



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 247**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03814232 .9**

96 Fecha de presentación : **18.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1578436**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

54 Título: **Saposina C y receptores como dianas para el tratamiento de trastornos benignos y malignos.**

30 Prioridad: **20.12.2002 US 324993**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2010

73 Titular/es: **Board of Supervisors of Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College**
111 Systems Building, 3810 West Lakeshore Drive
Baton Rouge, Louisiana 70808, US

72 Inventor/es: **Koochekpour, Shahriar y Sartor, Olivier, A.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Saposina C y receptores como dianas para el tratamiento de trastornos benignos y malignos.

5 Antecedentes de la técnica

La importancia de las dianas moleculares está aumentando constantemente en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades. Una diana molecular proporciona un enfoque para el desarrollo de fármacos nuevos al dirigir a los investigadores a moléculas diseñadas específicamente que interfieren con esas dianas de la manera deseada. En la actualidad, existen muchos ejemplos de terapias dirigidas que han tenido éxito en los trastornos del crecimiento celular. Véanse M.S. Tallman, "Advancing the treatment of hematological malignancies through the development of targeted interventions", *Semin. Hematol.*, vol. 39, Supl. 3, págs. 1-5 (2002); y L. Gianni, "The future of targeted therapy: combining novel agents", *Oncology*, vol. 63, Supl. 1, págs. 47-56 (2002).

Los trastornos del crecimiento de la próstata, incluyendo cáncer de próstata e hiperplasia benigna de próstata (HBP), afectan a más de 500.000 hombres al año. El cáncer de próstata es un problema importante de salud pública en todo el mundo, y sólo el cáncer de pulmón causa más fallecimientos en varones.

La hiperplasia benigna de próstata (HBP) se caracteriza clínicamente por el crecimiento de la glándula prostática causando la obstrucción del flujo de la orina, y patológicamente por la proliferación de las células epiteliales y estromales prostáticas (por ej., fibroblastos y músculo liso). Una causa principal del crecimiento de la próstata relacionada con la HBP es el aumento en el volumen estromal de la glándula prostática. La HBP y sus signos y síntomas relacionados son extremadamente comunes entre los varones al envejecer. La preponderancia de la HBP aumenta constantemente con la edad hasta alcanzar un 80-90% entre los varones de 80 a 90 años de edad. Según las estimaciones de la *Agency for Health Care Policy and Research* (AHCPR), aproximadamente 5,6 millones de varones entre los 50 y los 79 años de edad cumplen con las directrices de la AHCPR para el tratamiento de la HBP. Véase J.D. McConnell *et al.*, "Benign prostatic hyperplasia: Diagnosis and treatment", *Clinical Practice Guideline*, Número 8, AHCPR, Publicación nº 94-0582, Agency for Health Care Policy and Research, Servicio de Salud Pública, Departamento Estadounidense de Salud y Servicios Humanos, Rockville, Maryland, EE.UU. (1994). El crecimiento normal, benigno y neoplásico de la próstata depende bastante de las interacciones entre las células estromales y las epiteliales. Véase L.W. Chung, "The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth", *Cancer Survey*, vol. 23, págs. 33-42 (1995). El impacto del tratamiento médico sobre la inhibición del avance de la HBP se está haciendo cada vez más patente. La identificación de las moléculas que influyen el crecimiento o proliferación de las células epiteliales y estromales prostáticas en la HBP puede ocasionar el desarrollo de enfoques terapéuticos diferentes.

Se conocen otros trastornos de la proliferación de las células estromales, especialmente la proliferación de las células de los músculos lisos. Por ejemplo, la proliferación de las células de los músculos lisos es un evento dominante en la aterosclerosis y la restenosis vascular. Véanse S.M. Schwartz, "Smooth muscle proliferation in hypertension. State-of-the-art lecture", *Hypertension*, vol. 6, págs. 156-61 (1984); y E.R. O'Brien *et al.*, "Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy", *Cir. Res.*, vol. 73, págs. 223-231 (1993). Más aún, el patrón de la expresión del mRNA asociada con la proliferación celular en músculo liso de HBP es parecido al patrón observado en las células proliferantes en músculo liso en la aterosclerosis. Véase V.K. Lin *et al.*, "Myosin heavy chain gene expression in normal and hyperplastic human prostate tissue", *Prostate*, vol. 44, págs. 193-203 (2000). Estas referencias sugieren que los agentes diana para la proliferación de las células estromales pueden emplearse en el tratamiento de HBP, aterosclerosis y restenosis vascular.

Aunque desde hace muchas décadas se sabe que la mayoría de los cánceres de próstata dependen del andrógeno, las estrategias de tratamiento usando andrógeno y sus rutas de señalamiento como diana molecular inevitablemente han resultado en fallos del tratamiento. Aunque en las fases iniciales del tratamiento el cáncer de próstata depende principalmente del andrógeno, con el paso del tiempo el cáncer deja de depender de él. Además, las células estromales prostáticas sensibles al andrógeno son importantes en el crecimiento y avance del cáncer de próstata. Diversas hormonas, hormonas peptídicas y factores de crecimiento polipeptídico (por ej., FCE (factor de crecimiento epitelial), FTC- α y β (factores transformadores del crecimiento alfa y beta), FCI-I y II (factor de crecimiento de tipo insulínico uno y dos) y bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico)) han estado implicados en el crecimiento y diferenciación de las células de cáncer de próstata.

La glándula prostática requiere andrógenos y factores de crecimiento para la proliferación y mantenimiento de su función. El desarrollo de la próstata depende de los andrógenos, y las células epiteliales secretoras de la próstata normal presentan apoptosis en la ausencia de andrógenos. Véase V. Gnanapragasam *et al.*, "Androgen receptor signaling in the prostate", *Br. J. Urol.*, vol. 86, págs. 1001-10013 (2000). En una glándula prostática normal, la ablación de los andrógenos ocasiona la involución del epitelio prostático.

Las células del cáncer de próstata inicialmente dependen del andrógeno para su crecimiento. Esta etapa del cáncer de próstata dependiente del andrógeno puede tratarse con métodos de privación de andrógeno, como la castración o la administración de fármacos anti-andrógeno. Sin embargo, en pacientes que han sido sometidos a una terapia prolongada de fármacos anti-andrógeno, las células de cáncer de próstata adquieren la habilidad de proliferarse en ausencia de andrógeno (V. Gnanapragasam *et al.*, 2000). Más aún, normalmente se observa el avance al cáncer de próstata independiente del andrógeno (la etapa avanzada de la enfermedad), para el cual no existe un tratamiento

satisfactorio. Aunque independientes del andrógeno, estas células de cáncer de próstata tardío continúan expresando genes cuya estimulación es hecha por el andrógeno, lo que sugiere una activación independiente del andrógeno de la ruta de señalamiento del receptor del andrógeno (RA). El receptor del andrógeno (RA) es un mediador fundamental para el efecto del andrógeno. Se desconocen los mecanismos fisiológicos que participan en el cambio a las células de

5 cáncer independientes del andrógeno, y en la activación independiente del andrógeno de la ruta de señalamiento del RA.

El antígeno específico de la próstata (PSA) es un marcador tumoral específico de la próstata, y el marcador usado más frecuentemente para revisar, diagnosticar y determinar la prognosis de pacientes con cáncer de próstata en todo el mundo. Los andrógenos son reguladores reconocidos de la expresión del PSA. Sin embargo, aún después de la ablación del andrógeno, los niveles del PSA pueden aumentar y se emplean para indicar una enfermedad recurrente. Se ha informado sobre la activación no androgénica de los receptores del andrógeno que provocan el estímulo de la expresión del PSA, por ej., FGF-6 e IL-6 (interleucina-6). Estos reguladores reconocidos de la expresión del PSA contribuyen a un fenotipo más maligno en el cáncer de próstata. Véase D.-L. Lin *et al.*, “Interleukin-6 induces androgen responsiveness in prostate cancer cells through up-regulation of androgen receptor expression”, Clin. Cancer Res. vol. 7, págs. 1773-1781 (2001).

Para que un cáncer de próstata avance a la etapa independiente del andrógeno se requiere una interacción entre las células cancerosas, las proteínas de la matriz extracelular y las células estromales cercanas. Los receptores del andrógeno están presentes en las células estromales prostáticas, y se sabe que dichas células responden a los andrógenos. Véase J. Mohler *et al.*, “Androgen and glucocorticoid receptors in the stroma and epithelium of prostatic hyperplasia and carcinoma”, Clin. Cancer Res., vol. 2, págs. 889-895 (1996). Las células estromales prostáticas también expresan diversos factores de crecimiento (por ej., FGF- β 1, bFGF y FGFV) y poseen receptores para los factores de crecimiento. Véase R.L. Byrne *et al.*, “Peptide growth factors in the prostate as mediators of stromal epithelial interaction”, Br. J. Urol., vol. 77, págs. 627-633 (1996). Estos resultados indican que las células estromales prostáticas están reguladas por el andrógeno y por los factores de crecimiento que se sabe son producidos por las células cancerosas. Además, las células estromales desempeñan un papel importante en la diferenciación de las células epiteliales prostáticas. Véase L.W.K. Chung *et al.*, “Prostate epithelial differentiation is dictated by its surrounding stroma”, Mol. Biol. Reports, vol. 23, págs. 13-19 (1996). Igualmente, las células estromales podrían desempeñar un papel importante en las múltiples etapas de la invasión y metástasis del cáncer de próstata.

Durante el proceso complejo del avance tumoral, frecuentemente el cáncer de próstata empieza con células sensibles al andrógeno de baja virulencia. Después de la privación de andrógeno, los cánceres de próstata eventualmente se transforman en células que son primariamente insensibles al andrógeno. En algunos casos esta transformación es el resultado de un crecimiento excesivo de células negativas al RA (células que no tienen receptores del andrógeno), lo que ocasiona el establecimiento de la resistencia a la hormona. En otros casos, la independencia del andrógeno está asociada con la presencia de los receptores del andrógeno que transmiten señales de crecimiento en la ausencia de ligandos esteroides convencionales. Véanse A. Chiarodo, “National Cancer Institute roundtable on prostate cancer: future research directions”, Cancer Res., vol. 51, págs. 2498-2505 (1991); y W. Scott *et al.*, “Hormonal therapy of prostate cancer”, Cancer, vol. 45, págs. 1924-1936 (1980).

Se sabe que la glándula prostática y sus secreciones contienen diversos compuestos potentes que interaccionan con la matriz extracelular y estroma circundantes. Además de los factores de crecimiento y andrógenos, las proteasas también se han implicado en la transformación a los fenotipos malignos e independientes del andrógeno, y en el desarrollo de las células prostáticas normales y cancerosas. Estas proteasas incluyen (entre otros) activadores plasminógenos, metaloproteinasas de matriz (MMPs) y catepsinas lisosómicas. Se sabe que la expresión y actividad de las proteasas están influidas por diversos factores de crecimiento y andrógenos. Véase P. Vihinen *et al.*, “Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets”, Int. J. Cancer, vol. 99, págs. 157-166 (2002).

Un grupo importante de proteasas en mamíferos es el formado por los activadores de plasminógeno. Las células mamíferas contienen dos tipos de dichos activadores, el tipo uroquinasa (uPA) y el tipo tisular (tPA). De los dos, uPA está implicado principalmente en la degradación de la matriz extracelular que participa en la invasión celular cancerígena. Véase K. Dano *et al.*, “Cancer invasion and tissue remodeling-cooperation of protease systems and cell types”, APMIS, vol. 107, págs. 120-127 (1999). El sistema uPA consiste en las serina proteasas uPA y plasmina, dos importantes inhibidores de serpina (PAI-1 y PAI-2, inhibidor del activador plasminógeno 1 y 2, respectivamente) y un receptor superficial celular uPA (uPAR). Véase F. Blasi *et al.*, “Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor and inhibitors”, J. Cell. Biol., vol. 104, págs. 801-804 (1987). uPA tiene una especificidad de sustrato restringida, funcionando principalmente en la escisión del plasminógeno para formar plasmina. Véase L. Liotta *et al.*, “Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components on basement membrane”, Cancer Res., vol. 41, págs. 4629-4636 (1981). La plasmina degrada después los componentes de la matriz extracelular y activa muchas metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Véase G. Murphy *et al.*, “The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases”, Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 667, págs. 1-12 (1992). El sistema de activación plasminógena está específicamente controlado por los inhibidores, entre los cuales PAI-1 tiene un papel más importante en la invasión del cáncer. Véanse P. Andreasen *et al.*, “The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis”, Int. J. Cancer, vol. 72, págs. 1-22 (1997); y P. Andreasen *et al.*, “Plasminogen activator inhibitors: Hormonally regulated serpins”, Mol. Cell Endocrinol., vol. 88, págs. 1-19 (1990).

Tanto la secreción de uPA como la presencia de uPA unido al receptor en la superficie celular caracterizan las células de cáncer de próstata que contienen el fenotipo cancerígeno. Véanse F. Gaylis *et al.*, "Plasminogen activators in human prostate cancer cell lines and tumors: correlation with the aggressive phenotype", *J. Urol.*, vol. 142, págs. 193-198 (1989); y Blasi *et al.*, "Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor and inhibitors", *J. Cell Biol.*, vol. 104, págs. 801-804 (1987). Se ha demostrado que la activación plasminógena tiene un papel importante en la invasión y metástasis del cáncer. Véase K. Dano *et al.*, 1999; y C. Festuccia *et al.*, "Plasminogen activation system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells", *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 16, págs. 513-528 (1998). La mayor parte de la actividad de degradación de uPA ocurre mientras la proteasa está unida a uPAR, lo que concentra la digestión de la matriz extracelular en el área cercana a la célula. Además, el enlace de uPA a su receptor celular activa una ruta de señalización dentro de la célula que lleva a la posible activación de la transcripción genética. Los efectos moduladores del uPA sobre la migración, proliferación y adhesión de la célula pueden ser mediados por esta ruta señal-transducción en lugar de serlo por la actividad proteolítica. Véase U. Reuning *et al.*, "Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis", *Int. J. Oncology*, vol. 13, págs. 893-906 (1998). Además, en los tumores se libera un receptor soluble de la uroquinasa, y en los pacientes con cáncer los niveles sanguíneos del receptor soluble han aumentado. Véase N. Brunner *et al.*, "The urokinase plasminogen activator receptor in blood from healthy individuals and patients with cancer", *APMIS*, vol. 107, págs. 160-167 (1999).

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) tienen además un papel importante durante el desarrollo y metástasis del cáncer de próstata. Las células del cáncer de próstata secretan altos niveles de MMPs y bajos niveles de inhibidores endógenos de MMP (TIMPs), creando así un saldo excedente de MMPs. En el cáncer de próstata, se ha demostrado en estudios *in vivo* que la alta expresión de MMP-2 mediante hibridización *in situ* está asociada con comportamiento agresivo y metástasis. Véase J. Upadhyay *et al.*, "Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) y MMP-2 immunolocalization in human prostate: change in cellular localization associated with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia", *Clin. Cancer. Res.*, vol. 5, págs. 4105-4110 (1999); y M. Wood *et al.*, "In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer", *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 15, págs. 246-258 (1996). Se asoció un cambio constante en localización y distribución intracelular del MMP-2 y MT1-MMP con la transición del epitelio prostático benigno a la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado, lo que sugiere que la regulación de estas enzimas se modifica durante las etapas tempranas del avance tumoral.

En el cáncer de próstata se conocen diversos ligandos y receptores, incluyendo los receptores acoplados a la proteína G que activan las rutas MAPK. Véase C. Guo *et al.*, "Mitogenic signaling in androgen sensitive and insensitive prostate cancer cells", *J. Urol.*, vol. 163, págs. 1027-1032 (2000). Las quinasas proteicas activadas por mitógenos (MAPKs) son serina/treonina quinasas que son activadas por la fosforilación como respuesta a una amplia gama de estímulos extracelulares, generalmente a través de un receptor de la membrana celular asociado con la proteína G. Véase R. Seger *et al.*, "The MAPK signaling cascade", *FASEB J.*, vol. 9, págs. 726-735 (1995). Tres enzimas que son importantes en esta ruta son MEK1/2 (isoformas 1 y 2 de la quinasa que activan ERK, activadas por mitógenos), ERK1/2 (quinasas reguladas extracelulares con tres formas, p44^{MAPK}, p42^{MAPK} y p40^{MAPK}) y RSK (quinasa S6 ribosomal, también p90^{RAK}). La fosforilación activa MEK1/2, que a su vez fosforila y activa ERK1/2. El ERK1/2 activado fosforila a su vez RSK, que afecta la transcripción genética o comportamiento celular.

