con Matrigel se raspan con un bastoncillo de algodón. Después, los soportes permeables de las placas de 24 pocillos se retiran y se tiñen con una solución de tinción celular y las células invadidas se cuentan con un microscopio óptico.

Análisis de citometría de flujo cuantitativo

Las TPC o macrófagos asociados a tumores se diseccionan y se digieren en una solución de papaína y se obtiene una suspensión de células individuales. Para el análisis de clasificación celular, las células se centrifugan y se resuspenden en PBS que contiene DNasa. Después, las células se incuban durante 30 minutos a 4 °C, con un "cóctel" de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo que detecta Wnt5a, CD44, Efa2, se clasifican y se analizan mediante FACS. Las células se identifican y se seleccionan electrónicamente en señales de dispersión de luz directa y ortogonal (FSC y SSC) y firmas fluorescentes (FITC o PE) en una población distinta basada en la expresión de Wnt5a, CD44 o Efa2. La fluorescencia de fondo se calculó sustituyendo anticuerpos primarios con controles de isotipo específicos. La medición de la autofluorescencia también se realizó de forma rutinaria para cada condición analizada. Los datos sin procesar del instrumento se almacenaron electrónicamente para su archivo y procesamiento de datos.

Evaluación de la capacidad tumorigénica y de la invasividad *in vivo* mediante implante ortotópico

La tumorigenicidad se determinó inyectando células tumorales en ratones adultos inmunodeprimidos con inmunodeficiencia combinada grave (SCID, *severe combined immunodeficiency*). (Galli et al., Cancer Res. 2004, 65: 7011-7021). Células tumorales, por ejemplo, TPC GFI, GFD TPC, TPC GFI tratadas previamente con Box5 (SEQ ID NO: 1), TPC GFI tratadas previamente con péptido A (SEQ ID NO: 2), se inyectaron ortotópicamente en ratones SCID para evaluar la capacidad tumorigénica y la invasividad *in vivo*. Además, las TPC GFD o GFI y la proteína bloqueante de Wnt5a (AbWt), solas o en combinación con BMP4 (B4), Box5 (SEQ ID NO. 1) y Péptido A (SEQ ID NO: 2) se inyectaron conjuntamente en los ratones SCID.

Los ratones se sacrificaron en diferentes momentos. La reconstrucción histológica en serie de las secciones del cerebro de los ratones se inmunomarcaron para detectar la luciferasa para la evaluación.

Todos los resultados de los experimentos *in vivo* se sometieron a análisis estadístico. Las curvas de supervivencia se calcularon utilizando el método de Kaplan-Meier.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Según una realización, para determinar la pureza de los péptidos se utilizaron las siguientes condiciones de HPLC: Columna C18 Vydac, fase móvil A: TFA al 0,1 % en agua, fase móvil B: TFA al 0,1 % en acetonitrilo, gradiente de B al 5 % a B al 65 % en 20 minutos.

Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-Tof)

La desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI, *Matrix-assisted laser desorption/ionization*) es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas en la que se utiliza un pulso láser corto para analizar biomoléculas (biopolímeros tales como ADN, proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas de gran tamaño (tales como polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas), que tienden a ser frágiles y a fragmentarse cuando se ionizan mediante métodos de ionización más convencionales utilizando un láser continuo. Según una realización, para determinar el peso molecular de los péptidos, se utilizaron los siguientes parámetros por Maldi-Tof: Tensión de aceleración: 20000, tensión de rejilla: 93,7 %, tensión de cable guía: 0,070 %, entrada de baja masa: off, retraso: 100 off, ion negativo: off.

MATERIALES

Anticuerpo bloqueante de Wnt5a (R&D Systems, Mineápolis, MN), proteína Wnt3a recombinante (R&D Systems, Mineápolis, MN), proteína 1 relacionada con frizzled secretada recombinante (R&D System), Box5 (Primm srl Peptide Synthesis), Péptido A (Primm srl Peptide Synthesis), Péptido B (Primm srl Peptide Synthesis).

Box5 (SEQ ID NO: 1), El péptido A (SEQ ID NO: 2) y el péptido B (SEQ ID NO: 3) se sintetizaron en Primm srl (Milán, Italia) mediante síntesis de péptidos en fase sólida. La calidad de los péptidos sintetizados se controló mediante RP-HPLC y espectrometría de masas.

Se prepararon células propagadoras de tumores (TPC, *tumor-propagating cells*) de GBMh con características similares a células madre, procedentes de TPC de GBMh Mesenquimal y Proneural mediante ensayo de neuroesferas (Renolds y Weiss, Science, 1992, 225: 1707-1710).

La expresión mejorada de Wnt5a se consiguió tratando células GFD con concentraciones saturantes de proteína Wnt5a recombinante (GFD+R5) o mediante sobreexpresión mediada por lentivirus (GFD+LV5).

Ejemplo 1

Correlación de la expresión del gen Wnt5a con muestras de tumor histológicas clasificadas, obtenidas de pacientes con glioma

En este estudio, para evaluar el nivel de expresión del gen Wnt5a en muestras de tumor histológicas clasificadas, obtenidas de pacientes con glioma, se utilizaron los conjuntos de datos disponibles al público del Cancer Genome Atlas Network (TCGA) (Nature 2008, 455 (23): 1061-68), Phillips (Cancer cell 2006; 9: 157-173), Freije (Cancer Res. 2004; 64: 6503-6510), Murat (J. Clin. Oncol. 2008; 26: 3015-3024), Lee (BMC med. Genomics 2008; 1:52) y Beroukhim (PNAS 2007; 104(50): 20007-20012).

En la figura 7 se muestra la expresión del gen Wnt5a en cerebro humano normal, glioblastoma (GBM) y otra histología de tumor cerebral. Basándose en los conjuntos de datos disponibles al público, la expresión de Wnt5a fue significativamente mayor desde un punto de vista estadístico en glioblastoma humano (GBMh) en comparación con cerebro no neoplásico (figura 7a), en glioblastoma en comparación con otra histología de tumor cerebral (figura 7b) y

en glioblastoma necrótico de alto grado en comparación con glioma no necrótico de grado IV de la clasificación de la OMS (figura 7c). La expresión de Wnt5a no fue significativamente mayor desde un punto de vista estadístico en glioblastoma recurrente en comparación con glioblastoma primario (figura 7d). Las puntuaciones Z calculadas sobre los niveles de expresión de Wnt5a se correlacionaron de manera positiva y significativa con la existencia de hipermetilación conjunta en una gran cantidad de locus (fenotipo metilador de islas CpG de glioma; G-CIMP) en comparación con no G-CIMP (figura 7e). Dentro de los subgrupos del conjunto de datos del TCGA, La expresión del gen Wnt5a fue significativamente mayor en el subtipo Mesenquimal en comparación con los subtipos Proneural y Clásico (figura 7f-g). El número de copias de Wnt5a se correlacionó con neoplasia maligna en pacientes con glioma (Beroukhi y TCGA Brain Statistics) (figura 7h-i). Entre los pacientes con glioblastoma, se asoció un nivel de expresión alto del gen Wnt5a con una supervivencia significativamente más reducida en comparación con un nivel de expresión bajo del gen Wnt5a (conjuntos de datos de Philips (figura 7j), Lee (figura 7k) y Murat (Figura 7l)).

En la figura 8 se muestra el nivel de expresión de ARNm de Wnt5a en muestras de tumor histológicas clasificadas. En la figura 8a se muestran niveles más altos de ARNm de Wnt5a en astrocitomas anaplásicos (ANA) y GBMh (GBM H-TEX) en comparación con tejidos de endimoma (EP), glioma de grado bajo (BAJO) y meduloblastoma (MDB) detectados mediante perfil de expresión informático. Las células propagadoras de tumores de GBMh (TPC) con características similares a células madre, cultivadas sin la exposición simultánea a combinaciones específicas de factores de crecimiento (independiente de factor de crecimiento; GFI) (CTR) mostraron niveles más altos de Wnt5a en comparación con sus TPC hermanas dependientes de factor de crecimiento (GFD) (figura 8c). La diferenciación de TPC no causó ningún cambio detectable en la expresión de Wnt5a (DOUB frente a DIFF). Como células de control, se utilizaron células madre neuronales humanas (CMNh; B10) y U87MG de astrocitoma humano. El análisis bioinformático mostró que los tejidos de GBMh Mesenquimales y Proneurales y sus TPC relacionadas, tenían el nivel más alto de expresión de ARNm de Wnt5a en comparación con los tejidos o líneas celulares Clásicas y las células madre neuronales o cerebrales totales (B10, saludable) (figura 8b-e). Como se muestra en las figuras 8f y 8g, la cuantificación de los niveles de ARNm de Wnt5a mediante PCR cuantitativa (PCRc) en tiempo real, confirmó que Wnt5a estaba regulada positivamente en astrocitomas anaplásicos (AA) y en GBMh primarios en comparación con cerebro humano completo (WHB, *whole human brain*) normal, gliomas de grado bajo y otros tipos de tumores cerebrales (Ep; endimoma). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, esta prueba sugiere que Wnt5a regula la capacidad de una célula tumoral para infiltrarse ampliamente en el tejido cerebral normal. En la figura 8h se muestra que las células propagadoras de tumores (TPC) con características similares a células madre mesenquimales (130419-131030) y proneurales (130424) de GBMh, expresaron un nivel más alto de ARNm de Wnt5a en comparación con las TPC Clásicas (081104-081031-090310) y con las células madre neuronales humanas (CMNh).

En la figura 9 se muestra el inmunomarcado de las proteínas Wnt5a y del receptor 2 de efrina tipo A (Efa2) en muestras quirúrgicas de GBMh, MDB, de grado bajo (LG, *low grade*) y ganglioglioma. En la figura 9a, el inmunomarcado de especímenes quirúrgicos mostró una fuerte inmunorreactividad de Wnt5a en muchas células de tejidos de GBMh y MDB en comparación con pocas células positivas en tejidos de grado bajo (LG) y ganglioglioma. El inmunomarcado de tejido de GBMh (130424) también mostró expresión conjunta poco frecuente de la proteína Wnt5a y de la proteína Efa2 marcadora de TPC. La expresión de la proteína Wnt5a también fue más alta en el meduloblastoma más agresivo e invasivo (MDB desmoplásico 130920) en comparación con MDB 130221 (Figura 9a). Como se muestra en la figura 9b, los tejidos Mesenquimales (131030 y 130419) y Proneurales (130424) de GBMh, mostraron inmunorreactividad generalizada para la proteína Wnt5a en comparación con los tejidos Clásicos de GBMh (barras de escala, 50 μ m).

Ejemplo 2

Imágenes de inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo cuantitativo de la expresión de la proteína Wnt5a

En este estudio, para detectar la expresión de la proteína Wnt5a en TPC procedentes de GBMh Mesenquimal y Proneural en comparación con células Clásicas, se utilizaron imágenes de inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo cuantitativo.

Las imágenes de inmunofluorescencia mostraron una fuerte positividad para la proteína Wnt5a en las TPC procedentes de GBMh Mesenquimal (131030 y 130419) y Proneural (040622) en comparación con un marcaje más débil en las células Clásicas (0627 y 0913). Como control positivo, se utilizó Wnt5a sobreexpresada mediada por lentivirus (040622-5A) (barras de escala, 20, 30 y 50 μ m) (figura 10a). La expresión de la proteína Wnt5a también se correlacionó con la variación del número de copias (datos no mostrados).

Las TPC de GBMh independientes de factor de crecimiento (TPC GFI), aisladas de las líneas dependientes de factor de crecimiento (TPC GFD) preestablecidas afines o del tejido tumoral primario del paciente, mostraron una inmunoreacción clara e intensa (figuras 10b y 10c). Las células GFI mostraron una mayor expresión de proteína Wnt5a en comparación con su GFD homóloga (barras de escala, 20, 30 y 50 μ m) (figuras 10b y 10c). Las imágenes confocales mostraron una expresión conjunta poco frecuente de las proteínas Wnt5a y Efa2, en las TPC GFD y GFI, en las que la señal de Efa2 era menos obvia e intensa (barras de escala, 10 y 50 μ m) (figuras 10b y 10c).

Como se muestra en la figura 11a, el análisis de citometría de flujo cuantitativo confirmó la expresión conjunta poco frecuente de proteínas Wnt5a y Efa2 en las TPC GFD y GFI, que expresan altos niveles de CD44, el supuesto

marcador de adhesión y migración celular.

En las figuras 11b y 11c se muestra la cuantificación de los niveles de ARNm de Wnt5a y Dlx2 o Wnt5a y Wnt3a por PCRc en células TPC GFD y GFI en comparación con TPC diferenciadas y células madre neuronales humanas (CMNh) normales. El gen Dlx2 codifica la proteína Homeobox DLX2, que es un marcador de células que amplifican el tránsito y se cree que juega un papel en el desarrollo prosencefálico y craneofacial.

En la figura 11d se muestra la cuantificación temporal de los niveles de ARNm de Wnt5a y Efa2 en las TPC GFD (izquierda) o GFI (derecha) en comparación con las TPC diferenciadas según lo determinado por PCRc.

En la figura 23 se muestra la correlación de la expresión de Wnt5a con la expresión de Efa2 de las líneas celulares mostradas. Las unidades de la figura son la expresión de Wnt5a en el eje Y y la expresión del receptor en el eje X. Cuanto más alta es la expresión de Wnt5, más migran las células, y cuanto más alta es la expresión del receptor, más proliferan las células. Al correlacionar la expresión de Wnt5a con la expresión del receptor, cada línea celular puede asignarse a los grupos indicados. Los tipos celulares más agresivos se encuentran en el subtipo clásico (círculos).

Ejemplo 3

Análisis bioinformático de la expresión del gen Wnt5a en GBMh

En este estudio, el análisis bioinformático se realizó en especímenes teñidos de GBMh, seleccionados y clasificados según el nivel de expresión de Wnt5a.

