

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 473**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2006** **E 11171215 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015** **EP 2384763**

54 Título: **Un ligando peptídico para alterar la migración de células cancerígenas**

30 Prioridad:

30.05.2005 SE 0501204

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

19.08.2015

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 2 543 473 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

Un ligando peptídico para alterar la migración de células cancerígenas

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere entre otros a nuevos péptidos formulados utilizados para alterar la migración de células cancerígenas, en particular de cáncer de mama y de colon, y para actuar como supresor tumoral en el carcinoma de tiroides y el neurocarcinoma. En particular se refiere a un hexapéptido formulado.

Introducción

- 10 Las proteínas Wnt son una familia de glicoproteínas secretadas, con un peso molecular de 39-46 kDa que participan en el desarrollo y la génesis tumoral a través de rutas autocrinas o paracrinas (para una revisión, véase (1-3)). Las proteínas Wnt secretadas se unen y activan los receptores acoplados a proteína G de la familia Frizzled (Frz) (4, 5). Las proteínas relacionadas con el receptor LDL, LRP5 o LRP6, se presume que actúan como correceptores en este contexto (6, 7). Basándose en la capacidad de diferentes proteínas Wnt para transformar células epiteliales mamarias de ratón, se pueden dividir en tres clases diferentes. Wnt-1, Wnt-3a y Wnt-7a tienen la mayor capacidad de transformación; Wnt-2, Wnt-5b y Wnt-7b tienen una capacidad de transformación intermedia; y Wnt-4, Wnt-5a y Wnt-6 no son transformadoras (8).

- 20 Se ha descrito previamente que un nivel bajo de expresión de la proteína Wnt-5a en un carcinoma de mama invasivo primario, está asociado con un mayor grado histológico (diferenciación deficiente) y una supervivencia acortada exenta de recurrencia, debido a un desarrollo más rápido de metástasis distantes (9). Esta asociación no se debe a un efecto de Wnt-5a sobre la proliferación, ya que no se ha detectado una correlación entre la pérdida de expresión de la proteína Wnt-5a y el marcador de proliferación Ki67 (9). La única explicación actualmente disponible de cómo la presencia de Wnt-5a puede reducir la capacidad metastásica del cáncer de mama invasivo, es su capacidad para permitir el aumento de la adhesión, presumiblemente a través del receptor 1 del dominio discoidina, activado con colágeno (DDR 1), sin embargo es posible que mecanismos todavía sin definir también pudieran contribuir al efecto clínico descrito de Wnt-5a sobre la progresión tumoral. A pesar de esto, una activación dependiente de Wnt-5a, de DDR1 se traduce en una disminución de la motilidad y del potencial invasivo de las células cancerígenas epiteliales de mama (10). En las células epiteliales de mama que normalmente son muy adhesivas, una disminución de la expresión de Wnt-5a y, por lo tanto, una disminución de la adhesión, aumentará su motilidad. En consecuencia, se ha observado que era necesaria la introducción estable de un vector de expresión de Wnt-5a en una línea celular de cáncer de mama MCF-7 con una expresión endógena reducida de Wnt-5a, para la activación inducida con colágeno del receptor de adhesión DDR1 (10). De forma recíproca, la transfección de la línea celular epitelial mamaria humana normal HB2 (11) transfectada de forma estable con Wnt-5a o Wnt-5a antisentido, causó un aumento o disminución respectiva de la adhesión de estas células al colágeno (12). En células mamarias humanas aún no se ha establecido a través de cuál de los diferentes receptores Frz, en los que media Wnt-5a, se lleva a cabo. Sin embargo, en sinoviocitos similares a fibroblastos y en células de melanoma maligno, se ha observado claramente con un Ac que bloquea específicamente, que el receptor responsable de los efectos inducidos por Wnt-5a es Frz-5 (13, 14).

- 40 Para desarrollar un tratamiento específico para la metástasis del cáncer de mama, basado en el papel funcional de Wnt-5a, es importante entender los eventos celulares y moleculares responsables de sus efectos sobre este tumor epitelial. Uno de los eventos decisivos e iniciales en la metástasis del cáncer, es la capacidad de las células transformadas para dejar de estar adheridas entre sí y también de los componentes de la ECM (matriz extracelular) de la membrana basal (15). En presencia de Wnt-5a, el receptor DDR1 de adhesión puede ser activado por colágeno en las células epiteliales de mama y, por lo tanto, es un posible candidato que podría mediar en el aumento de la adhesión al colágeno inducida por Wnt-5a de estas células (10). Una posible explicación de la actividad metastásica elevada observada en los carcinomas de mama que carecen de Wnt-5a, podría ser una adhesión reducida y un aumento posterior de la actividad móvil en estas células tumorales. Por lo tanto, una metodología para reducir la actividad metastásica en carcinomas de mama que carecen de expresión de la proteína Wnt-5a, podría ser encontrar una manera de superar el defecto de la traducción, responsable de la pérdida de expresión de la proteína Wnt-5a (16) y otra, reconstituir la activación de las células inducida por Wnt-5a. Experimentalmente, la adición de Wnt-5a recombinante a carcinomas de tiroides diferenciados, ha mostrado que tiene actividad supresora tumoral (17). Sin embargo, la adición de una proteína Wnt-5a grande de 43 kDa a un paciente, lo más probable a lo largo de un período de tiempo prolongado, no se materializa como una metodología muy atractiva.

- 55 Un trabajo previo de Andersen y sus colaboradores (18) en plaquetas ha identificado dos fragmentos hexapéptidos diferentes que pueden activar específicamente los receptores activados por proteasas acoplados a la proteína G, PAR1 y PAR4, respectivamente. Otros pequeños péptidos bien estudiados que se pueden unir específicamente y activan los receptores acoplados a la proteína G en células de mamífero con una potencia elevada, son los péptidos formulados obtenidos a partir de bacterias que se unen y activan el receptor peptídico quimiotáctico sobre los leucocitos (19). En esta situación, se ha observado que el grupo formilo aumenta mucho las afinidades de unión de los péptidos hacia el receptor y, por consiguiente, también la amplificación de la activación de las células (19).

Curiosamente, estos péptidos son funcionalmente activos incluso a un pH bajo, tal como el que se encuentra en los sitios de inflamación. El pH en los sitios de inflamación es más probable que sea más bajo que el pH estimado en un tumor sólido (20, 21).

Compendio de la presente invención

- 5 La presente invención se refiere a nuevos formilados de péptidos, en particular derivados formilados de un hexapéptido, obtenido a partir de Wnt-5a que muestran una reducción de la motilidad de las células cancerígenas y un aumento de la adhesión, con lo que perjudican la migración de las células cancerígenas. En el presente estudio se han identificado e investigado 14 fragmentos peptídicos, basándose en el análisis de la secuencia de Wnt-5a, y sus derivados formilados, por su capacidad para imitar los efectos de la proteína Wnt-5a sobre la adhesión de las
- 10 células mamarias y la locomoción, con el fin de identificar una sustancia potencial para el tratamiento antimetastático de carcinomas de mama y de colon que tienen una expresión endógena reducida de Wnt-5a. Los péptidos formilados también actuarán como un supresor tumoral en el carcinoma de tiroides y el neurocarcinoma. En particular, la invención se refiere a un hexapéptido formilado.

Descripción detallada de la presente invención

- 15 La invención se describirá y explicará a continuación, haciendo referencia a la descripción técnica siguiente, así como a las figuras y los gráficos adjuntos que muestran detalles de las pruebas realizadas.

La presente invención se refiere a nuevos péptidos formilados, donde el péptido que se formula se selecciona a partir del grupo que consiste en:

LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 1
GTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 2
TQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 3
QGRLCMKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 4
GRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 5
RLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 6
LCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 7
CNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 8
NKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 9
KTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 10
TSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 11
SEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 12
EGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 13
GMDGCEL	SEQ. ID. NO: 14
MDGCEL	SEQ. ID. NO: 15

- 20 En una realización preferida de la invención se refiere a un derivado formilado del péptido de la SEQ. ID. NO: 9 o a un derivado formilado del péptido de la SEQ. ID. NO: 15.

En particular la invención se refiere a un derivado formilado de la SEQ. ID. NO: 15.

En un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un derivado formilado de uno o más péptidos seleccionados a partir del grupo que consiste en:

LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 1
GTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 2
TQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 3
QGRLCMKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 4
GRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 5
RLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 6
LCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 7

CNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 8
NKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 9
KTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 10
TSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 11
SEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 12
EGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 13
GMDGCEL	SEQ. ID. NO: 14
MDGCEL	SEQ. ID. NO: 15

en la preparación de una composición farmacéutica utilizada para el tratamiento del cáncer alterando la motilidad de las células cancerígenas, en particular, derivados formilados de los péptidos seleccionados a partir del grupo que consiste en:

5 NKTSEGMDGCEL

MDGCEL.

En otro aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente activa de uno o más péptidos formilados activos que alteran la motilidad de las células cancerígenas seleccionados entre derivados formilados del péptido en el grupo que consiste en:

10

LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 1
GTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 2
TQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 3
QGRLCMKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 4
GRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 5
RLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 6
LCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 7
CNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 8
NKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 9
KTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 10
TSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 11
SEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 12
EGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 13
GMDGCEL	SEQ. ID. NO: 14
MDGCEL	SEQ. ID. NO: 15

opcionalmente combinados con un vehículo o excipiente inerte, en particular el péptido formilado activo es un derivado formilado de:

MDGCEL	SEQ. ID. NO. 15
--------	-----------------

15 o uno de sus derivados formilados.

En un aspecto adicional de la presente invención, se refiere al uso de un derivado formilado de un péptido seleccionado a partir del grupo que consiste en:

LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 1
GTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 2

TQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 3
QGRLCMKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 4
GRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 5
RLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 6
LCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 7
CNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 8
NKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 9
KTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 10
TSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 11
SEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 12
EGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 13
GMDGCEL	SEQ. ID. NO: 14
MDGCEL	SEQ. ID. NO: 15

en el tratamiento del cáncer, en particular, cáncer de mama y de colon.

A continuación se discuten también péptidos no formulados con las secuencias anteriores proporcionadas para referencia y a efectos comparativos.

5 A continuación, se han utilizado algunas abreviaturas, que son

CM, medios condicionados de Wnt-5a;

DDR 1, receptor 1 del dominio discoidina;

F-actina, actina filamentosa;

Frz, Frizzled;

10 MTS, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna;

PP1, 4-amino-5-(4-metil-fenil)-7-(t-butil)pirazolo-D-3,4-pirimidina.

Resultados

Efectos inducidos por el péptido sobre la adhesión y la migración de las células HB2 Wnt-5a antisentido.