La prosaposina (PSAP) es una glucoproteína de 70 kilodaltons y el precursor de un grupo de cuatro glucoproteínas más pequeñas que se requieren para la hidrólisis de glucoesfingolípidos mediante hidrolasas lisosomales. Véanse las patentes estadounidenses n° 6.268.347, 5.714.459, 5.700.909 y 5.696.080. Se sabe que la prosaposina es un factor neurotrófico localizado en varios lugares: en los lisosomas de varios tipos celulares, en las membranas plasmáticas de las células derivadas de tejidos neurogliales y en fluidos corporales como una proteína secretora. En el sistema reproductor masculino se ha encontrado prosaposina en el fluido tubular seminífero, en plasma seminal y en las secreciones prostáticas. Véanse C.R. Morales *et al.*, "Expression and tissue distribution of rat sulfated glycoprotein-1 (prosaposin)", *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 44, págs. 327-337 (1995); y C.R. Morales *et al.*, "Distribution of mouse sulfated glycoprotein-1 (Prosaposin) in the testis and other tissues", *J. Androl.* vol. 19, págs. 156-164 (1998). La prosaposina se procesa proteolíticamente (por catepsina D) para generar cuatro proteínas saposina A, B, C y D, cada una de aproximadamente 8-13 kDa. Estas cuatro proteínas existen como dominios adyacentes en tándem en el polipéptido prosaposina. Véase M. Hiraiwa *et al.*, "Lysosomal proteolysis of prosaposin, the precursor of saposins (sphingolipid activator proteins): its mechanism and inhibition by ganglioside", *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 341, págs. 17-24 (1997). Tanto prosaposina como las saposinas maduras (A-D) se detectan en muestras de plasma de individuos normales, y las saposinas A, C y D muestran una distribución estrecha en plasma. Véase M.H.Y. Chang *et al.*, "Saposins A, B, C, and lysosomal storage disorders", *Clin. Chem.*, vol. 46, págs. 167-174 (2000).

La actividad del factor neurotrófico de prosaposina se encuentra en un residuo de 12 aminoácidos localizados en la porción terminal NH₂ del dominio C de la saposina. Véase J.S. O'Brien *et al.*, "Identification of the neurotrophic sequence of prosaposin", *FASEB J.*, vol. 9, págs. 681-685 (1995). Esta secuencia conocida se ha empleado para derivar péptidos sintéticos biológicamente activos (14-22 residuos) llamados prosaptidas, por ej., TX14A. Véase R. Misasi *et al.*, "Prosaposin and prosapeptide, a peptide from prosaposin, induce an increase in ganglioside content of NS20Y neuroblastoma cells", *Glycoconjugate J.*, vol. 13, págs. 195-202 (1996). La mediación de diferentes funciones neurobiológicas de prosaposina y saposina C, incluyendo prosaptidas (esto es, TX14A) se hace a través de un receptor de la membrana celular asociado con la proteína G. Véase W. Campana *et al.*, "Prosaptide activates the MAPK pathway by a G-protein-dependent mechanism essential for enhanced sulfatide synthesis by Schwann cells", *FASEB J.*, vol. 3, págs. 307-14 (1998). Se ha descubierto que saposina C, TX14A, y prosaposina afectan las enzimas en la ruta MAPK a través de un mecanismo dependiente de la proteína G en diversas células neurogliales. Véase M. Hiraiwa *et al.*,

"Prosaposin receptor: evidence for a G-protein associated receptor", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 240, págs. 415-418 (1997).

Se ha demostrado que la alteración predirigida del gene de prosaposina en ratón ocasiona varias anomalías en los órganos reproductores masculinos, incluyendo la atrofia testicular, involución de la próstata, vesícula seminal y epididimis, ausencia de células secretoras de la próstata y desactivación de la ruta de la MAP quinasa en el epitelio prostático. Véanse C.R. Morales *et al.*, "Targeted disruption of the mouse prosaposin gene affects the development of the prostate gland and other male reproductive organs", *J. Androl.*, vol. 21, págs. 765-775 (2000); y C.R. Morales *et al.*, "Role of prosaposin in the male reproductive system: effect of prosaposin inactivation on the testis, epididymis, prostate, and seminal vesicles", *Arch. Androl.*, vol. 44, págs. 173-186 (2000).

La serina proteasa catepsina D (Cath-D) que divide la prosaposina en las cuatro moléculas de saposina se expresa en gran medida entre algunos adenocarcinomas. La presencia de Cath-D también se ha correlacionado con una prognosis peor en algunos cánceres. La expresión de esta proteasa en células de cáncer de mama es estimulada por los estrógenos. Véase J.A. Henry *et al.*, "Prognostic significance of the estrogen-related protein, cathepsin D, in breast cancer", *Cancer*, vol. 65, págs. 265-271 (1990).

Cath-D se expresa en células prostáticas ventrales en ratas sometidas a apoptosis inducida por castración. Véase M.J. Wilson *et al.*, "Immunocytochemical localization of cathepsin D in rat ventral prostate: evidence for castration induces expression of cathepsin D in basal cells", *Anat. Rec.*, vol. 229, págs. 321-333 (1991). Usando tinción inmunohistoquímica, se demostró que los adenocarcinomas prostáticos primarios humanos sobreexpresan Cath-D, en comparación con las células prostáticas benignas. Véase R. Makar *et al.*, "Immunohistochemical analysis of cathepsin D in prostate carcinoma", *Modern Pathol.*, vol. 7, págs. 747-751 (1994). También se detectó una inmunorreactividad moderada a fuerte con anti-cath-D en la neoplasia intraepitelial prostática, adenocarcinomas primarios y casos de próstata metastático. Véase S. Mayagarden *et al.*, "Evaluation of cathepsin D and epidermal growth factor receptor in prostate carcinoma", *Modern Pathol.*, vol. 7, págs. 930-936 (1994). Adicionalmente, se encontró que el cath-D endógeno en una línea celular de cáncer de próstata sensible al andrógeno (LNCaP) hidroliza el receptor del andrógeno (RA), lo que indica un papel potencial para Cath-D en la modulación de la función RA en el cáncer de próstata. Véase J.A. Mordente *et al.*, "Hydrolysis of androgen receptor by cathepin D: its biological significance in human prostate cancer", *Br. J. Urol.*, vol. 82, págs. 431-435 (1998).

Existen pruebas sólidas que sugieren que los factores de crecimiento y sus receptores son necesarios para el avance de las enfermedades neoplásicas y los trastornos hiperplásicos. Se ha propuesto el tratamiento de ciertos cánceres mediante el enlace de estos factores de crecimiento con una toxina o usando otros mecanismos diseñados para aprovechar las consecuencias de interrumpir estas rutas de señalamiento dirigido. En particular, se han propuesto los conjugados que contienen la toxina ribosomal saporina y factores de crecimiento, como bFGF. Véanse las patentes estadounidenses n° 5.191.067, 5.478.804, 5.576.288 y 5.679.637. Estos conjugados se unen al receptor celular para el factor de crecimiento específico y se interiorizan mediante la endocitosis medida por el receptor. Al liberarse el conjugado de los endosomas, la toxina saporina catalíticamente inhibe la síntesis de proteínas. Se ha demostrado que en diferentes tipos de cáncer, el empleo de toxinas de origen vegetal (esto es, saporina) o bacterias (esto es, PE40) conjugadas a anticuerpos, factores de crecimiento, citoquinas o péptidos activos provenientes de las citoquinas o factores de crecimiento (esto es, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento transformante α , interleucina 4, interleucina 6), poseen un efecto antitumoral o de destrucción celular. Por ejemplo, se ha demostrado que el bFGF-saporina se dirige efectivamente a varios tumores humanos que expresan receptores bFGF, incluyendo melanoma, carcinoma prostático, teratocarcinoma ovárico y neuroblastoma que crecen tanto en cultivo tisular como en xenoinjertos en ratones desnudos, pero no es citotóxico en células que no expresan el receptor FGF. Adicionalmente, se ha propuesto un grupo de compuestos conjugados de hormonas de liberación de gonadotropina (GnRH)/toxinas para el tratamiento de ciertas enfermedades relacionadas con la hormona sexual, como el cáncer de próstata o de mama. Véase la patente estadounidense n° 6.326.467.

Al igual que los receptores de los factores de crecimiento, los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) como los receptores de prosaposina, son una de las clases únicas más grandes de receptores en biología y desempeñan un papel fundamental en un número sorprendentemente grande de condiciones fisiológicas y patológicas. Todos estos receptores poseen algo en común: cuando se unen a su ligando, activan las rutas de señalamiento y se interiorizan, algunas veces muy rápidamente, a las células que expresan el receptor. Se han investigado diversas toxinas diana muy selectivas del GPCR en función de sus efectos citotóxicos *in vitro* e *in vivo*. Véanse D. Lappi *et al.*, "Entering through the doors of perception: characterization of a highly selective substance P receptor-targeted toxin", *Neuropeptides*, vol. 34, págs. 323-328 (2000); S. Plonowski *et al.*, "Inhibition of PC-3 human androgen-independent prostate cancer and its metastasis by cytotoxic somatostatin analogue AN-238", *Cancer Res.*, vol. 59, págs. 1947-1953 (1999); N. Larnharzi *et al.*, "Decrease in the level and mRNA expression of LH-RH and EGF receptors after treatment with LH-RH antagonist Cetrorelix in DU-145 prostate tumor xenografts in nude mice", *Int. J. Oncol.* vol. 13, págs. 429-435 (1998); P. Davol *et al.*, "The mitotoxin, basic fibroblast growth factor-saporin, effectively targets prostatic carcinoma in an animal model", *J. Urol.*, vol. 156, págs. 11794-11798 (1996) y P. Davol *et al.*, "Targeting human prostatic carcinoma through basic fibroblast growth factor receptors in an animal model: characterizing and circumventing mechanisms of tumor resistance", *Prostate*, vol. 40, págs. 178-191 (1999). Se ha observado la activación de la ruta MAPK mediante saposina C, su péptido(s) trópico o compuestos análogos mediante un mecanismo dependiente de la proteína G en diversas células derivadas del neuroglial, como células PC-12, Schwann y neuroblastoma. Véanse M. Hiraiwa *et al.*, "Cell death prevention, mitogen-activated protein kinase stimulation, and increased sulfatide concentration in

Schwann cells and oligodendrocytes by prosaposin and prosaptides", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, vol. 94, págs. 4778-4781 (1997); W.M. Campana *et al.*, "Prosaptide activates the MAPK pathway by a G-protein-dependent mechanism essential for enhanced sulfatide synthesis by Schwann cells", *FASEB J.*, vol. 3, págs. 307-14 (1998); R. Misasi *et al.*, "Prosaposin treatment induces PC12 entry in the S phase of the cell cycle and prevents apoptosis: activation of ERKs and sphingosine kinase", *FASEB J.*, vol. 15, págs. 467-474 (2001); J.S. O'Brien *et al.*, "Identification of prosaposin as a neurotrophic factor", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, vol. 91, págs. 9593-6 (1994); y M. Hiraiwa *et al.*, "Prosaposin receptor: evidence for a G-protein associated receptor", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 240, págs. 415-8 (1997).

10

Divulgación de la invención

Hemos demostrado que la saposina C es un factor trófico para una variedad de células del cáncer, por ej., células de cáncer de próstata, pulmonar, de mama y de colon. Estas células expresan saposina C y responden a la misma mediante un aumento en los niveles de la proliferación celular, la migración celular y la invasión celular. Estas actividades tipifican y promueven el proceso neoplásico. En el cáncer de próstata, las células de cáncer de próstata insensibles al andrógeno responden a saposina C con niveles más altos de proliferación celular, migración celular e invasión celular que las células de próstata sensibles al andrógeno. Las células estromales (de la próstata) también responden a las señales mediadas por saposina C en la forma típica de los compuestos promotores del crecimiento. Las células de próstata insensibles al andrógeno fueron estimuladas por la saposina C para expresar niveles más altos del activador plasmínogénico de la uroquinasa (uPA) y su receptor (uPAR), dos proteínas que se sabe participan en la invasión celular. Se preparó un conjugado de un péptido de la región activa de saposina C (TX14A) y una toxina (saporina) y se demostró que disminuye la supervivencia de las células del cáncer de próstata, y las otras células cancerosas que se encontró expresan saposina C (incluyendo células cancerosas de mama, colon y pulmón). Puede emplearse este conjugado o un compuesto con una acción análoga que inhibe el crecimiento celular actuando a través del receptor de enlace de la saposina C para disminuir el crecimiento tumoral y/o tratar trastornos de la proliferación estromal (por ej. hiperplasia prostática benigna, aterosclerosis y restenosis vascular). Estos datos indican que las rutas de señalamiento de la prosaposina regulan el crecimiento epitelial y estromal y que la ruta de señalamiento de la prosaposina puede aprovecharse para disminuir dicho crecimiento usando enfoques moleculares diana.

30

Según la invención actual, se proporciona un conjugado ligando/toxina que contiene un ligando que puede unirse a un receptor de las células cancerosas que se une a saposina C, conjugado a un grupo toxina, en el que dicho conjugado se une al receptor celular y en el que dicho ligando es saposina C o una prosaptida de la saposina C.

La célula cancerosa podría por ejemplo seleccionarse del grupo formado por células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer pulmonar y células de cáncer de colon, especialmente una célula de cáncer de próstata.

También según la invención actual, se presenta un conjugado ligando/toxina que contiene un ligando que puede unirse a un receptor de las células estromales que se une a saposina C, conjugado a un grupo toxina, donde el conjugado indicado se une al receptor celular y donde dicho ligando es saposina C o una prosaptida de la saposina C.

El receptor de las células estromales es, por ejemplo, un receptor que se encuentra en una célula estromal prostática.

En una realización, este ligando es saposina C.

En otra realización, el ligando es una prosaptida, por ejemplo TX14A.

El agente citotóxico puede, por ejemplo, seleccionarse de entre el grupo formado por la toxina de la difteria, toxina ricina, toxina abrina, exotoxina de las pseudomonas, toxina shiga, α -amanitina, proteína antiviral de fitolaca (PAP), proteínas inhibidoras del ribosoma (RIP), melfalan, metotrexato, mostaza nitrogenada, doxorubicina, daunomicina, un radioisótopo ionizante y otros agentes citotóxicos, especialmente la proteína inhibidora del ribosoma o saporina. También según esta invención, se proporciona una composición farmacéutica que contiene un conjugado de la invención y un excipiente fisiológicamente aceptable.

55

Breve descripción de las figuras

En la Fig. 1A se ilustra la presencia de prosaposina y saposina C en el fluido intracelular extraído de varias líneas celulares, con la concentración más alta de prosaposina extracelular encontrada en líneas celulares prostáticas que son insensibles al andrógeno (dos tipos de células cancerosas prostáticas designadas PC-3 y DU-145 y células epiteliales prostáticas normales designadas N1.Pr.Ep); y la concentración más elevada de saposina C intracelular encontrada en las líneas celulares prostáticas que son sensibles al andrógeno (una línea de células cancerosas prostáticas designada LNCaP y una línea celular epitelial prostática normal designada Pr.Ep).

65

En la Figura 1B se ilustra la presencia de prosaposina después de la secreción al fluido extracelular por parte de varias líneas celulares, con el nivel más elevado de secreción en las dos líneas de cáncer de próstata que son insensibles al andrógeno, PC-3 y DU-145.

En la Figura 2 se ilustra el nivel de protección contra la muerte de la célula debido a la presencia de sodio-selenio mediante el empleo de varias concentraciones de saposina C y TX14A a diversas líneas celulares, observándose el efecto más alto en las dos líneas celulares de cáncer de próstata que son insensibles al andrógeno, PC-3 y DU-145.

En la Figura 3 se ilustra la estimulación de la proliferación celular usando diversas concentraciones de saposina C y TX14A a varias líneas celulares, observándose el efecto más alto en la línea celular estromal de próstata normal y las líneas celulares prostáticas que son insensibles al andrógeno, esto es, N1.Pr.St., PC-3 y DU-145.

En la Figura 4A se ilustra la estimulación de la migración celular mediante diversas concentraciones de saposina C en las líneas celulares prostáticas, lo que indica que el efecto estimulador más alto se observó en las líneas celulares de cáncer de próstata que son insensibles al andrógeno, esto es, PC-3 y DU-145.

En la Figura 4B se ilustra la estimulación de la invasión celular mediante diversas concentraciones de saposina C en las líneas celulares prostáticas, lo que indica que el efecto más alto se observó en la línea celular estromal de próstata normal y las líneas celulares prostáticas que son insensibles al andrógeno, esto es, PC-3 y DU-145.

En la Figura 5 se ilustra el efecto de los andrógenos (testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT)), y de saposina C y TX14A sobre la expresión de la pro-catepsina D (bandas de 50 kDa) y catepsina D (bandas de 36 kDa) y prosaposina en el cultivo sobrenadante de las células estromales de próstata normal y la línea celular de cáncer de próstata, LNCaP.