En las figuras 12a y 12b se muestran análisis bioinformáticos realizados en especímenes teñidos de GBMh, seleccionados y clasificados mediante FACS según la expresión de Wnt5a. La firma/activación de los genes Wnt5aHigh frente a Wnt5aLow en las TPC y en macrófagos asociados a tumores, se correlaciona con un fenotipo más invasivo y angiogénico. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, estos datos sugieren que Wnt5a regula actividades tanto en células tumorales como en macrófagos tumorales, lo que da lugar por tanto una mayor invasión tumoral (figuras 12a y 12b).

Los términos de ontología génica (OG) asociados a Wnt5aHigh, se clasificaron por niveles de significación estadística y se representaron mediante barras en la figura 12c. Cuanto mas alta sea la barra, menor será el valor de p del término correspondiente.

En las figuras 12d y 12f se muestra un conjunto enriquecido de Wnt5aAlto frente a Wnt5aBajo de procesos biológicos implicados en el desarrollo celular, adhesión celular y migración celular.

Ejemplo 4

Expresión y correlación de Wnt5a, Efa2 y DLX2 en tejidos de GBMh

En este estudio, para determinar si la expresión conjunta de Wnt5a con Efa2 o DLX2 se correlacionaba con neoplasia maligna en pacientes con glioma y/o con su supervivencia, se utilizó el análisis de los conjuntos de datos disponibles al público (TCGA, Phillips y Lee) y tinción inmunofluorescente de GBMh y MDB.

En la figura 13 se muestra la correlación de la expresión de Wnt5a, Efa2 y DIX2 en tejidos de GBM humano con respecto a la supervivencia de pacientes con glioma. El conjunto de datos del TCGA destacó una fuerte tendencia hacia la exclusión mutua entre los genes Wnt5a y Efa2 o Wnt5a y Dlx2 (datos no mostrados). Como se demuestra en la figura 13a, el análisis en red de interacción de proteínas de las firmas Wnt5a, Efa2 y Dlx2, mostró que Wnt5a está relacionada con Efa2 a través de YES1, una proteína tirosina cinasa no receptora que participa en la regulación del crecimiento, la supervivencia y la apoptosis celular, en la adhesión entre células, en la remodelación y en la diferenciación del citoesqueleto. Además, el análisis en red de interacción de proteínas mostró que Wnt5a está relacionada con Dlx2 a través de SLC6A1, un transportador de GABA que media sobre su rápida eliminación y mantiene bajos niveles extracelulares. Los gráficos de Kaplan-Meier de pacientes de los conjuntos de datos de Lee y Philips, mostraron una disminución significativa de la supervivencia de pacientes con glioma con una alta expresión de Wnt5a-Dlx2 o Wnt5a-Efa2 (figura 13b). En la figura 13c se muestra la cuantificación de los niveles de ARNm de Wnt5a y Dlx2 mediante PCRc en GBMh primario, glioma de bajo grado, astrocitoma anaplásico y meduloblastoma en comparación con cerebro humano completo (WNB) normal. En la figura 13d se muestra la cuantificación de los niveles de ARNm de la proteína Wnt5a no canónica frente a la proteína Wnt3a canónica (que se sabe que inhibe la expresión de Wnt5a) en las mismas muestras primarias y en otros tipos de tejidos cerebrales (ependimomas; Ep, y en tumores neuroectodérmicos primitivos, PNET (*Primitive Neuroectodermal Tumors*)).

En la figura 14a se muestra la expresión conjunta de Wnt5a y Dlx2, el supuesto marcador de células C amplificadoras de tránsito y neuroblastos, en GBMh y MDB frente a especímenes primarios de grado bajo (GB) (barras de escala, 20 y 50 µm). Las imágenes confocales a varios aumentos muestran una localización conjunta generalizada de Wnt5a y Dlx2 y una expresión conjunta más débil de Wnt5a, Dlx2 y Efa2 en la superficie de células en tejidos de GBMh (figura

14b).

En la figura 15 se muestra la expresión génica de Wnt5A, EFA2, DLX2 y de la molécula de adhesión de células neuronales 1 (NCAM1, *Neural Cell Adhesion Molecule 1*) en tumores cerebrales humanos a lo largo de la escala de neoplasias malignas. En la figura 15a se muestra la expresión génica de Wnt5a, EFA2, DLX2 y NCAM1 del Atlas de expresión génica (TCGA) en tumores cerebrales humanos a lo largo de la escala de neoplasias malignas (es decir, gliomas de grado bajo (astrocitoma, oligodendroglioma; Grado I y II de la clasificación de la OMS) y GBMh (Grado IV)) y en líneas celulares de glioblastoma humano. En la figura 15b se muestra el análisis en red de interacción de proteínas de las firmas Wnt5a, EFA2, Dlx2 y NCAM1. En los paneles superiores de la figura 15c, el inmunomarcado de tejidos de GBMh (130424) a diversos aumentos, muestra que una gran cantidad de células positivas al ligando de Wnt5a, expresan conjuntamente el supuesto marcador de neuroblastos, PSA-NCAM, siendo hasta el 60 % de las células inmunorreactivas a PSA-NCAM, positivas a Wnt5a y Dlx2 (Barras de escala, 20 y 50 μ m). En los paneles inferiores de la figura 15c, las imágenes confocales de los mismos tejidos de GBMh que se muestran en los paneles superiores de la figura 15c, muestran la expresión conjunta de Dlx2 y del marcador de \square Tubulina III progenitor neuronal en la superficie de las células en el tejido de GBMh en comparación con el marcaje poco frecuente en tejidos de grado bajo (GB) primario de cerebro normal (barras de escala, 20 y 50 μ m). En la figura 15d se muestra el porcentaje de células positivas. Cada barra indica la media \pm EEM (error estándar de la media).

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la correlación de la expresión de Wnt5a, Efa2 y DLX2 en tejidos de GBMh, sugiere la presencia de tipos de células que sobreexpresan Wnt5a, astrocitos de la zona subventricular (ZSV), Tipo B: Proteína ácida fibrilar glial (GFAP+, *glial fibrillary acidic protein*); progenitor amplificador transitorio, Tipo C; GFAP-, Dlx2+, PSA-NCAM- y neuroblastos, Tipo A: GFAP-, Dlx2+, PSA-NCAM+ en este tipo de tejido.

Ejemplo 5

La modulación de la expresión y/o actividad de Wnt5a afecta a la migración de las TPC y de las células U87MG en GBMh

En este estudio, se determinó el efecto de Wnt5a sobre el desarrollo, la migración y la invasividad tumoral *in vitro* e *in vivo*, utilizando la proteína recombinante Wnt5a y la sobreexpresión de la proteína Wnt5a mediada por lentivirus.

En la figura 16 se muestra la migración e invasión *in vitro* de las TPC GFI que sobreexpresan Wnt5a frente a las TPC GFD homólogas preestablecidas. Los ensayos de invasión de Matrigel muestran que las TPC GFI, que sobreexpresan Wnt5a, migran e invaden *in vitro* de una manera más eficaz que sus TPC GFD homólogas preestablecidas. La expresión mejorada de Wnt5a obtenida tratando células GFD con concentraciones saturantes de proteína Wnt5a recombinante (GFD+R5) y por sobreexpresión mediada por lentivirus (GFD+LV5), está en paralelo con un aumento en la migración celular (figura 16a). La administración de un anticuerpo bloqueante de Wnt5a (AbW5; R&D Systems), de concentraciones saturantes de proteína Wnt3a recombinante (R3; R&D System) o proteína 1 relacionada con frizzled secretada recombinante (R&D System; SFRP1) (un antagonista de Wnt endógeno), disminuyó la invasividad de las TPC GFI (figura 16b). Las TPC GFI expuestas a péptidos procedentes de Wnt5a, Box5, PEPA y PEPB, también disminuyeron la invasividad de las TPC GFI de una manera dependiente de la dosis (figuras 16c y 16d). En la figura 16e se muestra la cuantificación de la tasa de invasión a través del dispositivo de transwell recubierto con Matrigel (histograma, media \pm EEM). Después de la exposición a AbW5, las células GFI aisladas de tejidos tumorales primarios de un paciente, migran de una manera menos eficaz que las células GFD (figura 16f). En la figura 16g se muestra que la perturbación de la actividad de Wnt5a con AbW5, Box5 y PEPA, tuvo efectos insignificantes sobre la capacidad de las TPC GFI o GFD para expandirse según lo medido indirectamente a partir de la pendiente de las curvas. Los controles positivos de la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) y efrinaA1-Fc, desencadenaron significativamente desviaciones negativas de los parámetros cinéticos del crecimiento (figura 16g (Galli et al., Cancer Res. 2004, 65:7011-7021)). La inhibición de Wnt5a también tuvo efectos insignificantes sobre la eficacia clonal de las TPC (es decir, capacidad de autorrenovación) (figura 16h).

En la figura 17 se muestra un desarrollo y una invasividad tumoral significativamente mejorados por células U87MG que sobreexpresan Wnt5a mediado por lentivirus (U87-5A) en comparación con células de control (U87-ts). Una sección representativa del cerebro, teñida con tinción de contraste con hematoxilina y eosina (H&E), mostró un desarrollo y una invasión tumoral significativamente mejorados por células U87MG que sobreexpresan Wnt5a mediado por lentivirus (U87-5A) en comparación con células de control U87-wt (figura 17a). La misma sección del cerebro mostró inmunorreactividad generalizada y homogénea para el marcador de leucocitos humanos (HLA) en xenoinjertos de U87MG que expresan Wnt5a frente al tipo silvestre (U87-ts) (figura 17a) (barras de escala, 25 y 50 μ m). En la figura 17b se muestra la reconstrucción histológica en serie de secciones de cerebro de ratón inmunomarcadas con proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*). Células U87MG (U87/5A) transgénicas xenoinjertadas intracranialmente, generaron tumores con una mayor capacidad de migración, diseminación e invasión en comparación con tumores procedentes de U87 de ts (tipo silvestre), cuyo tamaño es bastante grande pero que no muestran ninguna capacidad migratoria. Estos tumores procedentes de U87 ts, consistían en una masa progresivamente creciente y bien definida, confinada al lugar donde se realizó la inyección (figura 17b). En la figura 17c se muestra una comparación directa de la inmunorreactividad de Ki67 (un marcador de índice mitótico) y CD147 de células U87MG que expresan Wnt5a frente al tipo silvestre. La sobreexpresión de Wnt5a mejoró significativamente

la proliferación intracraneal o la neo-angiogénesis de manera local como distal (barras de escala, 20 y 50 μ m). En las figuras 17d y 17e se muestra el inmunomarcaje de tumores xenoinjertados. Las secciones de U87 de tipo silvestre mostraron un marcaje poco frecuente y más débil para el supuesto marcador de invasividad, la proteína 2 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1 (Frem2), en comparación con una inmunorreactividad fuerte y frecuente en los tumores procedentes de U87-Wnt5a, tanto en el núcleo como en el borde del tumor (barras de escala, 50 μ m).

Ejemplo 6

La perturbación de Wnt5a afecta a la capacidad tumorigénica e invasividad *in vivo* de las TPC

En este estudio, para determinar el efecto de Wnt5a sobre el crecimiento y la invasividad tumoral, y sobre la supervivencia global, se implantaron TPC GFI y GFI (células propagadoras de tumores, dependientes de factor de crecimiento e independientes de factor de crecimiento) en ratones SCID adultos inmunodeprimidos.

En la figura 18 se muestra que la perturbación de Wnt5a afecta a la capacidad tumorigénica e invasividad *in vivo* de las TPC. La reconstrucción histológica en serie de secciones de cerebro de ratón inmunomarcadas con luciferasa mostró que, después del trasplante ortotópico en ratones SCID adultos inmunodeprimidos, los tumores generados a partir del implante de las TPC GFI se extendieron más y pudieron infiltrarse en el parénquima cerebral de manera más eficaz que los generados por sus células GFD homólogas en diferentes momentos después del trasplante (DPT; días después del trasplante) (figura 18a) (barra de escala, 1 mm). Las mediciones de la extensión rostrocaudal de tumores procedentes de TPC GFD y GFI, en tan solo 40 días después del trasplante, mostraron que los tumores que crecían a partir de células GFI estaban más expandidos que los de sus células GFD homólogas (datos no mostrados). La gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier de animales trasplantados con las TPC GFI-GFD, mostró que la capacidad tumorigénica mejorada de las células GFI también se refleja en términos de supervivencia global (figura 18b). En la figura 18c se muestra un análisis cuantitativo temporal de las TPC etiquetadas con luciferasa (luc-TPC). Al tratar las células GFI con Box5 (SEQ ID NO: 1) y el péptido A (SEQ ID NO: 2) en cultivo antes del trasplante (pretratamiento), el crecimiento tumoral disminuyó (figura 18c) (Histograma, media \pm EEM). Las secciones de cerebro de ratón inmunomarcadas para detectar la luciferasa, confirmaron que los tumores establecidos a partir de las TPC GFI marcadas con Luc previamente tratadas con Box5 y PEPA, se propagaban a través del parénquima cerebral menos que los establecidos a partir de las TPC GFI no tratadas (figura 18d) (barra de escala, 1 mm). El análisis cuantitativo temporal de las señales de luc-TPC (TPC etiquetadas con luciferasa) mostró que la inyección conjunta (es decir, el tratamiento conjunto) de las TPC GFD o GFI con AbW5, solo o en combinación con BMP4 (B4), inhibió el crecimiento tumoral de Box5 y PepA (figuras 18e y 18f) (Histograma, media \pm EEM). Se obtuvieron resultados similares inyectando, con bombas mini-osmóticas, AbW5 alrededor del tumor, comenzando 10 días después del trasplante de TPC GFI (postratamiento). (figura 18g) (cada barra indica la media \pm EEM).