15 La Tabla 1 muestra los 14 fragmentos peptídicos iniciales que se obtuvieron a partir de la secuencia de Wnt-5a y que se investigaron para estudiar su capacidad para imitar los efectos de la proteína Wnt-5a sobre la adhesión y la motilidad de células mamarias. Estudios anteriores han mostrado que se requiere la presencia de la proteína Wnt-5a para la activación inducida con colágeno del receptor de adhesión DDR1 y para una adherencia máxima de las células mamarias al colágeno (12). Por lo tanto, se utilizó la fosforilación de DDR1 y la adhesión como parámetros para escrutar la capacidad de los diferentes péptidos para imitar los efectos mediados por Wnt-5a en las células HB2

20 Wnt-5a antisentido. Estas células se seleccionaron ya que gracias a su nivel muy bajo de Wnt-5a, se facilita la observación de un efecto dependiente de Wnt-5a, de los péptidos. Como se muestra a partir de las transferencias representativas y el análisis densitométrico acumulado, los péptidos con el número 168, 169, 170 y 175 (100 µM) causaron una fosforilación significativa de DDR1. La pureza de estos péptidos en los escrutinios iniciales (Figuras 1 y 2) era de aproximadamente el 65%, según se determinó mediante análisis de HPLC (datos no mostrados). El porcentaje de células que se adherían al colágeno I en presencia de los cuatro péptidos (168, 169, 170 y 175) se determinó después en la figura 1 como la fosforilación facilitada de DDR1. El péptido 171 se incluyó como control negativo y el medio condicionado de Wnt-5a (CM) como control positivo. Los resultados muestran que el péptido 168 no tenía ningún efecto sobre la adhesión, mientras que el péptido considerado control negativo tenía un efecto significativo sobre la adhesión (Figura 2A). El hecho de que no se observara una fosforilación de DDR1 en presencia del péptido 171 (Figura 1A), hizo que resultara lógica la sospecha de que el mecanismo a través del cual el péptido 171 afecta a la adhesión, es independiente de DDR1. Puesto que la activación de DDR1 es independiente de las integrinas 111 (22) y que la adhesión de las células mamarias dependiente de Wnt-5a es insensible a una preincubación con un Ac anti-integrina 111 (12), las células H82 suspendidas se trataron previamente con un Ac monoclonal de bloqueo anti-integrina 111, durante 45 minutos a 37°C. Los resultados mostraron que el aumento de la adhesión provocada por el péptido control, 171, es más probable que sea dependiente de la integrina $\alpha_5\beta_1$ (Figura 28). Estos efectos difieren de los del péptido 175 (Figura 28). En este contexto, hay que señalar que ninguno de

estos péptidos con 65% de pureza, incrementaba la adhesión de las células HB2 en la medida del CM (Figura 2A). Para cerciorarse de que los efectos del CM en la figura 2 estaban mediados por Wnt-5a, se realizaron experimentos en los que el CM se había tratado previamente con un Ac de Wnt-5a y proteína A y de ese modo se había agotado Wnt-5a. Estos experimentos de control muestran que el CM con Wnt-5a agotada, no tenía ningún efecto sobre la adhesión (Figura 2C).

Tabla 1

Las secuencias peptídicas y la posición que les corresponde en la proteína Wnt-5a

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Posición en la secuencia de Wnt-5a	Nº de aminoácidos
167	SRAARPKDLPRDWLW	aa 150-164	15
168	DARERERIHAKGSYE	aa 183-197	15
169	ADFRKVGDALKEYD	aa 242-256	15
170 ^A	VKAKKATEIVDQFVA	aa 350-364	15
171	SQLAGLSQGQKKL	aa 55-67	13
172	GDNIDYGYRFAKE	aa 168-180	13
173	RGYDQFKTVQTER	aa 327-339	13
174 ^B	LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL	aa 303-322	20
175	NKTSEGMDGCEL	aa 311-322	12
176	YQDHMQYIGE	aa 71-80	10
177	QYQFRHRRWN	aa 90-99	10
178	RVMQIGSRET	aa 111-120	10
179	HNNEAGRR	aa 206-213	8
180	NSRGKLVQ	aa 264-271	8

^A Las 3 cisteínas en la secuencia de Wnt-5a se intercambiaron por alaninas (A) en el péptido

^B Secuencia extendida basada en el péptido 175

Habiendo identificado cuatro fragmentos peptídicos de la proteína Wnt-5a con capacidad para incrementar la adhesión de las células HB2 que tienen una expresión endógena baja de Wnt-5a (Figura 2A), se realizó a continuación un análisis de estos péptidos dependiente de la concentración, pero ahora con una mayor pureza (del 95% determinada por HPLC). Claramente, el péptido 175 era el más eficaz para incrementar la adhesión de las células HB2 al colágeno I (Figura 3A-3D). El efecto del péptido 169 aumentó cuando se sometió a ensayo con una mayor pureza, mientras que los efectos de los péptidos 170 y 171 con mayor pureza se perdieron o eran menos constantes. La adición de los péptidos 169 y 175 al mismo tiempo con una pureza del 95%, no incrementó adicionalmente la adhesión de las células HB2 en comparación con solo el péptido 175 (datos no mostrados). Previamente se había sugerido, basándose en un razonamiento teórico, que la parte activa de la molécula de Wnt-5b tiene una longitud de 20 aminoácidos. Curiosamente, el presente péptido 175 está contenido dentro del dominio correspondiente dentro de la molécula de Wnt-5a. Por lo tanto, se estudió la idea de si se podría mejorar la eficacia sobre la adhesión celular de un péptido 175 que comprende además los 8 aminoácidos que faltan para obtener un péptido que se corresponde perfectamente al sitio activo previamente sugerido de la proteína Wnt-5a. Claramente, el péptido 174 con una longitud de 20 aminoácidos (Tabla 1) no era tan eficaz como el péptido más corto 175 para incrementar la adhesión de las células HB2 al colágeno I (Figura 3E).

Se ha mostrado que el aumento de los niveles de proteína Wnt-5a en las células HB2 es perjudicial para la migración inducida por HGF en un gel de colágeno, debido presumiblemente a un aumento de la adhesión al colágeno (10). Debido al efecto de los péptidos 169 y 175 que se está observado sobre la adhesión celular, se investigó a continuación los efectos de estos péptidos (95% de pureza) sobre la migración de células HB2 con poca Wnt-5a. Como se describe en la sección de métodos, se permitió que las células migraran en una cámara de Boyden modificada durante 18 h en presencia o ausencia de los péptidos 169 y 175 con una pureza del 95% (100 µM). Como controles positivos y negativos, se añadieron respectivamente, Wnt-5a recombinante purificada (0,4 µg/ml) o el péptido 171 con una pureza del 95% (100 µM). Tanto el péptido 169 como el 175, así como la Wnt-5a recombinante disminuían efectivamente la migración de las células HB2 Wnt-5a antisentido (Figura 3F). El péptido control 171 no tuvo ningún efecto sobre la migración (Figura 3F).

Efectos inducidos con péptidos sobre la adhesión y la migración de las células tumorales MDA-MB-468 que carecen de Wnt-5a.

Basándose en el interés en reconstituir la señalización de Wnt-5a en células de cáncer de mama y de ese modo alterar potencialmente su capacidad metastásica, se investigaron a continuación los efectos de los péptidos puros

169, 175 y del péptido control 171 sobre la adhesión al colágeno I de células de cáncer de mama humanas MDA-MB-468 que carecen de Wnt-5a. El nivel de expresión de la proteína Wnt-5a en las células MDA-MB-468 se analizó primero tanto en relación con las células HB2 Wnt-5a antisentido como con las células HB2 que hiperexpresan HA-Wnt-5a. Como se observa en la Figura 4A, tanto las células HB2 Wnt-5a antisentido como las células MDA-MB-468 tienen bajos niveles proteicos de Wnt-5a, mientras que las células transfectadas con Wnt-5a expresan un nivel muy alto de la proteína Wnt-5a. Se sabe que la expresión de Wnt-5a depende de las condiciones del cultivo y también del grado de confluencia de las células en el momento del análisis (23). En consecuencia, las células analizadas en la figura 4A se recogieron con las mismas condiciones que en los experimentos posteriores, es decir, con una confluencia del 80-90% y después de haber sido tratadas con medio exento de suero durante 16 h antes de cada experimento, a menos que se indicara lo contrario.

La adhesión de las células MDA-MB-468 al colágeno I se incrementaba significativamente en presencia de los péptidos 169 y 175 y mediante CM que contenía Wnt-5a, pero no con el péptido control 171 (Figura 4B). Los péptidos que contienen una o varias cisteínas libres, tales como el péptido 175, pueden tener efectos inespecíficos formando interacciones cisteína-cisteína con diferentes proteínas/péptidos. Para investigar si el efecto del péptido 175 sobre la adhesión celular se relacionaba con su residuo de cisteína, se compararon los efectos del péptido 175 que contenía cisteína con los de un péptido idéntico al péptido 175 con la excepción de que la cisteína se había reemplazado por un residuo de alanina. Se encontró que el 175 que contenía alanina era igual de eficaz incrementando la adhesión que el 175 que contenía cisteína y no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los péptidos 175 que contenían cisteína y los que contenían alanina (Figura 4C).

Una observación interesante en las células MDA-MB-468 es el nivel de fosforilación constante, aunque modesto, de DDR1, observado incluso en la situación basal en la que no está presente ni Wnt-5a ni el péptido (Figura 4D). Además, ni los péptidos puros, ni CM, ni Wnt-5a recombinante fueron capaces de aumentar aún más el nivel de fosforilación de DDR1 en las células MDA-MB 468 (Figura 4D). Previamente se ha mostrado que la fosforilación inducida por colágeno dependiente de Wnt-5a, de DDR1 en las células MCF-7 y HB2, está mediada a través de una cinasa Src (12). En consecuencia, las células MDA-MB-468 fueron tratados con 10 µM del inhibidor de Src 4-amino-5-(4-metil-fenil)-7-(t-butil)pirazolo-D-3,4-pirimidina (PP1) durante 30 min. Claramente, este tratamiento inhibió la fosforilación basal de DDR1 (Figura 5A). Esta observación se correlaciona muy bien con la actividad elevada de la cinasa Src mencionada anteriormente, en MDA-MB-468 (24), confirmando y demostrando así que es independiente de la presencia de suero, pero está inhibida por PP1 (Figura 5B). Se ha sugerido que la actividad elevada de Src en estas células es debida a la hiperexpresión y la hiperactividad de receptores de EGF (25). De acorde con ello, el receptor de EGF se expresa abundantemente y de forma muy fosforilada en las células MDA-MB-468, incluso después de dejar de recibir suero durante 16 h (Figura 5C). Posiblemente esta hiperactividad de los receptores de EGF y la alta actividad resultante de Src, es la causa subyacente de la fosforilación constante de DDR1 observada en las células MDA-MB-468. Aunque estos resultados no están directamente relacionados con el presente esfuerzo para identificar péptidos que imitan a Wnt-5a, muestran claramente que i/ permitir la activación de DDR1 no es el único medio a través del cual Wnt-5a afecta a la adhesión y la motilidad de células mamarias y ii/ otros mecanismos además de la señalización de Wnt-5a, pueden conseguir la activación de DDR1 inducida con colágeno ii/ otros mecanismos además de la señalización de Wnt-5a, pueden conseguir la activación de DDR1 inducida con colágeno, a través de la activación con Src.

Se conoce que la migración es un requisito previo para la invasión del cáncer y la metástasis y que este aumento de la migración celular en un sistema de cámara de Boyden, se correlaciona con el aumento de las propiedades invasivas de células tumorales *in vivo*. Por lo tanto, se investigaron los efectos de los péptidos puros 171 (control), 169 y 175 sobre la motilidad de las células MDA-MB-468 en un ensayo en cámara de Boyden. Tanto el péptido 169 como el 175 disminuyeron significativamente la migración de las células MDA-MB-468, mientras que el péptido control 171 no tenía ningún efecto estadísticamente significativo (Figura 6A). Se obtuvieron los mismos resultados si los pocillos y las membranas se recubrían con colágeno I (10 µg/ml) a 37°C durante 1 h, antes de iniciar los experimentos (datos no mostrados). De paso, se observó que las células MDA-MB-468 expuestas al péptido 175 tenían un contenido celular en actina filamentosa (F-actina) significativamente superior, en comparación con las células no tratadas, visualizadas en este caso por tinción con faloidina AlexaFluor® 488 (Figura 6B). En ausencia de un aumento de la activación de DDR1, este incremento en F-actina bien podría explicar el aumento inducido por el péptido, de la adhesión y la alteración de la motilidad de las células MDA-MB-468, puesto que se sabe que un contenido incrementado en F-actina, hace que una célula sea más rígida y por lo tanto menos móvil.