En la Figura 6 se ilustra el efecto de la saposina C sobre el activador plasminogénico del tipo de la uroquinasa (uPA) y el receptor del activador plasminogénico del tipo de la uroquinasa (uPAR) en líneas celulares estromales de próstata normal y dos líneas celulares insensibles al andrógeno, PC-3 y DU-145.

En la Figura 7 se ilustra el efecto de la saposina C, TX14A, y andrógenos (T y DTH) sobre la expresión del antígeno específico prostático (PSA) en la línea celular de cáncer de próstata sensible al andrógeno, LNCaP.

En la Figura 8 se ilustra el efecto de la saposina C y TX14A sobre la fosforilación de ciertas enzimas en la ruta de señalamiento del MAPK intracelular, lo que indica un aumento en la fosforilación en células epiteliales y estromales de próstata normal, y en líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3, DU-145 y LNCaP).

En la Figura 9A se ilustra la presencia de prosaposina y saposina C en el fluido intracelular extraído de varias líneas celulares de cáncer no prostático (cáncer pulmonar, H1299, cáncer de colon, LoVo y cáncer de mama, MCF-7).

En la Figura 9B se ilustra la presencia de prosaposina después de la secreción al fluido extracelular de varias líneas celulares de cáncer no prostático (cáncer pulmonar, H1299, cáncer de colon, LoVo y cáncer de mama, MCF-7).

En la Figura 10 se ilustra la estimulación de la migración celular mediante varias concentraciones de saposina C sobre varias líneas celulares de cáncer no prostático (cáncer pulmonar, H1299, cáncer de colon, LoVo y cáncer de mama, MCF-7).

En la Figura 11 se ilustra la estimulación de la invasión celular mediante varias concentraciones de saposina C sobre varias líneas celulares de cáncer no prostático (cáncer pulmonar, H1299, cáncer de colon, LoVo y cáncer de mama, MCF-7).

En la Figura 12 se ilustra el efecto sobre el número de células de cáncer de próstata insensibles al andrógeno (PC-3) de varias concentraciones de TX14A, saposina C, un conjugado de TX14A-saporina, un conjugado de blanco-saporina, una mezcla de TX14A y el conjugado de TX14A-saporina, y una mezcla de saposina C y el conjugado de TX14A-saporina.

En la Figura 13 se ilustra el efecto sobre el número de células de cáncer de próstata insensibles al andrógeno (DU-145) de varias concentraciones de TX14A, saposina C, un conjugado de TX14A-saporina, un conjugado de blanco-saporina, una mezcla de TX14A y el conjugado de TX14A-saporina, y una mezcla de saposina C y el conjugado de TX14A-saporina.

En la Figura 14 se ilustra el efecto sobre el número de células de cáncer de mama (MCF-7) de varias concentraciones de TX14A, saposina C, un conjugado de TX14A-saporina, un conjugado de blanco-saporina, una mezcla de TX14A y el conjugado de TX14A-saporina, y una mezcla de saposina C y el conjugado de TX14A-saporina.

En la Figura 15 se ilustra el efecto sobre el número de células de cáncer pulmonar (H1299) de varias concentraciones de TX14A, saposina C, un conjugado de TX14A-saporina, un conjugado de blanco-saporina, una mezcla de TX14A y el conjugado de TX14A-saporina, y una mezcla de saposina C y el conjugado de TX14A-saporina.

En la Figura 16 se ilustra el efecto sobre el número de células de cáncer de colon (LoVo) de varias concentraciones de TX14A, saposina C, un conjugado de TX14A-saporina, un conjugado de blanco-saporina, una mezcla de TX14A y el conjugado de TX14A-saporina, y una mezcla de saposina C y el conjugado de TX14A-saporina.

Formas de llevar a cabo la invención

La invención actual ofrece tanto una molécula diana como una ruta de transducción del señalamiento diana para el empleo en trastornos del crecimiento de las células estromales o epiteliales. Por primera vez hemos demostrado que la molécula saposina C es un factor trófico para todas las células de cáncer epitelial investigadas hasta la fecha, por ejemplo células de cáncer de próstata, pulmón, mama y colon. Puede emplearse un conjugado de una toxina y saposina C o péptidos de la región activa de saposina C (por ej., TX14A) para disminuir del crecimiento dirigido a células de cáncer. Además, hemos demostrado que las señales de crecimiento de las células estromales pueden regularse al alza mediante moléculas de esta clase. Las aplicaciones futuras de estas observaciones se reconocen entre aquellos versados en el campo de la terapéutica dirigida a las rutas de transducción del señalamiento molecular diana. Las rutas de transducción del señalamiento de la saposina C son las dianas moleculares lógicas para la terapéutica diseñada para la inhibición de cánceres o trastornos del crecimiento estromal (por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, aterosclerosis o restenosis vascular después de las intervenciones vasculares). Se sabe que la proliferación del músculo liso presente en la aterosclerosis e hiperplasia prostática son similares, lo que sugiere que los agentes inhibidores del crecimiento del músculo liso prostático serían también inhibidores del músculo liso vascular. Véase V.K. Lin *et al.*, 2000. También se sabe que la proliferación de las células del músculo liso en una lesión aterosclerótica ocasiona la oclusión vascular. Véase S.M. Schwartz, 1984. Además, la proliferación del músculo liso y la proliferación endotelial son típicas de la restenosis vascular en arterias después de varias intervenciones. Véase E.R. O'Brien *et al.*, 1993.

Se ha identificado una región activa de la saposina C al menos para la actividad neurotrófica de la saposina C. Se ha empleado la secuencia de esta región activa para obtener péptidos sintéticos que son activos biológicamente, llamados "prosaptidas". Un ejemplo de una prosaptida es el compuesto designado TX14A. Hemos demostrado por primera vez que un conjugado de una toxina y una prosaptida puede también usarse para disminuir el crecimiento de las células derivadas de células de cáncer epitelial.

La saposina C o los compuestos análogos a la saposina C (por ejemplo, una prosaptida) pueden modificarse o conjugarse con otra molécula, de manera que las células que responden normalmente a una ruta de transducción de señalamiento iniciada por saposina C pueden sujetarse a la acción citotóxica o citostática. Por ejemplo, la saposina C o una prosaptida puede conjugarse con un agente citotóxico para dirigir al agente citotóxico específicamente a las células que exhiben receptores celulares que se enlazan a la saposina C o a una prosaptida. En la forma empleada en la especificación y reivindicaciones, un "agente citotóxico" incluye todos los compuestos que son capaces de inhibir la función celular, por ej., un agente citotóxico que inhibe la síntesis de proteínas.

Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitarse a ellos, la toxina de la difteria, toxina ricina, toxina abrina, exotoxina de las pseudomonas, toxina shiga, a-amanitina, proteína antiviral de fitolaca (PAP), proteína inhibidora del ribosoma (RIP), especialmente las proteínas inhibidoras del ribosoma de cebada, trigo, lino, centeno, gelonina, abrina, modeccina y algunos compuestos químicos citotóxicos como por ejemplo, melfalan, metotrexato, mostaza nitrogenada, doxorubicina y daunomicina. Véanse las patentes estadounidenses n° 5.679.637 y 6.326.467. También se incluye cualquier porción o dominio activo de cualquiera de los agentes citotóxicos nombrados anteriormente, como se describe en la patente estadounidense n° 6.326.467. Adicionalmente, los radioisótopos ionizantes serían ejemplos de agentes citotóxicos.

La capacidad de preparar conjugados de proteínas o péptidos biológicos y agentes citotóxicos se reconoce en el campo. Véanse por ejemplo las patentes estadounidenses n° 5.679.637 y 6.326.467 y los miembros de sus familias.

Además, los antagonistas o agonistas de la saposina C pueden emplearse para alterar la ruta de transducción de señalamiento. El diseño de antagonistas y agonistas de péptidos conocidos se reconoce entre aquellos versados en el campo. Como se usa en la especificación y las reivindicaciones, el término "agonista de la saposina C" se refiere a una sustancia o señal que activa directa o indirectamente una función receptora parecida a la activación por la saposina C, y el término "antagonista de la saposina C" se refiere a una sustancia que interfiere directa o indirectamente con la función de un receptor que es activado por la saposina C. Típicamente, se observa el efecto de un antagonista como el bloqueo de la activación por un agonista. Los antagonistas incluyen antagonistas competitivos y no competitivos. Un antagonista competitivo (o bloqueador competitivo) interactúa con o cerca del sitio específico del agonista (por ej., ligando o neurotransmisor) para el mismo sitio o uno situado cerca. Un antagonista o bloqueador no competitivo inactiva el funcionamiento del receptor mediante la interacción con un sitio diferente al sitio que interactúa con el agonista. Pueden identificarse los agonistas o antagonistas de la saposina C mediante el análisis y comparación de las características del enlace con las de la saposina C. Pueden diseñarse los agonistas o antagonistas de la saposina C mediante el análisis detallado de los elementos de enlace requeridos para la interacción del receptor de la saposina C y sustituyendo grupos funcionales estéricamente aceptables que aumentan o disminuyen esas interacciones. Mediante diversos ensayos, pueden optimizarse las moléculas para sustituir la prosaposina de manera potente o para bloquear la activación de los eventos medicados de la saposina C. Además, los cálculos informáticos que examinan las consecuencias conformacionales de esos compuestos químicamente sustituidos pueden ofrecer entendimiento y rapidez al proceso de diseño de agonistas o antagonistas apropiados que podrían emplearse como un fármaco. Estas moléculas diseñadas pueden ser no peptídicas. Véase R.M. Freidinger, "Nonpeptidic ligands for peptide and protein receptors", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 3, págs. 395-406 (1999).

El término “ruta de transducción de la señal” en la forma usada en la especificación y reivindicaciones hace referencia a las rutas bioquímicas que transmiten señales a la célula después de una interacción entre el ligando y el receptor. La señal puede variar dependiendo del tipo de receptor estudiado y puede incluir la fosforilación/desfosforilación de las diferentes proteínas o la activación de ciertas enzimas que modulan eventos bioquímicos como la formación de AMP cíclico.

El término “cantidad efectiva terapéuticamente” en la forma aquí usada se refiere a una cantidad de la saposina C, o un compuesto análogo capaz de alterar la ruta de transducción de señalamiento u otro efecto celular (como un conjugado de prosaptida/toxina) de forma suficiente para alterar el crecimiento tumoral o de las células estromales o para inhibir la metástasis en un grado estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Por lo tanto, el término “cantidad efectiva terapéuticamente” incluye, por ejemplo, una cantidad suficiente para prevenir la proliferación y/o invasión de las células cancerosas de los tejidos y células vecinos. Los intervalos de dosificación para la administración del conjugado u otro compuesto análogo son los que producen el efecto deseado. Generalmente, la dosis variará con la edad, peso, condición, sexo del paciente, tipo de tumor, grado de desarrollo y de metástasis del mismo. Una persona versada en el campo, considerando las enseñanzas de la especificación actual, podrá determinar fácilmente los intervalos adecuados de dosificación. La dosis podrá ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier contraindicación. En cualquier caso, la efectividad del tratamiento podrá determinarse mediante la monitorización de los puntos finales apropiados (por ej., el grado de disminución en el tamaño del tumor o en el comportamiento metastático) usando métodos reconocidos entre los versados en el campo. Asimismo, los compuestos efectivos pueden aplicarse en vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos en el estado de la técnica. La aplicación puede ser oral, inyectada o tópica.

La saposina C o el conjugado de prosaptida/toxina o el compuesto(s) que altera la ruta de transducción del señalamiento puede administrarse a un paciente mediante cualquier método adecuado, incluyendo por administración oral, parenteral, subcutánea, intrapulmonar, tópica, o intranasal. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial o intraperitonea. Los compuestos efectivos también pueden administrarse transdérmicamente, por ejemplo, en la forma de un implante subcutáneo de liberación lenta, u oralmente en la forma de cápsulas, polvos o gránulos. Los compuestos efectivos también pueden dirigirse a las células tumorales mediante la aplicación directa al tumor.

Las preparaciones de vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral incluyen las soluciones estériles, acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como oleato etílico. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo medios salino y tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado o aceites fijos. El ingrediente terapéutico activo puede mezclarse con excipientes que son aceptables farmacéuticamente y son compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados incluyen agua, solución salina, dextrosa, glicerol y etanol, o combinaciones de ellos. Los vehículos intravenosos incluyen sistemas de reposición de fluidos y nutrientes, sistemas de reposición de electrolitos, como los que se basan en la dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservadores y otros aditivos como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

La forma puede variar dependiendo de la ruta de administración. Por ejemplo, las composiciones inyectables podrían presentarse en la forma de ampollas, cada una con una dosis unitaria, o en la forma de un envase que contiene dosis múltiples.

La saposina C o el conjugado de prosaptida/toxina o el compuesto que altera la ruta de transducción de señalamiento puede formularse en composiciones terapéuticas como sales farmacéuticamente aceptables. Estas sales incluyen las sales de adición ácida formadas con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, u ácidos orgánicos como el ácido acético, oxálico, o tartárico, y similares. Las sales también pueden incluir las formadas con álcalis inorgánicos como, por ejemplo, los hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y los álcalis orgánicos como, por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

La administración controlada puede lograrse mediante la mezcla del principio activo con las macromoléculas apropiadas, por ejemplo, poliésteres, ácidos poliamínicos, pirrolidona polivinílica, acetato de etilvinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de prolamina o copolímeros de lactido/glucósido. Puede emplearse la modificación de la concentración de las macromoléculas y/o del tamaño de los polímeros para controlar la velocidad de liberación del principio activo.

Ejemplo 1

Materiales y líneas celulares

Se compraron cultivos primarios de células epiteliales normales de próstata humana (NL.Pr.Ep; n° catálogo CC-2655) y las células estromales normales de próstata humana (NL.Pr.St; n° catálogo CC-2608) de BioWhittaker (Walkersville, Maryland, EE.UU.). Se mantuvieron las células siguiendo las instrucciones del fabricante en un medio de cultivo específico definido para cada tipo de célula, conocido con el nombre de “Pr.EGM” (n° de catálogo CC-3166)

y “SCGM” (nº catálogo CC-3205) para las líneas celulares epiteliales y estromales prostáticas, respectivamente. Se obtuvieron otras líneas celulares de la American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, EE.UU.) y se cultivaron en los medios recomendados. Por ejemplo, se compró una línea celular de neuroblastomas (SK-N-MC, ATCC#HTB-10) que se sabe responde a la prosaposina (y Saposina C o TX14A) para el empleo como control en medio mínimo esencial de Eagle (MMEE), suero fetal bovino al 10% (SFB) y piruvato de sodio 1,0 mM. Esta línea celular se empleó como un control positivo externo para la expresión de prosaposina. Se compraron tres líneas celulares cancerosas de próstata humana en la ATCC: PC-3 (ATCC#CRL-1435), DU-145 (ATCC#HTB-81) y LNCaP (ATCC#CRL-1740). Las dos primeras, PC-3 y DU-145, son líneas celulares insensibles al andrógeno, mientras que LNCaP es una línea celular sensible al andrógeno. PC-3 y DU-145 se cultivaron en MMEE con 10% SFB. Las células LNCaP se cultivaron en RPMI-1640/10% SFB, suplementado con 1 mM de piruvato de sodio y 10 mM de HEPES. Además, se compró una línea celular feocromocitoma de rata (PC-12; ATCC nº CRL-1721). También se sabe que PC-12 responde a la prosaposina y a TX14A.

Se compraron líneas celulares de mama humana (MCF-7; ATCC#HTB-22), colon (LoVo; ATCC#CCL-229) y cáncer de pulmón (H1299; ATCC#CRL-5803) de la American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, EE.UU.). Se cultivaron las células MCF-7 y H1299 en MMEE suplementado con 10% SFB. Las células LoVo se cultivaron en medio Ham/F12 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, y 10% SFB.

Se obtuvieron saposina C humana (Sap. C), saposina C antihumana de cabra y saposina D antihumana de cabra del Prof. K. Sandoff (Bonn, Alemania) y se caracterizaron previamente usando ELISA, inmunoblot e inmunoprecipitación, como se describe en M. Hensler *et al.*, “Expression of the three alternative forms of the sphingolipid activation protein precursor in baby hamster kidney cells and functional assays in a cell culture system”, J. Biol. Chem., vol. 271, págs. 8416-8423 (1996). La prosaposina antiraton de conejo fue un regalo del Dr. Carlos Morales (McGill University, Montreal, Canadá) y se caracterizó previamente mediante tinción inmunohistoquímica en la forma descrita en M. Morales *et al.*, “Targeted disruption of the mouse prosaposin gene affects the development of the prostate gland and other male reproductive organs”, J. Androl., vol. 21, págs. 765-775 (2000).