Aunque la invención descrita se ha descrito con referencia a sus realizaciones específicas, los expertos en la materia deben entender que pueden realizarse diversos cambios y que pueden sustituirse equivalentes. Además, pueden realizarse muchas modificaciones para adaptar una situación, un material, una composición de materia, un proceso, una etapa o etapas del proceso particulares, al objetivo y alcance de la invención descrita.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral en un sujeto, que comprende una población de células propagadoras de tumores (TPC) con características similares a células madre, comprendiendo dicha composición farmacéutica una cantidad terapéutica de un agente terapéutico y un transportador farmacéuticamente aceptable, en donde el agente terapéutico es un derivado peptídico de Wnt5a, en donde la cantidad terapéutica del agente terapéutico es eficaz
 - (1) para reducir el crecimiento, la migración y la invasión tumorales, o una combinación de los mismos, en relación con un control, afectando a un nivel de expresión de Wnt5a; y
 - (2) para aumentar la supervivencia del sujeto en relación con un control.
2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde el tumor cerebral
 - (i) es un glioma; o
 - (ii) se selecciona del grupo que consiste en un meduloblastoma, un meningioma, un schwannoma, un craneofaringioma, un tumor de células germinales y un tumor de la región pineal.
3. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en donde el glioma
 - (a) se selecciona del grupo que consiste en un astrocitoma, un oligodendroglioma y un ependimoma
 - (b) comprende tejido mesenquimal, tejido proneural, tejido clásico o una combinación de los mismos; o
 - (c) comprende células positivas al ligando de Wnt5a.
4. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en donde el astrocitoma, el oligodendroglioma y el ependimoma, son anaplásicos.
5. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en donde el astrocitoma es un glioblastoma multiforme.
6. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el derivado peptídico es
 - (i) un antagonista de Wnt5a;
 - (ii) sintético;
 - (iii) seleccionado del grupo que consiste en un hexapéptido, un pentapéptido y una combinación de los mismos; o
 - (iv) un derivado de Box 5 (SEQ ID NO: 1).
7. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6 (iii), en donde
 - (a) el hexapéptido tiene la secuencia de aminoácidos MDGCEL (SEQ ID NO: 1);
 - (b) el hexapéptido tiene la secuencia de aminoácidos LECGDM (SEQ ID NO: 2); o
 - (c) el pentapéptido tiene la secuencia de aminoácidos LEGDM (SEQ ID NO: 3).
8. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde el control es un sujeto no tratado con la composición farmacéutica.
9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3(b), en donde el tejido mesenquimal y el tejido proneural se caracterizan por un nivel de expresión del ligando de Wnt5a aumentado en relación con el tejido clásico.
10. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, en donde el nivel de expresión del ligando de Wnt5a aumentado es indicativo de migración celular.
11. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde la población de células propagadoras de tumores (TPC) con características similares a células madre, tiene un fenotipo invasivo.
12. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde la modulación de la expresión y/o actividad de Wnt5a por el derivado peptídico, es eficaz para disminuir la invasividad de las TPC GFI (independientes del factor de crecimiento) de una manera dependiente de la dosis.
13. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3(c), en donde las células positivas al ligando de Wnt5a
 - (a) expresan conjuntamente el supuesto marcador de neuroblastos, PSA-NCAM, siendo hasta el 60 % de las células inmunorreactivas a PSA-NCAM, positivas a Wnt5a y Dlx2;
 - (b) se caracterizan por un nivel de expresión de CD44 aumentado en relación con un control; o

(c) no expresan conjuntamente el supuesto marcador EfA2 de TPC similares a células madre.

14. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde el fenotipo invasivo comprende la expresión del marcador de invasión, la proteína 2 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1 (Frem2).

5 15. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2(i), en donde el derivado peptídico es eficaz para reducir la invasión del tumor que comprende la población de las TPC a través del parénquima cerebral en comparación con un control no tratado.

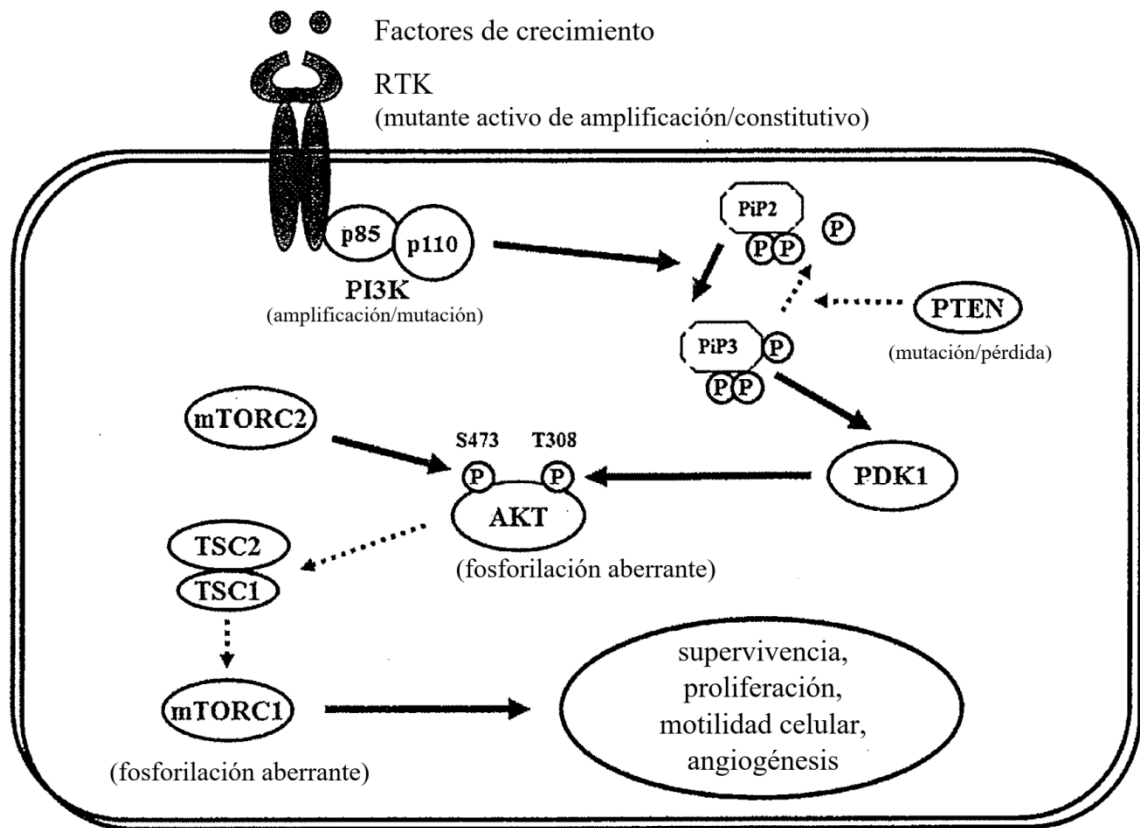


FIGURA 1

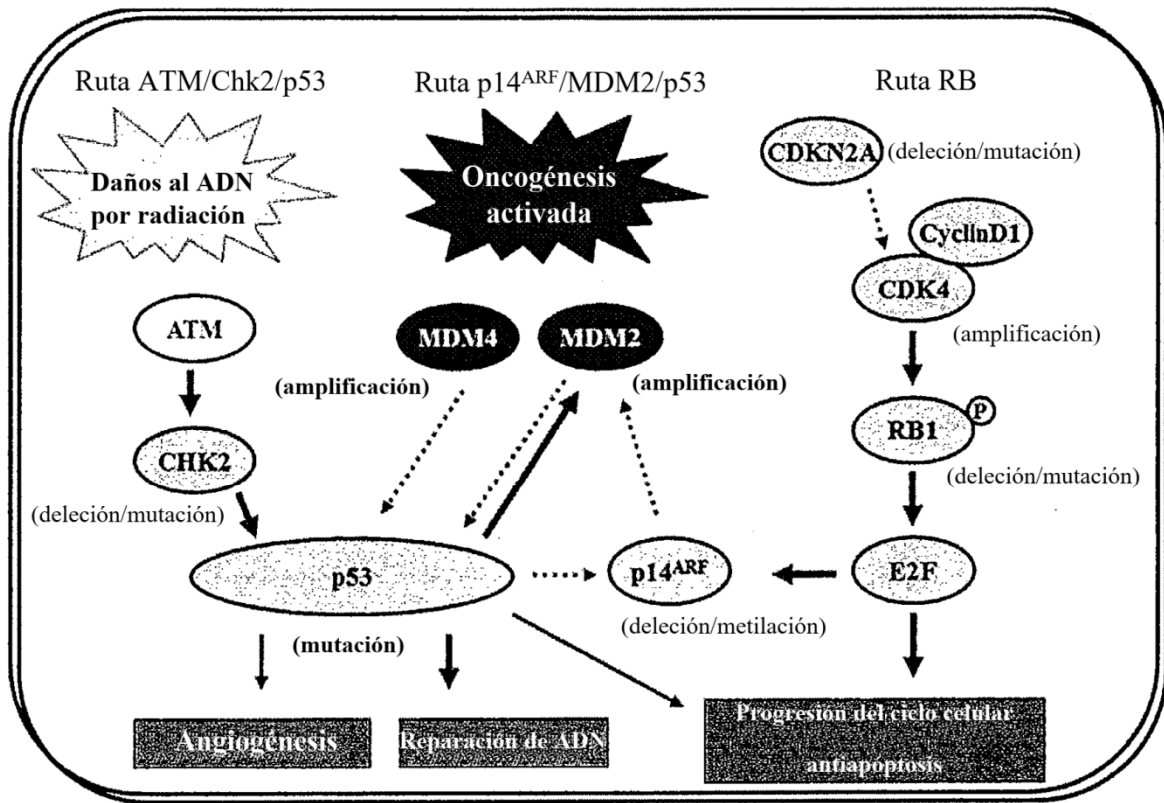


FIGURA 2

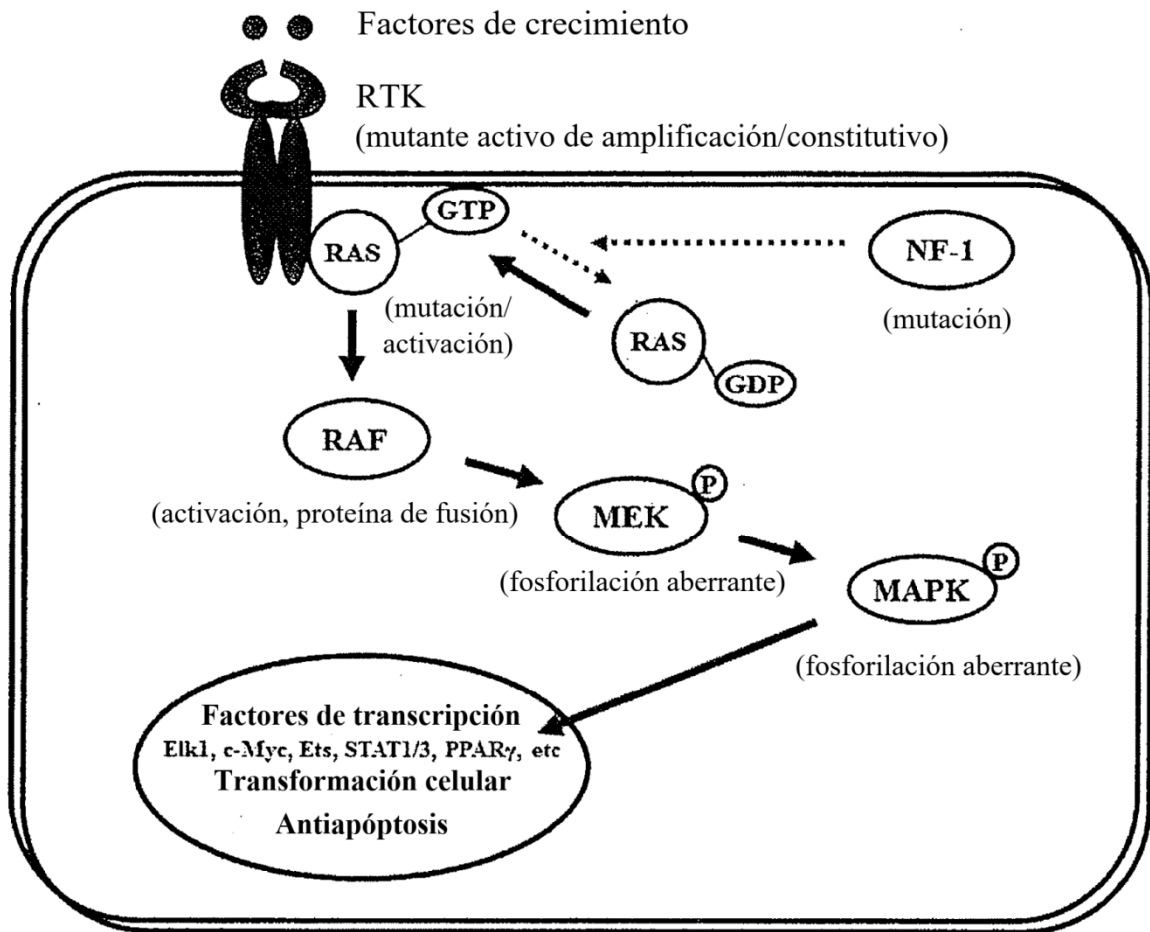
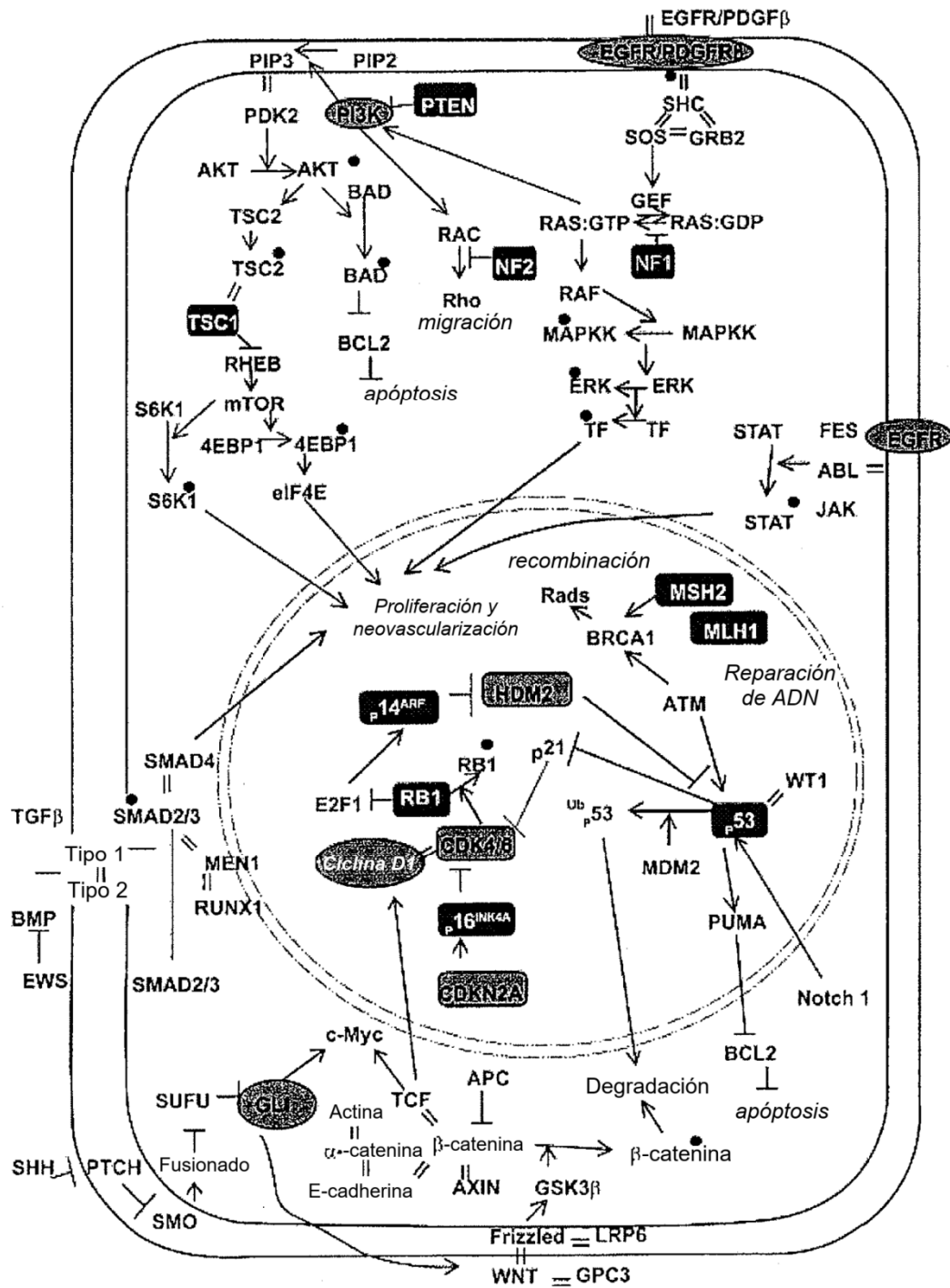


