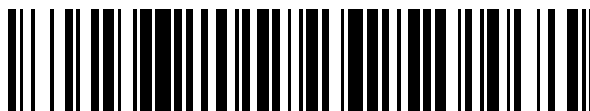


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 454**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2009** **E 09806925 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014** **EP 2328604**

54 Título: **El uso de derivados del péptido Wnt5-a para el tratamiento de melanoma y cáncer gástrico**

30 Prioridad:

13.08.2008 SE 0801791

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

23.01.2015

73 Titular/es:

WNTRESEARCH AB (100.0%)
Södra Promenaden 69
211 38 Malmö, SE

72 Inventor/es:

ANDERSSON, TOMMY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 527 454 T3

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

DESCRIPCIÓN

El uso de derivados del péptido Wnt5-a para el tratamiento de melanoma y cáncer gástrico

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a ciertos derivados de carbamato no ramificados de ciertos derivados de Wnt5- α , además de al tratamiento de melanoma usando estos derivados de Wnt5- α .

10 Antecedentes de la invención

El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos, que se encuentran predominantemente en la piel, pero también en el intestino y el ojo. Es uno de los tipos más raros de cáncer de piel, pero produce la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer de piel. El melanoma maligno es un tipo potencialmente grave de cáncer de piel. Es debido al crecimiento no controlado células del pigmento, llamadas melanocitos. A pesar de muchos años de intensa investigación de laboratorio y clínica, la única cura eficaz es la extirpación quirúrgica del tumor primario antes de que alcance un espesor superior a 1 mm.

Aproximadamente 160.000 nuevos casos de melanoma se diagnostican en el mundo cada año, y es más frecuente en hombres y caucásicos. Es más común en poblaciones caucásicas que viven en climas soleados que en otros grupos. Según el informe de la OMS, aproximadamente 48.000 muertes relacionadas con melanoma se producen en el mundo por año. El melanoma maligno representa el 75 por ciento de todas las muertes asociadas al cáncer de piel.

El tratamiento incluye la eliminación quirúrgica del tumor; tratamiento adyuvante; quimio- e inmunoterapia, o radioterapia.

El riesgo de desarrollar melanoma depende de dos grupos de factores: intrínsecos y medioambientales. Los factores "intrínsecos" son generalmente una historia familiar del individuo y genotipo heredado, mientras que el factor medioambiental más relevante es la exposición al sol. Estudios epidemiológicos sugieren que la exposición a radiación ultravioleta (UVA y UVB) es uno de los principales contribuyentes al desarrollo de melanoma. La radiación UV produce daño al ADN de las células, normalmente la dimerización de timina, que cuando no se repara puede crear mutaciones. Cuando la célula se divide, estas mutaciones se propagan a nuevas generaciones de células. Si las mutaciones se producen en oncogenes o genes supresores de tumores, la tasa de mitosis en las células que llevan la mutación pueden descontrolarse, conduciendo a la formación de un tumor. La exposición al sol extrema ocasional (produciendo "quemadura solar") está causalmente relacionada con el melanoma.

Posibles elementos significativos en la determinación del riesgo incluyen la intensidad y duración de la exposición al sol, la edad a la que se produce la exposición al sol y el grado de pigmentación de la piel. La exposición durante la infancia es un factor de riesgo más importa que la exposición en la adultez. Esto se observa en estudios de migración en Australia en los que personas tienden a retener el perfil de riesgo de su país de nacimiento si migran a Australia como adulto. Individuos con quemaduras solares con ampollas o con pelado (especialmente en los primeros veinte años de vida) tienen un riesgo significativamente mayor de melanoma. Esto no significa que la quemadura solar sea la causa del melanoma. En su lugar, está meramente estadísticamente correlacionado. La causa es la exagerada exposición a UV. Se ha mostrado que el filtro solar, aunque previene la quemadura solar, no protege de melanoma. Muchos investigadores dicen que el filtro solar puede incluso aumentar el riesgo de melanoma. Personas rubias y pelirrojas, personas con múltiples lunares atípicos o lunares displásicos y personas nacidas con lunares melanocíticos congénitos gigantes tienen un riesgo elevado.

La incidencia de melanoma ha aumentado en los últimos años, pero no está claro hasta qué grado participan los cambios en el comportamiento, en el entorno, o una detección precoz.

Para entender cómo el filtro solar puede reducir la quemadura solar y al mismo tiempo causar melanoma es necesario distinguir entre daño de ADN directo y daño de ADN indirecto. El análisis genético ha mostrado que el 92 % de todos los melanomas se produce por el daño de ADN indirecto. El melanoma familiar es genéticamente heterogéneo, y se han identificado sitios para el melanoma familiar sobre los brazos del cromosoma 1p, 9p y 12q.

Los signos y síntomas del melanoma son:

- Lesión de la piel asimétrica.
- El límite de la lesión es irregular.
- Los melanomas tienen normalmente múltiples colores.
- Es más probable que las verrugas de más de 5 mm sean melanomas que las verrugas más pequeñas.

La evolución (es decir, cambio) de una verruga o lesión puede ser una pista de que la lesión se está volviendo maligna.

Los tipos más comunes de melanoma en la piel son:

- 5
 - Melanoma superficial diseminante (SSM)
 - Melanoma nodular
 - Melanoma lentiginoso acral
 - Lentigo maligno (melanoma)

10 Cualquiera de los tipos anteriores puede producir melanina (y ser de color oscuro) o no (y ser amelanótico – no oscuro). Similarmente, cualquier subtipo puede mostrar desmoplasia (reacción fibrosa densa con neurotropismo), que es un marcador de comportamiento agresivo y una tendencia a reaparición local.

En cualquier parte:

- 15
 - sarcoma de células claras (melanoma de partes blandas)
 - melanoma de la mucosa
 - melanoma uveal

20 Las características que afectan el pronóstico son el espesor del tumor en milímetros (profundidad de Breslow), profundidad relacionada con estructuras de la piel (nivel de Clark), tipo de melanoma, presencia de ulceración, presencia de invasión linfática/perineural, presencia de linfocitos infiltrantes del tumor (si está presente, el pronóstico es mejor), localización de lesión, presencia de lesiones satélite y presencia de metástasis regionales o distantes.

25 Ciertos tipos de melanoma tienen peores pronósticos, pero esto se explica por su espesor. De forma interesante, los melanomas menos invasivos, incluso con metástasis al ganglio linfático, llevan un mejor pronóstico que los melanomas profundos sin metástasis regionales en el momento de la estadificación. Las reapariciones locales tienden a comportarse similarmente a una primaria, a menos que estén en el sitio de una amplia escisión local (a diferencia de una escisión escalonada o escisión por perforación/rasurado) ya que estas reapariciones tienden a indicar invasión linfática.

30 Cuando los melanomas se han diseminado a los ganglios linfáticos, uno de los factores más importantes es el número de nodos con tumor maligno. El grado de tumor maligno dentro de un nodo también es importante; las micrometástasis en las que el tumor maligno es solo microscópico tienen un pronóstico más favorable que las macrometástasis. En algunos casos, las micrometástasis solo pueden detectarse por tinción especial, y si el tumor maligno es solo detectable por una prueba raramente empleada conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el pronóstico es mejor. Las macrometástasis en las que el tumor maligno es clínicamente evidente (en algunos casos el cáncer sustituye completamente un nodo) tienen un pronóstico mucho peor, y si los nodos están apelmazados o si hay extensión extracapsular, el pronóstico es todavía peor.

40 Cuando hay metástasis distantes, el cáncer se considera generalmente incurable. La tasa de supervivencia a los cinco años es inferior al 10 %. La mediana de la supervivencia es de 6 a 12 meses. El tratamiento es paliativo, basándose en la prolongación de la vida y la calidad de vida. En algunos casos, los pacientes pueden vivir muchos meses o incluso años con melanoma metastásico (dependiendo de la agresividad del tratamiento). Las metástasis a la piel y los pulmones tienen un mejor pronóstico. Las metástasis al cerebro, hueso e hígado están asociadas a un peor pronóstico.

45 El melanoma aparece en diferentes estadios, que se denominan estadio 0, que es melanoma *in situ* que tiene el 100 % de supervivencia, estadio I/II, que es melanoma invasivo que tiene el 85-95 % de supervivencia, estadio II, que es melanoma de alto riesgo que tiene el 40-85 % de supervivencia, estadio III, que es metástasis regional que tienen el 25-60 % de supervivencia, estadio IV, que es metástasis distante que tiene el 9-15 % de supervivencia basada en la supervivencia a los 5 años de AJCC con tratamiento apropiado.

50 La cirugía es la primera terapia de elección para el melanoma cutáneo localizado. Dependiendo del estadio también se hace una biopsia del ganglio linfático centinela, aunque existe controversia alrededor de la evidencia del ensayo para este procedimiento. El tratamiento de melanoma maligno avanzado se realiza desde un enfoque multidisciplinar.

55 Los melanomas de alto riesgo pueden requerir tratamiento adyuvante. En los Estados Unidos, la mayoría de los pacientes con, por lo demás, buena salud empezarán hasta un año de tratamiento con interferón de alta dosis, que tiene graves efectos secundarios, pero puede mejorar el pronóstico del paciente. Esta afirmación no está soportada por toda la investigación en este momento, y en Europa el interferón normalmente no se usa fuera del alcance de los ensayos clínicos.

60 Se usan diversos agentes de quimioterapia, que incluyen dacarbazina (también llamada DTIC), se usan inmunoterapia (con interleucina-2 (IL-2) o interferón (IFN)), además de perfusión local, por diferentes centros. Pueden mostrar ocasionalmente un éxito espectacular, pero el éxito global en el melanoma metastásico está bastante limitado. La IL-2 (Proleukin®) es la primera nueva terapia autorizada para el tratamiento de melanoma

metastásico en 20 años. Los estudios han demostrado que la IL-2 ofrece la posibilidad de una remisión completa y de larga duración de esta enfermedad, aunque solo en un pequeño porcentaje de pacientes. Varios nuevos agentes y novedosos enfoques están en evaluación y son prometedores.

- 5 La radioterapia se usa frecuentemente después de la extirpación quirúrgica para pacientes con melanoma localmente o regionalmente avanzado o para pacientes con metástasis distantes no extirpables. Puede reducir la tasa de reaparición local, pero no prolonga la supervivencia.

El antecedente molecular de la progresión del melanoma se ha estudiado ampliamente y el análisis de expresión
 10 génica ha identificado varios genes diferencialmente expresados en formas invasivas de melanoma frente a melanoma menos invasivo o lunares benignos, un gen tal es Wnt-5a (Bittner y col., 2000). Wnt-5a es una proteína rica en cisteína secretada que experimenta glucosilación postraduccional y modificaciones de lípido (Kurayoshi y col., 2007). Tras su secreción, Wnt-5a actúa de uno modo auto- o paracrino, uniéndose a su receptor, en melanoma
 15 maligno se ha mostrado que Wnt-5a se une al receptor Frizzled-5 acoplado a la proteína G (Weeraratna, 2002). Se considera una proteína Wnt no canónica, que indica que no actúa principalmente mediante la ruta de señalización de β -catenina. La importancia de Wnt-5a en la progresión del cáncer se ha estudiado en diferentes tipos de cáncer durante los últimos años. Se ha mostrado que Wnt-5a tiene actividad supresora de tumores en cáncer de mama, cáncer de tiroides, linfoma, neuroblastoma, cáncer de colon y cáncer de hígado (Jönsson 2002; Kremenevskaja 2005; Liang 2003; Blanc 2005; Dejmek 2005; Liu 2008). Sin embargo, en otros tipos de cáncer como melanoma
 20 maligno y cáncer gástrico se ha mostrado un aumento de la expresión de Wnt-5a que promueve la progresión tumoral (Bittner y col., 2000; Weeraratna, 2002; Lewis y col., 2005; Kurayoshi y col., 2006). Basándose en estos resultados puede llegarse a la conclusión de que, en ciertos cánceres, una sustancia que imita los efectos de Wnt-5a podría servir para inhibir la progresión tumoral (Säfhholm, 2006), mientras que en otros cánceres, como melanoma maligno, se requeriría un inhibidor de la progresión tumoral mediada por Wnt-5a.

Con respecto a los efectos aguas abajo funcionales de la proteína Wnt-5a en melanoma maligno, solo está disponible conocimiento limitado (Weeraratna y col., 2002; Dissanayake y col., 2007). En células derivadas de
 25 muestras de tejido de melanoma se ha mostrado un aumento de la expresión de la proteína Wnt-5a que induce elevada adhesión, migración e invasión celular. En el mismo estudio, los autores también mostraron que los efectos de Wnt-5a están mediados mediante el receptor Frizzled-5 y una señal de proteína cinasa C (PKC) aguas abajo (Weeraratna y col., 2002). En un artículo más reciente, los autores muestran adicionalmente que Wnt-5a induce transición epitelial-mesenquimal (EMT) mediante una expresión inducida por PKC de Snail que conduce a una
 30 disminución en el nivel de E-cadherina, pero un aumento en el nivel de vimentina (Dissanayake y col., 2007). Sin embargo, todavía queda la duda en cuanto a la causa actual del aumento de la expresión de Wnt-5a en melanomas malignos.