Se sintetizó comercialmente TX14A, un péptido de 14 aminoácidos derivado de la región neurotrófica activa de saposina C, con una pureza del 98% y se compró en AnaSpec (San José, California, EE.UU.). Para el ensayo de la ruta de la quinasa intracelular, se compraron un equipo de muestreo de la ruta Fosfo-ERK1/2 y un anticuerpo anti-p42/44 de Cell Signaling Technologies, Inc. (Beverly, Massachusetts, EE.UU.).

Ejemplo 2

Expresión de saposina C y prosaposina en una línea celular de neuroblastoma y varias líneas celulares prostáticas

Para el ensayo de la expresión de saposina C y prosaposina en una línea celular de neuroblastoma (SK-N-MC) y varias líneas celulares prostáticas (LNCaP, PC-3, DU-145, NL.Pr.St, y NL.Pr.Ep), se incubaron placas de cultivo subconfluentes durante 24 h en un medio sin suero específico para cada una de las líneas celulares descritas anteriormente. Se recogió el medio por encima de las células cultivadas (“sobrenadante”) y se centrifugó a 2000 x g durante 10 min. Las células enteras se recolectaron y lisaron en tampón RIPA (25 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonident p-40, desoxicolato de sodio, 1% SDS, 10 mM fluoruro de sodio y 1 mM de ortovanadato de sodio) suplementado con inhibidores de la proteasa. Se centrifugó el lisado a 2000 x g durante 10 min y se recogió el sobrenadante transparente (“lisado celular”). Se determinó la concentración proteínica en el sobrenadante y el lisado celular usando un equipo de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, Illinois, EE.UU.). Se emplearon 10 µg de lisado celular y 20 µg de sobrenadante para el análisis por Western blot bajo condiciones reductoras siguiendo el procedimiento descrito en S. Koochekpour *et al.*, “The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor-induced invasion and branching morphogenesis in renal carcinoma cells”, Mol. Cell. Biol., vol. 19, págs. 5902-5912 (1999). Las bandas de saposina C y prosaposina se identificaron usando saposina C antihumana de cabra como el anticuerpo principal y HRP-anticabra (peroxidasa del rábano picante, nº catálogo SC-2033; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU.) como anticuerpo secundario, y se detectaron empleando un sistema de detección ECL (electroquimioluminiscente) (Amersham, Piscataway, Nueva Jersey, EE.UU.). Las células SK-N-MC se usaron como una línea celular de control positivo.

Como puede verse en la Fig. 1, se detectaron las bandas doblete inmunorreactivas a 62 y 64 kDa, indicativas de la presencia de prosaposina, en los lisados celulares y sobrenadantes. En un experimento paralelo usando anti-prosaposina y/o anti-saposina D como anticuerpo primario, se observaron las mismas bandas doblete (no se muestran los datos). Se ha informado sobre la presencia de bandas doblete de prosaposina (PSAP) en fluidos secretorios humanos y se piensa que representan isoformas debidas a diferencias en la glucosilación. Véase A. Sano *et al.*, “Sphingolipid hydrolase activator proteins and their precursors”, Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 165 págs. 1191-1197 (1989).

Además, como se muestra en la Fig. 1A, se detectó una banda más pequeña (alrededor de 10 kDa) sólo en el lisado celular, y sólo con la antisaposina C o el anticuerpo anti-prosaposina, pero no con el anticuerpo de la anti-saposina D. Esta banda más pequeña representa la expresión de la saposina C. Esta expresión en células LNCaP sensibles al andrógeno, y en células epiteliales y estromales normales de próstata fue mayor que con las células cancerosas de próstata resistentes al andrógeno (PC-3 y DU-145).

Sin embargo, el nivel de expresión de la prosaposina secretada en el sobrenadante siguió un orden inverso al observado en el lisado celular (Fig. 1B), lo que indica un nivel más alto de secreción de prosaposina por las líneas celulares cancerosas de próstata insensibles al andrógeno, PC-3 y DU-145. Como se muestra a continuación en el Ejemplo 4, estas células cancerosas presentan un nivel más alto de respuesta a la saposina C, derivada de la prosaposina. Se sabe que estas dos líneas celulares son tumores muy agresivos, y hemos demostrado que las células secretan una molécula que induce la proliferación, migración e invasión celular y aumenta la dispersión del cáncer.

Ejemplo 3

Saposina C y TX14A protegen las células cancerosas de próstata de la apoptosis

Para determinar los efectos de la saposina C y TX14A (la prosaptida sintética de saposina C) sobre la apoptosis de las células cancerosas, se empleó sodio-selenio (NaSe) para inducir la apoptosis, como se indicó en D.G. Menter *et al.*, "Selenium effects on prostate cell growth", Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, vol. 9 págs. 1171-1182 (2000). Las células se cultivaron en sus medios de cultivo completos respectivos, como se indicó en el Ejemplo 1, durante dos días. Las células se trataron entonces con uno de los siguientes: (1) NaSe (10 μ M); (2) NaSe (10 μ M) + saposina C (0,1 nM); (3) NaSe (10 μ M) + saposina C (1 nM); (4) NaSe (10 μ M) + saposina C (10 nM); o (5) NaSe (10 μ M) + TX14A (10 nM). Después de la incubación durante 48 h, se ensayó el porcentaje de células muertas usando el método de exclusión con azul de tripano. En este ensayo, se mezcló 0,4% de colorante de azul de tripano con un volumen igual de suspensión celular. El colorante cruzará las membranas celulares en células vivas y muertas, pero sólo las células vivas pueden expeler el colorante. El número de células vivas (sin color) y muertas (de color oscuro) se contaron bajo un microscopio usando un hemocitómetro. Los resultados en la Fig. 2 se presentan como el porcentaje de células muertas y son la media $\pm$ error estándar de la media (EEM) en tres experimentos duplicados.

Como se indica en la Fig. 2, las células estromales normales de próstata fueron resistentes al efecto tóxico del NaSe. El orden de clasificación de la supervivencia general del más bajo al más alto en presencia de NaSe fue LNCaP, DU-145, células epiteliales normales de próstata, PC-3 y células estromales normales de próstata. La presencia de saposina C, de manera dependiente de la dosis, disminuyó el grado de la muerte celular, lo que indica un efecto protector y anti-apoptótico mediado por el péptido. El grado del efecto protector, expresado mediante la diferencia en el porcentaje de muerte celular con o sin saposina C, fue mayor en PC-3 (55%) y DU-145 (50%). Además, se demostró que TX14A (a 10 nM), que imita la secuencia trópica de la saposina C, es igualmente efectivo que la saposina C (a 10 nM) en la protección de las células contra la muerte en presencia de NaSe. Ni saposina C ni TX14A protegieron las células epiteliales normales de próstata contra la muerte celular, y el efecto protector de LNCaP fue pequeño (5-10%).

Estos resultados indican que la mayor protección contra la apoptosis por saposina C se observó en las líneas celulares cancerosas de próstata que son insensibles al andrógeno, PC-3 y DU-145. Sin embargo, se observaron efectos menores pero constantes en las células sensibles al andrógeno, por ejemplo LNCaP.

Ejemplo 4

Efecto de saposina C y TX14A en la proliferación celular

Para estudiar los efectos de saposina C y TX14A sobre la proliferación celular, se cultivaron diversas células en la forma descrita en el Ejemplo 1, incubándose sólo en medios recién preparados, o en medios suplementados con saposina C o con TX14A en concentraciones de 0,1, 1,0 y 10 nM. Después de incubarse durante 2 días, se determinó el número de células vivas mediante el método de exclusión con azul de tripano, como se describió anteriormente en el Ejemplo 3. Se muestran los resultados en la Fig. 3, en donde cada punto representa la media $\pm$ EEM de tres experimentos duplicados.

Aunque la saposina C no mostró efecto alguno sobre el crecimiento de las células epiteliales normales de próstata, tanto la saposina C como TX14A estimularon la proliferación celular en las otras líneas celulares de manera dependiente de la dosis (Fig. 3). Expresada como un porcentaje de los valores de control, la cantidad de proliferación en las células estromales normales de próstata fue 17-69%; en células PC-3, 20-53%; en células DU-145, 35-47% y en células LNCaP, 15-32%. Se obtuvieron aumentos similares en el número de las células al contarse dichas células usando un ensayo de proliferación celular (n° catálogo G5430) comprado en Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.). (No se muestran los datos).

Los resultados mostrados en las Figs. 2 y 3 indican que la saposina C y su péptido trófico (TX14A) tienen un mayor efecto sobre las líneas celulares cancerosas insensibles al andrógeno (PC3 y DU-145) al determinarse mediante la protección contra la muerte celular y promoción de la proliferación celular (Figs. 2 y 3, respectivamente). Como se señaló en el Ejemplo 3, se observaron efectos más pequeños pero constantes en las células insensibles al andrógeno como LNCaP. Las células estromales prostáticas también fueron estimuladas a crecer por la saposina C. Se piensa que las células estromales prostáticas son críticas en el desarrollo de la hiperplasia prostática, y el efecto de la saposina C sobre la proliferación de estas células tiene ramificaciones terapéuticas en la hiperplasia prostática benigna.

Ejemplo 5

Efecto de la saposina C sobre la migración e invasión de las células de próstata

5 Para investigar el efecto de la saposina C sobre la migración e invasión celular prostática, se hicieron ensayos de migración e invasión celular usando unidades transwell de 24 pocillos con filtros de policarbonato de 8 μm (Costar, compradas en Becton Dickinson, Bedford, Massachussets, EE.UU.), como se describe en S. Koochekpour *et al.*, “Met and HGT/SF expression in human glioma”, Cancer Res., vol. 57 págs. 5391-5398 (1997). Para los ensayos de invasión, los filtros transwell se recubrieron con 20 μg de matriz GFR-Matrigel (Becton Dickenson) en 100 μl de medio basal y se dejaron secar al aire durante toda la noche. En el compartimento inferior de cada unidad transwell se añadieron 400 μl de medio basal suplementado con 0,5% SFB y 0,1% BSA. Se añadió entonces la saposina C al compartimento inferior en las concentraciones siguientes: 0 (control), 0,1 nM, 1 nM y 10 nM.

15 Las células cultivadas se recolectaron por tripsinización y se contaron. Se resuspendieron aproximadamente 5000 células en 100 μl de medio sin suero con 0,1% BSA, y se colocaron en el compartimento superior de la unidad transwell. Después de 16 h de incubación a 37°C se fijaron en metanol las células en el compartimento inferior y en el superior y se tiñeron con Diff-Quick (Dade, Aguada, Puerto Rico). Se eliminaron las células no migratorias en la superficie superior del filtro pasando un hisopo de algodón. Se contaron las células bajo el filtro. Los resultados de la migración celular se muestran en la Fig. 4A; y los de invasión celular en la Fig. 4B. Cada barra representa la media $\pm$ EEM de tres experimentos duplicados, y se contaron al menos tres veces las muestras de cada experimento.

25 Como se esperaba, las células epiteliales primarias normales de próstata no migraron a través del filtro ni invadieron la matriz Matrigel en presencia o ausencia de saposina C. (Figs. 4A y 4B, células NL.Pr.Ep.). En ausencia de saposina C, las células estromales normales de próstata mostraron un nivel menor de migración e invasión celular que las células cancerosas de próstata.

En las células cancerosas de próstata, el orden de clasificación del más bajo al más alto para el aumento en la migración e invasión como respuesta a la saposina C fue LNCaP, DU-145 y PC-3 (Figs. 4A y 4B). La saposina C, de manera dependiente de la dosis, estimuló la migración en PC-3 en más de un 300%, en DU-145 en 140% y en LNCaP en 50%. Además, la saposina C estimuló la invasión de PC-3 en 100%, DU-145 en 70% y LNCaP en 48%. Por lo tanto, nuevamente la saposina C tuvo un mayor efecto sobre las líneas celulares insensibles al andrógeno, PC-3 y DU-145. Se observaron nuevamente efectos más pequeños, pero constantes, con la línea celular sensible al andrógeno, LNCaP. Estos resultados, combinados con los resultados dados en el Ejemplo 2, indican que tanto las células estromales normales de próstata como las cancerosas secretan y responden a la saposina C mediante la migración e invasión.

Ejemplo 6

Efecto de los andrógenos y saposina C sobre la expresión de catepsina D y prosaposina en células que responden al andrógeno

40 La proteólisis lisosomal de prosaposina por catepsina D desempeña un papel importante en la producción de las saposinas maduras A, B, C y D. La catepsina D es una proteasa de aspartilo lisosomal que se secreta como procatepsina D y se activa en un entorno ácido, como ocurre durante el crecimiento e invasión tumoral. Ya que la saposina C estimula la migración e invasión de las células de cáncer de próstata, se diseñaron experimentos para investigar si la presencia de saposina C o TX14A modifica el nivel de expresión de la catepsina D.

Se sabe que las células estromales prostáticas normales y las células LNCaP cancerosas son sensibles al andrógeno y contienen receptores para los andrógenos. Se usaron estas líneas celulares para investigar el efecto de los andrógenos sobre la expresión de prosaposina y catepsina D. Se cultivaron las células en el medio preferido (descrito en el Ejemplo 1) hasta una confluencia del 80%. Estas placas de cultivo tisular se lavaron dos veces y se preincubaron en medio sin suero durante 2 h. Después de eliminar el sobrenadante del cultivo, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada de fosfato (PBS) y se incubaron en medio sin suero suplementado con las siguientes concentraciones de saposina C o TX14A: 0, 0,1, 1 y 10 nM. En un experimento paralelo, se trataron las células con andrógenos, tanto testosterona (T) como dihidrotestosterona (DHT) (Cat.# T-5035 y D-7149, respectivamente, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, EE.UU.), usando las siguientes concentraciones: 0, 0,1, 1 y 10 nM. Después de transcurridas 24 h, se recogió el medio de cultivo celular acondicionado y se centrifugó a 2000 g durante 30 min a 4°C. Se concentraron los sobrenadantes a una quinta parte usando un concentrador Centriprep-3 (Amikon, Beverley, Massachusetts, EE.UU.) y después se conservó congelado a -70°C hasta su empleo.

60 Los sobrenadantes (15 μg /muestra) se sujetaron a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, y las proteínas separadas se sometieron a electroblotting usando membranas de PVDF (Cat.# RPN 2020F, Amersham, Piscataway, Nueva Jersey, EE.UU.). Se hizo un análisis por Western blot usando un anticuerpo anticcatepsina D disponible comercialmente (Cat.# SC-6486, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.).

65 En la Fig. 5 se muestran los resultados. En comparación con los niveles de control (0 nM), los andrógenos, saposina C y TX14A pueden estimular la expresión de la procatepsina D (la banda a 50 kDa) y la catepsina D madura activa (la banda a 36 kDa) en las células LNCaP y estromales normales prostáticas. Este resultado indica que la saposina C (prosaposina y TX14A) puede funcionar de manera parecida a los andrógenos en las células estromales normales y

cancerosas prostáticas sensibles al andrógeno (LNCaP), al menos en la estimulación de la expresión de procatepsina D y catepsina D. La presencia de saposina C (o TX14A) y andrógeno (T o DHT) aumentaría bastante la expresión de la procatepsina D y catepsina D. Se ha sugerido que la catepsina D desempeña un papel fundamental en la promoción del crecimiento e invasión de los tumores malignos, incluyendo el cáncer de próstata. Véase J.P. Cherry *et al.*, "Analysis of cathepsin D forms and their clinical implications in prostate cancer", J. Urol., vol. 160 págs. 2223-2228 (1998). De esta manera, la presencia de andrógenos y saposina C podría aumentar la malignidad del cáncer de próstata al aumentar los niveles de catepsina D.

Es interesante que los dos andrógenos (T y DHT) en este ensayo estimularon la expresión de prosaposina en células LNCaP y estromales normales prostáticas. Este resultado indica que los andrógenos podrían ser un factor en la regulación de la expresión de prosaposina. Esta activación del receptor del andrógeno no sólo ofrece una mayor cantidad de prosaposina a las células tumorales y a las estromales en un microentorno de tumor prostático, sino que aumenta también el fenotipo maligno del cáncer de próstata mediante la producción de más prosaposina y catepsina D.

Ejemplo 7

Efecto de la saposina C sobre el activador plasminogénico de tipo uroquinasa y su receptor en la membrana celular

Para investigar el efecto de saposina C sobre la expresión del activador plasminogénico tipo uroquinasa (uPA) y el receptor soluble uPA (uPAR), se cultivaron células estromales normales de próstata y células de cáncer de próstata (PC-3, DU-145, LNCaP) en el medio descrito en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron en el medio preferido hasta una confluencia del 80%, después se lavaron dos veces con PBS, se incubaron durante 24 h a 37°C en medio sin suero, suplementado con 0, 0,1, 1,0 ó 10 nM de saposina C. Después de transcurrido el período de incubación, se recogió el medio de cultivo celular acondicionado (sobrenadante). Se concentraron los sobrenadantes a una quinta parte usando un concentrador Centriprep-3 (Amikon, Beverley, Mass., EE.UU.) y después se conservó congelado a -70°C hasta su empleo.