FIGURA 3

FIGURA 4



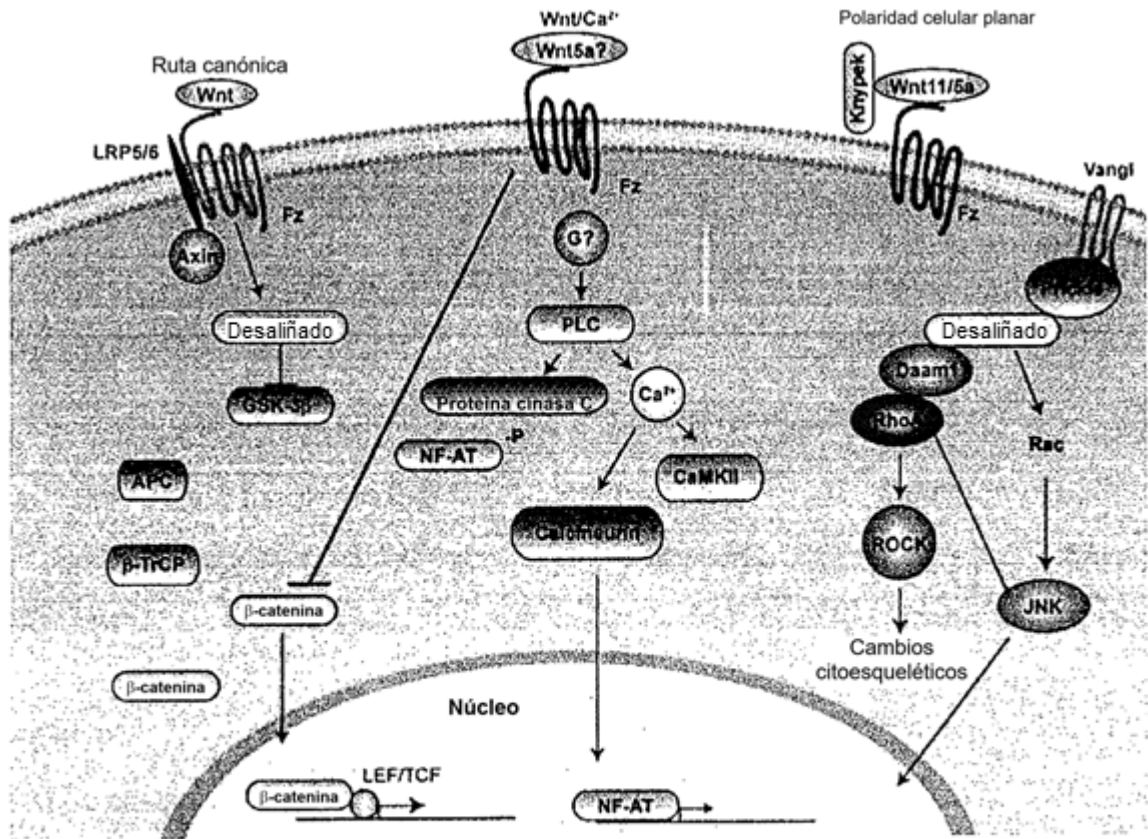


FIGURA 5

FIGURA 6

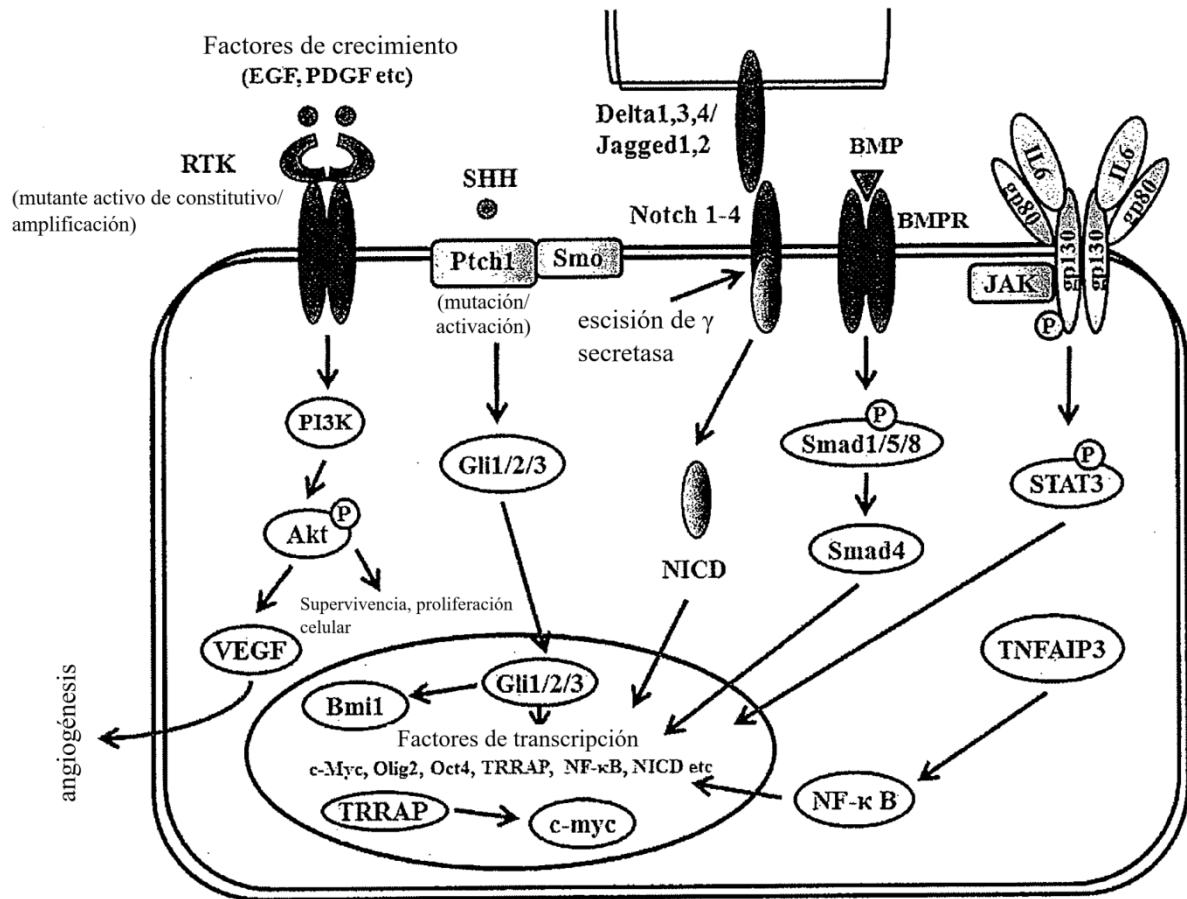
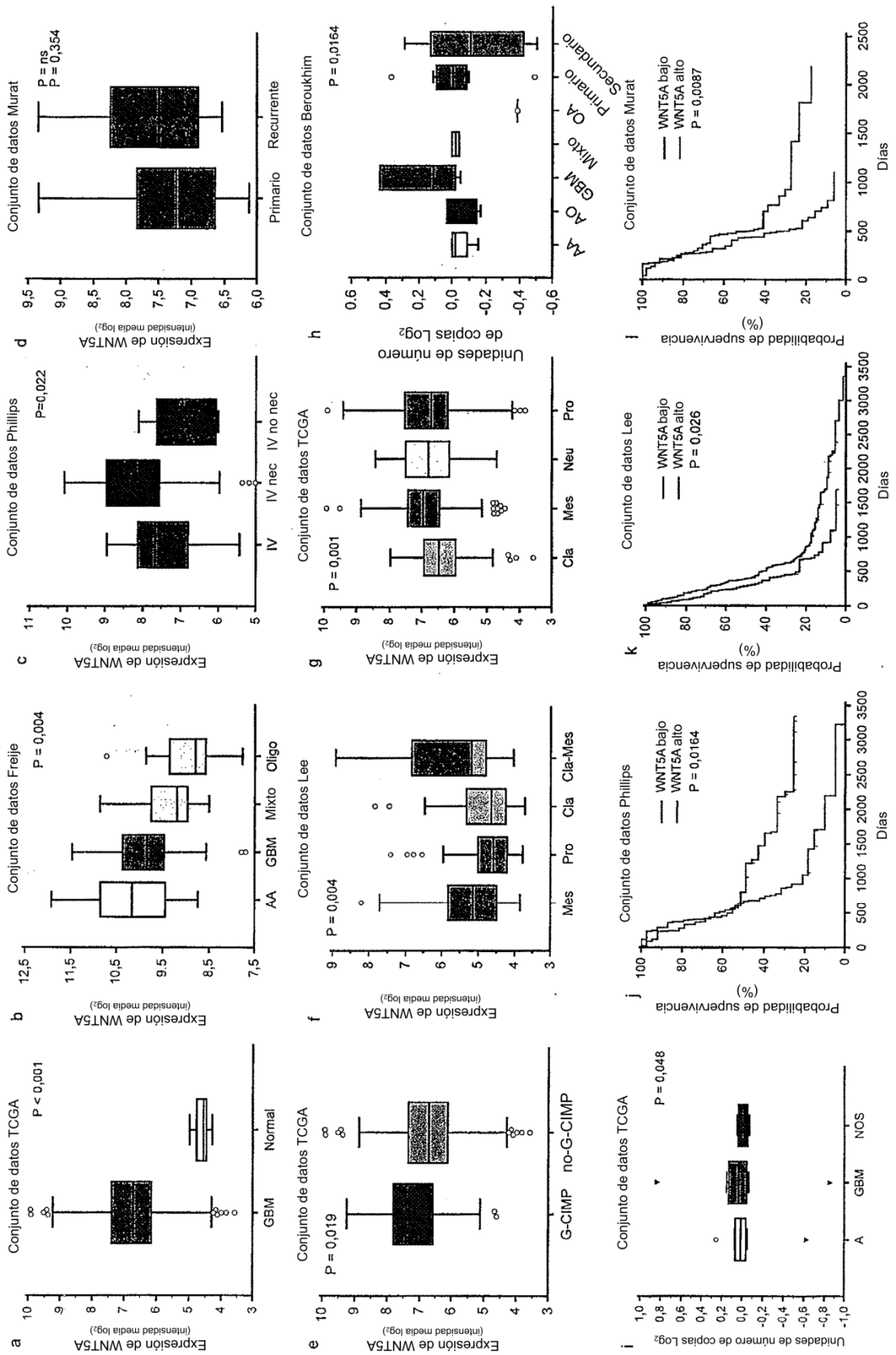