En un estudio reciente por Hoek y colaboradores basado en el análisis de micromatrices de ADN se sugirió que el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) desempeña una función decisiva en la regulación de la expresión del
 40 gen Wnt-5a (Hoek y col., 2006). De forma suficientemente interesante, miembros de la superfamilia de TGF- β (Van Belle y col., 1996) y la proteína morfogénica ósea (BMP; Rothhammer y col., 2005) presentan un aumento de la expresión en melanoma maligno. Además, al menos algunos efectos funcionales de TGF- β también se solapan con los de Wnt-5a. Más específicamente, como se menciona previamente para Wnt-5a, TGF- β 1 induce EMT y un aumento en la migración de células de melanoma y el potencial metastásico (Janji y col., 1999; Gouon y col., 1996). Finalmente, tanto Wnt-5a como TGF- β 1 median en cambios en los niveles de proteína celular de E-cadherina,
 45 ciertas integrinas y metaloproteinas de la matriz (Dissanayake y col., 2007; Janji y col., 1999). Hay publicaciones de sistemas no cancerígenos que han demostrado un enlace directo entre la señalización de TGF- β y la expresión de Wnt-5a. Por ejemplo, en células mesenquimatosas de la yema del ala de pollito se ha mostrado que TGF- β aumenta la expresión de Wnt-5a, produciendo activación de PKC α y diferenciación condrogénica (Jin y col., 2006). En una publicación más reciente en ratones, se mostró que TGF- β 1 aumentaba la expresión de Wnt-5a en células
 50 epiteliales mamarias que conducía a la inhibición de la expresión ductal y ramificación lateral en la glándula mamaria en desarrollo (Roarty y Serra, 2007). Por consiguiente, la inhibición de la señalización de TGF- β podría ser posiblemente un mecanismo atractivo por el cual podría alterarse la migración y metástasis de células tumorales mediada por Wnt-5a.

55 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un derivado de Wnt5- α que va a usarse en el tratamiento de melanoma y cáncer gástrico, además de a un procedimiento de tratamiento de melanoma y cáncer gástrico.

60 **Descripción detallada de la presente invención**

En particular, la invención se refiere a derivados de carbamato no ramificados, en particular derivados de N-butoxicarbonilo de un cierto péptido Wnt5- α , y más particularmente a un derivado de carbamato no ramificado, en particular derivado de N-butoxicarbonilo del péptido

65

Otro aspecto de la invención se refiere a un derivado de carbamato no ramificado, en particular derivado de N-butoxicarbonilo del péptido anterior, para su uso en el tratamiento de melanoma y cáncer gástrico.

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un derivado de carbamato no ramificado, en particular derivado de N-butoxicarbonilo del péptido anterior, para su uso en el tratamiento de melanoma y cáncer gástrico.

En una realización preferida de la misma, la composición farmacéutica es una composición tópica.

- 10 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de melanoma administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de carbamato no ramificado, en particular derivado de N-butoxicarbonilo del péptido anterior, a un sujeto que padece melanoma y cáncer gástrico.

- 15 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento profiláctico de melanoma administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de derivado de carbamato no ramificado, en particular derivado de N-butoxicarbonilo del péptido anterior, a un sujeto que está en la zona de riesgo de obtener melanoma y cáncer gástrico.

- 20 El término derivado de carbamato no ramificado en el presente documento significa uno de los derivados del grupo derivado de N-metiloxicarbonilo, N-etiloxicarbonilo, N-n-propiloxicarbonilo o N-butiloxicarbonilo, por el cual puede preferirse el último.

La presente invención se describirá a continuación por referencia a algunos experimentos llevados a cabo.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la caracterización de las líneas celulares de melanoma A2058 y HTB63.

- 30 **A)** Análisis de la ausencia o presencia de ARNm de Wnt-5a, Frizzled-2 y Frizzled-5 en células de melanoma A2058 y HTB63. La línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 (M) sirvió de control positivo para todos estos transcritos y β -actina de control de carga. Más (+RT) y menos (-RT) indican reacciones realizadas con y sin transcriptasa inversa. Para Fzd2 y Fzd5, las reacciones de PCR se realizan sobre 3,5 veces la cantidad de ADNc usada para el control de β -actina.

- 35 **B)** Para caracterizar adicionalmente la presencia del transcrito de Wnt-5a en células HTB63, el inventor también determinó por transferencia Western los niveles celulares de proteína Wnt-5a en células A2058 y HTB63 usando Wnt-5a recombinante (rW5a) como control positivo y β -actina como control de carga. El inventor también realizó análisis de transferencia Western de medio de cultivo sin suero recogido de A2058 y células después de 48 horas para revelar la ausencia o presencia de proteína Wnt-5a secretada de estas células. La proteína recombinante Wnt-5a sirvió de control positivo. Cada uno de los resultados brevemente
40 expuestos se repitió como experimentos independientes al menos tres veces.

- La Figura 2 ilustra Foxy5, que es un agonista de Wnt-5a en células de melanoma. **A** muestra la estructura de Foxy5 (grupo formilo marcado). **B** muestra que Foxy5 (50 μ M) promueve la migración de células A2058 (ensayo de cicatrización) durante un transcurso de tiempo que consiste en 0, 16, 24, 40 y 48 horas. Las barras de error
45 representan e.e.m. Pruebas de la t para datos emparejados; * $p < 0,05$.

La Figura 3 muestra la estructura de Box5, que es un análogo modificado de Foxy5.

- La Figura 4 ilustra los efectos de Wnt-5a y un novedoso hexapéptido de N-butiloxicarbonilo, Box5, sobre la adhesión
50 y migración de células de melanoma.

- A)** Se estimularon células de melanoma A2058 con las concentraciones indicadas de Wnt-5a, se desprendieron con Versene y se resuspendieron como células individuales en medio sin suero en presencia o ausencia de Wnt-5a recombinante a las concentraciones indicadas. A continuación, se dejó que las
55 células se adhirieran en una placa de 96 pocillos. Después de un periodo de 60 min, las células no adherentes se lavaron, mientras que las células adherentes se tiñeron y se determinó su número. Este número se presenta como un porcentaje de la estimulación de control (sin Wnt-5a).

- B)** Se cultivaron células de melanoma A2058 a confluencia en una placa de 12 pocillos después de ocasionar un arañazo en cada pocillo, el medio se cambió a medio sin suero fresco que carecía (círculos
60 negros) o que contenía 0,2 μ g/ml de Wnt-5a (cuadrados blancos).

- C)** Se cultivaron células de melanoma A2058 a confluencia en una placa de 12 pocillos después de ocasionar un arañazo en cada pocillo, el medio se cambió a medio sin suero fresco en ausencia de cualquier aditivo (círculo negro), presencia de 0,2 μ g/ml de Wnt-5a solo (cuadrados blancos) o presencia de
65 0,2 μ g/ml de Wnt-5a con Box5 100 μ M (triángulo blanco).

- D)** Se cultivaron células de melanoma HTB63 a confluencia en una placa de 12 pocillos después de ocasionar un arañazo a cada pocillo, el medio se cambió a medio sin suero fresco (círculo negro), medio

acondicionado (cuadrados blancos) o medio acondicionado complementado con Box5 100 μ M (triángulo blanco). Para registrar los cambios en la migración en los paneles B-D se hizo una foto de cada arañazo/pocillo del mismo área de las células después de 0, 16, 24, 40 ó 48 horas, y la cicatrización se expresó como el porcentaje de área de la herida cerrada.

E) Antes del inicio de cada experimento, las células A2058 (las seis barras a la izquierda) y las células HTB63 (las dos barras a la derecha) se desprendieron con Versene y se resuspendieron como células individuales en medio sin suero. Las células se pre-incubaron durante 40 min con agitación continua en ausencia (barras blancas) o presencia (barras negras) de Box5 100 μ M. A continuación se añadió una alícuota de la suspensión de células que contenía 25.000 células a la cámara superior de Transwell, y la cámara inferior se llenó con medio que contenía suero (10 %). Como se indica, se añadieron 0,1 μ g/ml de Wnt-3a, 0,2 μ g/ml de Wnt-5a y/o Box5 100 μ M a la cámara superior. A continuación, se dejó que las células invadieran durante 24 horas, después de lo cual se contaron las células unidas sobre el lado inferior de la membrana. Los resultados se facilitan como media $\pm$ EEM (n= 5-7). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, y *** = $p < 0,001$, comparándose los valores con el control. (Fig. 5D, CM frente a CM + Box5, ^ = $p < 0,05$, ^^ = $p < 0,01$, y ^^ = $p < 0,001$).

La Figura 5 ilustra que Box5 no tiene efecto sobre la migración basal de células de melanoma A2058, pero puede inhibir la migración inducida por TGF β 1. **A)** Análisis de cicatrización de células A2058 en presencia ($\square$) o ausencia ($\bullet$) de Box5 100 μ M. **B)** Ensayo de cicatrización de células A2058 pre-incubadas con o sin 100 μ M de Box5 durante 40 minutos, y a continuación se estimularon adicionalmente con o sin 5 ng/ml de TGF β 1 como se indica. Todos los datos de cicatrización se expresan como porcentaje del área de la herida cerrada después de 0, 16, 40 y 48 horas.

La Figura 6 ilustra que la ruta de señalización de Wnt-5a/Ca²⁺ es esencial para la invasión de células de melanoma mediada por Wnt-5a. **A)** rWnt-5a (0,1 μ g/l; adición indicada por la flecha) desencadena una rápida señal de Ca²⁺ citosólico en células A2058. **B)** La pre-incubación de células A2058 con MAPT/AM 10 μ M durante 30 minutos suprime la estimulación de rWnt-5a (0,1 μ g/ml) (indicada por la flecha) de Ca²⁺ citosólico. **C)** MAPT/AM suprime la invasión de células A2058 inducida por Wnt-5a. Las células se pre-incubaron con MAPT/AM 10 μ M durante 30 minutos, a continuación se estimularon con/sin rWnt-5a (0,2 μ g/l), y a continuación con MAPT/AM 1 μ M durante toda la duración del experimento de invasión (24 horas), teniendo la última condición de tratamiento el mismo efecto quelante sobre Ca²⁺ que 10 μ M de MAPT/AM durante 30 minutos, mostrado en la Fig. 6A. Las barras de error representan e.e.m. Prueba de la *t* para datos emparejados; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

La Figura 7 ilustra el efecto de Box5 sobre la señalización de Ca²⁺ inducida por Wnt-5a y activación de PKC.

Se registraron las señales de fluorescencia de células de melanoma A2058 cargadas con fura-2, pre-incubadas (durante la noche) e incubadas en ausencia o presencia de Box5 (100 μ M), tras la estimulación con tanto Wnt-5a (0,1 μ g/ml), endotelina-1 (ET-1) (10 nM) como carbacol (5 μ M). **A)** Trazas de Ca²⁺ representativas de células A2058 estimuladas con Wnt-5a, endotelina-1 o carbacol, siendo los dos últimos controles de ligandos del receptor de proteína G. **B)** Dos trazas de Ca²⁺ de células de melanoma A2058 se pre-incubaron e incubaron con Box5 y a continuación se estimularon con Wnt-5a (primera flecha) y a continuación de nuevo con tanto endotelina-1 (trazo superior de la segunda flecha) como carbacol (segunda flecha en el trazo inferior). Todos los trazos son representativos de al menos cinco experimentos separados. **C)** Se muestran los resultados acumulados de cambios de Δ Ca²⁺ en los valores de relación (nivel basal con respecto a nivel pico) registrados de células A2058 estimuladas con Wnt-5a, endotelina-1 o carbacol en ausencia (barras blancas) o presencia (barras negras) de Box5. **D)** La pre-incubación con Box5 (100 μ M) durante la noche inhibe la fosforilación de MARCKS después de 45 minutos o la estimulación de rWnt-5a (0,2 μ g/ml). Se usó PMA 1 nM como indicador positivo para la fosforilación de MARCKS. Los resultados se facilitan como medias $\pm$ EEM, *** = $p < 0,001$

La Figura 8 ilustra los efectos de la señalización de TGF- β 1 sobre la expresión de proteínas Wnt-5a en células de melanoma A2058 y HTB63.

A) Transferencia Western representativa que muestra los efectos de incubar células de melanoma HTB63 en ausencia o presencia del antagonista del receptor de TGF- β 1 selectivo SB431542 (10 μ M) durante 4 ó 5 días sobre su expresión endógena de Wnt-5a. Wnt-5a recombinante sirvió de control positivo y β -actina de control de carga.