Efectos de la eliminación secuencial de aminoácidos y de la formilación sobre los efectos inducidos por el péptido 175 sobre la adhesión y la migración de las células tumorales MDA-MB-468.

Para identificar el péptido más corto posible que todavía tuviera efectos adhesivos y de antimotilidad, se realizaron deleciones secuenciales de dos aminoácidos desde la parte N-terminal del péptido más corto de los dos péptidos activos identificados, que es el péptido 175. El efecto sobre la adhesión de células tumorales se perdió gradualmente cuando se eliminaban 2 aminoácidos a la vez del péptido 175, y cuando solo había 6 aminoácidos, no se pudo detectar ningún efecto (Figura 7A). Es bien conocido que ligandos peptídicos N-formilados procedentes de bacterias pueden activar de forma potente los leucocitos mediante la unión a receptores acoplados a la proteína G en estas células. En este contexto, el grupo formilo aumenta el efecto del ligando en 3 o 4 órdenes de magnitud. Curiosamente, estos péptidos bacterianos y Wnt-5a se unen a receptores acoplados a la proteína G y algunos de

estos péptidos bacterianos y nuestro hexapéptido tienen un residuo de metionina en su extremo N-terminal. En consecuencia, hemos sometido a ensayo el efecto de una variante formilada de nuestro hexapéptido sobre la adhesión celular. La formilación de la metionina N-terminal de este hexapéptido restauraba y posiblemente incluso potenciaba su efecto sobre la adhesión (Figura 7A). Los experimentos de control mostraron que el tripéptido formilado fMet-Leu-Phe, conocido por activar leucocitos (19), no afectaba a la adhesión celular de MDA-MB-468 (control $15,3 \pm 3,6$, fMet-Leu-Phe $15,7 \pm 4,5$; $n = 6$). Esto indica un papel específico de la secuencia del hexapéptido de Wnt-5a en la mediación del efecto del hexapéptido formilado. De acuerdo con los efectos del hexapéptido formilado y del péptido 175 sobre la adhesión celular, también se podría mostrar que con una concentración tan reducida como $10 \mu\text{M}$, ambos péptidos alteran de manera significativa la motilidad de las células MDA-MB-468 (Figura 7B y 7C).

Para garantizar que el hexapéptido formilado y Wnt-5a recombinante son en realidad ligandos que se unen al receptor Frz-5 en las células mamarias, como se ha mostrado anteriormente en sinoviocitos y en células de melanoma maligno, se generó el Ac de bloqueo descrito anteriormente para el receptor Frz-5 y un Ac control producido contra la misma secuencia en el ectodominio del receptor Frz-2. Las manchas en la figura 8A muestran que estos dos Ac purificados por afinidad reconocen específicamente bandas de proteínas que se corresponden perfectamente al peso molecular del receptor Frz-2 y del receptor Frz-5, respectivamente. Experimentos de bloqueo de péptidos en los que el Ac se preincubaba con los péptidos antigénicos contra los que se habían producido (relación molar 1:10) también se realizaron. En el siguiente análisis de transferencia Western (WB), la detección de los receptores Frz-2 y Frz-5 fue imposible, incluso si las películas se exponían durante mucho tiempo (Figura 8A, pistas 2 y 4, respectivamente). De acuerdo con datos anteriores de melanoma maligno (14) la disminución inducida por Wnt-5a de la migración celular de MDA-MB-468, se puede mostrar que está mediada a través del receptor Frz-5, mientras que el Ac control anti-Frz-2 no tenía efecto (Figura 8B). Curiosamente, también se pudo mostrar que el efecto del hexapéptido formilado sobre la migración de las células MDA-MB-468 está mediado a través del receptor Frz-5 (Figura 8B). En el contexto de la inhibición de la migración de células tumorales *in vivo*, hay que recordar que el pH que se encuentra en el tejido del tumor de mama es de aproximadamente 6,7. En consecuencia, era fascinante observar que el hexapéptido formilado es igual de eficaz en la inhibición de la migración de las células MDA-MB-468 a pH 6,7 como a pH 7,4 (Figura 8C).

En la presente investigación, se generaron diferentes péptidos procedentes de la secuencia de la proteína Wnt-5a y se identificaron dos de ellos que tenían capacidad para imitar a Wnt-5a en términos de inhibición de la motilidad de las células de cáncer de mama. Se razonó que era probable que Wnt-5a interaccionara, como muchos otros ligandos de proteínas, con su receptor a través de al menos un bucle expuesto al disolvente en su superficie. Dado que la estructura tridimensional experimental de Wnt-5a es desconocida, no se pudieron aplicar métodos de formación de modelos por homología debido a la falta de un molde adecuado. Como tal, con el fin de predecir qué segmento de Wnt-5a podría formar un bucle expuesto al disolvente, se realizaron predicciones de superficies secundarias/accesibles al disolvente con PHD. Los resultados (presentados en la Tabla 1) nos permitieron dirigir inicialmente el estudio sobre solo unos pocos péptidos con una longitud de 8 a 15 aminoácidos.

Anteriormente varios ligandos peptídicos habían sido identificados con éxito, entre éstos el tripéptido bien establecido Arg-Gly-Asp, que funciona como un ligando del receptor de la integrina y los dos hexapéptidos que pueden activar específicamente los receptores 1 y 4 activados por proteasas acopladas a la proteína G (18). Otro ejemplo, pero esta vez con un efecto antagonista, es el septapéptido que se une a trombina acoplada a la proteína G (30). En este estudio, como metodología de escrutinio primario se utilizaron efectos inducidos por los péptidos sobre la adhesión de células mamarias. Con esta táctica se identificaron dos péptidos que con una pureza elevada (95%), incrementaban la adhesión al colágeno I de una manera dependiente de la concentración, tanto en las células HB2 no cancerígenas como en las células cancerígenas MDA-MB-468 (líneas celulares con niveles endógenos muy bajos de proteína Wnt-5a). Para identificar el péptido más corto posible que todavía tenía un efecto antimotilidad similar al de Wnt-5a, se realizaron deleciones secuenciales de dos aminoácidos desde la parte N-terminal del péptido más corto de estos dos péptidos (doce aminoácidos de longitud). Se encontró que el octapéptido todavía tenía efectos que incrementaban la adhesión, mientras que el hexapéptido no tenía ninguno. Sin embargo, el hecho de que el aminoácido N-terminal en este hexapéptido fuera una metionina, trajo a colación el fuerte efecto promotor que ejerce el grupo formilo de la metionina N-terminal del péptido fMet-Leu-Phe obtenido a partir de bacterias (19, 31-33). La metionina N-formilada es el aminoácido iniciador de la síntesis de todas las proteínas bacterianas. Durante una infección, un gran número de bacterias se desintegran por diversas razones y durante este proceso se produce una liberación de péptidos cortos N-formilados desde las bacterias. Estos péptidos son activadores muy potentes de los leucocitos por su afinidad de unión alta a los receptores peptídicos de formilo acoplados a la proteína G (31, 33).

La secuencia del hexapéptido Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu es única para las proteínas Wnt-5 en células de mamífero, pero está presente en dos proteínas diferentes en bacterias. Sin embargo, en ninguno de los casos la secuencia del hexapéptido tiene una ubicación N-terminal y por lo tanto no puede estar presente en estado formilado. En consecuencia, el hexapéptido N-formilado descrito actualmente es un péptido único que no se puede encontrar ni en bacterias ni en células de mamífero. En este contexto se debe mencionar que N-formil-Met-Leu-Phe, el tripéptido potente que activa los leucocitos, no tenía ningún efecto sobre la adhesión de células MDA-MB-468, lo que indica que ningún péptido formilado se unirá y activará el receptor Frz-5 en estas células.

Previamente se ha mostrado que una pérdida de expresión de Wnt-5a conduce a una disminución de la adhesión de las células tumorales de mama y por tanto a un aumento de la motilidad. Estos resultados junto con el conocimiento de que el aumento de la migración celular es un problema subyacente en la metástasis del cáncer, nos dispusieron a investigar un efecto antimotilidad del hexapéptido formulado en las células tumorales de mama. Estos experimentos se realizaron en una cámara de Boyden modificada, debido a que se había mostrado previamente que la actividad móvil de las células tumorales en un ensayo de este tipo, se correlaciona bien con su comportamiento invasivo *in vivo*. Coincidiendo con el efecto que tenía el hexapéptido formulado sobre la adhesión de las células tumorales MDA-MB-468, también dañaba fuertemente su migración. Se pensaba que DDR1 es responsable del efecto sobre la adhesión y la migración. El hecho de que las células MDA-MB-468 muestren una fosforilación constante de DDR1 en ausencia o presencia de péptidos, CM o Wnt-5a recombinante, indica que Wnt-5a puede actuar a través de un mecanismo adicional, mediante el cual afecta a la migración de las células tumorales MDA-MB-468. La observación de un aumento significativo inducido por péptido, de F-actina de forma paralela a una disminución de la motilidad, sugiere que la rigidez mediada por F-actina de las células podría ser una explicación alternativa de su fuerte adhesión y motilidad reducida. La concentración mínima del hexapéptido formulado que tenía un efecto significativo sobre la migración, era de 10 μ M, lo que está en concordancia con el hallazgo de Andersen y sus colaboradores, que encontraron que las concentraciones funcionales más bajas de sus hexapéptidos en plaquetas era de 10 μ M. La importancia clínica potencial de los presentes resultados es evidente. El hecho de que la falta de expresión de la proteína Wnt-5a endógena en las células tumorales mamarias esté fuertemente asociada con un mayor grado histológico y una supervivencia reducida exenta de enfermedad en estos pacientes (9), indica una necesidad de un medio para reconstituir la señalización de Wnt-5a en tales células tumorales y, por lo tanto, de retrasar o inhibir la formación de metástasis distales. Además, la reconstitución de la señalización de Wnt-5a también parece ser una metodología terapéutica futura en otras formas tumorales, ya que se ha mostrado que Wnt-5a tiene actividad supresora tumoral en el carcinoma de tiroides y la pérdida de expresión de Wnt-5a está asociada con neuroblastoma de alto riesgo.

Debido a la vascularización ineficaz, así como a un aumento de la producción de lactato, el pH extracelular en el tejido tumoral sólido es menor que en el tejido normal. Sin embargo, en los tumores de mama humanos, también se ha sugerido que la isoforma 1 del intercambiador Na^+/H^+ participa en la regulación tanto del pH extracelular como intracelular. Por lo tanto, es de vital importancia para cualquier sustancia potencial que inhiba la metástasis, que sea eficaz también al pH bajo encontrado en el tejido tumoral. Los intentos para estimar el pH en un tejido tumoral sólido *in vivo* han estimado que es aproximadamente 6,75. Curiosamente, los datos presentes muestran que el hexapéptido formulado que se ha identificado, inhibe la movilidad de las células tumorales de mama MDA-MB-468, tanto a un pH bajo (6,7) como a pH normal (7,4).