FIGURA 7



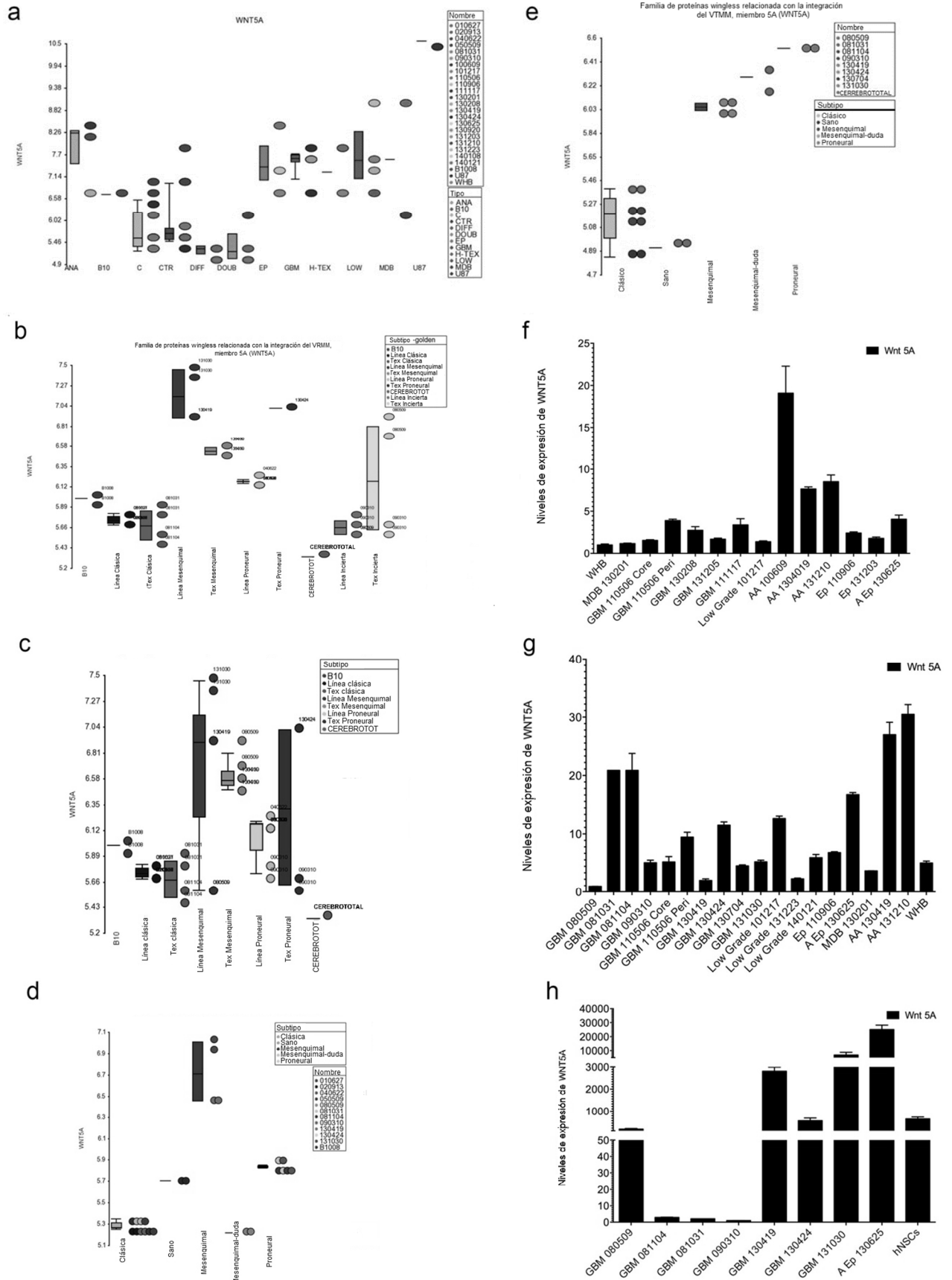


FIGURA 8

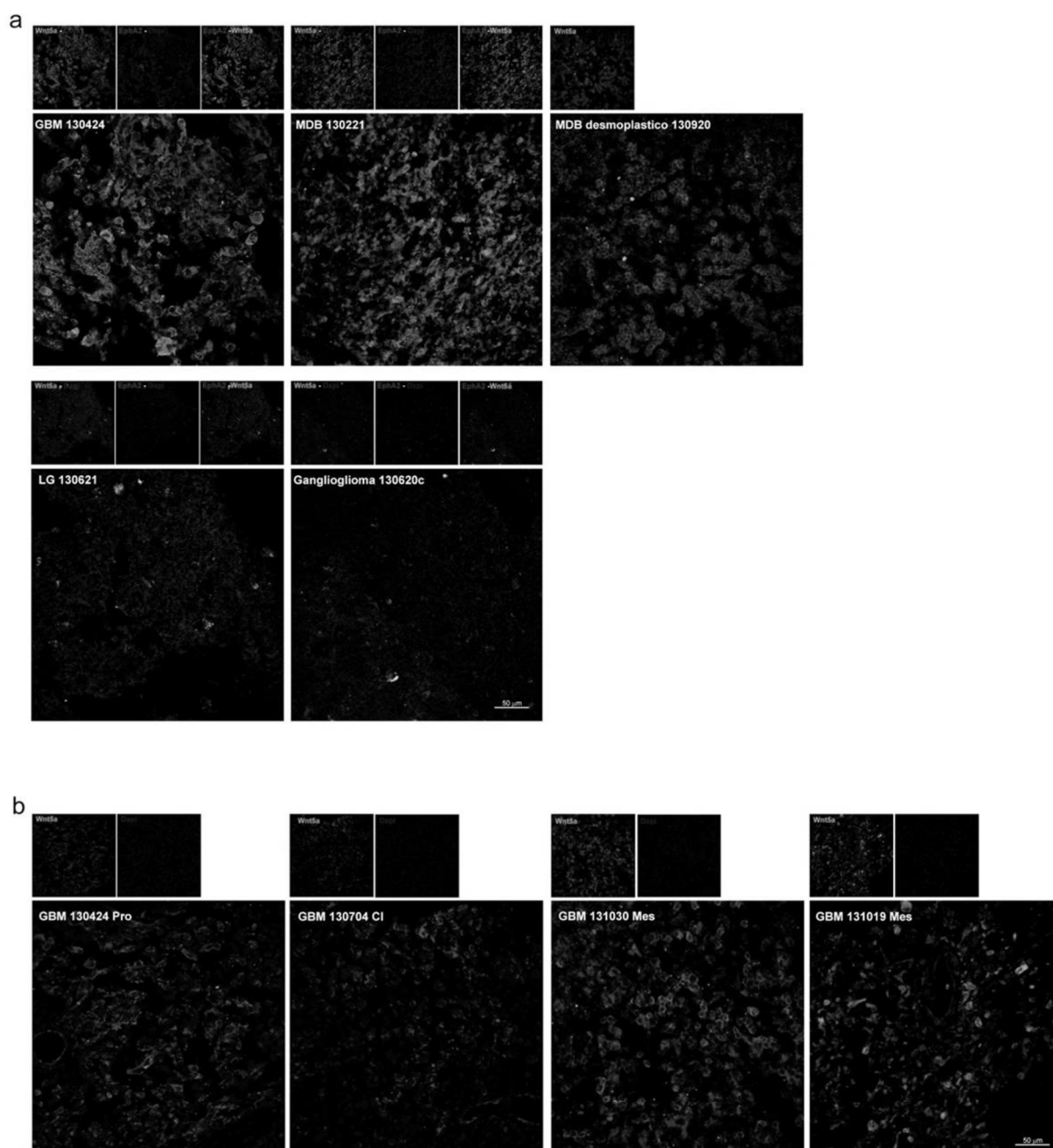


FIGURA 9

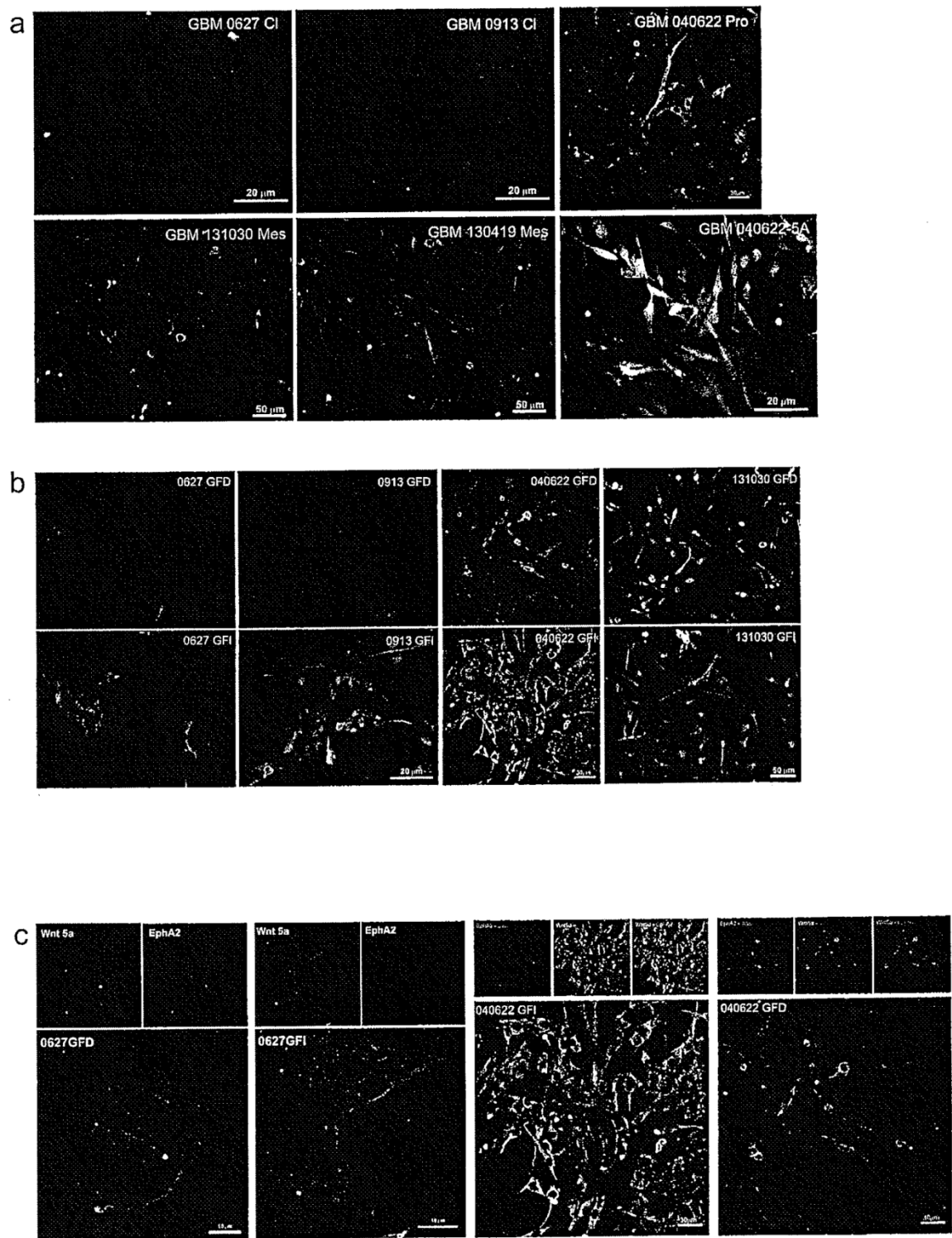


FIGURA 10

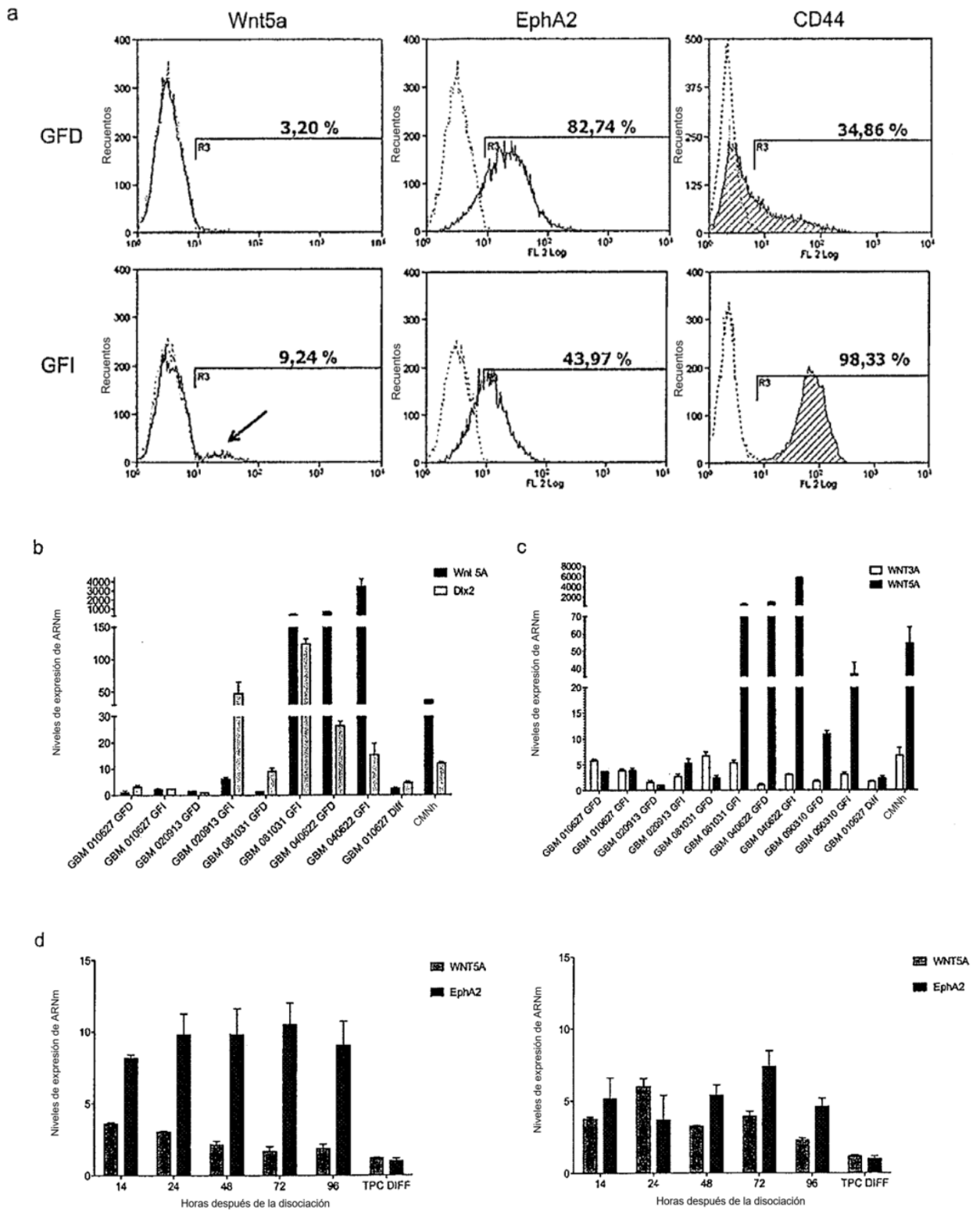
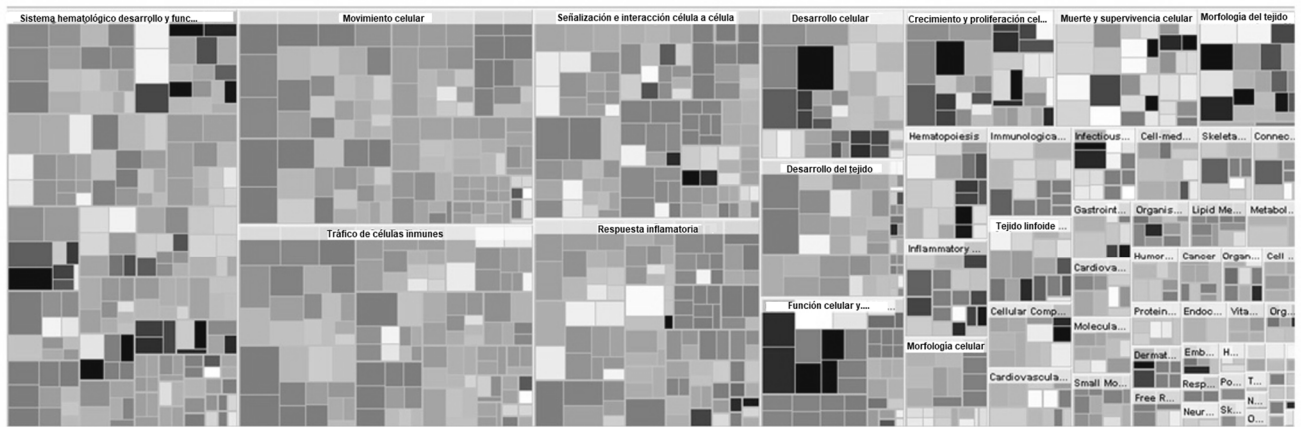