B) Transferencias Western que muestran los efectos de 24 horas de estimulación con concentraciones crecientes de TGF- β 1 sobre la expresión de Wnt-5a en células A2058. Wnt-5a recombinante sirvió de control positivo y β -actina de control de carga. **C)** Transferencias Western que muestran los efectos de la estimulación con 5 ng/ml de TGF- β 1 para aumentar los periodos de tiempo sobre la expresión de Wnt-5a en células A2058. Wnt-5a recombinante sirvió de control positivo y β -actina de control de carga. Cada uno de los resultados brevemente expuestos se repitió como experimentos independientes al menos cuatro veces.

La Figura 9 ilustra los efectos de TGF- β 1 y Box5 sobre la adhesión y migración de células de melanoma.

A) Se estimularon células de melanoma A2058 con las concentraciones indicadas de TGF- β 1, se desprendieron con Versene y se resuspendieron como células individuales en medio sin suero. A

continuación se dejó que las células se adhirieran en una placa de 96 pocillos y tras un periodo de 60 min las células no adherentes se lavaron, mientras que las células adherentes se tiñeron y se determinó su número. Este número se presenta como un porcentaje del control (sin estimulación de TGF- β 1).

B) Se cultivaron células de melanoma HTB63 a confluencia en una placa de 12 pocillos después de hacer un araño en cada pocillo, el medio se cambió a un medio sin suero fresco en ausencia (círculo negro) o presencia (cuadrado blanco) de SB431542 10 μ M.

C) Se cultivaron células de melanoma A2058 a confluencia en una placa de 12 pocillos después de ocasionar un araño a cada pocillo, el medio se cambió a un medio sin suero fresco en ausencia de cualquier aditivo (círculo negro) o presencia de 5 ng/ml de TGF- β 1 solo (cuadrado blanco) o presencia de 5 ng/ml de TGF- β 1 con 100 Box5 (triángulo blanco). En los experimentos expuestos brevemente en los paneles B y C se hizo una foto de cada araño/pocillo de la misma área de células después de 0, 16, 24, 40 ó 48 horas, y la cicatrización se expresó como porcentaje del área de la herida cerrada.

D) Antes del inicio de cada experimento, las células A2058 (las dos barras a la izquierda) y las células HTB63 (las dos barras a la derecha) se desprendieron con Versene y se resuspendieron como células individuales en medio sin suero RPMI. A continuación se añadió una alícuota de la suspensión de células que contenía 25.000 células a la cámara superior de Transwell, y la cámara inferior se llenó con medio que contenía suero (10 %). Como se indica, se dejó que las células invadieran en ausencia (barras blancas) o presencia de tanto 5 ng/ml de TGF- β 1 (barra negra) como SB431542 10 μ M (barra negra) la cámara superior. A continuación, se dejó que las células invadieran durante 24 horas, después de lo cual se contaron las células unidas sobre la cara inferior de la membrana.

Los resultados se facilitan como medias $\pm$ EEM (n= 5-10). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, y *** = $p < 0,001$

Parte experimental

Anticuerpos y péptidos

Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: Ab AC-15 monoclonal para β -actina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO); Ab policlonal de pollo para TGF- β 1 (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, RU). El anticuerpo policlonal hacia Wnt-5a se produjo en el laboratorio del inventor contra los aminoácidos 275-290 de la molécula de Wnt-5a madura, como se ha descrito previamente (Jonsson y col., 2002). La molécula completa de anti-IgY de pollo (IgG) conjugada con peroxidasa secundaria fue de Sigma Aldrich (St. Louis, MO); todas las otras IgG conjugadas con peroxidasa se obtuvieron de Dakopatts (Glostrup, Dinamarca). Inbiolabs Ltd (Tallin, Estonia) sintetizó el novedoso hexapéptido de N-butiloxycarbonilo derivado de Wnt-5a (Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu; Box5) en dos ocasiones diferentes. Los dos lotes del péptido Box5 tuvieron resultados similares en los ensayos del inventor. Los lotes sintetizados del péptido Box5 (>95 % de pureza) fueron controlados para su calidad por RP-HPLC y espectrometría de masas. El péptido de control formulado usado: formil-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys fue de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Productos químicos - Benzamidina, suero bovino, todos los tipos de medios de cultivo de tejido fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las proteínas Wnt-5a, Wnt-3a y TGF- β 1 recombinantes humanas se compraron de R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, RU). La endotelina-1 porcina humana y el carbacol se compraron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Los inhibidores de la proteasa pefabloc, leupeptina y aprotinina fueron de Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania). El inhibidor selectivo de la cinasa ALK5 similar al receptor de activina del receptor tipo I de TGF- β y sus familiares ALK4 y 7 SB431542 (Inman y col., 2002) se compraron de Tocris Bioscience (Tocris Cookson Ltd., Bristol, RU). Los reactivos de detección de quimioluminiscencia potenciada (ECL) se compraron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Estocolmo, Suecia), mientras que todos los otros reactivos de electroforesis procedieron de BioRad (Richmond, CA). Todos los otros productos químicos fueron de calidad analítica y se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Cultivo celular

La línea celular de melanoma maligno humano A2058 fue una generosa donación de László Kopper del Departamento de Patología e Investigación Experimental del Cáncer, Universidad Semmelwees, Budapest, Hungría. Las células A2058 se mantuvieron en RPMI 1640 complementado con 10 % de SBF, 5 U/ml de penicilina, 0,5 U/ml de estreptomycin y glutamina 2 mM.

La línea celular de melanoma maligno humano HTB63 (también denominada HT144) se compró de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; LGC Promochem AB, Boras, Suecia) y se mantuvo en medio 5A de McCoy complementado con 10 % de SBF, 5 U/ml de penicilina, 0,5 U/ml de estreptomycin y glutamina 2 mM.

Las células de carcinoma de mama mamario humano, MCF7 (control positivo para la expresión de Wnt-5a) se cultivaron en DMEM complementado con 10 % de SBF, 5 U/ml de penicilina, 0,5 U/ml de estreptomycin y glutamina 2 mM. Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de dióxido de carbono.

Transferencia Western

Las células o bien se lisaron directamente en 1X tampón Laemmli que contenía DTT y se hirvieron durante 10 min, o bien se lisaron en tampón que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 1 % de Triton X-100, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, 20 % de glicerol, Na₃VO₄ 1 mM e inhibidores de la proteasa (20 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de leupeptina, benzamidina 2,5 mM y pefabloc 2 mM). Las células tratadas con tampón de lisis se centrifugaron a 15.000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se determinó el contenido de proteína en cada muestra y se ajustó para garantizar carga igual de la proteína en cada carril. Después, se añadió DTT 50 mM y 5x tampón Laemmli concentrado y las muestras se hirvieron durante 5 min. Las muestras se separaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF. Para la inmunotransferencia, las membranas se bloquearon en PBS complementado con 0,2 % de Tween 20 y 1 % de leche desnatada para Wnt-5a o 3 % de leche desnatada en cuanto a todos los otros anticuerpos durante 1 h. Después, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C con el Ab primario indicado (1:25.000 para β-actina; 1:1.000 para Wnt-5a y 1:1.000 para TGF-β1) en 2 % de leche desnatada o 1,5 % de BSA. Después de un amplio lavado en PBS con 0,2 % de Tween, las membranas se incubaron durante 1 h con un Ab secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante en 2 % de leche desnatada o 1,5 % de BSA y de nuevo se lavaron ampliamente. Finalmente, los complejos de Ab-antígeno se detectaron usando quimioluminiscencia potenciada. Para volver a sondear, las membranas se desnudaron con una disolución Reblot Strong de Chemicon International (Temecula, CA). Las transferencias Western mostradas son representativas de al menos tres experimentos independientes.

RT-PCR

Se llevó a cabo extracción de ARN usando TRIzol[®] de Invitrogen () según las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se midió usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Bio-Rad (Hercules CA)). Antes de la transcripción inversa, el ARN se trató con 1 U/µl de DNasa I (Invitrogen). Se sintetizó ADNC, usando hexámeros aleatorios de Fermentas (Helsingborg, Suecia), 1-2 µg de ARN total usando M-MuLV RT (Fermentas, Helsingborg, Suecia). Las reacciones de PCR en un volumen de 50 µl usaron 5 µl de reacción RT en 1X tampón Taq polimerasa (Tris-HCl 75 mM, [NH₄]₂SO₄ 20 mM, 0,01 % de Tween 20), con la adición de MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 200 mM, 1 µM de cada cebador y 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Fermentas, Helsingborg, Suecia). Los cebadores de PCR fueron los siguientes: Wnt-5a directo: 5'-GGATTGTTAACTCAACTCTC-3' (SEC ID NO: 16); Wnt-5a inverso: 5'-ACACCTCTTTCCAAACAGGCC-3' (SEC ID NO: 17); β-actina directo: 5'-TTCAACACCCAGCCATGTA-3' (SEC ID NO: 18); β-actina inverso: 5'-TTGCCAATGGTGATGACCTG-3' (SEC ID NO: 19); Frizzled-2 directo: 5'-ACATCGCCTACAACCAGACC-3' (SEC ID NO: 20) y Frizzled-2 inverso: 5'-CTCGCCCAGAACTTGTAGC-3' (SEC ID NO: 21); Frizzled-5 directo: 5'-ACACCCGCTCTACAACAAGG-3' (SEC ID NO: 22) y Frizzled-5 inverso: 5'-CGTAGTGATGTGGTTGTGC-3' (SEC ID NO: 23).

Las RT-PCR mostradas en la Figura 1 son representativas de al menos tres experimentos independientes.

Adhesión celular

Las células pre-tratadas y estimuladas como se describen a continuación se desprendieron con Versene, se resuspendieron en medio RPMI sin suero y las muestras que contenían 30.000 células de cada grupo de tratamiento se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se dejó que las células se adhirieran durante 60 min a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de dióxido de carbono después de que las células no adherentes se lavaran con PBS. Las células adherentes se fijaron en 1 % de glutaraldehído durante 10 min a temperatura ambiente y a continuación se tiñeron con 0,5 % de cristal violeta en 20 % de metanol durante 10 min. Finalmente, la tinción de cada grupo de células se disolvió en 50 % de ácido acético. La cantidad de tinte disuelta de cada pocillo se midió después en un lector de placas Fluostar (BMG Lab Technologies GmbH, Offenberg, Alemania) a 544 nm. Las muestras individuales de cada experimento separado se analizaron en cuadruplicado y los datos acumulados se basaron en 5 experimentos separados. Los resultados se ilustran en la Fig. 4.

A) Se estimularon células de melanoma A2058 con las concentraciones indicadas de Wnt-5a, se desprendieron con Versene y se resuspendieron como células individuales en medio sin suero en presencia o ausencia de Wnt-5a recombinante a las concentraciones indicadas. A continuación, se dejó que las células se adhirieran en una placa de 96 pocillos. Después de un periodo de 60 min, las células no adherentes se lavaron mientras que las células adherentes se tiñeron y se determinó su número. Este número se presenta como un porcentaje de la estimulación del control (sin Wnt-5a) (Fig. 4A)

B) Se cultivaron células de melanoma A2058 a confluencia en una placa de 12 pocillos después de ocasionar un araño en cada pocillo, el medio se cambió a medio sin suero fresco que carecía (círculo negro) o que contenía 0,2 µg/ml de Wnt-5a (cuadrados blancos). (Fig. 4B)

C) Se cultivaron células de melanoma A2058 a confluencia en una placa de 12 pocillos después de ocasionar un araño en cada pocillo, el medio se cambió a medio sin suero fresco en ausencia de cualquier aditivo (círculo negro), presencia de 0,2 µg/ml de Wnt-5a solo (cuadrados blancos) o presencia de 0,2 µg/ml de Wnt-5a con Box5 100 µM (triángulo blanco). (Fig. 4C)

D) Se cultivaron células de melanoma HTB63 a confluencia en una placa de 12 pocillos después de ocasionar un arañazo a cada pocillo, el medio se cambió a medio sin suero fresco (círculo negro), medio acondicionado (cuadrados blancos) o medio acondicionado complementado con Box5 100 μ M (triángulo blanco). Para registrar los cambios en la migración en los paneles B-D se hizo una foto de cada arañazo/pocillo del mismo área de las células después de 0, 16, 24, 40 ó 48 horas, y la cicatrización se expresó como el porcentaje de área de la herida cerrada. (Fig. 4D)

E) Antes del inicio de cada experimento, las células A2058 (las seis barras a la izquierda) y las células HTB63 (las dos barras a la derecha) se desprendieron con Versene y se resuspendieron como células individuales en medio sin suero. Las células se pre-incubaron durante 40 min con agitación continua en ausencia (barras blancas) o presencia (barras negras) de Box5 100 μ M. A continuación se añadió una alícuota de la suspensión de células que contenía 25.000 células a la cámara superior de Transwell, y la cámara inferior se llenó con medio que contenía suero (10 %). Como se indica, se añadieron 0,1 μ g/ml de Wnt-3a, 0,2 μ g/ml de Wnt-5a y/o Box5 100 μ M a la cámara superior. A continuación, se dejó que las células invadieran durante 24 horas, después de lo cual se contaron las células unidas sobre el lado inferior de la membrana. Los resultados se facilitan como media $\pm$ EEM (n= 5-7). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, y *** = $p < 0,001$, comparándose los valores con el control. (Fig. 4D, CM frente a CM + Box5, ^ = $p < 0,05$, ^^ = $p < 0,01$ y ^^ = $p < 0,001$).