En conclusión, se ha establecido que un nuevo ligando peptídico formil-Met-Asp-Gly-Cys-Glu-Leu obtenido a partir del ligando de Wnt-5a, tiene potencial para imitar los efectos de la molécula Wnt-5a completa en la unión al receptor Frz-5 y alterar la capacidad de movilidad de una línea celular de tumor de mama humana que tiene una expresión endógena baja de la proteína Wnt-5a. Este ligando peptídico puede servir como sustancia modelo para el desarrollo futuro de un tratamiento antimetastático innovador para aquellos pacientes (aproximadamente el 50%) que han sido diagnosticados con un cáncer de mama que muestra una expresión endógena reducida de Wnt-5a.

Métodos

Cultivo celular.

Se utilizó la línea de células epiteliales mamarias HB2, un subclon de la línea celular MTSV-1.7, originaria del laboratorio del Dr. J. Taylor-Papadimitriou (11). Las células HB2 se cultivaron en DMEM complementado con 10% de FBS, 5 U/ml de penicilina, 0,5 U/ml de estreptomina, glutamina 2 mM, 10 μ g/ml de insulina bovina y 5 μ g/ml de hidrocortisona. Las líneas celulares de carcinoma mamario humano MCF-7 y MDA-MB-468 se cultivaron en DMEM complementado con 10% de FBS, 5 U/ml de penicilina, 0,5 U/ml de estreptomina y glutamina 2 mM. Los experimentos del pH se realizaron en MEM complementado con Tris 10 mM, 0,5% de BSA, 5 U/ml de penicilina, 0,5 U/ml de estreptomina y glutamina 2 mM. El medio con pH 7,4 se complementó adicionalmente con bicarbonato sódico 4 mM mientras que el medio con pH 6,7 no se complementó. Todas las células se incubaron a 37°C en 95% de aire y 5% de CO_2 .

Productos químicos y reactivos.

Las fuentes de Ac y los productos químicos fueron los siguientes: Ac monoclonal anti-actina C4 (MP Biomedicals, Irvine, CA), Ac monoclonal anti-integrina β 1 P5D2 (Chemicon, Temecula, CA), colágeno, tipo I de cola de rata y Ac anti-receptor de EGF (forma activada) (BD Biosciences, San José, CA), Ac anti-receptor de EGF (todas las formas) y Ac monoclonal anti-fosfotirosina 4G10 (Upstate Biotech. Inc. Lake Placid, NY), PP1 (Biomol, Plymouth Meeting, PA), Wnt-5a recombinante de ratón (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), Ac anti-Src (Santa Cruz, Santa Cruz, CA), anti-Src [pY⁴¹⁸] (Biosource Int, Camarillo, CA) y reactivos de SDS-PAGE (BioRad Laboratories, Hercules, CA).

Síntesis de péptidos.

En la mayoría de los casos Eurogentec (Seraing, Bélgica) sintetizó los diferentes fragmentos peptídicos obtenidos a

partir de la molécula Wnt-5a. Sin embargo, los péptidos más cortos y el péptido formilado obtenido a partir del péptido 175 con una longitud de 12 aminoácidos, fueron sintetizados por sistemas Pepscan (Lelystad, Países Bajos). Todos los demás reactivos de laboratorio se obtuvieron de Sigma Aldrich Corporation (St Louis, MO).

Anticuerpos bloqueantes del receptor.

- 5 El péptido CPILKESHPLYNKVRTGQVNP, que se corresponde a los aminoácidos 198-217 en el ectodominio del receptor Frz-5 humano, se utilizó como se ha descrito previamente para generar un Ac bloqueante del receptor Frz-5 (13). El péptido CPRVLKVPSYLSYKFLGERD, que se corresponde a los aminoácidos 202-220 en el ectodominio del receptor Frz-2 humano, se utilizó para generar un Ac anti-Frz-2 de control. La síntesis de los péptidos (las letras en cursiva indican las secuencias de Frz-5 y Frz-2, la cisteína se añadió para producir y purificar el Ac) y la producción de antisueros de conejo anti-Frz-5 y anti-Frz-2 estuvo supervisada por AgriSera (Vännäs, Suecia; permiso A69-04 del Umeå animal ethic committee). Los antisueros se purificaron por afinidad en el laboratorio mediante el acoplamiento del antígeno peptídico correspondiente a sefaroza Sulfolink sobre la que, a continuación, se eluyeron los antisueros respectivos.

Inmunoprecipitación y transferencia Western.

- 15 El análisis de transferencia Western se llevó a cabo para evaluar la expresión proteica de Wnt-5a, receptor de EGF, Src y Frz-2 y 5 en células HB2 y MDA-MB-468. Evidentemente, el lote de células MDA-MB-468 utilizadas en el presente estudio tenía un nivel de expresión de Wnt-5a bajo. El Ac de Wnt-5a se produjo en el laboratorio, como se ha descrito previamente (9, 10). Las células se lisaron y se hirvieron en tampón de Laemmli concentrado, dos veces. El contenido en proteína se determinó en cada muestra y se ajustó para asegurar que se cargaban cantidades iguales de proteína en cada pista, a continuación se añadió DTT 50 mM y los lisados se hirvieron durante 10 min, antes de la separación mediante electroforesis en gel SDS. Las proteínas se transfirieron posteriormente a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon en 3% de BSA o 5% de leche desnatada durante 45 min, se incubaron con el Ac primario durante 1 hora (1:2000 para Wnt-5a, 1:1000 para el receptor de EGF activado, receptor de EGF total, actina, Src activa y Src total, y 1:5.000 para Frz-2 y Frz-5), y luego durante 1 h con un Ac secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante. El complejo Ac-antígeno se detectó usando un kit de detección de quimioluminiscencia de Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia). En el caso de analizar las membranas con otros anticuerpos (reprobing), las membranas fueron despojadas del Ac con una solución Reblot Strong de Chemicon International (Temecula, CA).

- 30 Se analizó el estado de fosforilación de DDR1 como se ha descrito previamente (12), con las siguientes modificaciones. Después del agotamiento del suero durante 16 h, las células se desprendieron con Versene y después se permitió que se adhirieran a colágeno I durante 60 min (MDA-MB-468) o 90 min (HB2) a 37°C. Los experimentos terminaron mediante la lisis de las células tanto adherentes como no adherentes con un tampón de lisis (Tris 50 mM pH 7,4, 1% de Triton-X, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NaCl 50 mM, 10 µg/ml de aprotinina, benzamidina 2,5 mM, Pefabloc 1 mM, 1 µg/ml de leupeptina y Na₃VO₄ 1 mM). Para la inmunotransferencia se empleó un Ac monoclonal anti-DDR1 de conejo, sc-532 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) con una dilución de 1:10.000. El Ac reconoce DDR1b/c, que es esencial porque el colágeno solo induce la fosforilación de las isoformas b o c de DDR1 en las células epiteliales mamarias (10).

Ensayo de adhesión.

- 40 El ensayo de adhesión se llevó a cabo como se ha descrito previamente (12). Brevemente, se agotó el suero de las células durante 16 h, se desprendieron con Versene y se permitió que se adhirieran como células individuales a colágeno I durante 60 min (MDA-MB-468) o 90 min (HB2) a 37°C. Las células no adherentes se eliminaron por lavado con PBS. Las células adherentes se incubaron con un ensayo de reducción de colorante con sal interna MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio, (Promega, Madison, WI) y se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de microplacas Fluostar de BMG Labtechnologies (GmbH, Offenberg, Alemania). En cada experimento se calculó un único valor basándose en la media de la adhesión de seis pocillos distintos, después de restar la adhesión solo a plástico. El CM utilizado como control en los ensayos de adhesión se obtuvo a partir de células HB2 confluentes que hiperexpresaban Wnt-5a (para experimentos con células HB2 con Wnt-5a antisentido) o células MCF-7 que hiperexpresaban Wnt-5a (para células MDA-MB-468) transfectadas de forma estable con un vector que hiperexpresaba Wnt-5a. El CM recogido se utilizó siempre en los siguientes tres días.

Control del CM.

Para controlar la especificidad del CM, se incubó con Wnt-5a o con un Ac control durante 45 min a 37°C. Posteriormente se añadieron 10 µl de Proteína A Sefarosa durante 30 min y después de recoger por centrifugación los anticuerpos unidos a la proteína A, el material sobrenadante restante se empleó en los experimentos.

- 55 Ensayo de migración celular.

Los análisis de la migración celular se realizaron en una cámara de Boyden modificada con una membrana de policarbonato (10 µm de espesor con un diámetro poroso de 8,0 µm) que separaba las dos cámaras (Transwell®;

Costar, Cambridge, MA). Como se ha indicado en algunos experimentos, las membranas se recubrieron con colágeno mediante la adición de colágeno-I (10 µg/ml) diluido en ácido acético al 0,25%, a la cámara superior durante 1 hora a 37°C, después de lo cual se lavó tres veces con PBS. Cada experimento se inició desprendiendo las células mediante tratamiento con Versene durante 10-20 min a 37°C, se lavó y se resuspendió como una sola suspensión celular en DMEM exento de suero, complementado con 0,5% de BSA. A continuación, se añadió junto con el agonista indicado una suspensión de 0,2 ml de células (que contenía 25.000 células MDA-MB-468 o 50.000 células HB2) a la cámara superior de la Transwell. La cámara inferior se llenó con 0,6 ml de medio DMEM exento de suero, pero que contenía BSA, complementado con 1 ng/ml de IGF-I quimioatrayente. Como control, IGF-I fue excluido en algunos pocillos en cada experimento independiente. Se permitió que las células migraran a la cámara de Boyden durante 18 h a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO₂. Los experimentos terminaron mediante la eliminación de las células no migratorias con un aplicador con punta de algodón desde la superficie superior de las membranas. Las células restantes en la superficie inferior que habían migrado a través de la membrana, se tiñeron durante 20 minutos con 0,5% de cristal violeta diluido en 20% de metanol/80% de agua. Después de lavar las membranas se contó el número de células teñidas por membrana y pocillo en un microscopio invertido. El valor de cada experimento por separado representa el valor medio de tres pocillos individuales.

Microscopía fluorescente.

Las células MDA-MB-468 se desprendieron de las placas de cultivo de tejidos mediante incubación con Versene durante 10 min a 37°C, se lavaron, se resuspendieron como células individuales en medio DMEM exento de suero complementado con 0,5% de BSA, con o sin péptido 175 (100 µM), y se extendieron sobre un cubreobjetos, recubierto previamente con 10 µg/ml de colágeno-I, en una placa de cultivo celular. Estos experimentos terminaron después de 18 h mediante la fijación de las células con paraformaldehído al 4% durante 10 min a 4°C. Después las células se permeabilizaron mediante incubación con 0,5% de Triton X-100 durante 5 min y se bloquearon incubando con una solución de 3% de BSA complementada con 0,3% de Triton X-100 durante 45 min. La tinción de las células se realizó en la oscuridad mediante incubación durante 40 min con faloidina AlexaFluor® 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) con una dilución de 1:500 y en presencia de 1% de BSA. Posteriormente, las células se lavaron a fondo y finalmente se montaron con medio fluorescente para montar de Dako Cytomation. Las muestras se examinaron y se fotografiaron en un microscopio Nikon Eclipse 800, utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 60x.