FIGURA 11

a

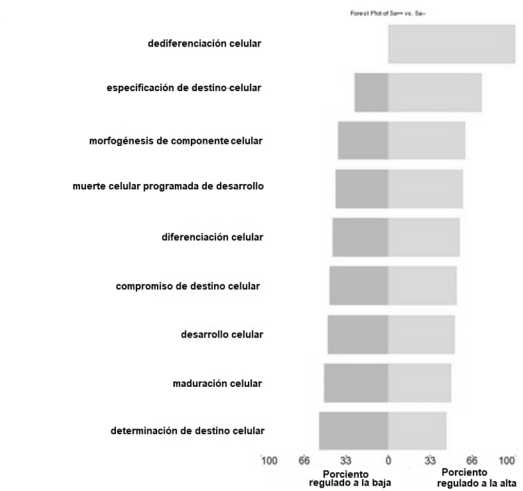
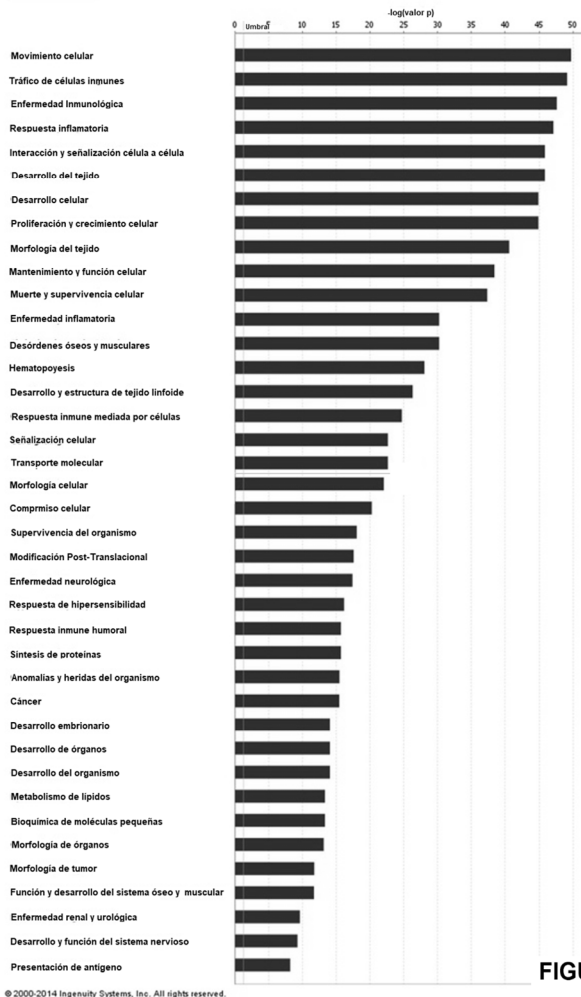


b

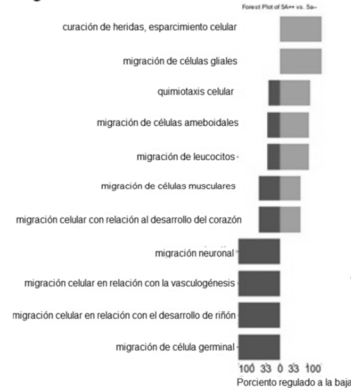


■ Sa++ vs Sa- FC13

d



e



f

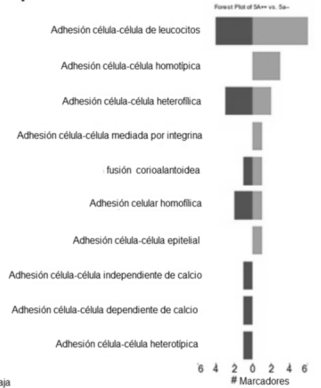
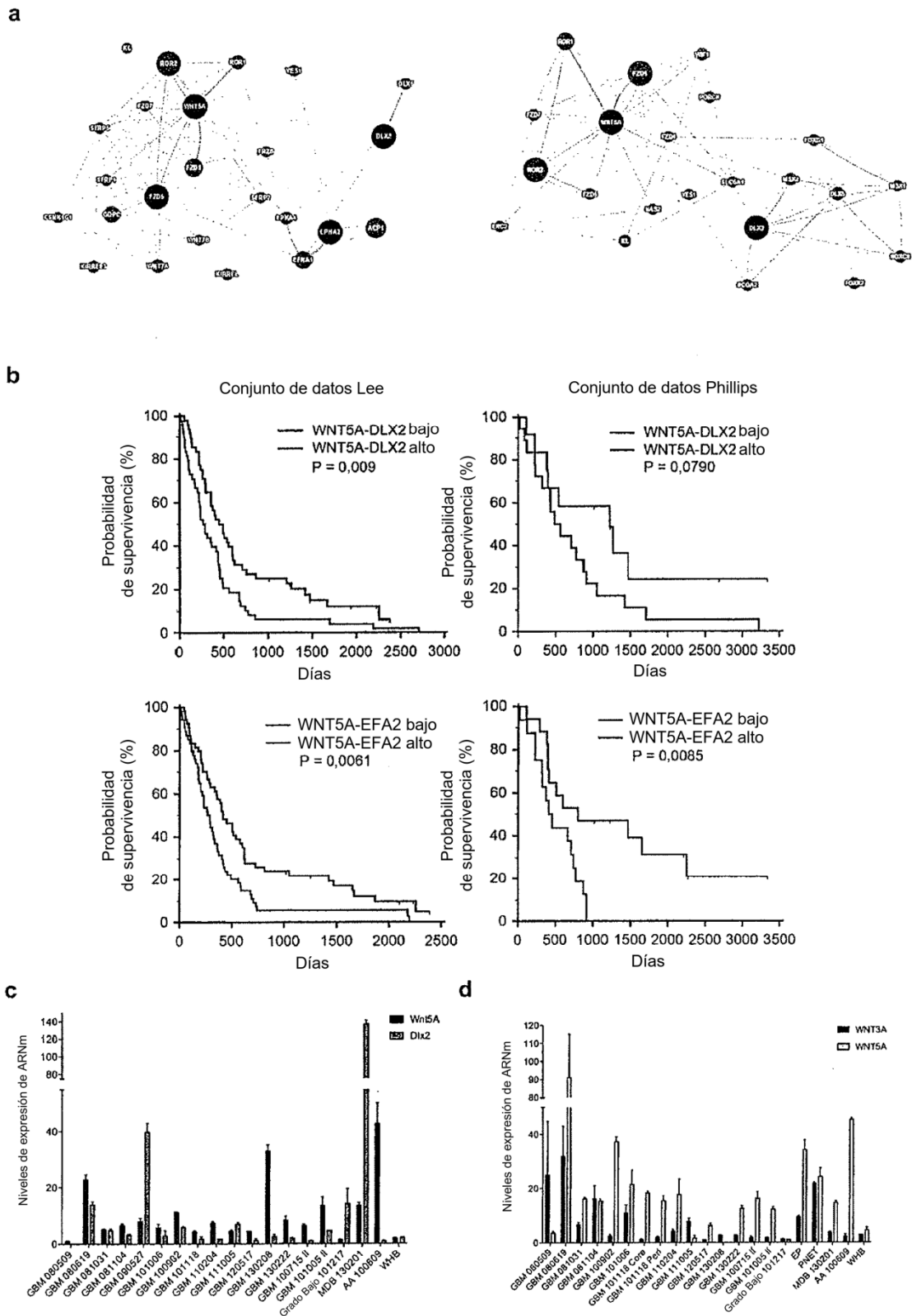