Ensayo de cicatrización

Se sembraron células en placas de 12 pocillos y se dejó que crecieran en una capa confluyente en RPMI completo (para células A2058) o medio 5A de McCoy completo (para células HTB63). Como se indica, las células se pre-incubaron con el péptido Box5 (100 μ M) o disolvente de control durante 40 min con agitación continua. A continuación se causó una herida haciendo un arañazo a través de la capa confluyente de células con una punta de pipeta. Durante el periodo de migración del ensayo, las células se incubaron tanto en medio sin suero como en el caso de células HTB63 en su propio medio acondicionado libre de suero recogido de células cultivadas durante 48 h y se usó en el plazo de 2 días después de la recogida. Las condiciones exactas de cada experimento se han descrito anteriormente. Para evitar la pérdida de actividad, el medio de células se cambió después de 24 horas. Se hizo una foto para cada arañazo en la misma área de las células a las 0, 16, 24, 40 y 48 horas, y se midió la cicatrización como el porcentaje de área de la herida cerrada. Para cada condición experimental la cicatrización se analizó por triplicado. Todos los datos se basaron en 3 a 8 experimentos separados como se indica.

Invasión celular

La invasión celular se analizó usando el ensayo en cámara de invasión BD Matrigel™ (BD Biosciences, Bedford, MA). Antes del inicio de cada experimento, las células se desprendieron con Versene y se resuspendieron como células individuales en medio RPMI sin suero. Como se indica, las células se pre-incubaron con el péptido Box5 (100 μ M) o disolvente de control durante 40 min con agitación continua. A continuación se añadió una alícuota de la suspensión de células que contenía 25.000 células y Box5 100 μ M o disolvente de control a la cámara superior de Transwell, y la cámara inferior se llenó con medio que contenía suero (10 %). Simultáneamente, Wnt-5a, Wnt-3a o el de inhibidor de TGF- β 1 SB431542 se añadieron a la cámara superior como se indica en la Figura 7. Las cámaras de invasión se agitaron horizontalmente durante 5 min para garantizar incluso la distribución de las células en suspensión y posteriormente a través de la superficie de la membrana. Se dejó que las células invadieran durante los periodos de tiempo indicados a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂. El medio se desechó y las células se fijaron en 4 % de paraformaldehído durante 10 min. Las células se tiñeron con 0,5 % de cristal violeta en 20 % de metanol durante 10 min y las células no invasoras sobre el lado interno de la membrana se eliminaron con un aplicador con punta de algodón. Se cortó la membrana de la cámara usando una hoja de bisturí y se contaron las células teñidas sobre el lado de la cámara inferior de la membrana.

Determinación de niveles de calcio citosólicos

Se incubaron células cultivadas sobre un cubreobjetos de vidrio con fura-2/AM 4 μ M en medio de cultivo durante 30 minutos a 37 °C (Dejmek y col., 2006). Después de la carga de fura-2 de las células, los cubreobjetos se lavaron y se montaron en un cámara especialmente diseñada a la que se añadió un medio que contenía calcio (NaCl 136 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,1 mM, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 5 mM, glucosa 5,5 mM y HEPES 20 mM, pH 7,4). A continuación, la cámara se colocó en un sistema que consiste en un microscopio Diaphot de NIKON conectado a un sistema de obtención de imágenes de Photon Technology International (PTI). Se permitió primero que las células reposaran durante 10 minutos antes de realizarse cualquier estimulación. A continuación se registró la fluorescencia de fura-2 continuamente de las células antes y después de las estimulaciones con tanto Wnt-5a, endotelina-1 como carbacol (como se indica en la leyenda de la Fig. 8) usando una longitud de onda de excitación rápidamente alternante entre 340 y 380 nm, mientras que la longitud de onda de emisión se fijó a 510 nm. Las relaciones de intensidad de fluorescencia (340/380 nm) se calcularon posteriormente y se analizaron usando el software PTI Imagen Master. *Análisis estadístico* – Se usó la prueba de la *t* de Student para muestras independientes para analizar diferencias en los experimentos, en la que * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$

Caracterización de las líneas celulares de melanoma A2058 y HTB63

Para investigar adicionalmente los efectos de la expresión y señalización de Wnt-5a en células de melanoma se decidió usar dos líneas celulares de melanoma humano diferentes, A2058 y HTB63. Ambas células de melanoma A2058 y HTB62 expresan receptores Frizzled-5 (Fig. 1A), el receptor de Wnt-5a propuesto en células de melanoma (Weeraratna 2002). A diferencia, se observó una expresión mucho más débil de receptores Frizzled-2 en líneas celulares. La caracterización adicional reveló que las células A2058 carecen de una expresión endógena de ARNm de Wnt-5a y proteína, mientras que las células HTB63, a diferencia, presentan una sólida expresión endógena de ARNm de Wnt-5a (Fig. 1A) y proteína (Fig. 1 B).

Con el fin de determinar que Wnt-5a endógena expresada en células HTB63 es de hecho secretada, se analizaron los medios en los que las células se cultivaron por transferencia Western para la presencia de Wnt-5a. La transferencia inferior en la Figura 1B revela claramente que las células HTB63 no solo expresan, sino que también secretan, Wnt-5a. Se usaron las células de cáncer de mama MCF-7 que expresan Wnt-5a y Frizzled-5 y Wnt-5a recombinante como controles positivos en estos experimentos. Estos datos sugieren que la expresión de Wnt-5a en estas líneas celulares está regulada al nivel transcripcional, que es a diferencia del tejido de cáncer de mama y células, en las que está regulada al nivel traduccional (Dejmek, Leandersson). Hasta la fecha se desconocen los factores que regulan la transcripción de Wnt-5a en células de melanoma.

Desarrollo de un péptido antagonista de Wnt-5a

Previamente, el inventor ha identificado un hexapéptido formulado en N derivado de Wnt-5a (Foxy5; Fig. 2A) que funciona de agonista de la señalización de Wnt-5a. Este péptido imita los efectos de Wnt-5a en líneas celulares de cáncer de mama, y posee funciones anti-tumorigénicas *in vivo*. Se encontró que Foxy5 también podría imitar los efectos pro-migratorios de Wnt-5a en células de melanoma A2058 (Fig. 2B), sugiriendo que este péptido funciona como agonista de Wnt-5a en diversos tipos de células. De forma interesante, se ha mostrado previamente que la modificación específica de un péptido quimiotáctico derivado de bacterias formulado (formil-Met-Leu-Phe), convirtió la molécula de un agonista en un análogo de antagonista. Se ha mostrado ahora que una modificación tal de Foxy5 también podría cambiar sus funciones agonistas de Wnt-5a a las de un antagonista. Este péptido t-boc-Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu se ha llamado Box5 (Fig. 3)

Efectos de Wnt-5a y el hexapéptido de N-butiloxicarbonilo Box5 sobre la adhesión y migración celular

Se probaron los efectos de Wnt-5a sobre la adhesión de células de melanoma A2058. Wnt-5a potenció la capacidad adhesiva de las células de melanoma A2058 y se obtuvo un efecto máximo tras la estimulación con 0,2 µg/ml (Fig. 4A). Basándose en estos hallazgos se exploró a continuación cómo esta concentración de Wnt-5a recombinante afectó la migración de células A2058 en un ensayo de cicatrización. Los resultados expuestos brevemente en la Figura 4B muestran claramente que la adición de Wnt-5a (0,2 µg/ml) al inicio de los experimentos aumentó la migración de células de melanoma A2058. Para inhibir específicamente esta migración inducida por Wnt-5a de células de melanoma, posteriormente se desarrolló y se probó un péptido novedoso y modificado con N-butiloxicarbonilo. Se ha mostrado previamente que un hexapéptido formulado derivado de Wnt-5a puede imitar el efecto inhibidor de Wnt-5a sobre la migración de células de cáncer de mama *in vitro* (Säfhholm 2006) y que este péptido también inhibe la metástasis de cáncer de mama en un modelo de ratón (Säfhholm, 2008). Aquí se probó la posibilidad de añadir un grupo butiloxicarbonilo al residuo de metionina del extremo N del hexapéptido para obtener un inhibidor de la señalización de Wnt-5a. La base de esta manipulación es el hallazgo de que se ha informado que una modificación tal de un péptido quimiotáctico bacteriano (formil-Met-Leu-Phe) cambia la acción del péptido de un agonista a un antagonista (Derian, 1996). Se probó la capacidad de este hexapéptido modificado con butiloxicarbonilo, denominado en lo sucesivo Box5, para inhibir la migración de tanto células de melanoma A2058 como HTB63 en un ensayo de cicatrización. Box5 suprimió la migración inducida por Wnt-5a de células A2058 (Fig. 4C), pero no tuvo efecto sobre la migración intrínseca de aquellas células que carecen de expresión endógena (Fig. 5A). También se mostró que la migración mediada por TGF1β de células A2058 podría bloquearse por pre-incubación con Box5 (Fig. 5B) Estos datos también están soportados por los hallazgos de que Box5, pero no un hexapéptido de control formulado (datos no mostrados), inhibe la migración de células HTB63 al mismo grado que un cambio de los medios acondicionados (que contienen Wnt-5a secretado) a un medio sin suero fresco (que carece de Wnt-5a) (Fig. 4D). El ensayo de cicatrización investiga la migración de células presentes en una monocapa que se caracteriza por numerosas interacciones célula-célula. Sin embargo, no refleja la situación *in vivo* en la que las células tumorales son obligadas a invadir la matriz extracelular y, por tanto, a continuación se realizaron experimentos similares en un ensayo de invasión.

Durante el proceso metastásico, las células tumorales necesitan invadir la matriz extracelular, de manera que se probó la eficacia de Box5 para bloquear la invasión celular en un modelo de cultivo celular tridimensional. La adición de Box5 suprimió la invasión inducida por Wnt-5a de células A2058, un efecto no observado cuando las células se estimularon con el ligando de Wnt canónico, Wnt-3a (Fig. 4E). Box5 también tuvo la capacidad de inhibir la invasión de células HTB63, antagonizando los efectos de Wnt-5a endógena (Fig. 4E). Conjuntamente, estos datos muestran que Box5 es un potente antagonista de la migración e invasión mediada por Wnt-5a de células de melanoma, siendo ambos componentes esenciales del proceso metastásico.

Los resultados obtenidos en el ensayo de cicatrización se confirmaron en el ensayo de invasión con respecto a la capacidad de Wnt-5a para estimular la invasión de células de melanoma A2058. Además, este efecto de Wnt-5a sobre la invasión de células de melanoma no se observó cuando las células se estimularon con el ligando canónico Wnt-3a. De nuevo, la adición del péptido Box5 suprimió la invasión inducida por Wnt-5a de células de melanoma A2058, pero no tuvo efecto sobre su invasión basal. Además, Box5 también podría inhibir la invasión de células de melanoma HTB63 que tuvieron una expresión y secreción endógena de Wnt-5a.

La ruta de señalización Wnt/Ca²⁺ es esencial para la invasión de células de melanoma mediada por Wnt-5a

Para identificar la base molecular para las funciones antagonistas de Box5, se investigaron las rutas de señalización que son esenciales para la invasión de células de melanoma inducida por Wnt-5a. Se encontró que Wnt-5a estimula una rápida señal de Ca²⁺ citosólico en células A2058 (Fig. 6A), que puede inhibirse usando el quelante de Ca²⁺ intracelular MAPT/AM (Fig. 6B).

Se usó quelación de Ca²⁺ con MAPT/AM para evaluar la capacidad invasiva de células de melanoma en ausencia de señalización inducida de Ca²⁺ por Wnt-5a. El efecto pro-invasivo de Wnt-5a sobre las células A2058 se suprimió completamente por MAPT/AM (Fig. 6C). Esto demostró que el componente de señalización del Ca²⁺ de la estimulación por Wnt-5a es esencial para mediar en la invasión de células de melanoma.