Los sobrenadantes (15 µg/muestra) se sujetaron a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, y las proteínas separadas se sometieron a electroblotting usando membranas de PVDF (Cat.# RPN 2020F, Amersham, Piscataway, Nueva Jersey, EE.UU.). Se hizo un análisis por Western blot (como en los Ejemplos 2 y 6) usando anticuerpos anti-uPA y anti-uPAR disponibles comercialmente (Cat.# 389 y 399R, respectivamente; American Diagnostica Inc., Greenwich, Connecticut, EE.UU.).

Bajo estas condiciones experimentales, no se detectó la expresión del uPA o del uPAR soluble en el sobrenadante de las células LNCaP (no se muestran los datos). En comparación, como se muestra en la Fig. 6, PC-3, DU-145 y las células estromales normales de próstata dieron resultados positivos para la expresión de uPA y uPAR. La saposina C aumentó el nivel extracelular de uPA y uPAR en las células estromales y en las células de cáncer de próstata (PC-3 y DU-145). El aumento de los niveles de uPA y uPAR indica un mecanismo adicional mediante el cual la saposina C podría aumentar la migración e invasión de las células de cáncer de próstata que son insensibles al andrógeno. Más aún, estos resultados apoyan un papel potencial para la saposina C como mediador de la interacción estromal de las células tumorales en la invasión y metástasis del cáncer. Las células estromales normales de próstata secretan y aumentan el nivel extracelular de uPA y uPAR soluble al microentorno de las células tumorales.

Ejemplo 8

Efecto de la saposina C y TX14A sobre la expresión de PSA en células LNCaP

LNCaP es una línea celular sensible al andrógeno, que se ha demostrado es sensible a andrógenos y antiandrógenos. Para investigar el efecto de la saposina C sobre la expresión de PSA en las células LNCaP, se cultivaron las células en el medio preferido hasta una confluencia del 80% y entonces se lavaron dos veces con PBS. Se incubaron las células en medio sin suero suplementado con testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT), saposina C o TX14A en las concentraciones siguientes: 0, 0,1, 1 ó 10 nM. Después de transcurridas 24 h, se recogió el medio de cultivo celular acondicionado. Se concentraron los sobrenadantes a una quinta parte usando un concentrador Centriprep-3 (Amikon, Beverley, Mass., EE.UU.) y después se conservó congelado a -70°C hasta su empleo. Se hizo un análisis por Western blot (como en los Ejemplos 2 y 6) usando un anti-PSA disponible comercialmente (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU.).

En la Fig. 7 se muestran los resultados. Similarmente al efecto conocido de los andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) (panel inferior), la saposina C y TX14A aumentaron significativamente el nivel extracelular de PSA en concentraciones tan bajas como 0,1 nM (panel superior). Este resultado demuestra por primera vez que la saposina C (o su péptido sintético) es una molécula reguladora potente para la expresión del gene que responde al andrógeno (PSA). La saposina C podría ofrecer señales celulares que interactúan mediante el receptor del andrógeno para mediar acciones como las del andrógeno. Así, la saposina C podría mediar en el desarrollo del fenotipo independiente del andrógeno en el cáncer de próstata.

Ejemplo 9

Activación de la ruta de transducción del señalamiento de MEK1/2-ERK1/2-RSK por saposina C y TX14A

- 5 Se diseñaron experimentos para investigar el efecto de la saposina C y TX14A sobre la ruta MAPK en células estromales y epiteliales normales de próstata y en las células cancerosas prostáticas, PC-3, DU-145 y LNCaP.

Se cultivaron las células hasta una confluencia del 80% incubándolas en sus medios basales sin suero respectivos durante 18 h. Para cada línea celular se pretrataron las placas de cultivo de tejidos con un inhibidor MEK1/2 específico (U0126, Cat.# 9903, Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, EE.UU.) a un nivel de 10 μ M durante 1,5 h. Se añadieron saposina C y TX14A a las concentraciones siguientes: 0,1, 1,0 y 10 nM. Después, se incubaron las células a 37°C durante 5 min, se lavaron, se lisaron en hielo en tampón RIPA suplementado con inhibidores de la proteasa y 1 mM de ortovanadato de sodio, como se describe en S. Koochekpour *et al.*, 1999. Los lisados celulares clarificados se sometieron al análisis Western usando anticuerpos fosfo-específicos contra tres enzimas en la ruta MAPK: MEK1/2 (Ser217/22; Cat.# 9121; Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, EE.UU.); p90RSK (p90^{rsk}, Ser380, Cat.# 9341, Cell Signaling Technology); y p42/44MAP quinasas (p44^{MAPK}, p42^{MAPK}, Thr202/Tyr204, Cat.# 9102; Cell Signaling Technology). Se emplearon como controles los anticuerpos primarios contra p42/44 MAP quinasa (Cell Signaling Technology) o contra tubulina (Cat.# 12463, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU.). Para cuantificar la diferencia entre el control y los diversos tratamientos, se leyeron los autorradiogramas en un densitómetro, un Alpha Imager 2000 (Alpha Innotech Corp., San Leandro, California, EE.UU.).

Como se muestra en la Fig. 8, tanto la saposina C como su péptido activo (TX14A) en concentraciones al nivel nanomolar activaron las enzimas en la ruta de transducción del señalamiento de MAPK en células estromales normales de próstata (células estromales NLPr) y en las células de cáncer de próstata, PC-3, DU-145 y LNCaP. En estos tipos de células, el inhibidor de MEK1/2, U0126, inhibe sustancialmente esta activación. En células estromales normales de próstata, se observó un nivel de aumento de quince veces, en comparación con el control, de la fosforilación de p42/44 como respuesta a saposina C y TX14A. Tanto en las células estromales como en PC-3 se encontró un nivel de aumento de 1 a 5 veces en la fosforilación para las proteínas P90RSK.

Como se muestra en la Fig. 8, tanto la saposina C como TX14 pueden inducir la fosforilación de las dos isoformas de ERK (p42/44) y MEK casi igualmente en las células estromales y las células cancerosas de la próstata. La respuesta de las células epiteliales normales de próstata a la saposina C fue diferente a la de las demás células en este estudio. Aunque se encontró un aumento dependiente de la dosis en la expresión de MEK1/2, se observó un patrón bifásico único para las enzimas, p42/44 y p90RSK. Al compararse con los valores de control, la actividad de fosforilación disminuyó a 0,1 nM, aumentó a 1,0 nM y disminuyó a 10 nM (Fig. 8). También se observó este patrón bifásico para la actividad de p90RSK en las células estromales normales de próstata como respuesta a saposina C y TX14A. Esta respuesta bimodal a saposina C y TX14A puede deberse a una modulación negativa mejorada del receptor(es) o una mejor actividad de la fosfatasa.

Usando las mismas condiciones experimentales indicadas anteriormente y un ensayo Biotrak *in vitro* de p42/44 quinasa (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra), la incorporación de [γ -32P]ATP en un péptido sintético específico se midió a 30°C durante un período de 30 minutos, como se describe en W.M. Campana *et al.*, "Induction of MAPK phosphorylation by prosaposin and prosaptide in PC12 cells", Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 229, págs. 706-712 (1996). El péptido sintético del ensayo es más específico para p42/44 MAPK que el sustrato usado más comúnmente (MBP). Los datos verifican el patrón de activación y fosforilación por saposina C y TX14A, como se indicó anteriormente (no se muestran los datos). Como una línea celular de control positivo externo, se usaron las células PC12 (feocromocitoma) incubadas con 20% SFB, saposina C o TX14A.

Ejemplo 10

Expresión de saposina C y prosaposina en las líneas celulares de cáncer no prostático

Para ensayar la expresión de saposina C y prosaposina en líneas celulares cancerosas adicionales, se incubaron las líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7), de cáncer de colon (LoVo) y de cáncer pulmonar (H1299) en placas de cultivo subconfluente y se recogieron muestras como se describe anteriormente en el Ejemplo 2. Las muestras se ensayaron entonces usando un análisis Western bajo las condiciones reductoras indicadas en el Ejemplo 2.

Como se muestra en la Fig. 9, se detectó prosaposina en el sobrenadante y el lisado celular de las tres líneas celulares cancerosas. La expresión de la prosaposina fue más elevada en las células de carcinoma pulmonar (H1299) y menor en las células de carcinoma de colon (LoVo). Se detectó la saposina C en el lisado celular de los tres tipos de células. El orden del más elevado al menor fue el mismo que el observado para la expresión de prosaposina, esto es, carcinoma pulmonar, carcinoma de mama y carcinoma de colon.

Así, se encontró que estas líneas celulares de cáncer no prostático también expresan prosaposina y saposina C.

Ejemplo 11

Efecto de la saposina C sobre la migración celular y la invasión de las líneas celulares de cáncer no prostático

- 5 Para investigar el efecto de la saposina C sobre la migración e invasión de las células cancerosas no prostáticas, se hicieron ensayos usando las líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7), de cáncer de colon (LoVo) y de cáncer pulmonar (H1299) en unidades transwell de 24 pocillos con filtros de policarbonato, como se describió anteriormente en el Ejemplo 5.
- 10 Los resultados se muestran en las Figs. 10 y 11. En ausencia de la saposina C, las células del carcinoma pulmonar (H1299) mostraron propiedades más altas de migración e invasión que las células cancerosas de mama o de colon. La saposina C estimula la migración e invasión de las tres líneas celulares cancerosas. La saposina C aumentó la migración en el siguiente orden, del efecto mayor al menor: células cancerosas pulmonares (H1299), 44-460%; células cancerosas de colon (LoVo), 22-59%; y células cancerosas de mama (MCF-7), 12-59% (Fig. 10). La saposina C aumentó la
- 15 invasión en el orden siguiente, de mayor a menor: células cancerosas de pulmón, 19-195%; células cancerosas de colon, 16-37%; y células cancerosas de mama, 22-36% (Fig. 11). Con todas las células estudiadas, la migración e invasión más altas se observaron a una concentración de 1 nM de saposina C, niveles que se detectan fácilmente en los fluidos corporales humanos (por ejemplo, secreción prostática, plasma seminal, sangre, etc.).
- 20 Estos resultados, conjuntamente con los resultados obtenidos en el Ejemplo 5 con células cancerosas de próstata, indican que el efecto estimulador de la saposina C sobre la migración e invasión no se limita al cáncer de próstata sino que se extiende a una amplia variedad de células cancerosas, por ejemplo, las células epiteliales transformadas malignamente.

Ejemplo 12

Efecto del conjugado TX14A-saporina sobre varias líneas celulares cancerosas

- 30 En todos los ensayos llevados a cabo en este estudio, la saposina C actúa como un factor multipotencial de crecimiento. Debido al considerable parecido de los efectos biológicos de TX14A (péptido trófico derivado de la saposina C) y la saposina C, decidimos emplear un conjugado de TX14A y una toxina (saporina, derivada de una planta llamada *Saponaria officinalis*) y estudiar su actividad antitumoral (muerte celular) sobre las células cancerosas de próstata (PC-3, DU-145, LNCaP), mama (MCF-7), pulmón (H1299) y colon (LoVo). Se seleccionaron estas células debido a los
- 35 efectos celulares mediados por saposina C demostrados en los ejemplos anteriores.

- El conjugado de saporina y TX14A se preparó mediante un pedido especial por Advanced Targeting Systems con una relación molar 1:1 entre el péptido y la saporina. Se compró Blanco-SAP, un conjugado de saporina no diana, como control (ATS, Cat.# IT-21). Las células que crecieron exponencialmente se tripsinizaron y cultivaron en sus medios
- 40 de cultivo completos (1000/pocillo en placas de 96 pocillos), como se describe en el Ejemplo 1. Después de un día de incubación a 37°C, se suplementaron los medios de cultivo con TX14A, saporina, TX14A-saporina (conjugado), saposina C, TX14A-saporina más TX14A, o TX14A-saporina más saposina C en las siguientes concentraciones: 0, 0,1, 1, 10, 100, 1000 nM. Tres días después del tratamiento, se monitorizó la muerte celular usando un equipo de citotoxicología de título celular Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.). Se normalizaron los recuentos celulares a
- 45 los controles del medio.

- Los resultados para las líneas celulares PC-3, DU-145, MCF-7, H1299 y LoVo se muestran en las Figs. 12, 13, 14, 15 y 16, respectivamente. Aunque tanto la saposina C como la TX14A aumentaron la proliferación celular de todas las
- 50 líneas de células cancerosas, nuevamente el efecto fue mucho mayor en las líneas de células cancerosas prostáticas, PC-3 y DU-145.

- Se encontró que el conjugado de TX14A-saporina a una concentración entre 1 y 100 nM inhibe la proliferación celular en todas las líneas celulares estudiadas: una disminución de 20-38% en PC-3 (Fig. 12), 23-46% en DU-145 (Fig. 13), 31-50% en células H1299 (Fig. 14), 14-30% en LoVo (Fig. 15) y 10-34% en células MCF-7 (Fig. 16). TX14A-saporina mostró un efecto citotóxico mínimo sobre las células estromales y LNCaP de próstata (no se muestran los
- 55 datos). El orden de clasificación del efecto citotóxico general (muerte celular) de TX-14A-saporina de células del más alto al más bajo fue H1299, DU-145, PC-3, MCF-7, LoVo, LNCaP y células estromales normales de próstata.

- En ensayos de inhibición competitiva (tratando células simultáneamente con una mezcla equimolar de TX14A-saporina y TX14A o saposina C), la citotoxicidad de TX14A-saporina fue inhibida de manera dependiente de la dosis por TX14A o saposina C (Figs. 12-16). La citotoxicidad del blanco-saporina (una molécula de control de saporina no específica) fue al menos 200 veces menor que la de TX14A-saporina. También se confirmó la citotoxicidad de saporina o saporina conjugada mediante el examen microscópico de las células. Estos resultados indican que los efectos de la
- 60 toxina-conjugado pueden abrogarse mediante el péptido estimulador del crecimiento, lo que indica seriamente una acción mediada por un receptor para la toxina conjugada.

Por lo tanto, los receptores de saposina C o TX14A en las células cancerosas son potencialmente fármacos diana y aquí se demuestra que inhiben el crecimiento, migración e invasión de las células cancerosas. Estos resultados indican

consecuencias terapéuticas claras para aquellos versados en el campo del desarrollo de terapias diana moleculares para el tratamiento del cáncer.

Ejemplo 13

Detección de prosaposina en muestras de tejidos cancerosos de pacientes con cáncer de próstata

Para ensayar prosaposina en muestras de tejidos provenientes de pacientes con cáncer de próstata, se seleccionaron secciones fijadas en formalina, montadas en parafina, de 80 especímenes (derivados de 80 personas diferentes): 13 sin cáncer de próstata (incluyendo células normales de próstata, células tumorales prostáticas benignas y células BHP) y 67 con cáncer de próstata con una suma de Gleason de 6 a 10 (la escala de Gleason es una escala empleada por patólogos para determinar la gravedad de la malignidad de un tumor dado. Cuanto mayor el número, más maligno se considera el tumor). Las secciones se encuentran en el banco de tejidos de la Universidad Estatal de Louisiana, Centro de Ciencias de la Salud. La tinción se hizo usando el sistema y reactivos inmunohistoquímicos automatizados Ventana Medical gen II (Ventana Medical, Tucson, Arizona, EE.UU.). Los tejidos fijados con formalina y montados en parafina se cortaron en secciones de 4 μm , se eliminó la parafina, y se hidrataron en xileno y etanol. Después, las secciones se incubaron en peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. A continuación, se hizo la inmunotinción usando el equipo estándar DAB (Sigma Chemical Co.) con un 20% de suero de cabra para prevenir el enlace no específico (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, California, EE.UU.). Después de 12 min, se incubaron las secciones con el anticuerpo primario de anti-prosaposina durante 32 min, haciéndose la contratinción con hematoxilina durante 4 min.

En todas las secciones de cáncer de próstata de alto grado se detectó una alta expresión de prosaposina. El nivel de expresión de prosaposina aumentó en cánceres mal diferenciados y agresivos, usando la escala de Gleason (no se muestran los datos). La expresión de la prosaposina en células normales de próstata o en células HBP en secciones de tejidos fue considerablemente menor que en las células cancerosas de próstata en casos malignos.

Por lo tanto, un indicador del nivel de malignidad de las células cancerosas de próstata es el grado de expresión de la prosaposina.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de ligando/toxina que comprende un ligando capaz de unirse al receptor de una célula cancerosa que se une a saposina C, conjugado a un grupo toxina, donde el conjugado indicado se une al receptor de la célula, y donde dicho ligando es saposina C o una prosaptida de la misma.