Formulaciones farmacéuticas

Cuando se empleaban como productos farmacéuticos, los compuestos de esta invención se administran normalmente en forma de composiciones farmacéuticas. Estos compuestos se pueden administrar por una variedad de rutas incluyendo la ruta oral y rectal. Estos compuestos son eficaces como composiciones orales. Tales composiciones se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo.

Esta invención también incluye composiciones farmacéuticas, que contienen como ingrediente activo, uno o varios de los compuestos descritos en la presente memoria, asociados con vehículos farmacéuticamente aceptables. Al preparar las composiciones de esta invención, el ingrediente activo se mezcla normalmente con un excipiente, se diluye mediante un excipiente o se incluye dentro de un vehículo tal que puede estar en forma de cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como un vehículo, soporte o medio para el ingrediente activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios y polvos envasados.

En la preparación de una formulación, puede ser necesario moler el compuesto activo para proporcionar el tamaño de partícula apropiado antes de combinarlo con los otros ingredientes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, normalmente se muele hasta tener un tamaño de partícula menor que la malla nº 200. Si el compuesto activo es sustancialmente hidrosoluble, el tamaño de partícula se ajusta normalmente mediante molienda para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, malla aproximadamente nº 40.

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

Las composiciones se formulan preferiblemente en forma de dosificación unitaria. La expresión "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 un excipiente farmacéutico adecuado. Preferiblemente, el compuesto de la Fórmula (I) anterior se emplea con no más de aproximadamente 20 por ciento en peso de la composición farmacéutica, más preferiblemente no más de aproximadamente 15 por ciento en peso, siendo el resto el(los) vehículo(s) farmacéuticamente inerte(s).

- 5 El compuesto activo es eficaz en un intervalo amplio de dosificación y se administra generalmente en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Por ejemplo, cuando el fármaco se administra por vía oral, cada dosificación contiene desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg, preferiblemente desde aproximadamente 2 mg a aproximadamente 500 mg, más preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 60 mg de ingrediente activo. Sin embargo, se
10 entenderá que la cantidad de compuesto administrada realmente será determinada por un médico, en vista de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado y su actividad relativa, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares. Desde un punto de vista principal, la formulación se debe administrar simultáneamente con una ingesta de alimentos, y después se debe administrar en una cantidad que proporcione una
15 inhibición suficiente de lípidos. Por ello, el organismo puede necesitar algunos lípidos desde un punto de vista nutricional y esto puede influir después en la cantidad administrada de compuestos inhibidores de la invención. El efecto de los compuestos de la invención tiene lugar en el intestino delgado y por lo tanto no hay un efecto adicional obtenido como tal, sino de posibles metabolitos de los compuestos.

- 20 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el ingrediente 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 hace referencia a estas composiciones de preformulación porque sean homogéneas, significa que el ingrediente activo se dispersa uniformemente por toda la composición, de manera que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces, tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide después en formas de
25 dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen el ingrediente activo de la presente invención.

- Los comprimidos, píldoras o gránulos de la presente invención se pueden recubrir o meclar de otra manera para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora pueden comprender un componente de dosificación interna y de dosificación externa, estando este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por
30 una capa entérica, que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Se puede utilizar una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo tales materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

- Los comprimidos, las píldoras o los gránulos de la presente invención pueden estar recubiertos con un recubrimiento de liberación sostenida que permite la liberación en el páncreas, en donde la lipasa pancreática se libera al intestino. Tal recubrimiento de liberación sostenida permitirá de este modo una pequeña liberación, si alguna, en el estómago, pero permite la liberación total en la parte superior del intestino delgado.

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

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

- Los aglutinantes adecuados para la preparación de 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 acacia, alginato de sodio, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etil celulosa, acetato de celulosa, calcio
50 carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de sodio), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, almidón pregelatinizado, hidroxipropil metil celulosa, (por ejemplo, n° 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina y mezclas de los mismos.

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

Ejemplos de cargas adecuadas para el uso con las formas de dosificación de los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, talco, carbonato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina,

celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido salicílico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado y mezclas de los mismos.

Típicamente, desde 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.

- 5 Los agentes disgregantes se utilizan para hacer que el comprimido se desintegre cuando se expone a un entorno acuoso. Demasiado agente disgregante producirá comprimidos que se pueden desintegrar en la botella debido a la humedad atmosférica; demasiado poco puede ser insuficiente para que se produzca la desintegración y, por tanto, puede alterar la tasa y el grado de liberación del compuesto de la invención desde la forma de dosificación. Por lo tanto, una cantidad suficiente de agente disgregante que no sea ni demasiada escasa ni demasiada cantidad para
- 10 alterar perjudicialmente la liberación del fármaco, se debe utilizar para constituir las formas de dosificación sólidas de la invención. La cantidad de agente disgregante utilizado varía basándose en el tipo de formulación y el modo de administración, y para los expertos en la técnica es fácilmente distinguible. Típicamente, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 por ciento en peso de agente desintegrante, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento en peso de agente disgregante, se puede utilizar en la composición farmacéutica.
- 15 Los agentes disgregantes adecuados que se pueden usar para constituir formas de dosificación sólidas incluyen, pero no se limitan a, agar-agar, ácido algínico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilina de potasio, almidón glicolato sódico, almidón de patata o de tapioca, otros almidones, almidón pregelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas y mezclas de los mismos.

- 20 Los lubricantes adecuados para 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, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato 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 zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar y mezclas de los mismos. Lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice Syloid (AEROSIL 200, fabricado por W.R. Grace Co. de Baltimore, Md.), un aerosol
- 25 coagulado de sílice sintético (comercializado por Degussa Co. de Plano, Tex.), CAB-O-SIL (un producto de dióxido de silicio pirógeno vendido por Cabot Co. de Boston, Mass.) y mezclas de los mismos. Opcionalmente se puede añadir un lubricante, típicamente en una cantidad menor de aproximadamente 1 por ciento en peso de la composición farmacéutica.

- 30 Preferiblemente, cada forma de dosificación sólida contiene desde aproximadamente 5 mg a aproximadamente 3000 mg del compuesto de la invención. Preferiblemente, 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 la administración oral contienen preferiblemente desde aproximadamente 5 mg a aproximadamente 200 mg del compuesto de la invención.

- 35 Las formas líquidas en las que las nuevas composiciones de la presente invención se pueden incorporar para la administración por vía oral, incluyen soluciones acuosas, jarabes aromatizados adecuadamente y emulsiones acuosas aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

- 40 Además, las composiciones farmacéuticas que contienen uno o varios compuestos de esta invención se pueden administrar en combinación con cualquier otro fármaco adecuado, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos gastrointestinales. Cuando se emplea la terapia de combinación, la composición farmacéutica que contiene el(los) compuesto(s) de esta invención y el segundo fármaco, se puede administrar 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 *in vivo* de los síntomas en cuestión.
- 45

- Preferiblemente, el intervalo de dosis para los compuestos de esta invención es desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por dosis, más preferiblemente de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 500 mg, aún más preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg, y aún más preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 60 mg. Una vez más, la dosis particular usada dependerá del paciente
- 50 (edad, peso, etc.) y de la gravedad de la enfermedad (leve, moderada, grave). Por último, una composición farmacéutica que contiene dos ingredientes activos también se puede preparar para administrar los fármacos simultáneamente.

- La administración del(de los) presente(s) fármaco(s) normalmente se llevará a cabo en relación con una ingesta de alimentos, cuando la lipasa-colipasa se libera debido a la digestión y se obtendrá una inhibición óptima tras el duodeno.
- 55

EJEMPLOS

Las siguientes preparaciones y ejemplos se proporcionan para permitir que los expertos en la técnica entiendan más

claramente y pongan en práctica la presente invención.

Ejemplos de Formulación

Ejemplo 1

Se preparan cápsulas de gelatina dura que contienen los siguientes ingredientes:

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

- 5 Los ingredientes anteriores se mezclan y se introducen en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 340 mg.

Ejemplo 2

Se prepara una fórmula de comprimido usando los siguientes ingredientes:

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

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

Ejemplo 3

- 10 Se preparan comprimidos conteniendo cada uno 30 mg de ingrediente activo, del modo siguiente:

Ingrediente	Cantidad (mg/comprimido)
Ingrediente activo	30,0 mg
Almidón	45,0 mg
Celulosa microcristalina	35,0 mg
Polivinilpirrolidona (como solución al 10% en agua estéril)	4,0 mg
Carboximetil almidón sódico	4,5 mg
Estearato de magnesio	0,5 mg
Talco	1,0 mg
Total	120,0 mg

- 15 El ingrediente activo, el almidón y la celulosa se hacen pasar a través de un tamiz de malla US nº 20 y se mezclan a fondo. La solución de polivinilpirrolidona se mezcla con los polvos resultantes, que después se hacen pasar a través de un tamiz de malla US nº 16. Los gránulos así producidos se secan de 50 a 60°C, y se hacen pasar a través de un tamiz de malla US nº 16. El carboximetil almidón sódico, el estearato de magnesio y el talco, pasados previamente a través de un tamiz de malla US nº 30, se añaden entonces a los gránulos que, después de mezclar, se comprimen en una máquina de comprimidos para producir comprimidos en donde cada uno pesa 120 mg.

Ejemplo 4

Se preparan cápsulas conteniendo cada una 40 mg de medicamento, del modo siguiente:

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

- 20 El ingrediente activo, el almidón y el estearato de magnesio se mezclan, se hacen pasar a través de un tamiz de malla US nº 20, y se introducen en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 150 mg.

Ejemplo 5

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

Ingrediente	Cantidad
Ingrediente activo	25 mg
Glicéridos de ácidos grasos saturados hasta	2000 mg

El ingrediente activo se hace pasar a través de un tamiz de malla US nº 60 y se suspende en los glicéridos de ácidos grasos saturados, fundidos previamente usando el mínimo calor necesario. La mezcla se vierte entonces en un molde de supositorios con una capacidad nominal de 2,0 g y se deja enfriar.

Ejemplo 6

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

Ingrediente	Cantidad
Ingrediente activo	50,0 mg
Goma de xantano	4,0 mg
Carboximetil celulosa sódica (11%)	
Celulosa microcristalina (89%)	50,0 mg
Sacarosa	1,75 g
Benzoato de sodio	10,0 mg
Sabor y Colorante	c.s.
Agua purificada hasta	5,0 ml

El ingrediente activo, la sacarosa y la goma de xantano, se mezclan, se hacen pasar a través de un tamiz de malla US nº 10, y luego se mezclan con una solución previamente preparada de celulosa microcristalina y carboximetil celulosa sódica en agua. El benzoato de sodio, el sabor y el colorante se diluyen con algo de agua y se añaden con agitación. A continuación, se añade agua suficiente para producir el volumen requerido.

Ejemplo 7

Se puede preparar una formulación del modo siguiente:

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

El ingrediente activo, el almidón y el estearato de magnesio se mezclan, se hacen pasar a través de un tamiz de malla US nº 20 y se introducen en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 425,0 mg.

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

Referencias

1. Wodarz, A. y Nusse, R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. Annu Rev Cell Dev Biol 14:59-88.

2. Veeman, M.T., Axelrod, J.D. y Moon, R.T. 2003. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. Dev Cell 5:367-377.