Efectos del hexapéptido de N-butiloxicarbonilo Box5 sobre la señalización inducida por Wnt-5a

Para investigar adicionalmente las propiedades del hexapéptido Box5 y su interacción selectiva con receptores de Wnt-5a, se analizaron sus efectos sobre la señalización inmediata del receptor inducida por Wnt-5a. Se había mostrado previamente que Wnt-5a desencadenaba un rápido aumento en el Ca²⁺ libre citosólico en células de la tiroides (Kremenevskaja, 2005) y en células de cáncer de mama (Dejmek, 2006). Los datos muestran que Wnt-5a también desencadena una rápida señal de Ca²⁺ citosólico en células de melanoma A2058 (Fig. 7A) similar a las rápidas respuestas inducidas por otros dos ligandos del receptor de control acoplados a la proteína G, endotelina-1 y carbacol (Fig. 7A). Debe observarse que con el fin de obtener respuestas de Ca²⁺ aproximadamente similares para los tres ligandos, la concentración de Wnt-5a se redujo de 0,2 a 0,1 µg/ml en esta serie de experimentos.

A continuación se probaron los efectos de Box5 sobre células que se estimularon por primera vez con Wnt-5a y posteriormente con tanto endotelina-1 como carbacol (Fig. 7B). Estos experimentos revelan que Box5 inhibe selectivamente la señal de Ca²⁺ intracelular inducida por Wnt-5a, pero ni la inducida por endotelina-1 ni la inducida por carbacol, en células de melanoma A2058. Los resultados acumulados sobre cómo la Box5 afecta la señal de Ca²⁺ inducida por Wnt-5a revelaron que hay más del 70 % de inhibición cuando se comparó con los valores pico de la señal de Ca²⁺ en ausencia de Box5 (Fig. 7C). Experimentos de Ca²⁺ similares en los que las células se estimularon con tanto endotelina-1 como carbacol en ausencia o presencia de Box5 no revelaron efecto significativo de este péptido sobre la señalización de Ca²⁺ (Fig. 7C).

Uno de los efectos aguas debajo de la señalización de Wnt-5a en células de melanoma es la activación de PKC. La estimulación por Wnt-5a de células A2050 produjo un aumento de la fosforilación de MARCKS, y sustrato de PKC endógeno, que se inhibió en presencia del péptido Box5 (Fig. 7D). Estos datos sugieren que Box5 funciona bloqueando la invasión de células de melanoma antagonizando directamente la señalización de Ca²⁺ y de PKC estimulada por Wnt-5a, produciendo inhibición aguas debajo de la invasión de células mediada por Wnt-5a.

Aunque el registro de cambios de Ca²⁺ intracelular es un ensayo muy sensible para estudiar la modulación de la señalización de receptores acoplados a la proteína G, no se ha relacionado directamente con la motilidad de células de melanoma. Sin embargo, estudios previos han demostrado un efecto aguas abajo de la activación de PKC inducida por Wnt-5a sobre la regulación de la migración de células de melanoma (Weeraratna y col., 2002, Dissanayake y col., 2007).

En el presente estudio no se estimó el nivel de auto-fosforilación de PKC (Weeraratna y col., 2002, Dissanayake y col., 2007), ya que no está clara su relación con la actividad de PKC. En su lugar, se analizaron los efectos de Wnt-5a y Box5 sobre la fosforilación del sustrato de PKC endógeno MARCKS como medio directo de estimación del nivel de actividad de PKC en las células de melanoma. La estimulación por Wnt-5a de células de melanoma A2058 produjo un aumento distinto en la fosforilación de MARCKS que alcanza el pico a 9 a 15 min (Fig. 7A). Este efecto de Wnt-5a se suprimió por el péptido Box5 (Fig. 7B). Estos resultados confirman de nuevo el efecto selectivo de Box5 sobre la migración e invasión de células de melanoma (Fig. 4C-D) y soporta adicionalmente la hipótesis de que Box5 es un antagonista de péptido selectivo de Wnt-5a.

Efectos de SB431542 y TGF-β1 sobre la expresión de proteínas Wnt-5a en células HTB63 y A2058

Actualmente, la regulación de la transcripción de Wnt-5a en células de melanoma no está clara. En otros tipos de células, más recientemente se demostró en células epiteliales mamarias ductales durante el desarrollo (Roarty y Serra, 2007), se encontró que TGF-β1 era responsable de la regulación de la expresión de Wnt-5a al nivel transcripcional. Con el fin de explorar la posibilidad de que exista un mecanismo similar en células de melanoma, se

probó directamente la capacidad de que el inhibidor del receptor tipo I de TGF- β 1 selectivo SB431542 y TGF- β 1 recombinante afecte la expresión de Wnt-5a en las células. Los datos brevemente expuestos en la Figura 7C muestran que cuando las células HTB63 (que tienen una expresión de Wnt-5a endógena) se mantuvieron en medio 5A de McCoy completo complementado con SB431542 10 μ M durante 4-5 días, la expresión de proteínas Wnt-5a endógenas se redujo significativamente después de 4 días de incubación y casi se suprimió después de 5 días de incubación. La estimulación de células A2058 (que carecen de expresión de Wnt-5a endógena) durante 36 h con diferentes concentraciones de TGF- β 1 recombinante produjo una elevada expresión de proteína Wnt-5a (Fig. 8B). Estos datos revelan que se logra una expresión casi máxima de Wnt-5a tras la estimulación con 5 ng/ml de TGF- β 1 (Fig. 8B) y que la estimulación de células A2058 con 5 ng/ml de TGF- β 1 requirieron 36 h de estimulación para producir un aumento claramente detectable en la expresión de proteínas Wnt-5a (Fig. 8C). Estos resultados confirman que TGF- β 1 regula la expresión de Wnt-5a al menos en las dos líneas celulares de melanoma usadas en este estudio. Esto aumenta la posibilidad de que la migración de células de melanoma mediada por Wnt-5a pudiera ser antagonizada indirectamente bloqueando la señalización de TGF- β 1 en estas células.

15 *Efectos de TGF- β 1, SB431542 y Box5 sobre la adhesión, migración e invasión de células de melanoma*

Para explorar si Wnt-5a es de hecho un regulador aguas abajo de la migración de células inducida por TGF- β 1, los efectos de TGF- β 1 se probaron primero sobre la adhesión de células de melanoma A2058. Se encontró que TGF- β 1 estimuló la capacidad adhesiva de las células de melanoma A2058 y que el máximo efecto se obtuvo tras la estimulación con 5 ng/ml (Fig. 9A). Basándose en estos hallazgos se exploró a continuación cómo esta concentración de TGF- β 1 recombinante afectó la migración de células A2058 en un ensayo de cicatrización. Los resultados brevemente expuestos en la Figura 9B muestran claramente que la adición TGF- β 1 (5 ng/ml) al inicio de los experimentos aumentó la migración de células de melanoma A2058. En buena concordancia con estos resultados se encontró que SB431542 10 μ M, un inhibidor del receptor tipo I de TGF- β , inhibió la migración de células HTB63 (Fig. 9C). A continuación, se probó la capacidad de Box5 para inhibir la migración de A2058 en un ensayo de cicatrización. Box5 suprimió la migración inducida por TGF- β 1 en el ensayo de cicatrización bidimensional (Fig. 9D). Box5 no tuvo efecto sobre la migración basal de células de melanoma A2058 (datos no mostrados). Sin embargo, cuando se probó el efecto de TGF- β 1 (5 ng/ml) sobre la migración en un ensayo de migración más complejo, se obtuvieron resultados contradictorios. En el ensayo de invasión, TGF- β 1 inhibió la migración de células A2058 y SB431542 estimuló la migración de células HTB63 (Fig. 9E). Se concluyó, por tanto, que TGF- β 1 es una diana impredecible para bloquear la migración de células de melanoma dependientes de Wnt-5a supuestamente debido a sus múltiples efectos aguas abajo.

En el presente estudio se ha demostrado que un hexapéptido derivado de Wnt-5a modificado Box5 inhibe selectivamente la señalización inducida por Wnt-5a en células de melanoma y bloquea la migración mediada por Wnt-5a de estas células en tanto un ensayo de cicatrización como uno de invasión. La base para el diseño de Box5 procede del trabajo previo en el que se realizó una predicción de superficie secundaria/ accesible al disolvente según el procedimiento de PHD (Rost, 1996), y a continuación se cribó para péptidos pequeños derivados de Wnt-5a con capacidades para reconstituir los efectos de Wnt-5a sobre células de tumor de mama que carecen de una expresión endógena de Wnt-5a (Särndahl, 2006). En ese estudio se caracterizó un hexapéptido Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu, que después de la formilación de la Met del extremo N, denominado Foxy5, fue capaz de imitar los efectos de Wnt-5a sobre la señalización e inhibición de la migración de células de cáncer de mama (Särndahl, 2006). Estos efectos de Foxy5 se perdieron cuando las células se incubaron con un anticuerpo anti-Frizzled-5 bloqueante previamente descrito (Sen 2001; Weeraratna 2002), sugiriendo que Foxy5 media en su efecto sobre la célula de cáncer de mama mediante el receptor Frizzled-5 acoplado a la proteína G (Säfhholm 2006). Se ha sugerido que el mismo receptor Frizzled es el responsable de la señalización y efectos funcionales de Wnt-5a sobre células de melanoma (Weeraratna 2002 y Dissanayake 2007).

Hay varios ejemplos de ligandos de péptidos que pueden activar específicamente un receptor distinto; estos incluyen el tripéptido Arg-Gly-Asp que funciona como ligando del receptor de integrina (Pierschbacher y Rouslahti, 1984), los dos hexapéptidos que activan específicamente los receptores 1 y 4 activados por proteasa acoplados a la proteína G (Andersen, 1999) y el septapéptido antagonizante que se une al receptor acoplado a la proteína G para trombina (Pakala 2000). Sin embargo, para el presente estudio, el ligando de péptido más interesante es el tripéptido Met-leu-Phe formilado derivado de bacterias que activa leucocitos uniéndose con alta afinidad a los receptores del péptido de formilo acoplados a la proteína G sobre estas células (Le, 2002). Si el grupo formilo de este péptido se intercambia con un grupo butiloxycarbonilo, este tripéptido todavía se une al mismo receptor, pero en lugar de actuar como agonista este tripéptido butiloxycarbonilado actúa ahora de antagonista (Derian 1996). La misma modificación del hexapéptido Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu lo convierte, obviamente, como se muestra aquí, en un péptido antagonista selectivo de Wnt-5a en células de melanoma.

Los datos muestran claramente que la señalización de Wnt-5a estimula coherentemente la migración en tanto células de melanoma A2058 como HTB63 si se usa un ensayo de cicatrización o de invasión y que Box5 en todas estas situaciones bloquea la migración de células de melanoma dependiente de Wnt-5a. A pesar de la presente demostración de que TGF- β 1 regula la transcripción de Wnt-5a en tanto las líneas de células de melanoma A2058 como HTB63, y que la adición de Wnt-5a siempre estimula la migración de células de melanoma, se observaron efectos muy contradictorios cuando se estimulan células de melanoma con TGF- β 1. Los efectos obtenidos parecen

referirse al tipo de ensayo usado para investigar la migración de células. Lo más probablemente, estos efectos diferentes de TGF- β 1 sobre la migración de células de melanoma se refieren a sus múltiples efectos bien documentados sobre células tumorales. Debe observarse que en las situaciones en las que TGF- β 1 estimuló la migración de células de melanoma, Box5 inhibió eficazmente su efecto sobre la migración. Por consiguiente, los datos parecen soportar que la intervención directa con la señalización de Wnt-5a por un compuesto tal como Box5 podría ser un enfoque terapéutico novedoso eficaz para inhibir selectivamente la metástasis de melanoma maligno.

Las abreviaturas usadas son:

- 10 BMP - proteína morfogénica ósea;
EMT - transición epitelial-mesenquimal;
PKC - proteína cinasa C; y
TGF- β - factores de crecimiento transformantes β .

15 *Formulaciones farmacéuticas*

Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los compuestos de la presente invención se administran normalmente en forma de composiciones farmacéuticas. Estos compuestos pueden administrarse mediante una variedad de vías que incluyen oral y rectal. Estos compuestos son eficaces como composiciones orales. Tales composiciones se preparan de un modo muy conocido en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo.

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas, que contienen, como principio activo, uno o más de los compuestos descritos en el presente documento asociados a vehículos farmacéuticamente aceptables. En la preparación de las composiciones de la presente invención, el principio activo se mezcla normalmente con un excipiente, se diluye por un excipiente o se encierra dentro de un vehículo tal que puede estar en forma de una cápsula, sobre, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve de diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa de vehículo, excipiente o medio para el principio activo. Así, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios y polvos envasados.