2. Un conjugado como el indicado en la reivindicación 1, donde la célula cancerosa se selecciona de entre el grupo formado por células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón y células de cáncer de colon.

3. Un conjugado como el indicado en la reivindicación 2, donde dicha célula cancerosa es una célula de cáncer de próstata.

4. Un conjugado de ligando/toxina que comprende un ligando capaz de unirse al receptor de una célula estromal que se une a saposina C, conjugado a un grupo toxina, donde el conjugado indicado se une al receptor de la célula y donde dicho ligando es saposina C o una prosaptida de la misma.

5. Un conjugado como el indicado en la reivindicación 4, donde el receptor de la célula estromal es un receptor encontrado en una célula estromal de próstata.

6. Un conjugado como el indicado en las reivindicaciones 1-5, donde el ligando es saposina C.

7. Un conjugado como el indicado en las reivindicaciones 1-5, donde dicho ligando es una prosaptida.

8. Un conjugado como el indicado en la reivindicación 7, donde dicha prosaptida es TX14A.

9. Un conjugado como el indicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente citotóxico se selecciona de entre el grupo formado por la toxina de la difteria, toxina ricina, toxina abrina, exotoxina de pseudomonas, toxina shiga, α -amanitina, proteína antiviral de fitolaca (PAP), proteínas inhibidoras del ribosoma (RIP), melfalan, metotrexato, mostaza nitrogenada, doxorubicina, daunomicina, un radioisótopo ionizante y otros agentes citotóxicos.

10. Un conjugado como el indicado en la reivindicación 9, donde el agente citotóxico es una proteína inhibidora del ribosoma.

11. Un conjugado como el indicado en la reivindicación 10, donde el agente citotóxico es saporina.

12. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado como el indicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un excipiente fisiológicamente aceptable.