3. Nelson, W.J. y Nusse, R. 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science 303:1483-1487.

4. Yang-Snyder, J., Miller, J.R., Brown, J.D., Lai, C.J. y Moon, R.T. 1996. A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. Curr Biol 6:1302-1306.

5. Wang, Y., Macke, J.P., Abella, B.S., Andreasson, K., Worley, P., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. y Nathans, J. 1996. A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled. J Biol Chem 271:4468-4476.

6. Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P. y He, X. 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407:530-535.
7. Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., 3rd, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., et al. 2001. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7:801-809.
8. Shimizu, H., Julius, M.A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A.M. y Kitajewski, J. 1997. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* 8:1349-1358.
9. Jonsson, M., Dejmek, J., Bendahl, P.O. y Andersson, T. 2002. Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 62:409-416.
10. Jonsson, M. y Andersson, T. 2001. Repression of Wnt-5a impairs DDR1 phosphorylation and modifies adhesion and migration of mammary cells. *J Cell Sci* 114:2043-2053.
11. Bartek, J., Bartkova, J., Kyprianou, N., Lalani, E.N., Staskova, Z., Shearer, M., Chang, S. y Taylor-Papadimitriou, J. 1991. Efficient immortalization of luminal epithelial cells from human mammary gland by introduction of simian virus 40 large tumour antigen with a recombinant retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3520-3524.
12. Dejmek, J., Dib, K., Jonsson, M. y Andersson, T. 2003. Wnt-5a and G-protein signaling are required for collagen-induced DDR1 receptor activation and normal mammary cell adhesion. *Int J Cancer* 103:344-351.
13. Sen, M., Chamorro, M., Reifert, J., Corr, M. y Carson, D.A. 2001. Blockade of Wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synovioocyte activation. *Arthritis Rheum* 44:772-781.
14. Weeraratna, A.T., Jiang, Y., Hostetter, G., Rosenblatt, K., Duray, P., Bittner, M. y Trent, J.M. 2002. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1:279-288.
15. DiMilla, P.A., Barbee, K. y Lauffenburger, D.A. 1991. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J* 60:15-37.
16. Dejmek, J., Leandersson, K., Manjer, J., Bjartell, A., Emdin, S.O., Vogel, W.F., Landberg, G. y Andersson, T. 2005. Expression and signaling activity of Wnt-5a/discoidin domain receptor-1 and Syk plays distinct but decisive roles in breast cancer patient survival. *Clin Cancer Res* 11:520-528.
17. Kremenevskaja, N., von Wasielewski, R., Rao, A.S., Schofl, C., Andersson, T. y Brabant, G. 2005. Wnt-5a has tumour suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* 24:2144-2154.
18. Andersen, H., Greenberg, D.L., Fujikawa, K., Xu, W., Chung, D.W. y Davie, E.W. 1999. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11189-11193.
19. Seifert, R. y Wenzel-Seifert, K. 2003. The human formyl peptide receptor as model system for constitutively active G-protein-coupled receptors. *Life Sci* 73:2263-2280.
20. Martin, G.R. y Jain, R.K. 1993. Fluorescence ratio imaging measurement of pH gradients: calibration and application in normal and tumour tissues. *Microvasc Res* 46:216-230.
21. Martin, G.R. y Jain, R.K. 1994. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy. *Cancer Res* 54:5670-5674.
22. Vogel, W., Brakebusch, C., Fassler, R., Alves, F., Ruggiero, F. y Pawson, T. 2000. Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin. *J Biol Chem* 275:5779-5784.
23. Huguet, E.L., Smith, K., Bicknell, R. y Harris, A.L. 1995. Regulation of Wnt5a mRNA expression in human mammary epithelial cells by cell shape, confluence, and hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 270:12851-12856.
24. Egan, C., Pang, A., Durda, D., Cheng, H.C., Wang, J.H. y Fujita, D.J. 1999. Activation of Src in human breast tumour cell lines: elevated levels of phosphotyrosine phosphatase activity that preferentially recognizes the Src carboxy terminal negative regulatory tyrosine 530. *Oncogene* 18:1227-1237.
25. Biscardi, J.S., Belsches, A.P. y Parsons, S.J. 1998. Characterization of human epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in human breast tumour cells. *Mol Carcinog* 21:261-272.
26. Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Vuori, K. y Cheresch, D.A. 1998. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol* 140:961-972.
27. Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T. y Horwitz, A.R. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704-1709.

28. Rost, B. 1996. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol* 266:525-539.
29. Pierschbacher, M.D. y Ruoslahti, E. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309:30-33.
- 5 30. Pakala, R., Liang, C.T. y Benedict, C.R. 2000. Inhibition of arterial thrombosis by a peptide ligand of the thrombin receptor. *Thromb Res* 100:89-96.
31. Bylund, J., Bjorstad, A., Granfeldt, D., Karlsson, A., Woschnagg, C. y Dahlgren, C. 2003. Reactivation of formyl peptide receptors triggers the neutrophil NADPH-oxidase but not a transient rise in intracellular calcium. *J Biol Chem* 278:30578-30586.
- 10 32. Christophe, T., Karlsson, A., Dugave, C., Rabiet, M.J., Boulay, F. y Dahlgren, C. 2001. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A₄ receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J Biol Chem* 276:21585-21593.
33. Dahlgren, C., Christophe, T., Boulay, F., Madianos, P.N., Rabiet, M.J. y Karlsson, A. 2000. The synthetic chemoattractant Trp-Lys-Tyr-Met-Val-DMet activates neutrophils preferentially through the lipoxin A₄ receptor. *Blood* 95:1810-1818.
- 15 34. Hanahan, D. y Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
35. Blanc, E., Roux, G.L., Benard, J. y Raguenez, G. 2005. Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. *Oncogene* 24:1277-1283.
- 20 36. Reshkin, S.J., Bellizzi, A., Albarani, V., Guerra, L., Tommasino, M., Paradiso, A. y Casavola, V. 2000. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumour-specific activation of human breast cancer cell Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange, motility, and invasion induced by serum deprivation. *J Biol Chem* 275:5361-5369.

Leyendas de las figuras

Figura 1

- 25 Efectos de los péptidos crudos sobre la fosforilación de DDR1 inducida por colágeno en células HB2 Wnt-5a antisentido. Se permitió que las células individuales se adhirieran a placas recubiertas con colágeno I en presencia del péptido crudo indicado (100 μ M). (A) Experimentos realizados en presencia de los péptidos 167-173. (B) Experimentos realizados en presencia de los péptidos 175-180. Después de 90 min, las células se lisaron y se inmunoprecipitaron con DDR1. Posteriormente, los inmunoprecipitados se sometieron a análisis de transferencia Western con un Ac anti-fosfotirosina y, a continuación, después de eliminar los anticuerpos, con un Ac anti-DDR1
- 30 para determinar la igualdad de carga. Las transferencias que se muestran son representativas de 3 experimentos independientes. Los diagramas muestran el análisis densitométrico de la fosforilación de DDR1, expresada como porcentaje del control.

Figura 2

- 35 Efectos de los péptidos crudos sobre la adhesión al colágeno de células HB2 Wnt-5a antisentido. (A) Se permitió que células individuales se adhirieran durante 90 minutos en ausencia o presencia de los péptidos crudos indicados (100 μ M). Se analizaron las cantidades de células adhesivas tal y como se describe en los métodos y los resultados se proporcionan como medias $\pm$ SEM de 7 experimentos distintos. (B) La adhesión de las células HB2 Wnt-5a antisentido al colágeno se analizó después de un tratamiento previo de las células con un Ac anti-integrina β 1 durante 45 min, antes de dejar que se adhirieran durante 90 minutos en ausencia o presencia de los péptidos 171 o
- 40 175 (100 μ M) o CM. Se analizaron las cantidades de células adhesivas tal y como se ha descrito en los métodos y los resultados se proporcionan como medias $\pm$ SEM de 6 experimentos distintos. (C) El diagrama describe un control del CM utilizado directamente. Se permitió que las células se adhirieran a pocillos recubiertos con colágeno I en ausencia o presencia de CM normal o CM agotado para Wnt-5a. Se analizaron las cantidades de células adhesivas como se ha descrito en los métodos y los resultados se proporcionan como medias $\pm$ SEM de 6 experimentos
- 45 distintos. Ns = no significativo, * p < 0,05, ** p < 0,01 y *** p < 0,001.

Figura 3

- Efectos de los péptidos seleccionados y puros sobre la capacidad de las células HB2 Wnt-5a antisentido para adherirse y migrar. (A-E) Se analizó la capacidad de las células para adherirse a pocillos recubiertos con colágeno de tipo I como se ha descrito anteriormente para la figura 2, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones
- 50 del péptido indicado. (F) Efecto de los péptidos indicados sobre la migración de células HB2 Wnt-5a antisentido en un ensayo de migración Transwell. Se permitió que las células migraran durante 18 h en ausencia o presencia de péptido 100 μ M o 0,4 mg/ml de Wnt-5a recombinante. Los datos se presentan como medias $\pm$ SEM de 6-7 experimentos distintos, cada uno realizado por triplicado. * p < 0,05 y ** p < 0,01.

Figura 4

Efectos inducidos con péptidos sobre la adhesión y la fosforilación de DDR1 en células de cáncer de mama MDA-MB-468. (A) Análisis con transferencia Western de la expresión de la proteína Wnt-5a en células HB2 Wnt-5a antisentido y que hiperexpresan Wnt-5a, en comparación con células tumorales MDA-MB-468. La transferencia es representativa de 9 experimentos distintos. (B) Efectos inducidos con péptidos sobre la adhesión de células tumorales MDA-MB-468. Se permitió que las células se adhirieran a pocillos recubiertos con colágeno de tipo I durante 60 min en ausencia o presencia de 100 μ M de los péptidos indicados o CM. Se analizaron las cantidades de células adhesivas como se ha descrito en los métodos y los resultados se presentan como medias $\pm$ SEM de 8 experimentos distintos. (C) Adhesión de células MDA-MB-468 a pocillos recubiertos con colágeno I en ausencia o presencia de péptido 175 o un péptido con la misma secuencia de aminoácidos a excepción de una sustitución de cisteína por alanina (175Ala) o CM. La cantidad de células adherentes se estimó como en el panel A y se expresó como medias $\pm$ SEM de 6 experimentos distintos, ns = no significativo, ** p < 0,01 y *** p < 0,001. (D) Se permitió que células individuales MDA-MB-468 se adhirieran a placas recubiertas con colágeno I durante 60 min en ausencia o presencia de los péptidos indicados (100 μ M), CM o Wnt-5a recombinante (0,8 μ g/ml). Inmunoprecipitados de DDR1 se sometieron a transferencia Western, primero con un Ac anti-fosfotirosina y luego, después de eliminar el Ac, con un Ac anti-DDR1. Las transferencias que se muestran son representativas de 6 experimentos distintos. El diagrama de la derecha muestra un análisis densitométrico de los datos de la fosforilación de DDR1, expresados como porcentaje del control.

Figura 5

(A) Efecto del pretratamiento (30 min) con el inhibidor de Src PP1 (10 μ M) sobre la adhesión inducida con la fosforilación de DDR1 en células MDA-MB-468. Las transferencias que se muestran son representativas de 3 experimentos distintos. (B) Actividad de Src en células MDA-MB-468 en ausencia y presencia de PP1 y/o suero. Las células se agotaron o no con suero durante 16 horas y luego se trataron o no con PP1 10 μ M durante los últimos 30 minutos de este periodo de incubación. Las transferencias que se muestran son representativas de 6 experimentos distintos. (C) Actividades del receptor de EGF y niveles de expresión en células MDA-MB-468 y en células HB2 Wnt-5a antisentido o que hiperexpresan Wnt-5a. Las transferencias que se muestran son representativas de 5 experimentos distintos.