En la preparación de una formulación, puede ser necesario moler un compuesto para proporcionar el tamaño de partícula apropiado antes de combinar con los otros componentes. Si el compuesto es sustancialmente insoluble, generalmente se muele a un tamaño de partícula inferior a 200 de malla. Si el compuesto es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula normalmente se ajusta moliendo para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, aproximadamente 40 de malla.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; humectantes; emulsionantes y agentes de suspensión; conservantes tales como hidroxibenzoatos de metilo y propilo; edulcorantes; y aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse de manera que se proporcione liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

Las composiciones se formulan preferentemente en una forma de dosificación unitaria. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con excipientes farmacéuticos adecuados. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) anterior se emplea a no más de aproximadamente el 20 por ciento en peso de la composición farmacéutica, más preferentemente no más de aproximadamente el 15 por ciento en peso, siendo el resto vehículo(s) farmacéuticamente inerte(s).

El compuesto activo es eficaz durante un amplio intervalo de dosificación y generalmente se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Por ejemplo, cuando el fármaco se administra por vía oral, cada dosificación contiene de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg, preferentemente de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 500 mg, más preferentemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg, incluso más preferentemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 60 mg, del principio activo. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad del compuesto en realidad administrada se determinará por un médico, en vista de las circunstancias relevantes, que incluyen la afección que va a tratarse, la vía de administración elegida, el actual compuesto administrado y su actividad relativa, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares. Desde un principio de vista del principio, la formulación debe administrarse simultáneamente con un consumo de alimentos, y debe administrarse a continuación en una cantidad que proporcione una inhibición suficiente de lípidos. Así, el cuerpo puede necesitar algunos lípidos desde un punto de

vista nutritivo y esto puede influir a continuación en la cantidad para inhibir los compuestos de la invención administrados. El efecto de los compuestos de la invención tiene lugar en el intestino delgado y así no hay efecto adicional obtenido como tal, excepto de posibles metabolitos de los compuestos.

- 5 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se refiere a estas composiciones de pre-formulación como homogéneas, se indica que el principio activo está disperso uniformemente en toda la composición de manera que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta pre-formulación sólida se subdivide a continuación en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contienen el principio activo de la presente invención.

- 15 Los comprimidos, píldoras o gránulos de la presente invención pueden recubrirse o combinarse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, estando el último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica, que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o sea de liberación retardada. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como Shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

- 25 Los comprimidos, píldoras o gránulos de la presente invención pueden recubrirse con un recubrimiento de liberación sostenida que permite la liberación en el páncreas, en el que la lipasa pancreática se libera al intestino. Un recubrimiento de liberación sostenida tal permitirá así una pequeña liberación, si la hay, en el estómago, pero permite la liberación total en la parte superior del intestino delgado.

- 30 Por ejemplo, puede prepararse un comprimido por compresión o moldeo. Los comprimidos pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada una composición de la invención en una forma fluida tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclada con un aglutinante, un lubricante, un diluyente inerte y/o una agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte.

- 35 En una realización preferida, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable es un aglutinante, carga, o una mezcla de los mismos. Excipientes adecuados incluyen lubricantes, disgregantes, y mezclas de los mismos. Excipientes preferidos incluyen, pero no se limitan a, lactosa, croscarmelosa, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado y estearato de magnesio.

- 40 Aglutinantes adecuados para preparar formulaciones de dosificación de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz, almidón de patata, u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, alginato de sodio, ácido alginico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, almidón pregelatinizado, hidroxipropilmetilcelulosa (por ejemplo, nº 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina y mezclas de los mismos.

- 45 Formas adecuadas de celulosa microcristalina incluyen, por ejemplo, los materiales comercializados como AVICEL-PH-101, AVICEL-PH-103 y AVICEL-PH-105 (disponibles de FMC Corporation, American Viscose Division, de Marcus Hook, Pa.). Un aglutinante particularmente adecuado es una mezcla de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio comercializada como AVICEL RC-581 por FMC Corporation.

- 50 Ejemplos de cargas adecuadas para su uso con las formas de dosificación de los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, talco, carbonato cálcico (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido salicílico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, y mezclas de los mismos.

- 55 Normalmente, de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 99 por ciento en peso de una forma de dosificación sólida de la invención es aglutinante y/o carga.

- 60 Se usan disgregantes para hacer que el comprimido se disgregue cuando se expone a un entorno acuoso. Un exceso de un disgregante producirá comprimidos que pueden disgregarse en la botella debido a humedad atmosférica; demasiado poco puede ser insuficiente para que se produzca la disgregación y puede así alterar la tasa y grado de liberación del compuesto de la invención de la forma de dosificación. Así, debe usarse una cantidad suficiente de disgregante que no sea ni demasiado pequeña ni demasiado grande para alterar perjudicialmente la liberación del fármaco para formar formas de dosificación sólidas de la invención. La cantidad de disgregante usada varía basándose en el tipo de formulación y modo de administración, y es fácilmente discernible para aquellos expertos habituales en la materia. Normalmente, puede usarse de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 15 por ciento en peso de disgregante, preferentemente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5 por ciento en

peso de disgregante, en la composición farmacéutica.

Disgregantes adecuados que pueden usarse para formar formas de dosificación sólidas incluyen, pero no se limitan a, agar-agar, ácido alginico, carbonato cálcico, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilin potasio, glicolato sódico de almidón, almidón de patata o de tapioca, otros almidones, almidón pregelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas y mezclas de los mismos.

Lubricantes adecuados para su uso con formas de dosificación sólidas incluyen, pero no se limitan a, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, laurilsulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de cinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, y mezclas de los mismos. Lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice siloide (AEROSIL 200, fabricado por W.R. Grace Co. de Baltimore, Md.), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializado por Degussa Co. de Plano, Tex.), CAB-O-SIL (un producto de dióxido de silicio pirogénico comercializado por Cabot Co. de Boston, Mass.), y mezclas de los mismos. Opcionalmente puede añadirse un lubricante, normalmente en una cantidad inferior a aproximadamente el 1 por ciento en peso de la composición farmacéutica.

Preferentemente, cada forma de dosificación sólida contiene de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 3000 mg del compuesto de la invención. Preferentemente, cada forma de dosificación sólida contiene aproximadamente 5 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, o aproximadamente 500 mg del compuesto de la invención. Formas de dosificación sólidas adecuadas para administración por vía oral contienen preferentemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 200 mg del compuesto de la invención.

Las formas líquidas en las que las composiciones novedosas de la presente invención pueden incorporarse para administración por vía oral incluyen disoluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, emulsiones acuosas y aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, además de elixires y vehículos farmacéuticos similares. También pueden usarse formulaciones líquidas para administración por inhalación, suspendiéndose el componente activo en un líquido que va a administrarse usando un dispensador nasal. Así, el compuesto activo puede resorberse tanto por las membranas mucosas en el tracto nasal como resorberse por los pulmones.

Otras composiciones de administración nasal están presentes como composiciones secas usando un gas propulsor para conducir la composición seca al tracto nasal y/o pulmones.

Además, las composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos de la presente invención pueden administrarse en combinación con cualquier otro fármaco adecuado, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos gastrointestinales. Cuando se emplea terapia de combinación, la composición farmacéutica que contiene el (los) compuesto(s) de la presente invención y el segundo fármaco pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado. Cada componente usado en la terapia de combinación se emplea en una cantidad suficiente para su fin previsto. Por ejemplo, el fármaco secundario se emplea en cantidades suficientes para efectuar la reducción del síntoma en cuestión *in vivo*.

Preferentemente, el intervalo de dosis para compuestos de la presente invención es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por dosis, más preferentemente de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 500 mg, incluso más preferentemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg, y todavía más preferentemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 60 mg. De nuevo, la dosis particular usada dependerá del paciente (edad, peso, etc.) y la gravedad de la enfermedad (leve, moderada, grave). Por último lugar, una composición farmacéutica que contiene dos principios activos también puede prepararse para administrar los fármacos simultáneamente.

La administración del (de los) presente(s) fármaco(s) tendrá normalmente lugar a propósito del consumo de alimentos, cuando se libera lipasa-colipasa debido a la digestión y se obtendrá una inhibición óptima debajo del duodeno.

Ejemplos

Se facilitan las siguientes preparaciones y ejemplos para permitir que aquellos expertos en la materia entiendan más claramente y pongan en práctica la presente invención. No deben considerarse limitantes del alcance de la invención, sino que simplemente son ilustrativos y representativos de la misma.

Ejemplos de formulación

Ejemplo 1

- 5 Se preparan cápsulas de gelatina dura que contienen los siguientes componentes:

Componente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	30,0
Almidón	305,0
Estearato de magnesio	5,0

Los componentes anteriores se mezclan y se llenan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 340 mg.

10 Ejemplo 2

Se prepara una formulación en comprimido usando los siguientes componentes:

Componente	Cantidad (mg/comprimido)
Principio activo	25,0
Celulosa, microcristalina	200,0
Dióxido de silicio coloidal	10,0
Ácido esteárico	5,0

- 15 Los componentes se mezclan y se comprimen para formar comprimidos, pesando cada uno 240 mg.

Ejemplo 3

Se preparan comprimidos, que contiene cada uno 30 mg de principio activo, del siguiente modo:

Componente	Cantidad (mg/comprimido)
Principio activo	30,0 mg
Almidón	45,0 mg
Celulosa microcristalina	35,0 mg
Polivinilpirrolidona	4,0 mg
(como disolución al 10 % en agua estéril)	
Carboximetilalmidón de sodio	4,5 mg
Estearato de magnesio	0,5 mg
Talco	1,0 mg
Total	120,0 mg

- 25 El principio activo, almidón y celulosa se pasan a través de un tamiz U.S. Nº: 20 de malla y se mezclan minuciosamente. La disolución de polivinilpirrolidona se mezcla con los polvos resultantes, que a continuación se pasan a través de un tamiz U.S. de 16 de malla. Los gránulos así producidos se secan a 50 a 60 °C, y se pasan a través de un tamiz U.S. de 16 de malla. A continuación se añaden el carboximetilalmidón de sodio, el estearato de magnesio y el talco, previamente pasados a través de un tamiz U.S. Nº: 30 de malla, a los gránulos que, después de mezclarse, se comprimen sobre una máquina de comprimidos para dar comprimidos que pesan cada uno 120 mg.

Ejemplo 4

- 30 Se preparan cápsulas, que contienen cada una 40 mg de medicamento, del siguiente modo:

Componente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	40,0 mg
Almidón	109,0 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Total	150,0 mg

- 35 Se mezclan el principio activo, almidón y estearato de magnesio, se pasan a través de un tamiz U.S. Nº: 20 de malla y se llenan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 150 mg.

Ejemplo 5

Se preparan supositorios, que contienen cada uno 25 mg de principio activo, del siguiente modo:

Componente	Cantidad
Principio activo	25 mg

Glicéridos de ácidos grasos saturados hasta 2.000 mg

El principio activo se pasa a través de un tamiz U.S. Nº: 60 de malla y se suspende en los glicéridos de ácidos grasos saturados previamente fundidos usando el calor mínimo necesario. A continuación, la mezcla se vierte en un molde de supositorio de 2,0 g de capacidad nominal y se deja enfriar.

Ejemplo 6

Se preparan suspensiones, que contiene cada una 50 mg de medicamento por 5,0 ml de dosis, del siguiente modo:

Componente	Cantidad
Principio activo	50,0 mg
Goma xantana	4,0 mg
Carboximetilcelulosa de sodio (11 %)	
Celulosa microcristalina (89 %)	50,0 mg
Sacarosa	1,75 g
Benzoato de sodio	10,0 mg
Aroma y color	c.s.p.
Agua purificada hasta	5,0 ml

Se combinan el principio activo, sacarosa y goma xantana, se pasan a través de un tamiz U.S. Nº: 10 de malla, y a continuación se mezclan con una disolución previamente preparada de la celulosa microcristalina y la carboximetilcelulosa de sodio en agua. Se diluyen el benzoato de sodio, aroma y color con algo de agua y se añaden con agitación. A continuación se añade agua suficiente para producir el volumen requerido.

Ejemplo 7

Puede prepararse una formulación del siguiente modo:

Componente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	15,0 mg
Almidón	407,0 mg
Estearato de magnesio	3,0 mg
Total	425,0 mg

Se combinan el principio activo, almidón y estearato de magnesio, se pasan a través de un tamiz U.S. Nº: 20 de malla, y se llenan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 425,0 mg.

Otras formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, editado por E. W. Martin (Mack Publishing Company, 18ª ed., 1990).

Listado de secuencias

<110> FORSKARPATENT I SYD y col.