FIGURA 12

© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

FIGURA 13



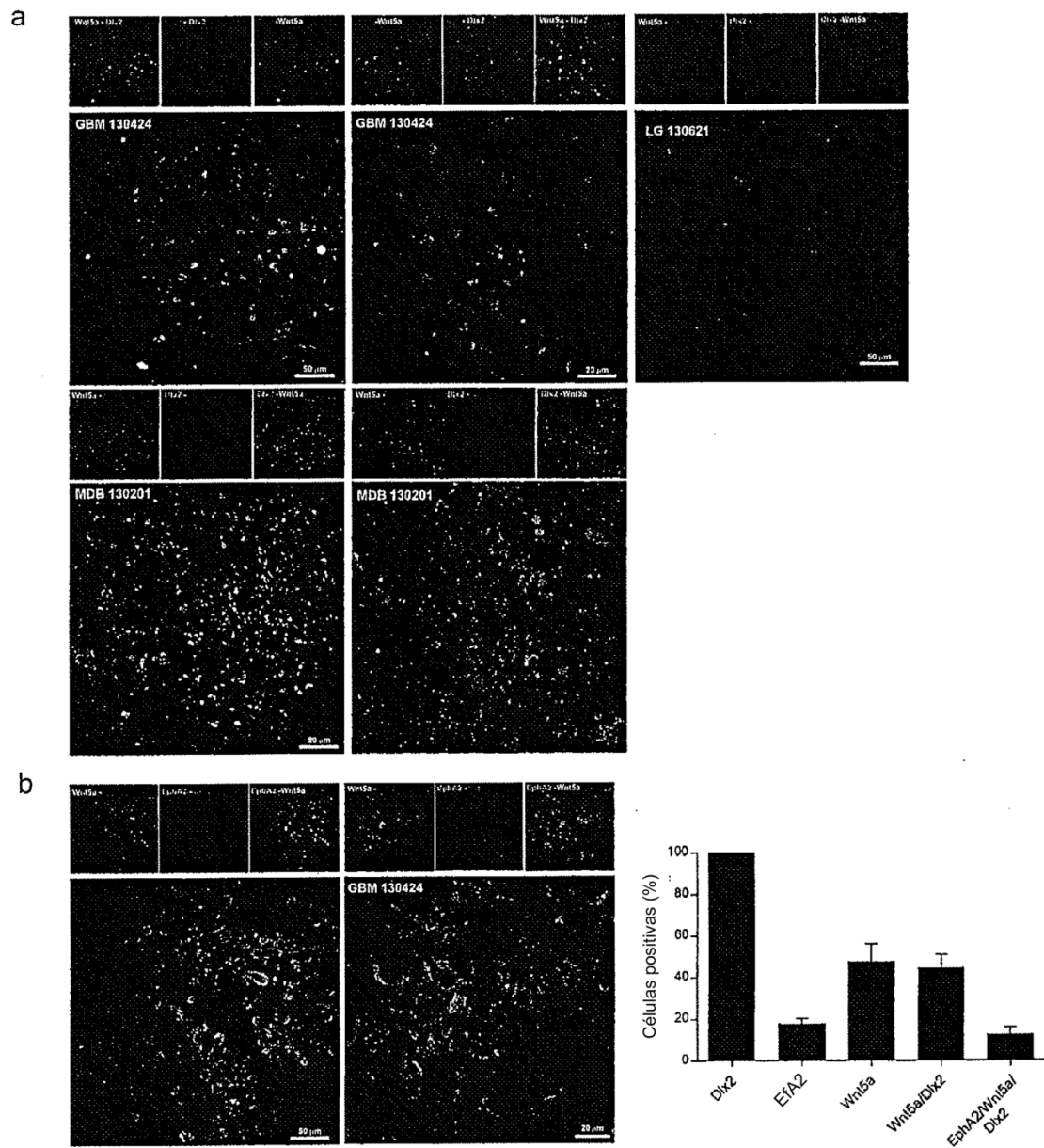


FIGURA 14

FIGURA 15

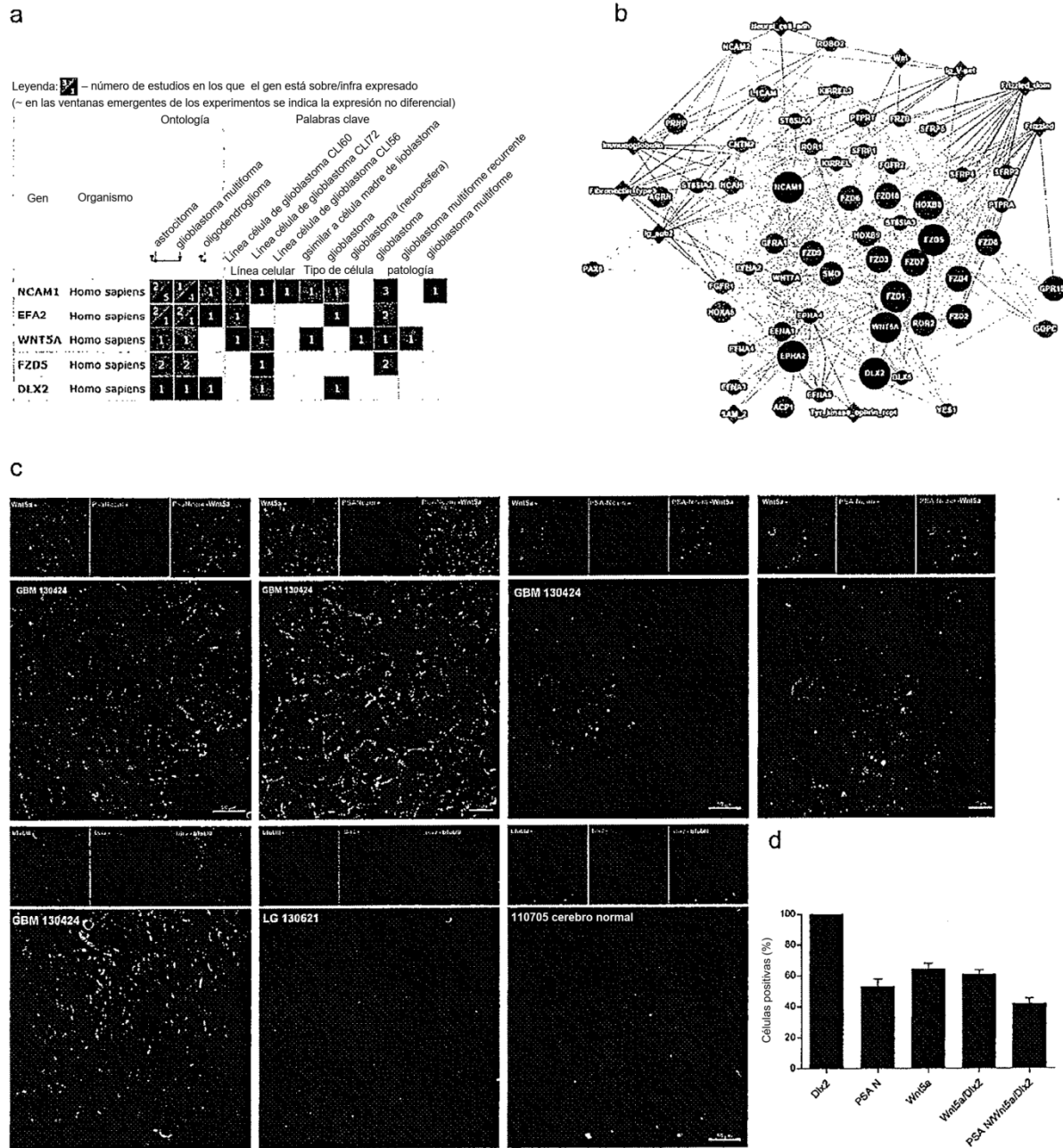


FIGURA 16

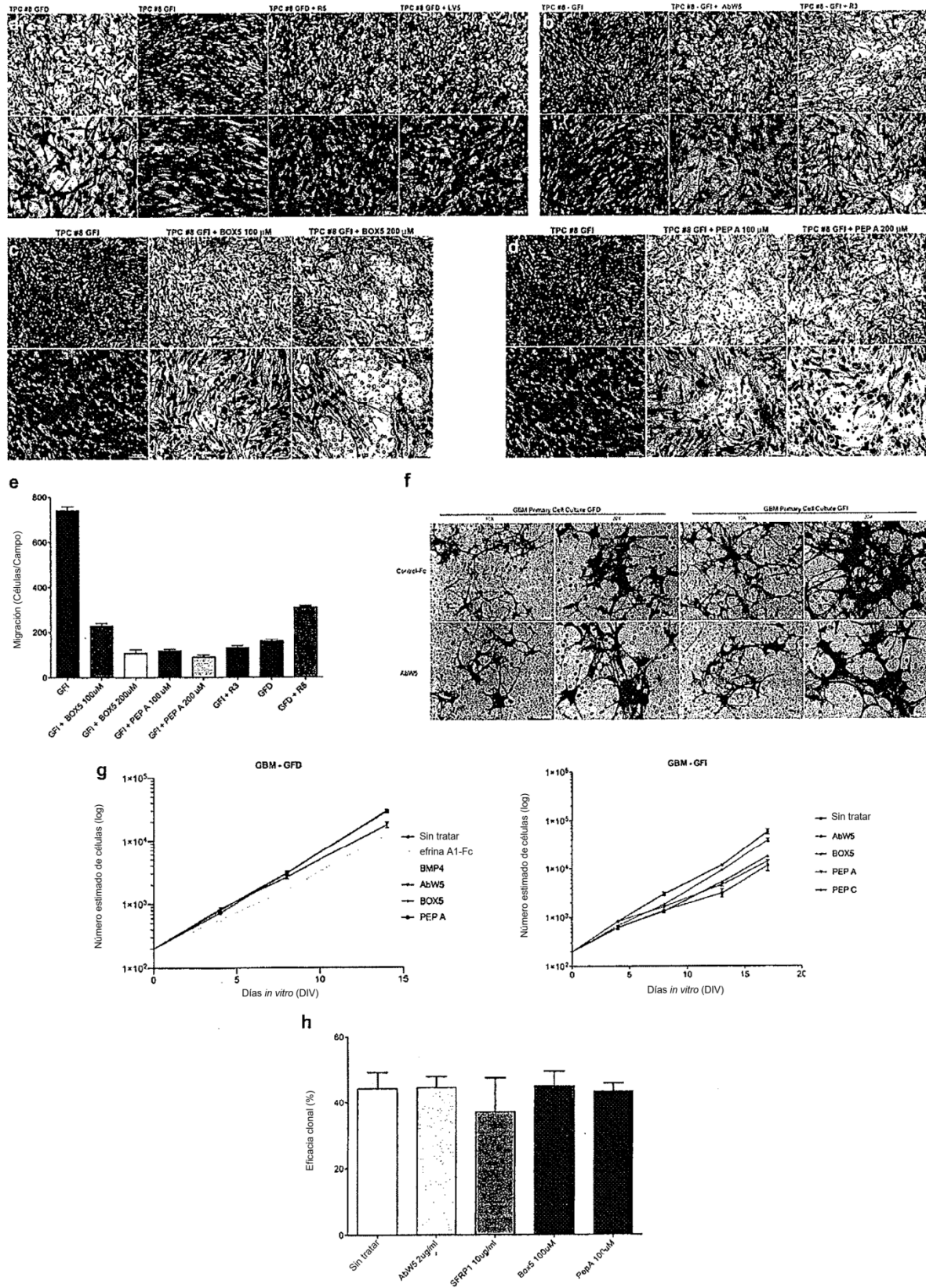
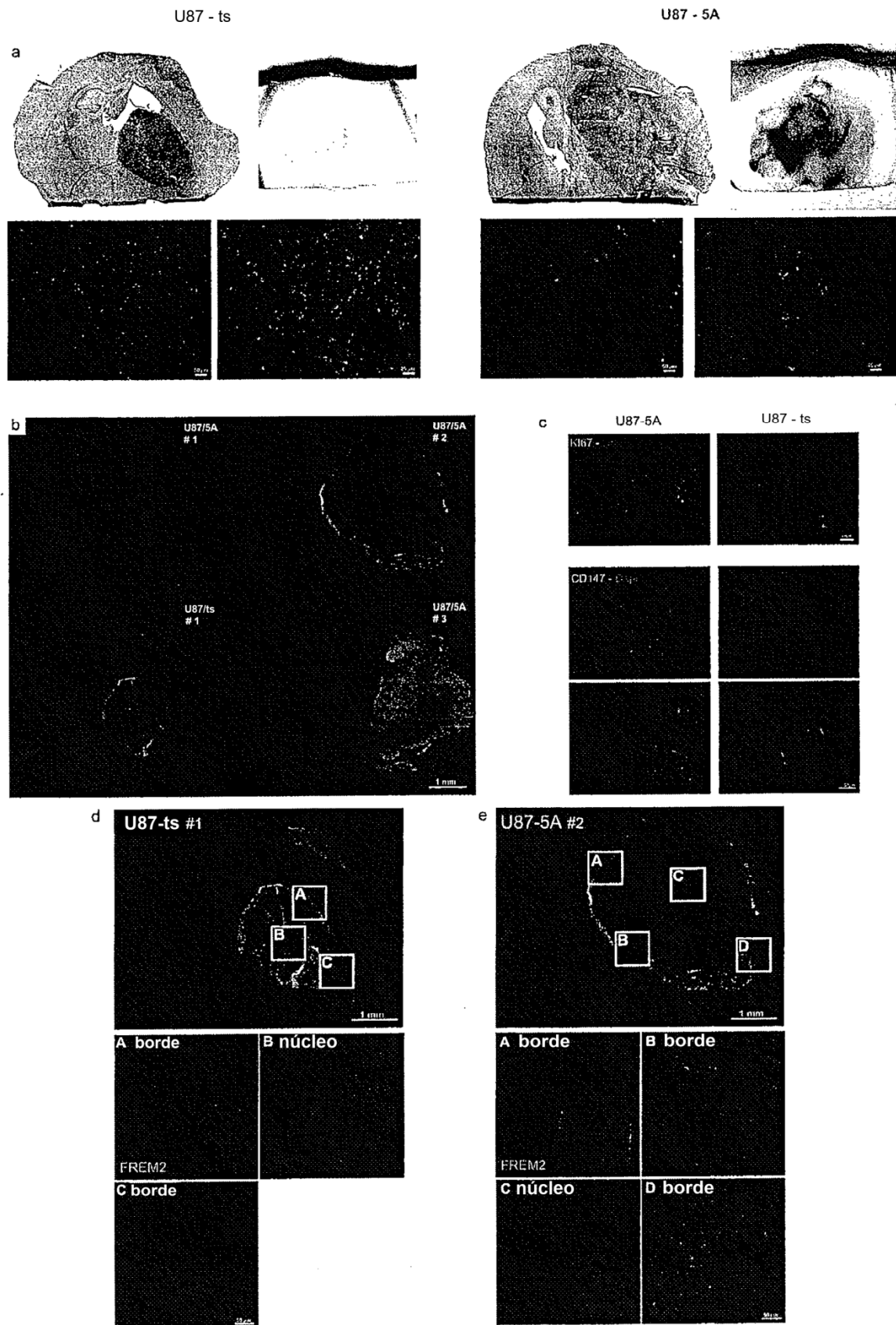


FIGURA 17



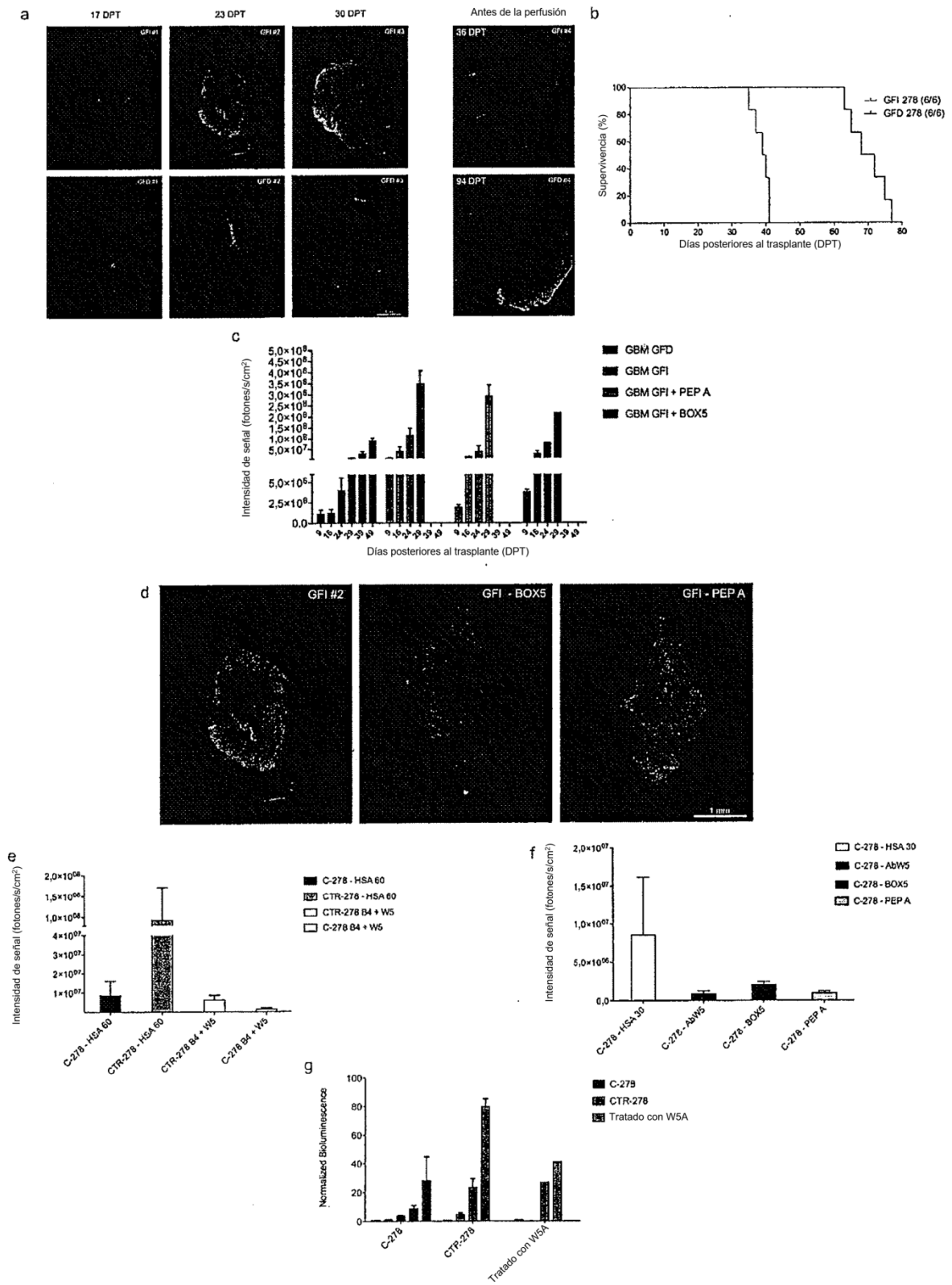
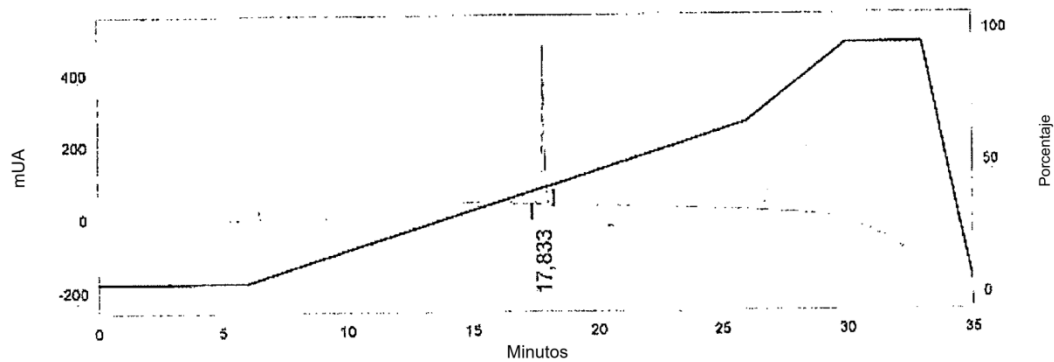


FIGURA 18

ID de muestra: 201211-00033
 Nombre del método: C:\CLASS-VP dati old\Metodi\5-65b.met
 Volumen de inyecc.: 10
 Fecha de impresión: 1/4/2013 3:00:44 PM



1: 210 nm, 2 nm				
Tiempo de retención	Área	Porcentaje de área	Altura	Porcentaje de altura
17,833	2961415	100.00	443732	100.00
Totales	2961415	100.00	443732	100.00

Columna C18 Vydac
 Eluente A: TFA al 0,1 % en agua
 Eluente B: TFA al 0,1 % en acetonitrilo
 Gradiente: de B al 5% o de B al 65 % en 20 min.