Figura 6

Efectos inducidos por el péptido sobre la migración de células tumorales MDA-MB-468 y su contenido en F-actina. (A) Se permitió que las células migraran durante 18 h en ausencia o presencia de los péptidos indicados (100 μ M). Los datos en el panel A se expresan como medias $\pm$ SEM de 8 experimentos distintos, cada uno realizado por triplicado. * p < 0,05. (B) Se permitió que las células se adhirieran a cubreobjetos recubiertos con colágeno I durante 18 h en ausencia o presencia de péptido 175 (100 μ M). Las células se tiñeron después con faloidina Alexa488 como se ha descrito en la sección de métodos. Las micrografías ilustradas son representativas de 5 experimentos distintos.

Figura 7

Efectos de modificaciones del péptido 175 sobre su capacidad para inducir adhesión y migración de células tumorales MDA-MB-468. (A) Se permitió que las células se adhirieran a pocillos recubiertos con colágeno-I durante 60 min, en ausencia o presencia de péptido 175, tres variantes por delección N-terminal por fases del péptido 175 o una versión formulada del hexapéptido sometido a ensayo obtenido a partir del péptido 175. Se analizaron las cantidades de células adhesivas como se ha descrito en los métodos y los resultados se presentan como medias $\pm$ SEM de 6 experimentos distintos. (B y C) Se permitió que las células migraran durante 18 h en ausencia o presencia de péptido 175 1 o 10 μ M (B) o el hexapéptido formulado. (C). Los datos se presentan como medias $\pm$ SEM de 6 experimentos distintos, cada uno realizado por triplicado. * p < 0,05, ** p < 0,01.

Figura 8

Efectos del bloqueo del receptor Frz-5 y del pH reducido sobre la capacidad del hexapéptido formulado y de Wnt-5a para inhibir la migración de células tumorales. (A) Análisis por transferencia Western de lisados de células MDA-MB-468 con el Ac anti-Frz-2 y anti-Frz-5. Los experimentos de bloqueo del péptido (antígeno) no mostraron bandas detectables de proteínas incluso después de una exposición prolongada de las películas. Las transferencias son representativas de 3 experimentos distintos. (B) Efectos del Ac anti-Frz-2 y anti-Frz-5 sobre la migración de células MDA-MB-468. Se permitió que las células migraran durante 18 h en ausencia o presencia de Ac anti-Frz-2 o anti-Frz-5 (5 μ g/ml), barras de color gris y blanco respectivamente. Como se ha indicado, el hexapéptido formulado (100 μ M) o Wnt-5a recombinante (0,4 μ g/ml) se añadió a las células durante todo su periodo de migración. Los datos se presentan como medias $\pm$ SEM de 7 experimentos distintos, realizado cada uno por triplicado. (C) Se permitió que las células MDA-MB-468 migraran durante 18 h en ausencia o presencia del hexapéptido formulado (10 μ M) en un medio que tenía pH 7,4 (barras grises) o 6,7 (barras blancas). Los datos se expresan como medias $\pm$ SD de 4 experimentos distintos, cada uno realizado por triplicado. * p < 0,05, ** p < 0,01.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> WNTRESEARCH AB

<120> UN LIGANDO PEPTÍDICO PARA ALTERAR LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS CANCERÍGENAS

<130> EP-21052683

5

<150> SE0501204-2

< 151> 2005-05-30

<150> EP 06747832.1

< 151> 2006-05-30

<150> PCT/SE2006/000638

< 151> 2006-05-30

10

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 20

< 212> PRT

15

< 213> Humano

<400> 1

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

Gly Cys Glu Leu
20

20

<210> 2

< 211> 19

< 212> PRT

< 213> Humano

<400> 2

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

Cys Glu Leu

25

<210> 3

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> Humano

<400> 3

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

Glu Leu

30

<210> 4

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Humano

ES 2 543 473 T3

<400> 4
 Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu
 1 5 10 15
 Leu
 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 5
 Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
 1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 6
 Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 7
 Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 8
 Cys Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 9
 Asn Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 10
 Lys Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
 1 5 10

<210> 11
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> Humano

5 <400> 11
Thr Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5 10

<210> 12
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> Humano

10 <213> Humano

 <400> 12
 Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
 1 5

<210> 13
< 211> 8
< 212> PRT
< 213> Humano

15 < 212> PRT
 < 213> Humano

 <400> 13
Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
 1 5

< 211> 7
< 212> PRT
< 213> Humano

20 < 212> PRT
 < 213> Humano

 <400> 14
Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
 1 5

<210> 15
< 211> 6
< 212> PRT
< 213> Humano

25 < 211> 6
 < 212> PRT
 < 213> Humano

<400> 15

Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5

<400> 15

30

REIVINDICACIONES

1. Un péptido formulado seleccionado a partir del grupo que consiste en:

MDGCEL	SEQ. ID. NO: 15
GMDGCEL	SEQ. ID. NO: 14
EGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 13
SEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 12
TSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 11
KTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 10
NKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 9
CNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 8
LCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 7
RLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 6
GRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 5
QGRLCMKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 4
TQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 3
GTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 2
LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 1.

2. Un péptido según la reivindicación 1, en el que dicho péptido es MDGCEL formulado (SEQ. ID. NO: 15).

5 3. Un péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido es NKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO: 9), en el que la cisteína situada entre la glicina y el ácido glutámico en el péptido ha sido sustituida con alanina.

4. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente activa de un péptido formulado activo que altera la motilidad de las células cancerígenas seleccionado a partir del grupo que consiste en:

MDGCEL	SEQ. ID. NO: 15
GMDGCEL	SEQ. ID. NO: 14
EGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 13
SEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 12
TSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 11
KTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 10
NKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 9
CNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 8
LCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 7
RLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 6
GRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 5
QGRLCMKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 4
TQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 3
GTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 2
LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 1

10 opcionalmente en combinación con un vehículo o un excipiente inerte.

5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el péptido es MDGCEL formulado (SEQ. ID. NO: 15).

6. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el péptido es NKTSEGMDGCEL (SEQ. ID.

NO: 9) en el cual la cisteína situada entre la glicina y el ácido glutámico en el péptido ha sido sustituida con alanina.

7. Un péptido formulado seleccionado a partir del grupo que consiste en:

MDGCEL	SEQ. ID. NO: 15
GMDGCEL	SEQ. ID. NO: 14
EGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 13
SEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 12
TSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 11
KTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 10
NKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 9
CNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 8
LCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 7
RLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 6
GRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 5
QGRLCMKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 4
TQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 3
GTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 2
LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 1

para uso en el tratamiento del cáncer.

5 8. Un péptido para uso según la reivindicación 7, en el que dicho péptido es MDGCEL formulado (SEQ. ID. NO: 15).

9. Un péptido para uso según la reivindicación 7, en la que el péptido es NKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO: 9) en el que la cisteína situada entre la glicina y el ácido glutámico en el péptido se ha sustituido con alanina.

10. Un péptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que dicho cáncer es cáncer de mama.

11. Un péptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que dicho cáncer es cáncer de colon.

10 12. El uso de un péptido formulado seleccionado a partir del grupo que consiste en:

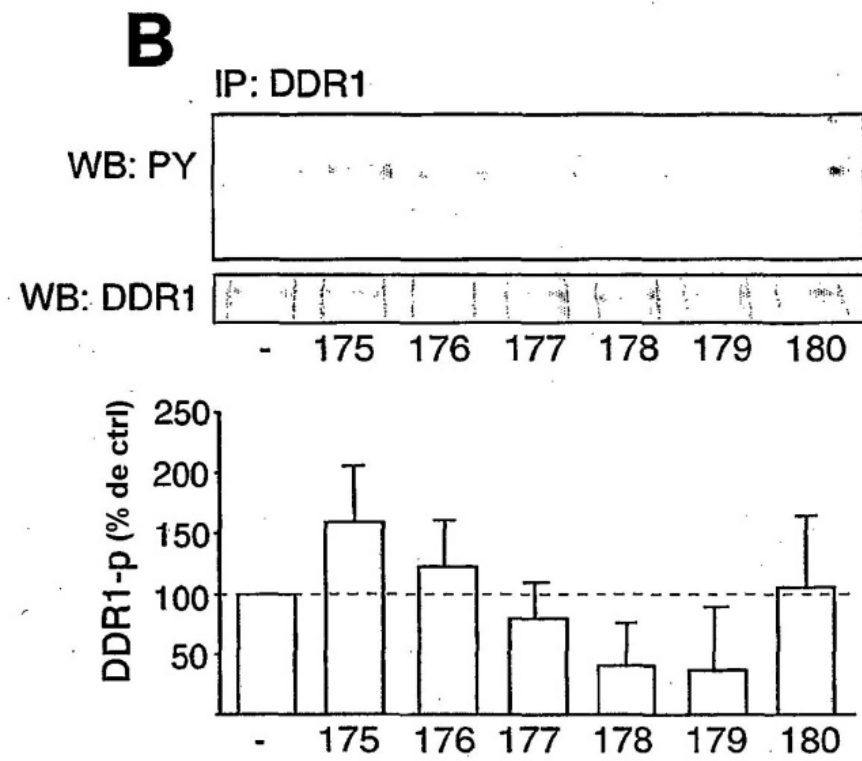
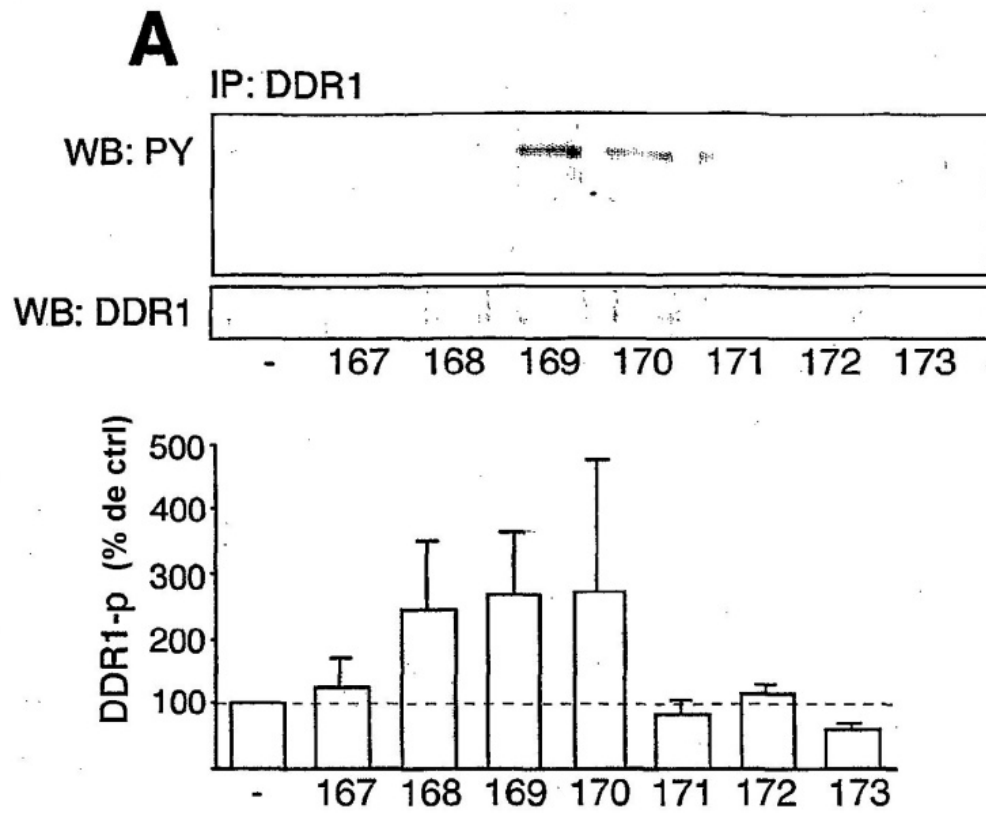
MDGCEL	SEQ. ID. NO: 15
GMDGCEL	SEQ. ID. NO: 14
EGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 13
SEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 12
TSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 11
KTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 10
NKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 9
CNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 8
LCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 7
RLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 6
GRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 5
QGRLCMKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 4
TQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 3
GTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 2
LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL	SEQ. ID. NO: 1