<120> TRATAMIENTO DE MELANOMA

<130> PC-21043355

<150> SE 0801791-5

<151> 13-08-2008

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Wnt5a humana

<400> 1

ES 2 527 454 T3

		Met Asp Gly Cys Glu Leu
		1 5
5	<210> 2	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Wnt5a humana	
	<400> 2	
10		Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
		1 5
15	<210> 3	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Wnt5a humana	
	<400> 3	
20		Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
		1 5
25	<210> 4	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Wnt5a humana	
	<400> 4	
30		Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
		1 5
35	<210> 5	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Wnt5a humana	
	<400> 5	
40		Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
		1 5 10
45	<210> 6	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Wnt5a humana	
	<400> 6	
50		Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
		1 5 10
55	<210> 7	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Wnt5a humana	
	<400> 7	
60		Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
		1 5 10
	<210> 8	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Wnt5a humana	

ES 2 527 454 T3

<400> 8

Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10

5 <210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> Wnt5a humana

10 <400> 9

Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10

15 <210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Wnt5a humana

20 <400> 10

Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10 15

25 <210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Wnt5a humana

30 <400> 11

Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10 15

35 <210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Wnt5a humana

40 <400> 12

Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu
1 5 10 15

40 Leu

45 <210> 13
<211> 18
<212> PRT
<213> Wnt5a humana

50 <400> 13

Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys
1 5 10 15

50 Glu Leu

55 <210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> Wnt5a humana

55 <400> 14

ES 2 527 454 T3

	Gly Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly	
	1 5 10 15	
	Cys Glu Leu	
5	<210> 15 <211> 20 <212> PRT <213> Wnt5a humana <400> 15	
	Leu Gly Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp	
	1 5 10 15	
10	Gly Cys Glu Leu	
	20	
15	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Cebador <400> 16 ggattgttaa actcaactct c 21	
20	<210> 17 <211> 21 <212> ADN <213> Cebador	
25	<400> 17 acacctcttt ccaaacaggc c 21	
30	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Cebador <400> 18 ttcaacaccc cagccatgta 20	
35	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Cebador	
40	<400> 19 ttgccaatgg tgatgacctg 20	
45	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Cebador	
50	<400> 20 acatgccta caaccagacc 20	
55	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Cebador <400> 21	

ES 2 527 454 T3

	ctcgcccaga aactgtagc	20
	<210> 22	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Cebador	
	<400> 22	
10	acacccgctc tacaacaagg	20
	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Cebador	
	<400> 23	
	cgtagtggat gtggtgtgc	20

REIVINDICACIONES

- 1.- Un derivado de carbamato no ramificado del péptido Wnt5- α que consiste en SEC ID NO: 1.
- 5 2.- Un derivado de carbamato no ramificado según la reivindicación 1, en el que el derivado está seleccionado del grupo que consiste en derivado de N-metiloxicarbonilo, derivado de N-etiloxicarbonilo, derivado de N-n-propiloxicarbonilo y derivado de N-butiloxicarbonilo.
- 10 3.- Un derivado de carbamato no ramificado de un péptido Wnt5- α según la reivindicación 1 ó 2 para su uso en el tratamiento de melanoma y cáncer gástrico.
- 4.- Una composición farmacéutica que contiene un derivado de carbamato no ramificado del péptido Wnt5- α que consiste en SEC ID NO: 1, en combinación con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables inertes.
- 15 5.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el derivado de carbamato no ramificado es uno del grupo derivado de N-metiloxicarbonilo, N-etiloxicarbonilo, N-n-propiloxicarbonilo o de N-butoxicarbonilo.
- 20 6.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 4 o 5, en la que la composición está formulada como una composición tópica.
- 7.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 4 o 5, en la que la composición está formulada como una composición inyectable.