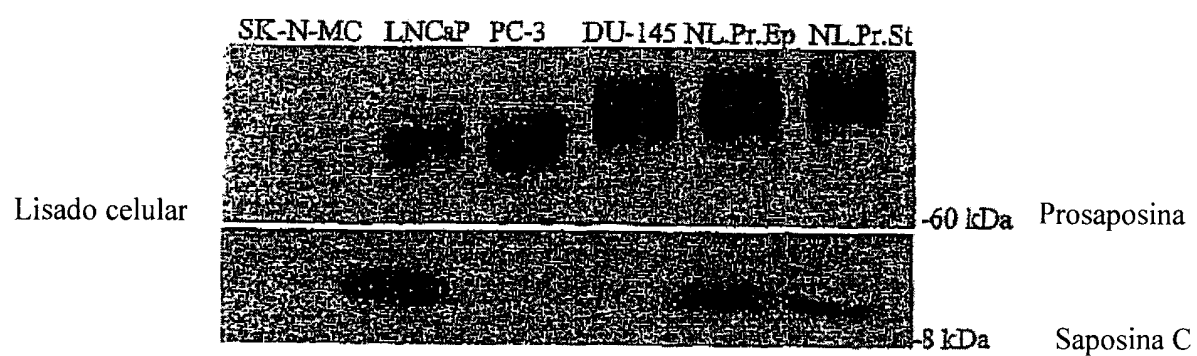


Fig. 1A

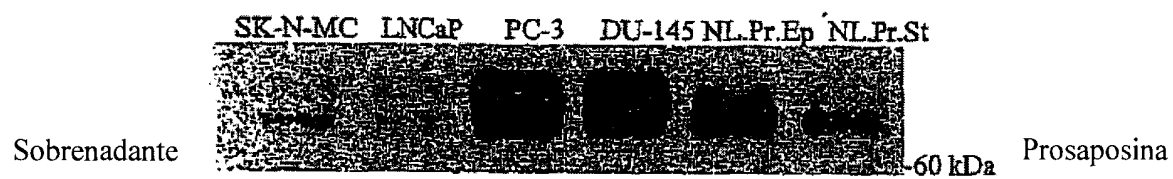


Fig. 1B

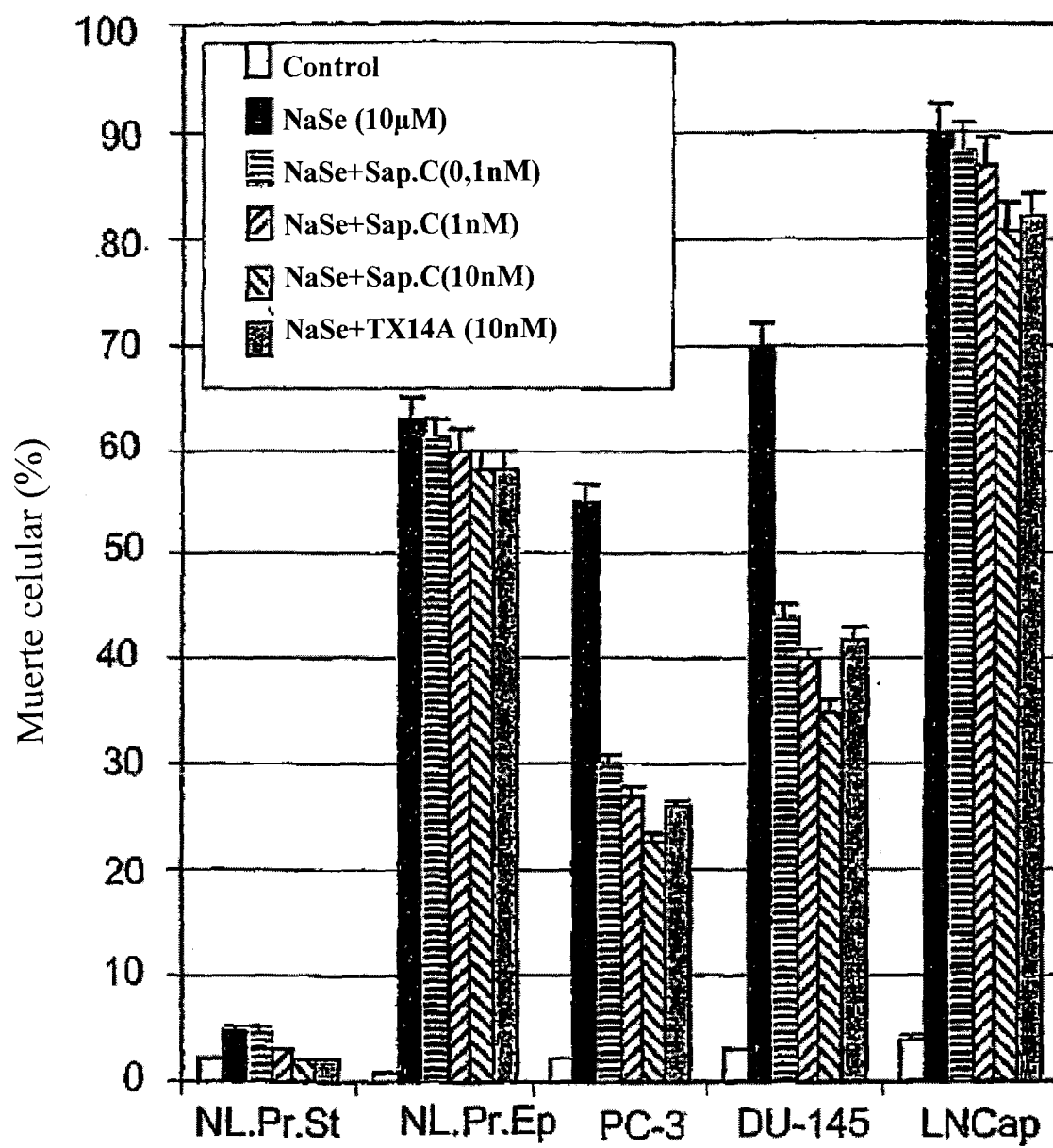


Fig. 2

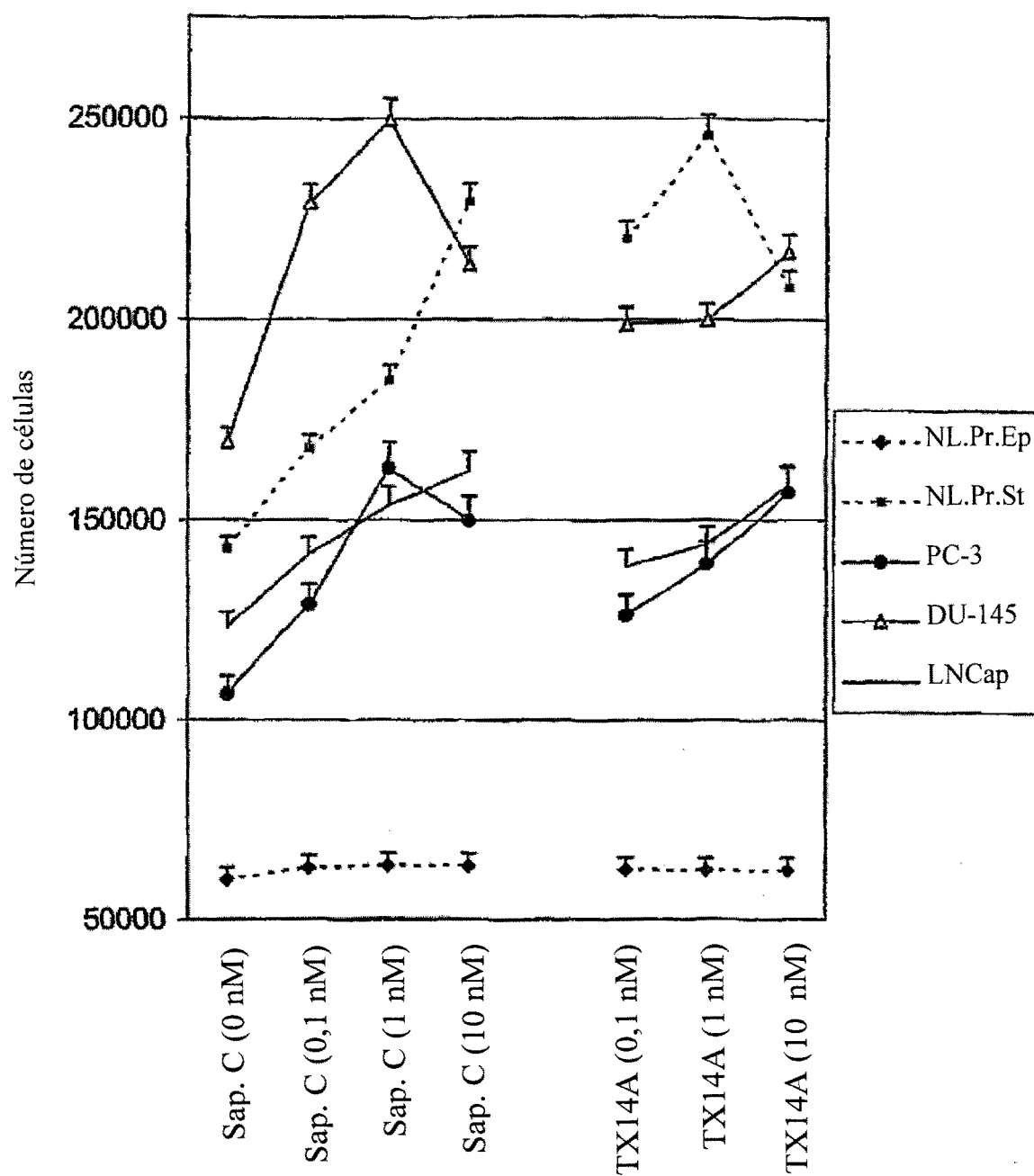


Fig. 3

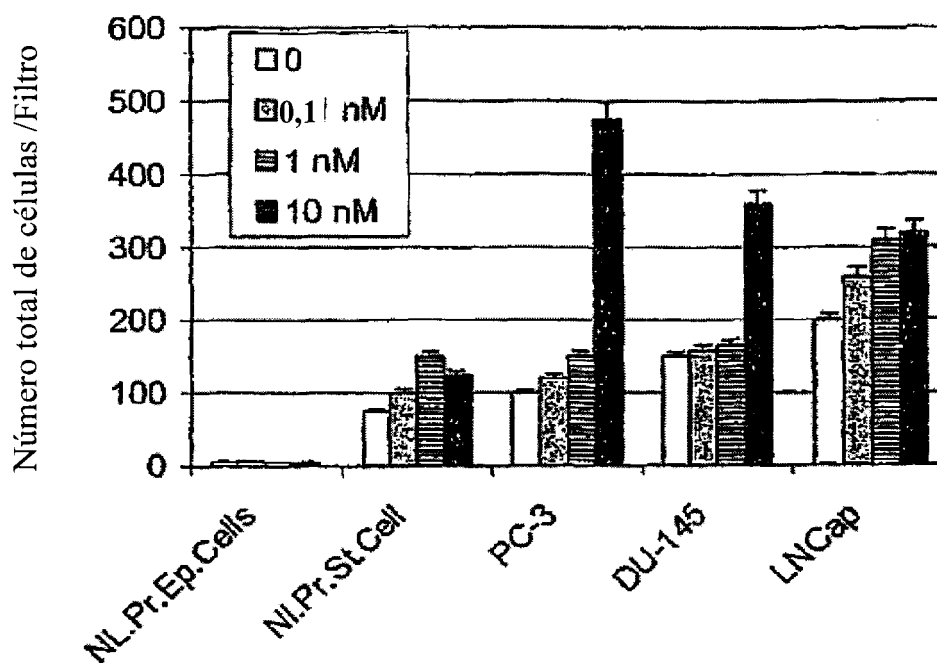


Fig. 4A

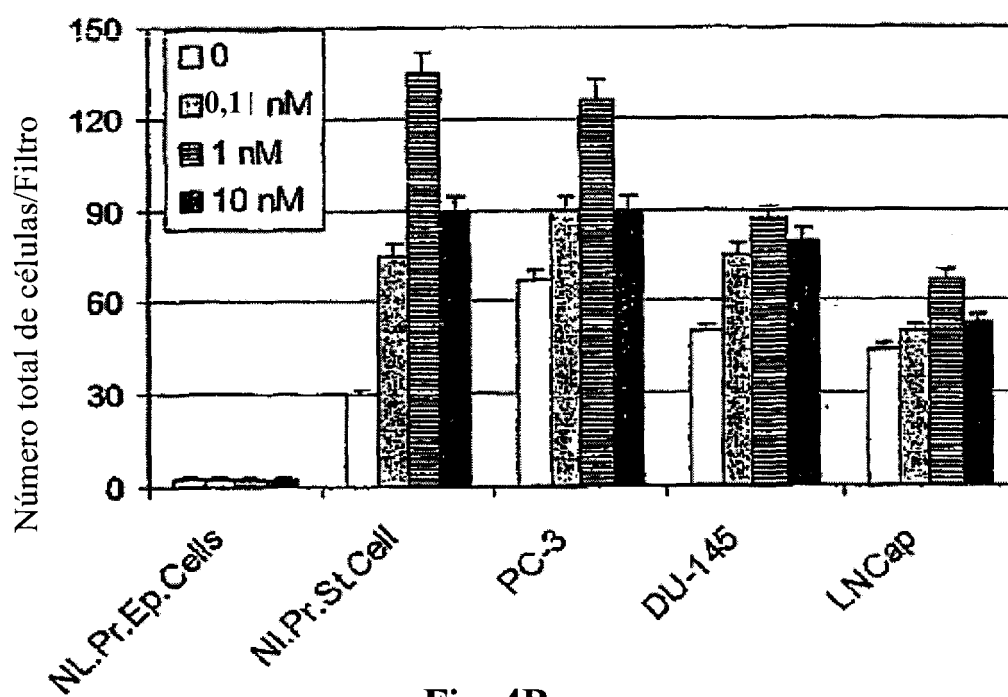


Fig. 4B

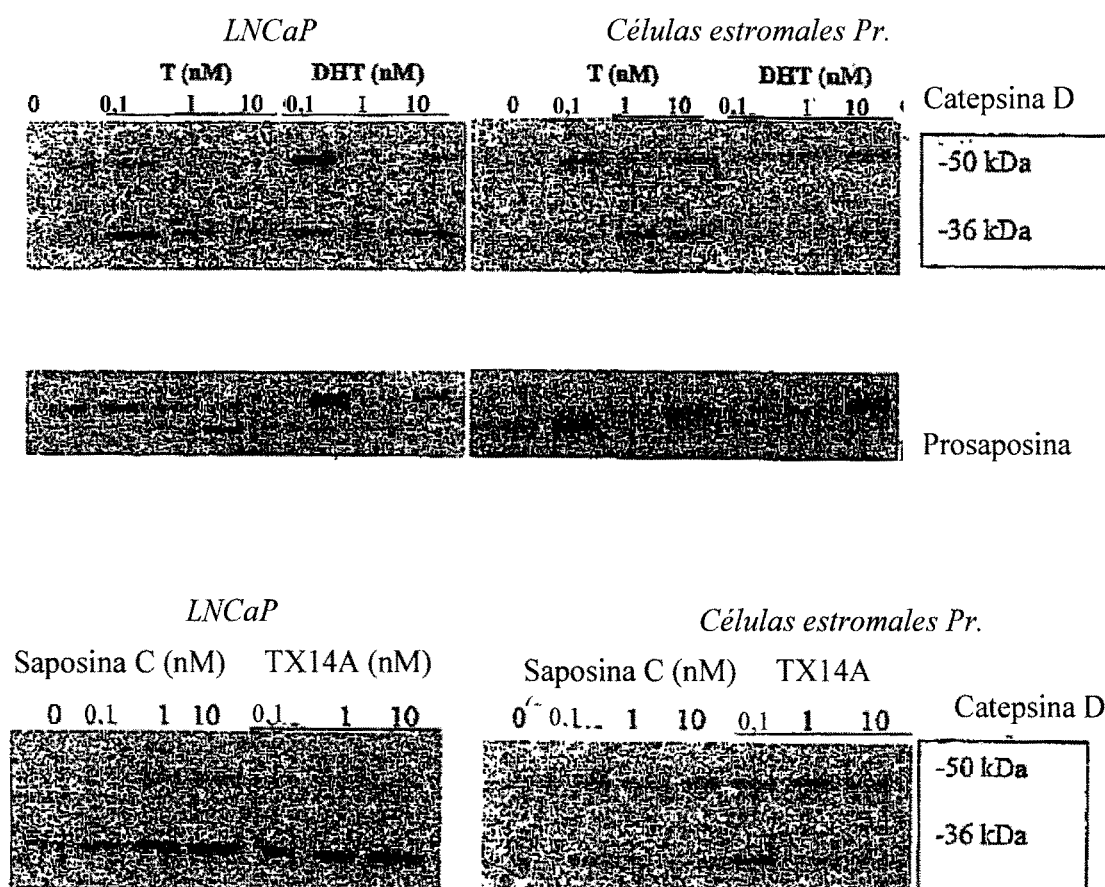


Fig. 5

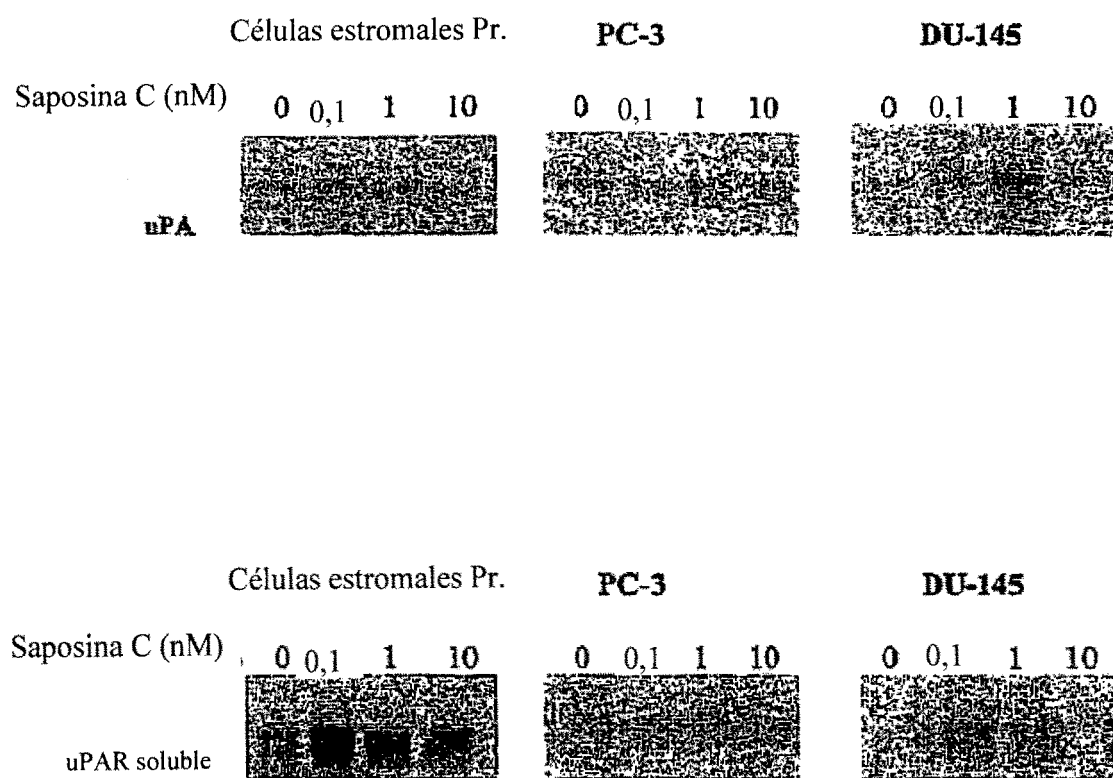


Fig. 6

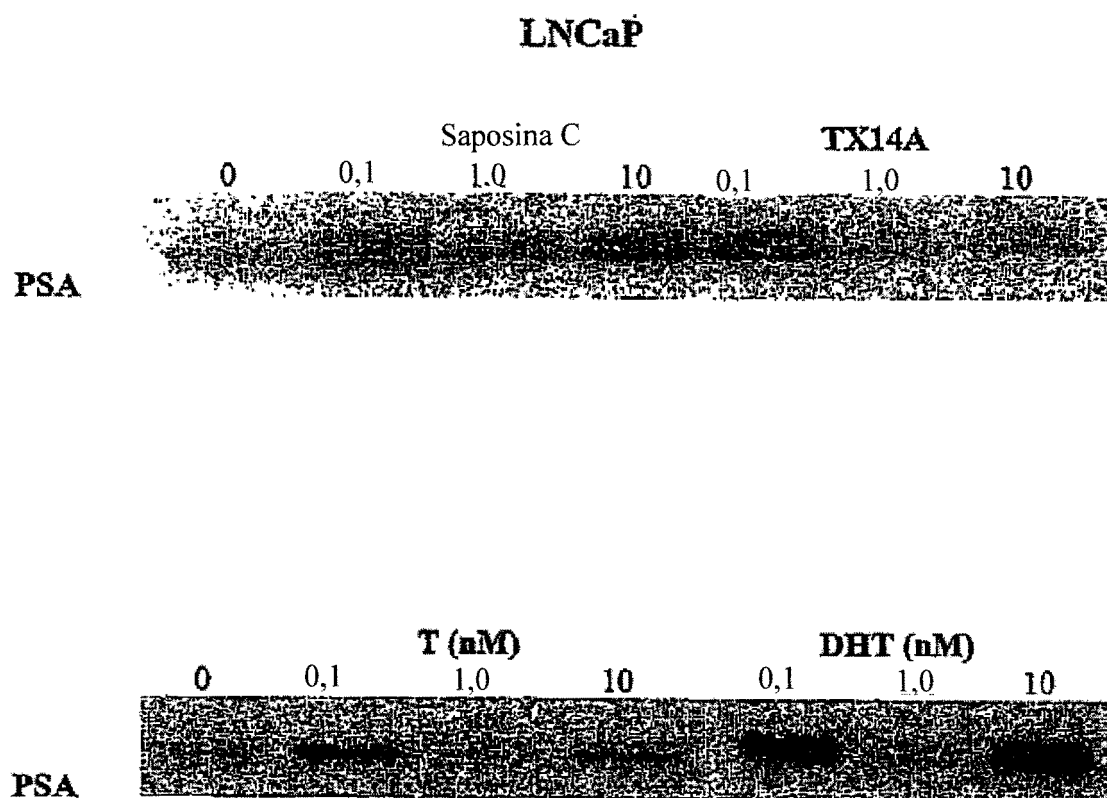


Fig. 7