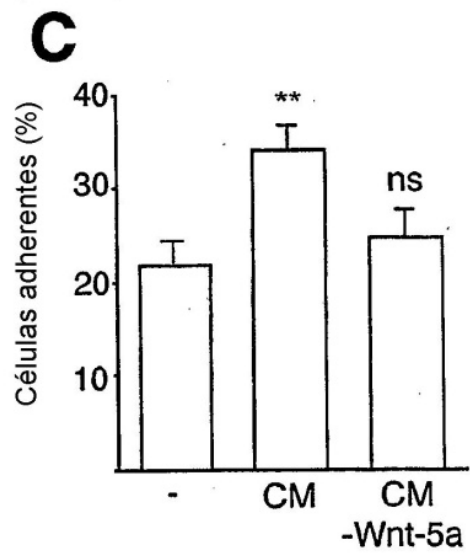
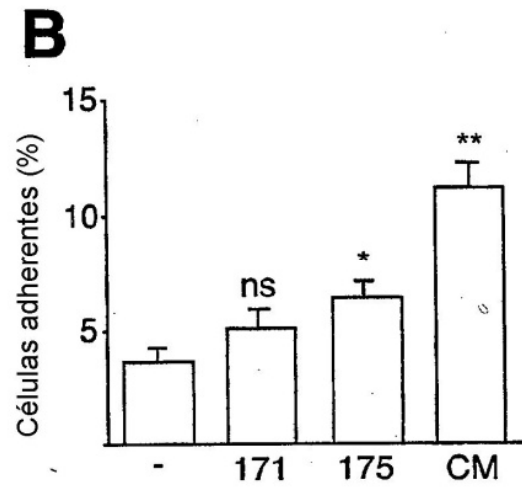
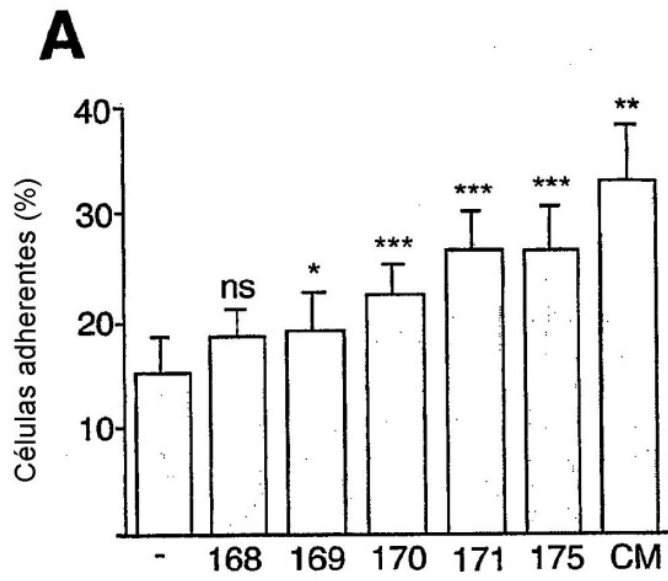
en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer alterando la motilidad de las células cancerígenas.

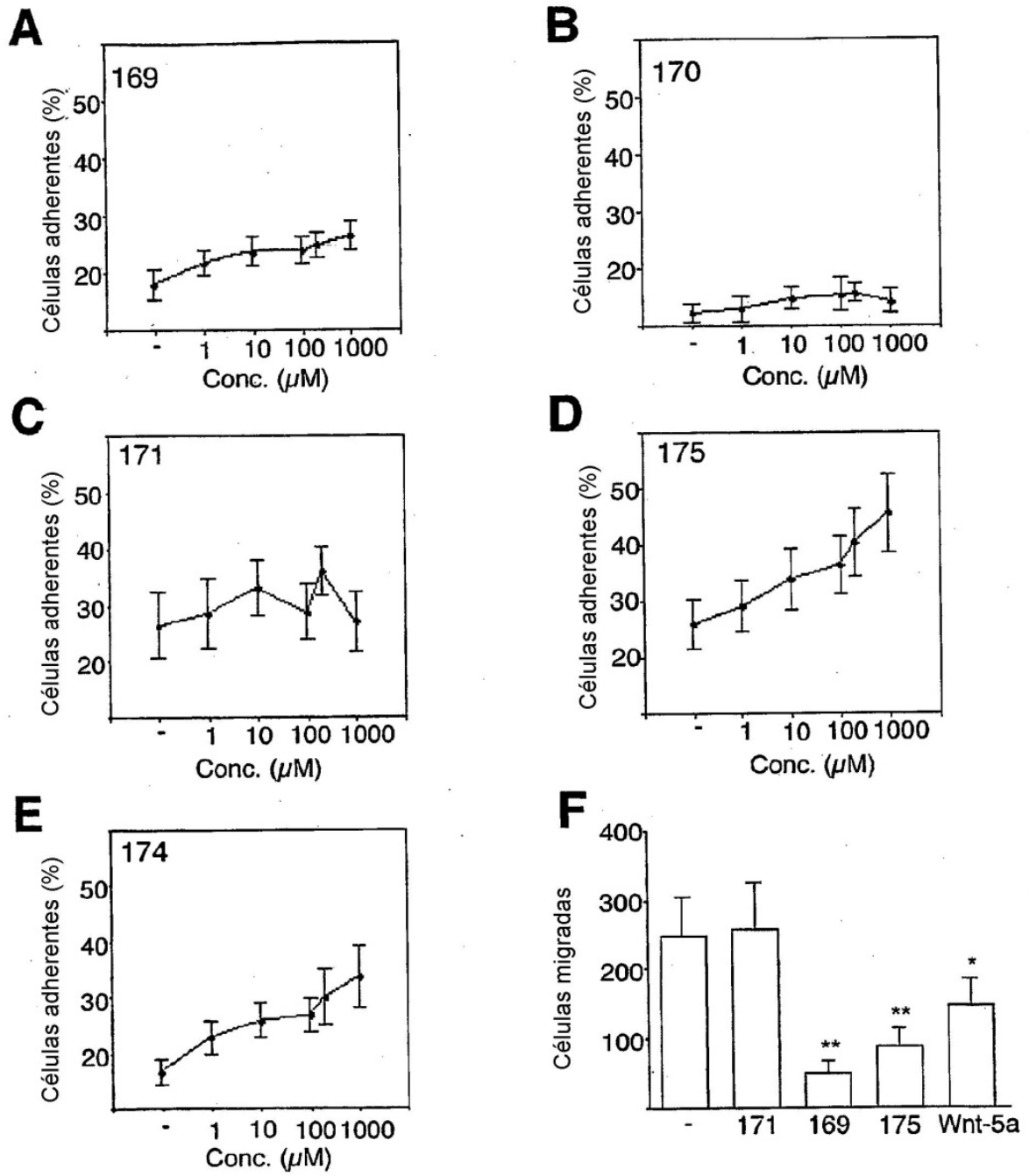
13. El uso según la reivindicación 12, en el que dicho péptido es MDGCEL formulado (SEQ. ID. NO: 15).

5 14. El uso según la reivindicación 12, en el que el péptido es NKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO: 9) en el cual la cisteína situada entre la glicina y el ácido glutámico en el péptido ha sido sustituida con alanina.

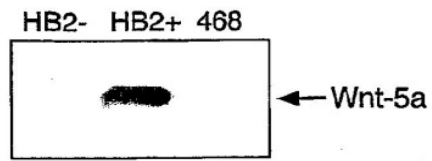
15. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que la composición farmacéutica es para el tratamiento del cáncer de mama o cáncer de colon.



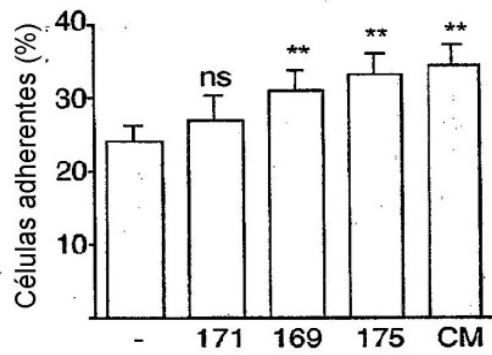




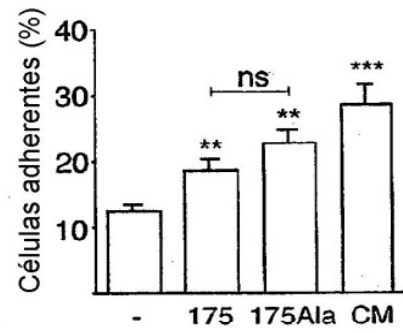
A



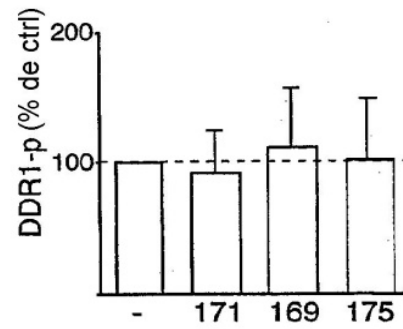
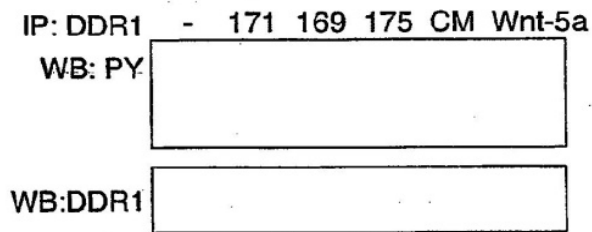
B



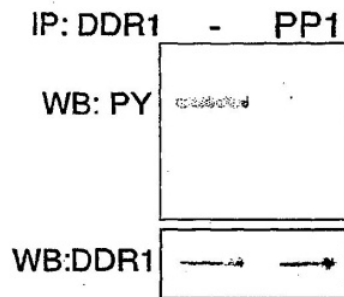
C



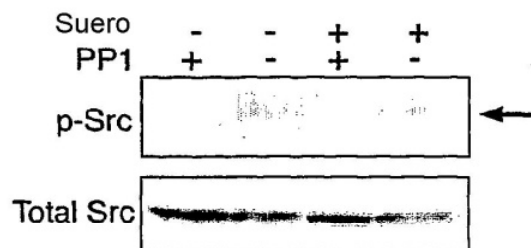
D



A



B



C