FIGURA 19

Nombre de archivo original: c:\voyager\pim__02.ms
 Este archivo N°2 : C:\VOYAGER\PRIMI\201211-33AC3.MS
Espectro Maldi-Tof: 201211-00033

Tensión de aceleración: 20000
 Tensión de rejilla: 93,700 %
 Tensión de cable guía: 0,070
 Retraso: 100 OFF
 Muestra: 26

Promedio de exploraciones: 34
 Presión: 3.723-07
 Entrada de masa baja: OFF
 Iones negativos: OFF

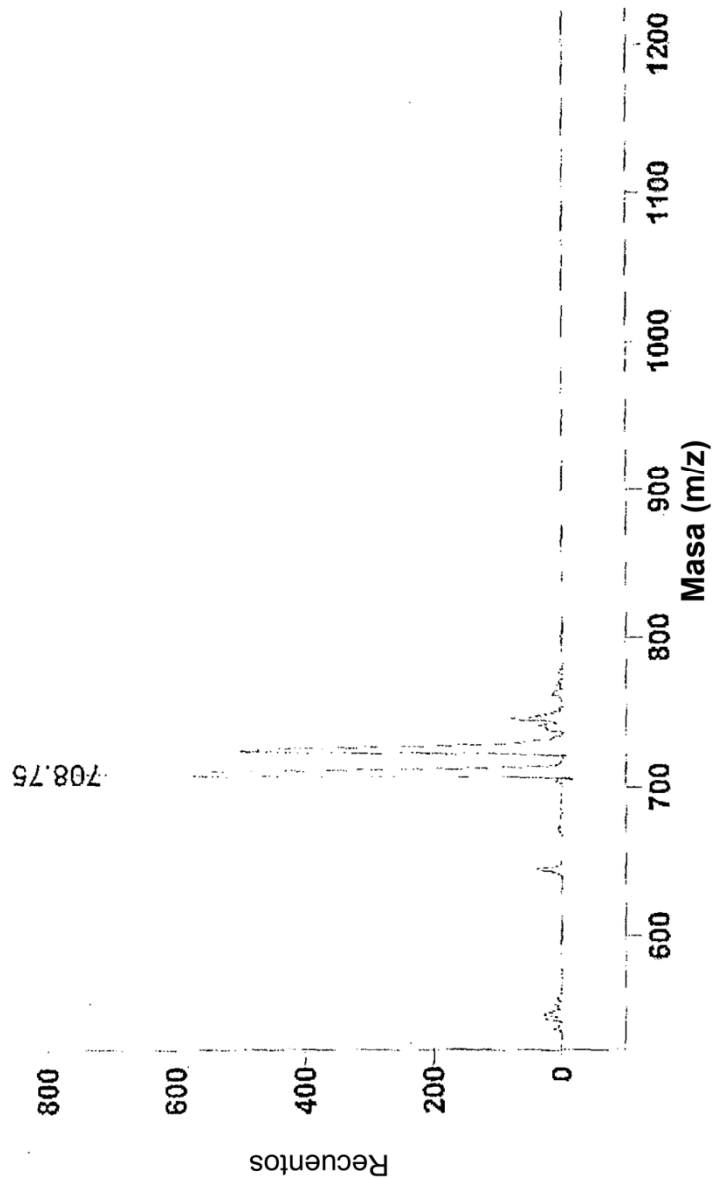
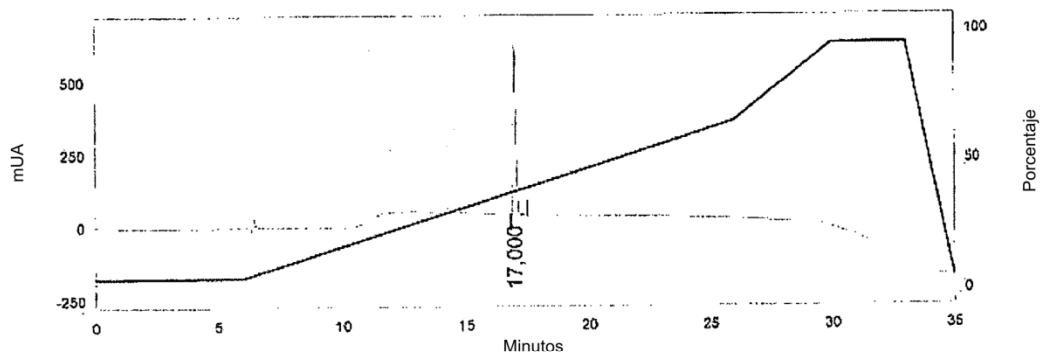


FIGURA 20

ID de muestra: 201211-00034
 Nombre del método: C:\CLASS-VP dati old\Metodi\5-65b.met
 Volumen de Inyecc.: 10
 Fecha de impresión: 1/4/2013 3:00:11 PM



1: 210 nm, 2 nm				
Tiempo de retención	Área	Porcentaje de área	Altura	Porcentaje de altura
17,000	3893573	100,00	588720	100,00
Totales	3893573	100,00	588720	100,00

Columna C18 Vydac
 Eluyente A: TFA al 0,1 % en agua
 Eluyente B: TFA al 0,1 % en acetonitrilo
 Gradiente: de B al 5% o de B al 65 % en 20 min.

FIGURA 21

Nombre de archivo original c:\voyager\plm___07.ms
 Este archivo N°3: C:\VOYAGER\PRIMM\2012\11-34AC5 MS
Espectro Maldi-Tof: 201211-00034

Tensión de aceleración: 20000
 Tensión de rejilla: 93,700 %
 Tensión de cable guía: 0,070
 Retraso: 100 OFF
 Muestra: 32

Promedio de exploraciones: 54
 Presión: 2.67e-07
 % de entrada de masa baja: OFF
 Iones negativos: OFF

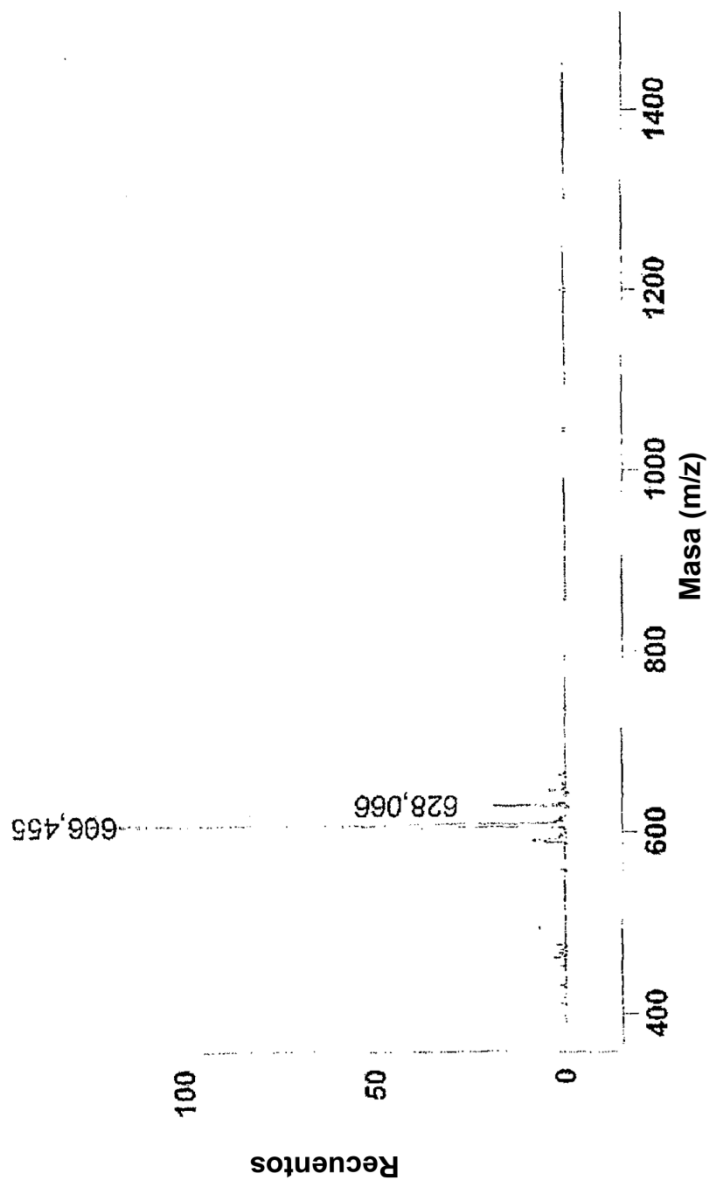


FIGURA 22

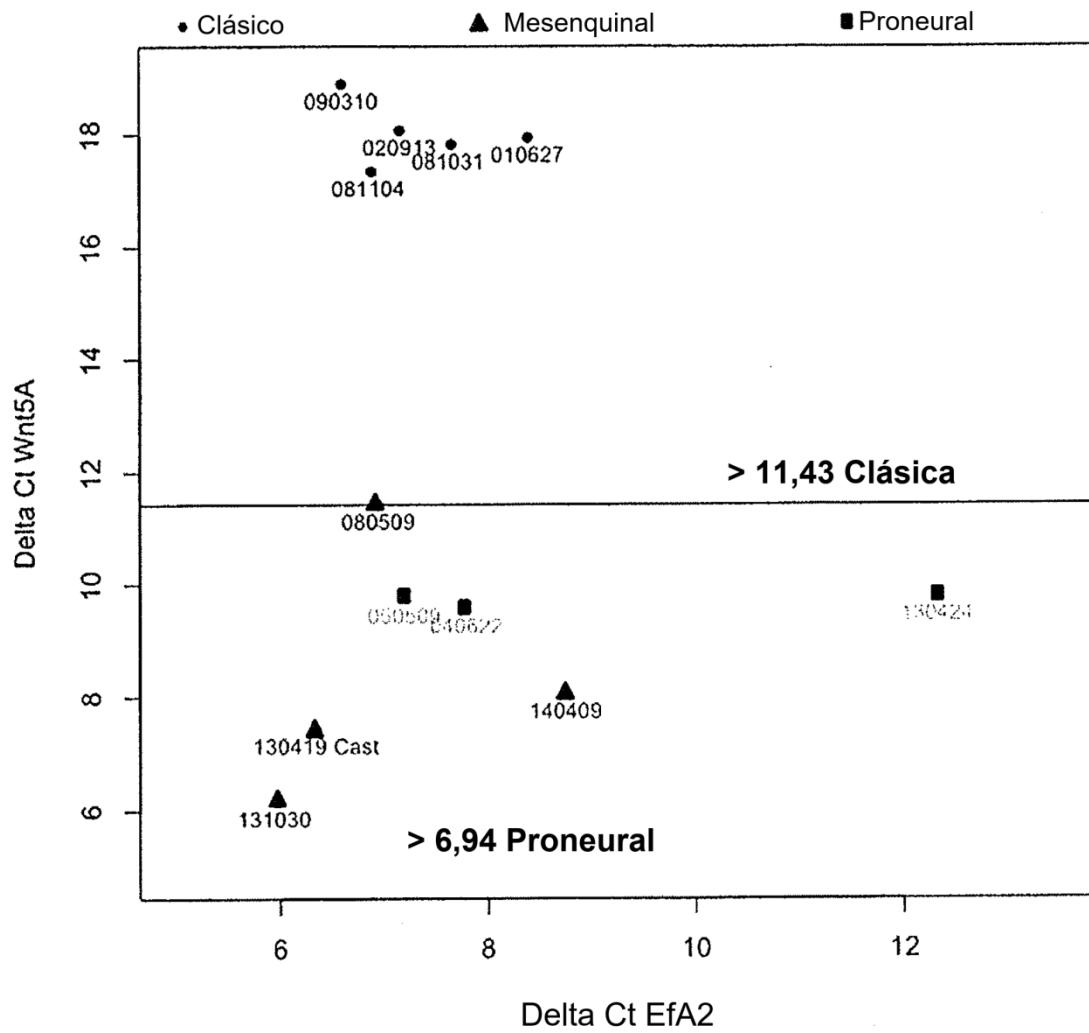


FIGURA 23