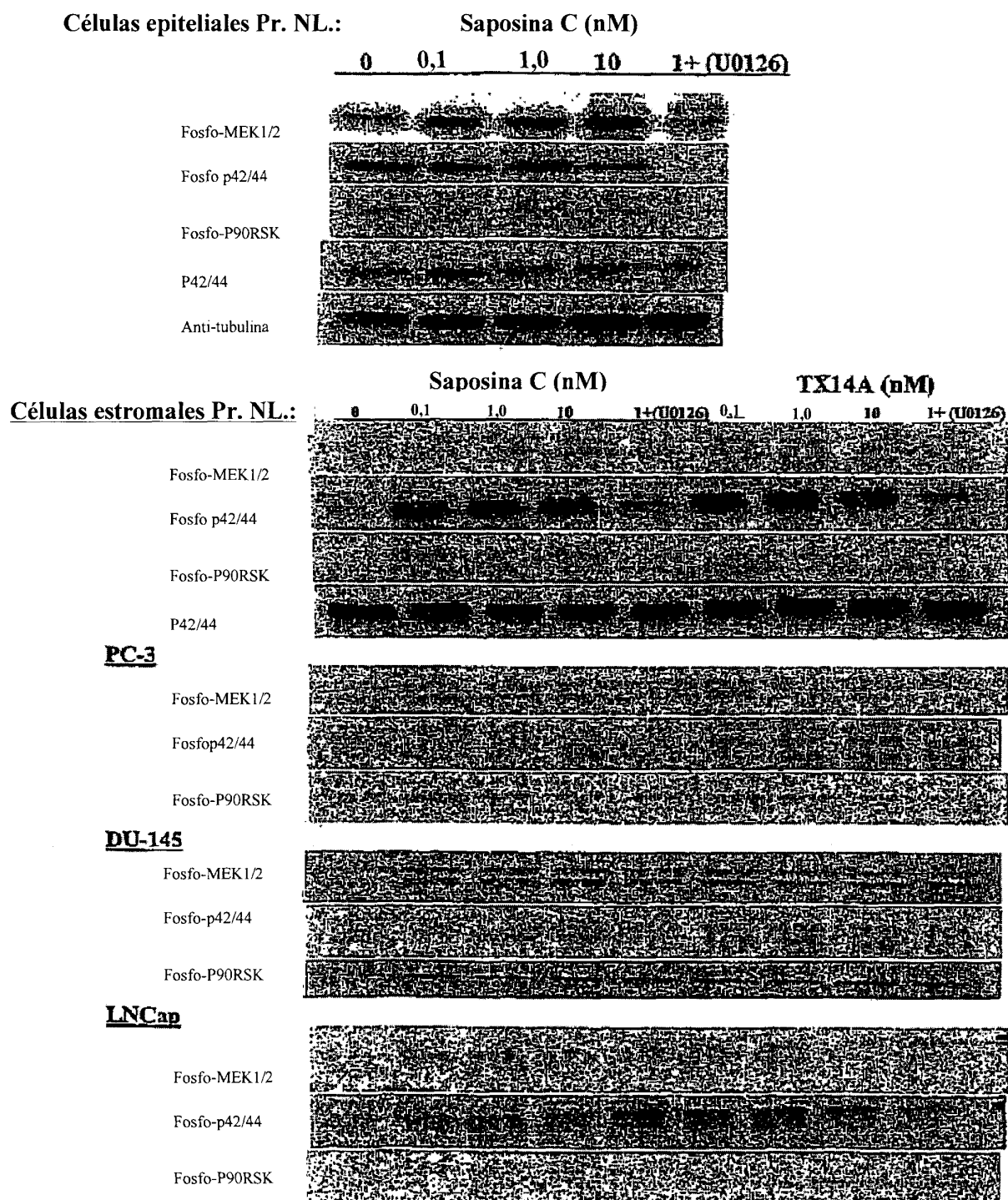


Fig. 8

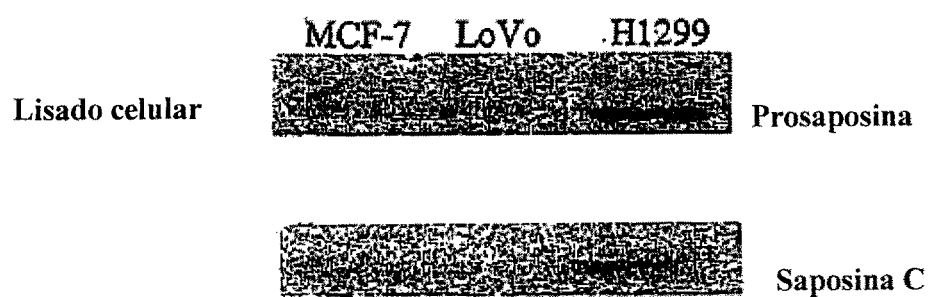


Fig. 9A



Fig. 9B

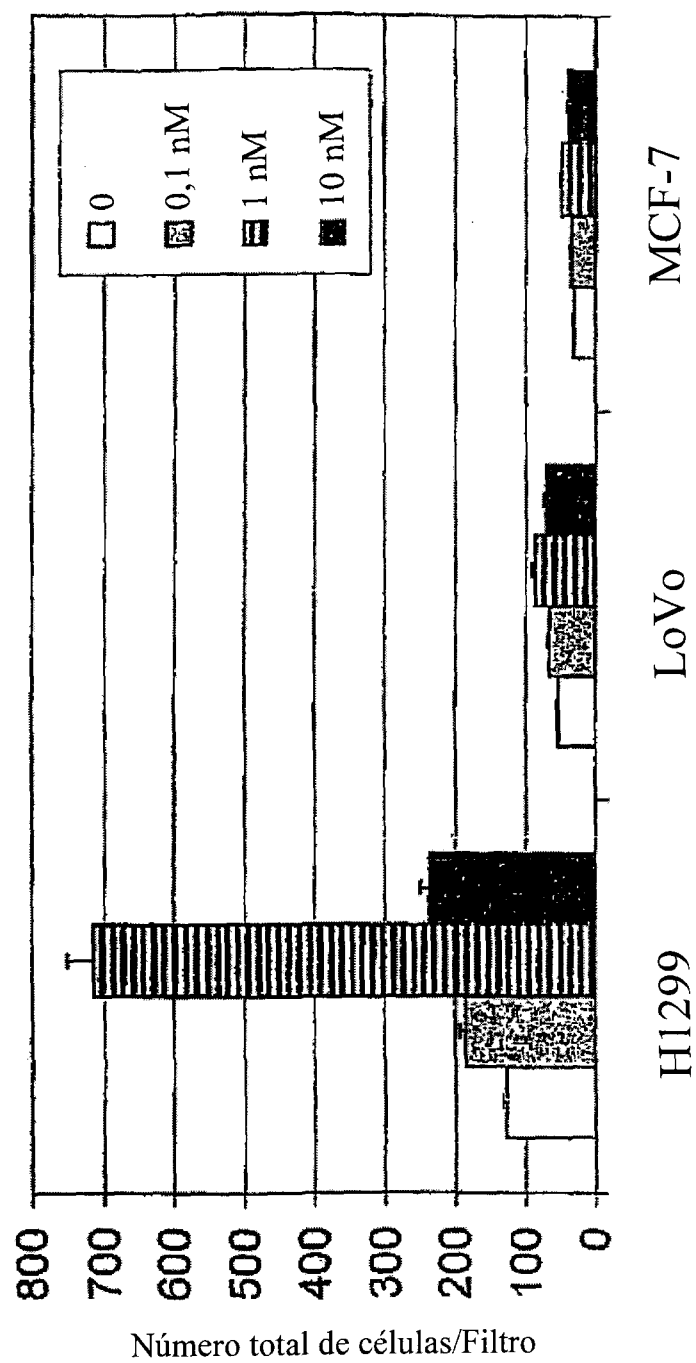


Fig. 10

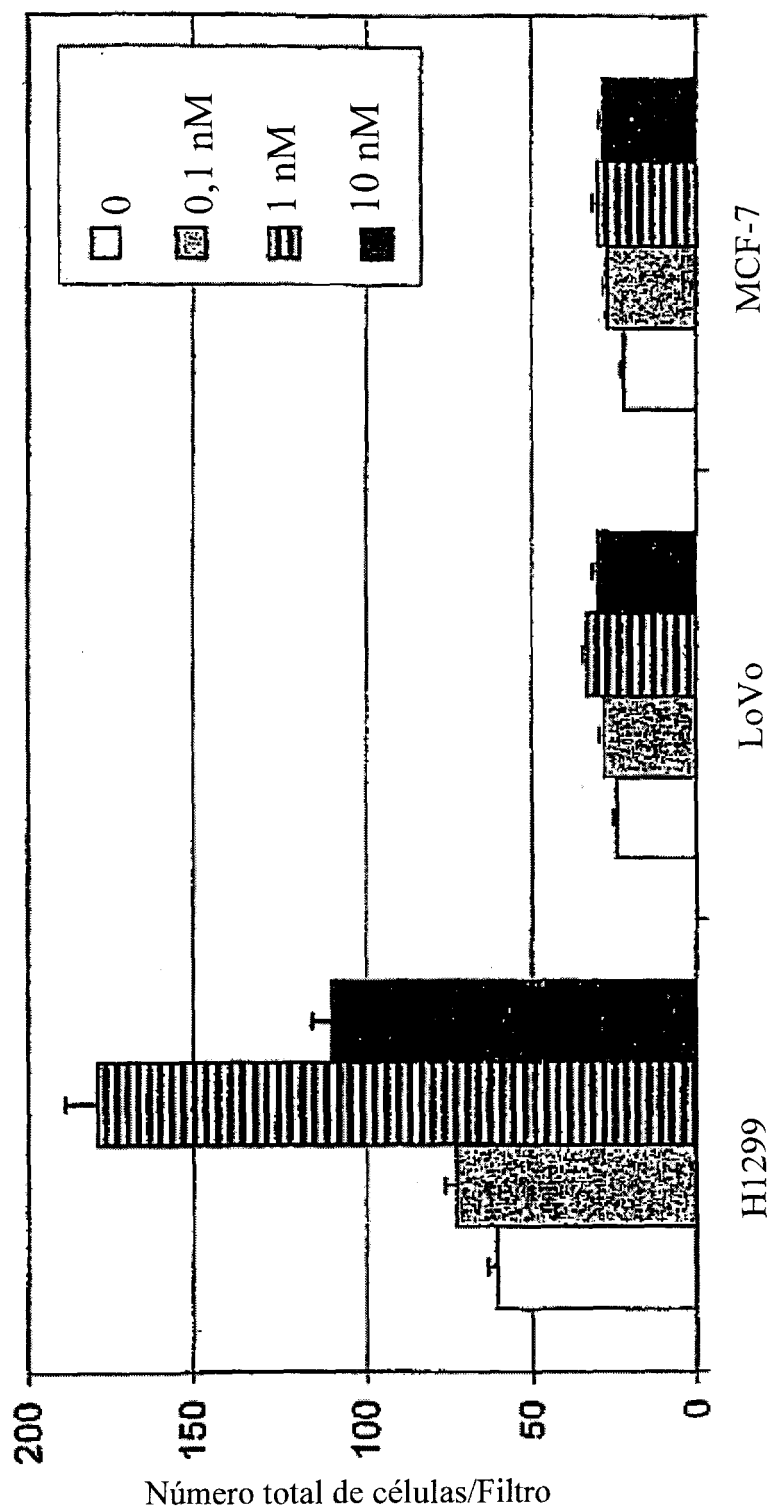


Fig. 11

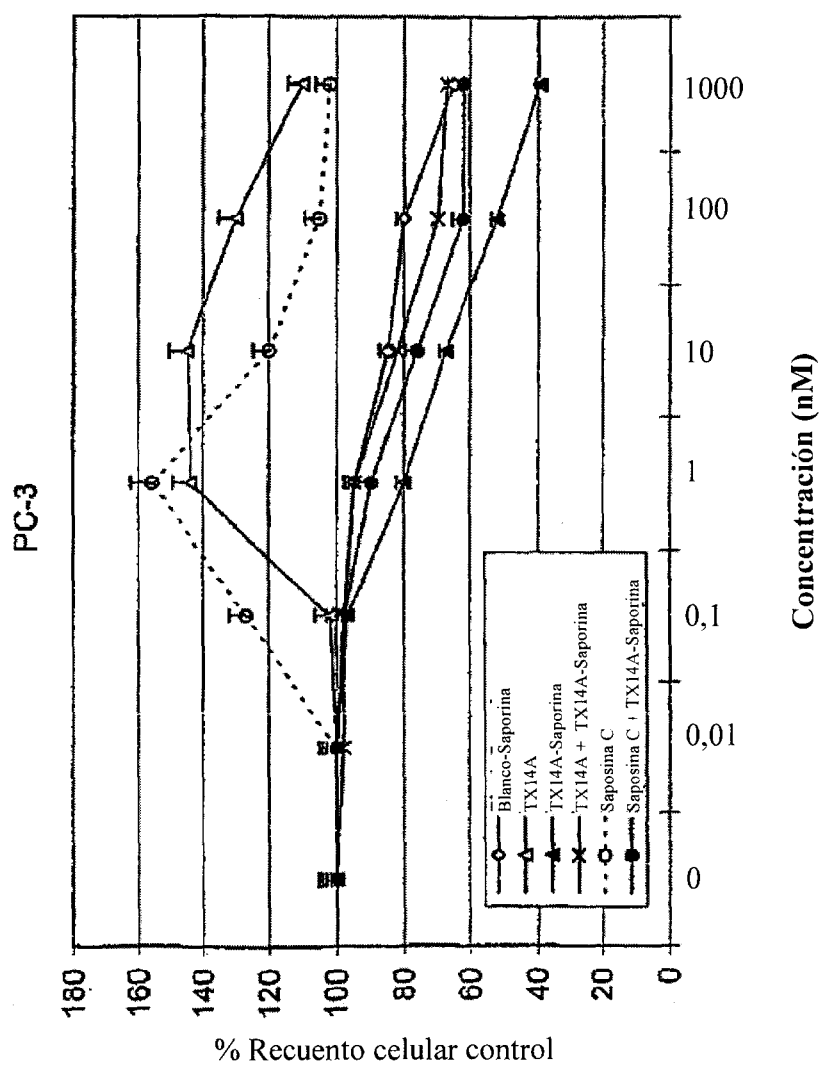


Fig. 12

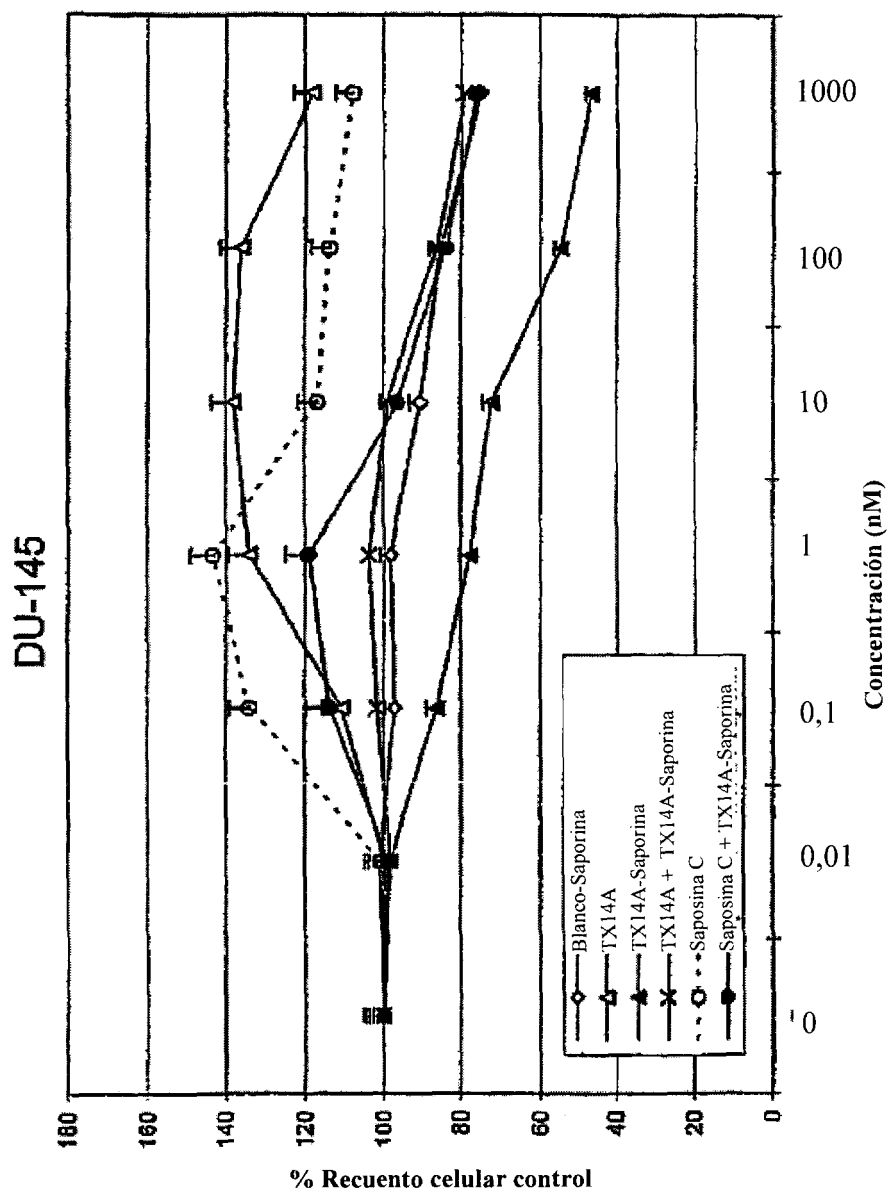


Fig. 13

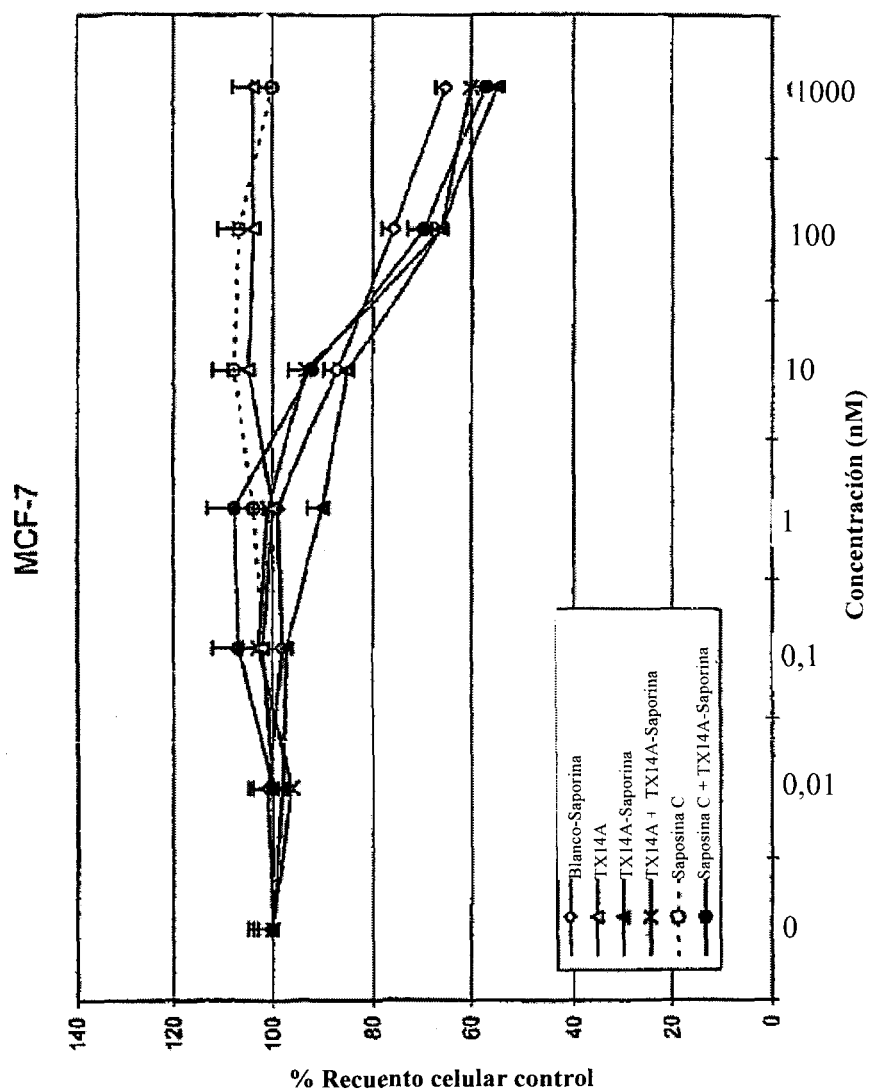


Fig. 14

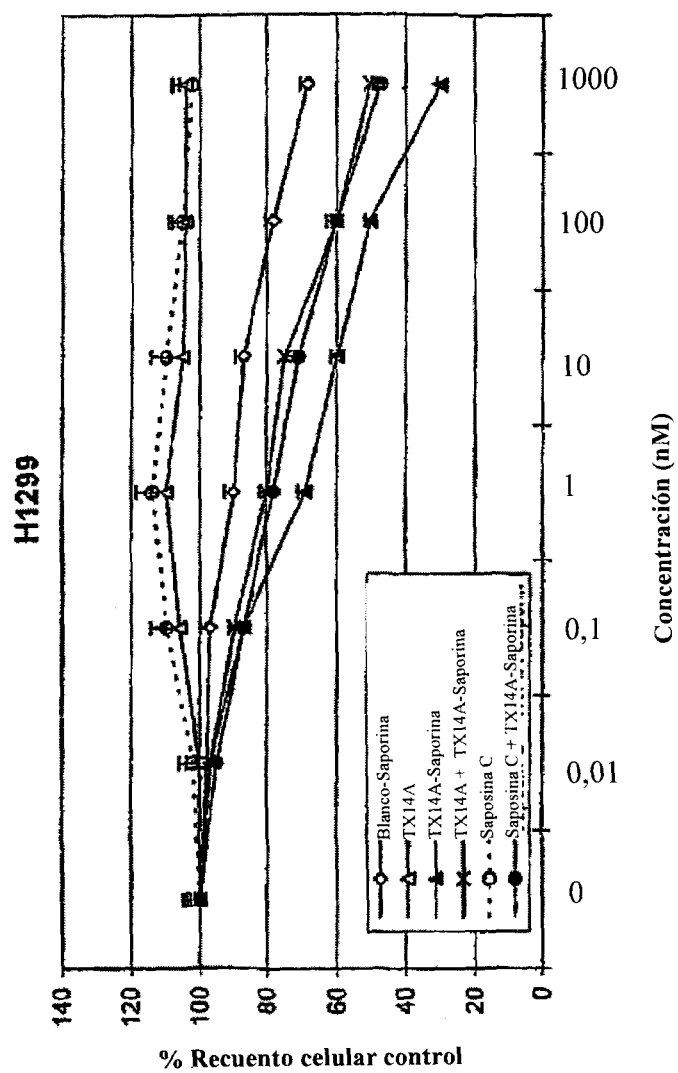


Fig. 15

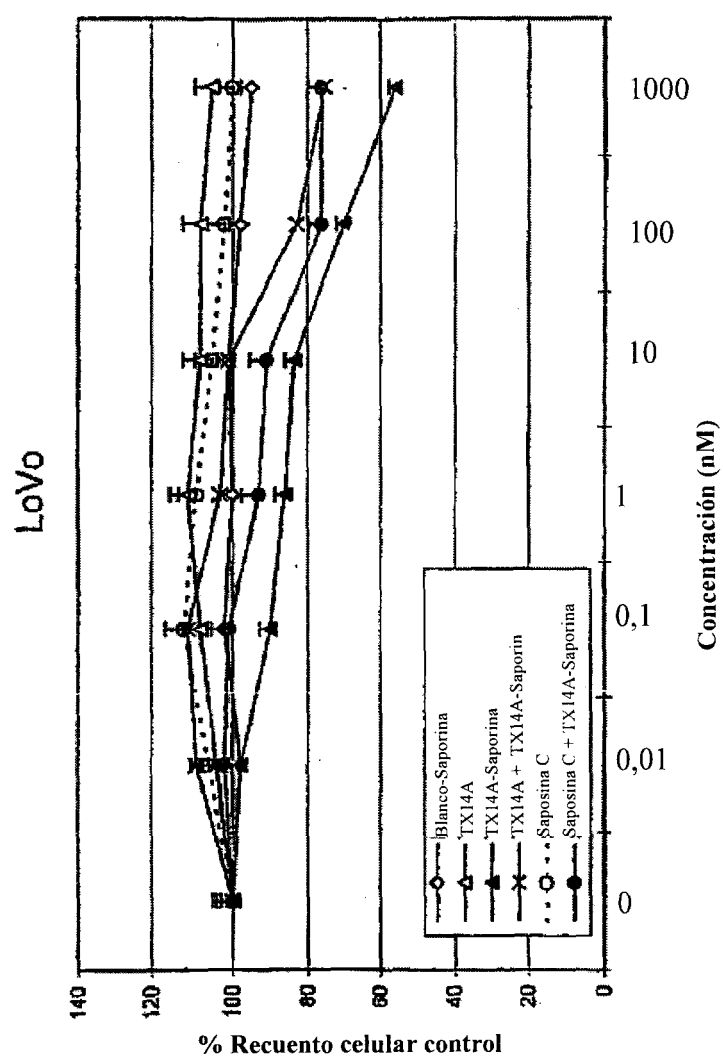


Fig. 16