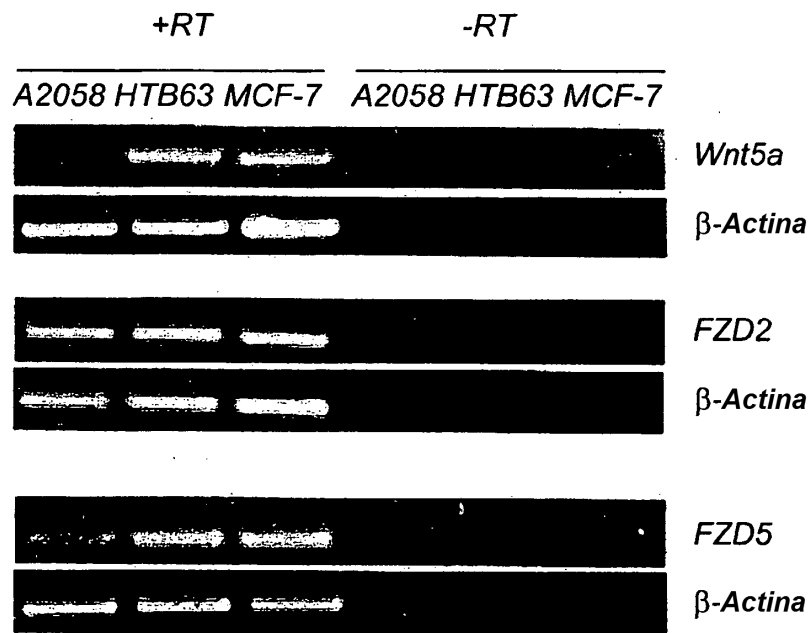


Fig. 1a

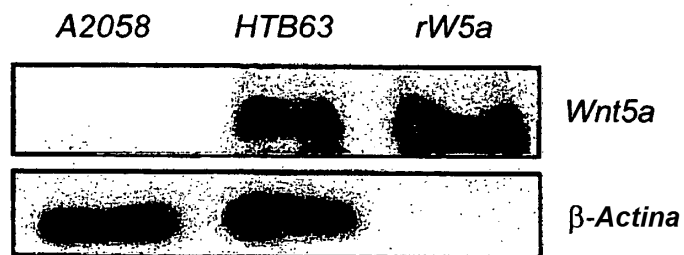


Fig. 1b

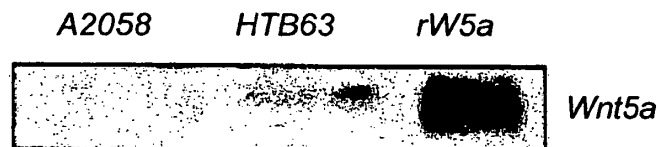


Fig. 1c

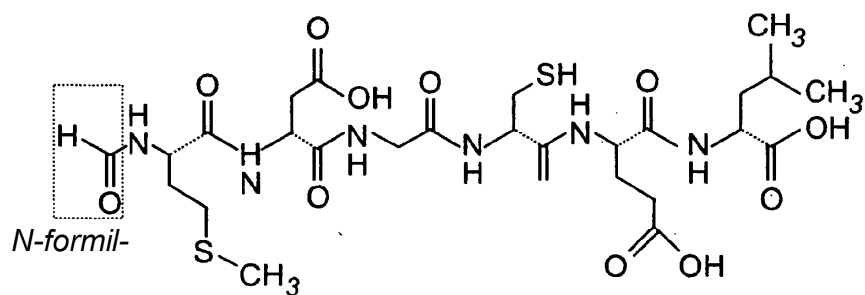


Fig. 2a

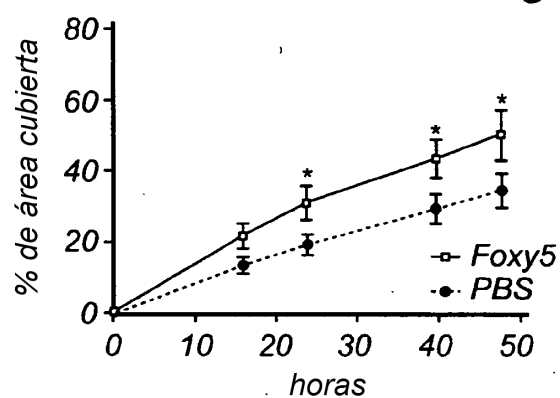


Fig. 2b

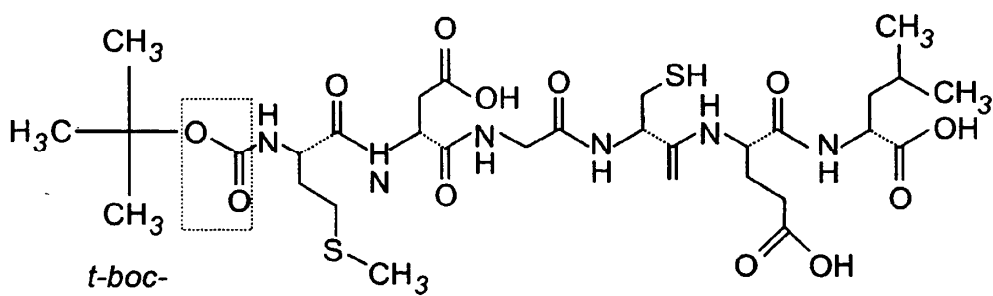


Fig. 3

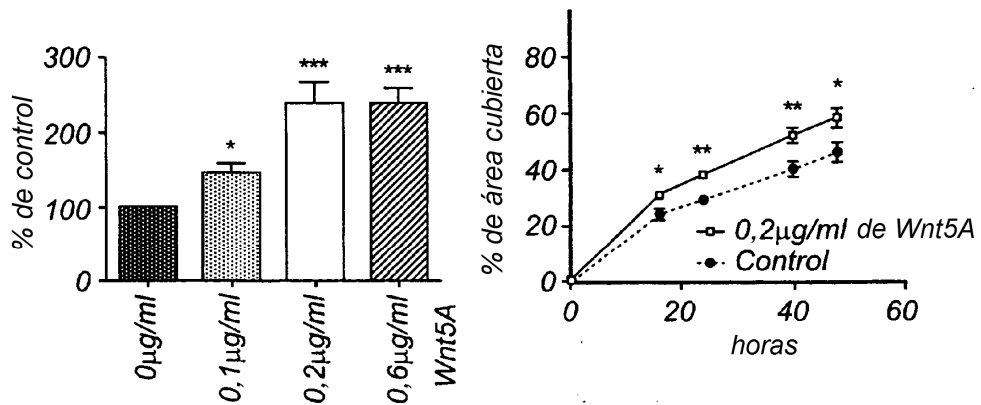


Fig. 4b

Fig. 4a

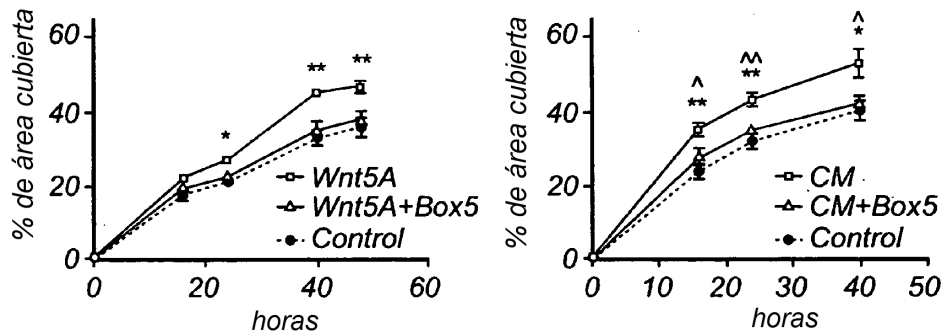


Fig. 4c

Fig. 4d

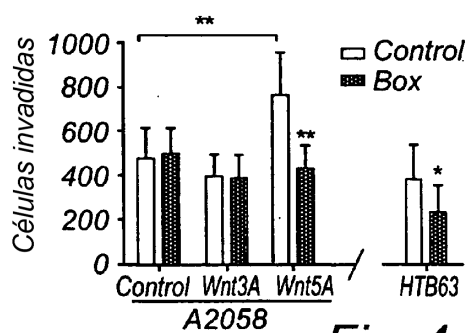


Fig. 4e

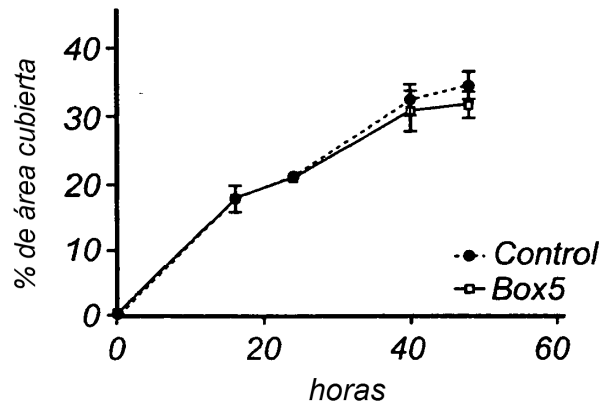


Fig. 5a

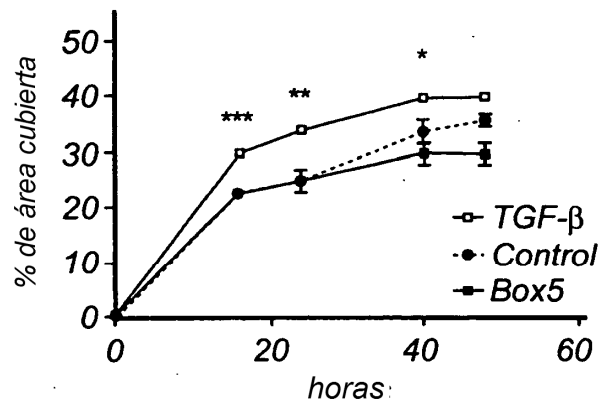


Fig. 5b

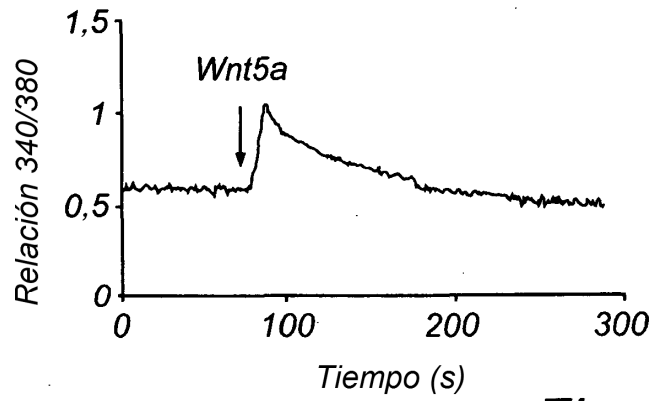


Fig. 6a

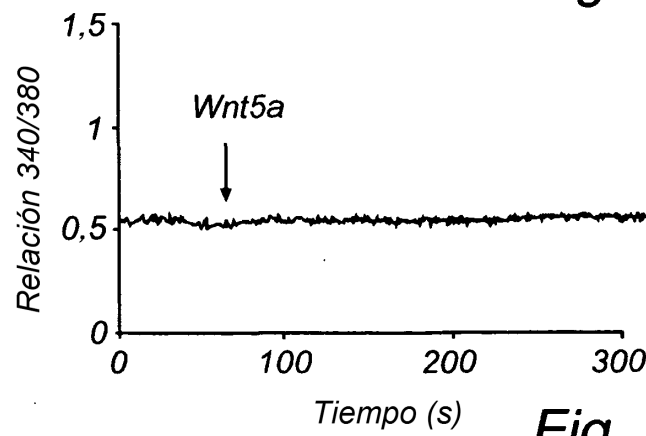


Fig. 6b

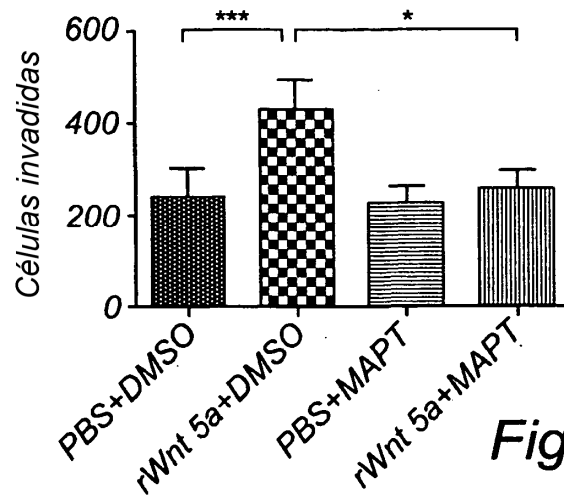


Fig. 6c

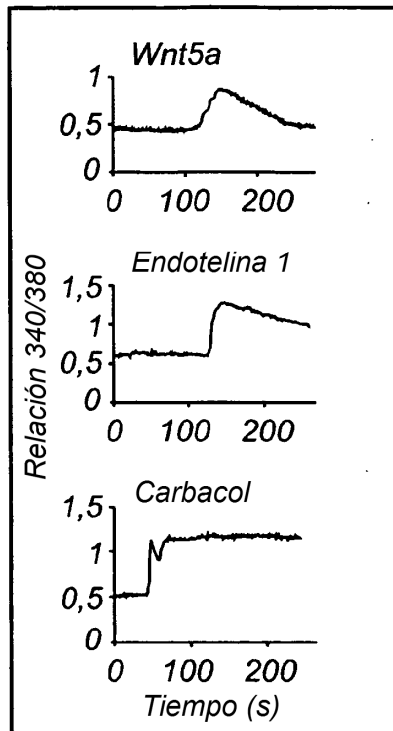


Fig. 7a

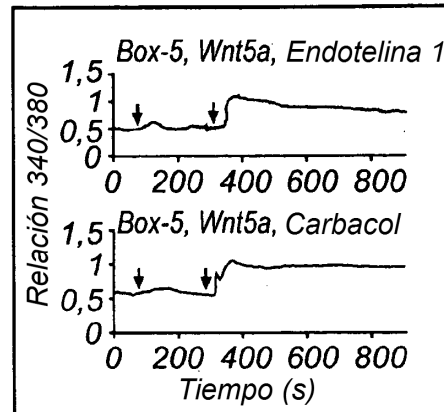


Fig. 7b

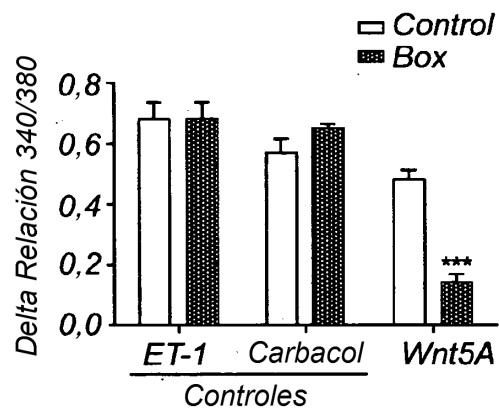


Fig. 7c

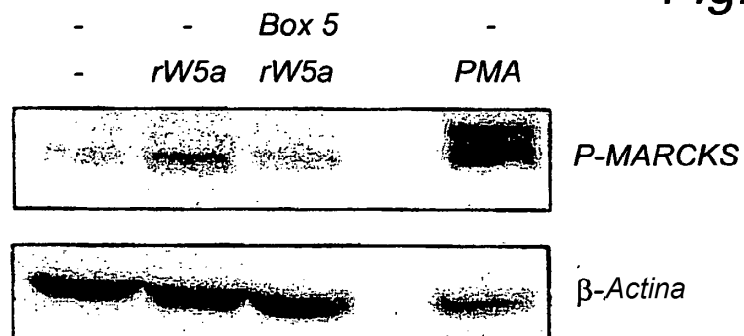


Fig. 7d

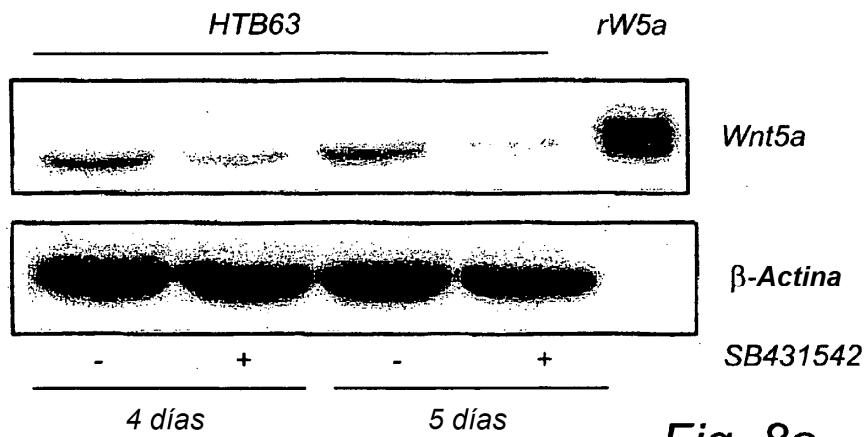


Fig. 8a

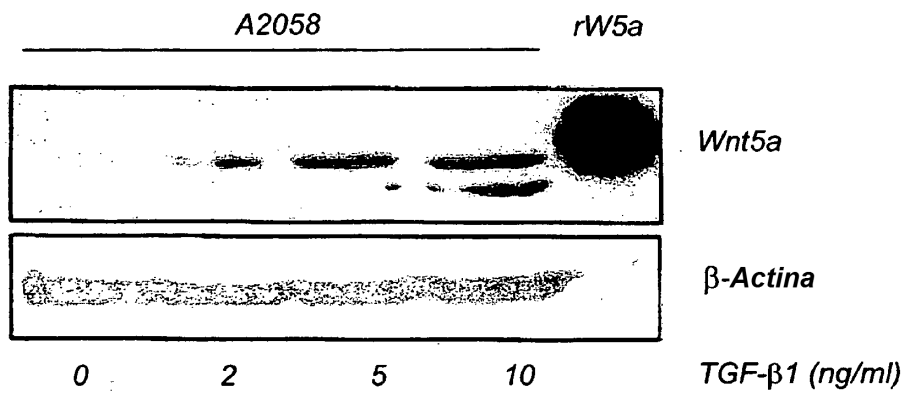


Fig. 8b

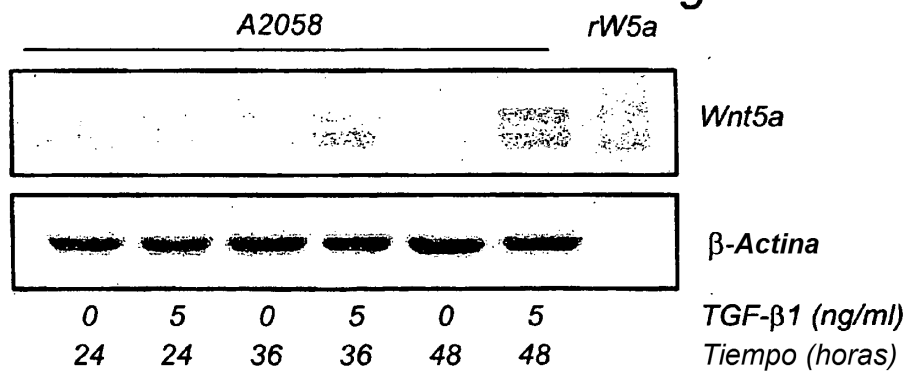


Fig. 8c

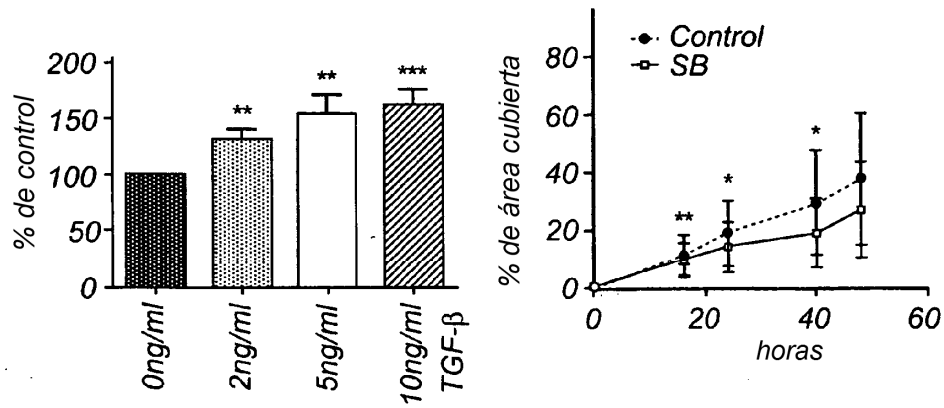


Fig. 9a

Fig. 9b

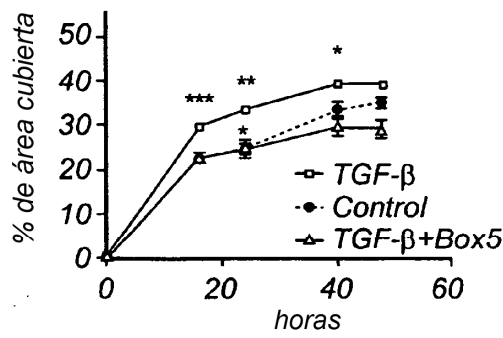


Fig. 9c

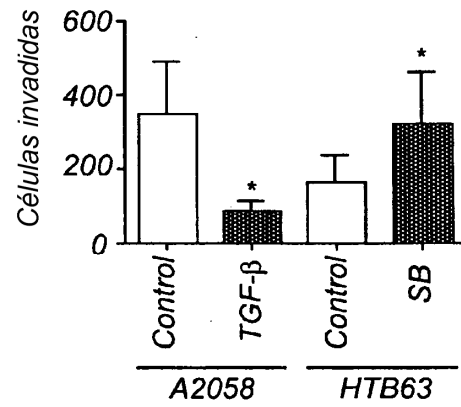


Fig. 9d