

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 540**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 13/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2012 PCT/SE2012/050738**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13006129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012 E 12807837 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2726880**

54 Título: **Tratamiento del cáncer de próstata y un método para determinar el pronóstico para pacientes con cáncer de próstata**

30 Prioridad:

01.07.2011 SE 1150619

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

19.12.2019

73 Titular/es:

**WNTRESEARCH AB (100.0%)
Medeon Science Park, Per Albin Hanssons väg 41
S-205 12 Malmö, SE**

72 Inventor/es:

**ANDERSSON, TOMMY y
BJARTELL, ANDERS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 735 540 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

Tratamiento del cáncer de próstata y un método para determinar el pronóstico para pacientes con cáncer de próstata

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un péptido Wnt5a que posee propiedades de señalización Wnt5a para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata.

10 Antecedentes

El Wnt5a es una glucoproteína secretada no canónica de la familia Wnt que desempeña un papel importante en el desarrollo y la progresión del cáncer.

15 Los péptidos derivados de Wnt5a, incluido el hexapéptido Foxy5 N-formilado, se han descrito anteriormente, i.a. en los documentos WO 01/32708 y WO 2006/130082. Se ha demostrado que estos péptidos son agonistas de la señalización de Wnt5a. El uso de dicho péptido en un modelo de cáncer de mama de ratón ha demostrado su capacidad para inhibir significativamente la diseminación metastásica del tumor primario inoculado y el crecimiento en una almohadilla de grasa mamaria. En el documento WO 2010/019103 se ha demostrado que modificando tales péptidos de cierta manera es posible cambiar la función agonista a la de un antagonista, y además que dichos antagonistas se pueden usar en el tratamiento del melanoma y el cáncer gástrico.

20 Los estudios previos informan que Wnt5a está regulado positivamente en el cáncer de próstata y sugirió que Wnt5a afecta la migración y la invasión de células tumorales de próstata.

25 El cáncer de próstata (PCa) es el principal cáncer que afecta a hombres de todas las razas y la segunda causa de muerte en los países desarrollados [1]. Los andrógenos y el receptor de andrógenos (AR) desempeñan funciones críticas no solo en el desarrollo normal, el crecimiento y la función de la glándula prostática, sino también en la carcinogénesis y la progresión del PCa [2]. Inicialmente, las células de PCa son comúnmente dependientes de AR para su crecimiento y supervivencia, y por consiguiente responden a la terapia de privación de andrógenos (ADT), pero en etapas posteriores las células de PCa se vuelven insensibles a los andrógenos y se desarrolla un cáncer de próstata fatal resistente a la castración (CRPC) [3]. Los mecanismos moleculares responsables de la transición a CRPC son poco conocidos, sin embargo, el cambio más consistente asociado con el crecimiento resistente a la castración en los perfiles de expresión génica globales de xenoinjertos de PCa fue un aumento en los niveles de ARNm de AR [4]. El aumento de la expresión de AR se considera una característica clave del CRPC y se ha demostrado como consecuencia de ya sea la mutación o la amplificación de AR o por el aumento de la expresión causado por factores de crecimiento desregulados o diversos coreguladores [5]. Si bien se tiene acceso a factores pronósticos en PCa, incluidos el grado de Gleason, el estadio TNM, el estado del margen quirúrgico y los niveles séricos de PSA, existe una necesidad urgente de identificar biomarcadores novedosos, que puedan mejorar significativamente, ya sea solos o en combinación con otros biomarcadores, nuestra capacidad de predecir el resultado en pacientes con PCa. Estudios previos han sugerido una posible relación entre las vías de señalización AR y Wnt-β-catenina durante el desarrollo y la progresión de PCa [6, 7].

45 Recientemente, se ha llamado la atención sobre el papel de las proteínas Wnt y la señalización Wnt en el PCa. El nombre Wnt proviene del "sitio de integración de MMTV relacionado con las alas" y fue sugerido originalmente por Nusse y colaboradores en 1991 [8]. Las proteínas Wnt constituyen una familia de diecinueve glucoproteínas secretadas que desempeñan funciones importantes durante el desarrollo y en la especificación del destino celular, la migración y la polaridad celulares [9,10]. Las proteínas Wnt se pueden clasificar en al menos dos subfamilias; Wnt canónicos que promueven la transcripción mediada por β-catenina y Wnt no canónicos. La señalización de Wnt se produce de forma automática o paracrina a través de la unión de moléculas de Wnt secretadas a siete proteínas transmembrana receptoras Frizzled (Fz) en ausencia o presencia de coreceptores tales como LRP 5/6 y ROR [10]. Varios componentes de señalización de Wnt también se han implicado en la génesis de los cánceres humanos; la sobreexpresión de Wnt-1 se observó en el adenocarcinoma epitelial mamario [11] y en varias líneas celulares de PCa y tejidos de PCa. La expresión de Wnt-1 se correlacionó positivamente con la puntuación de Gleason, β-catenina y con los niveles séricos de PSA [12]. Además, basándose en la determinación de los niveles de ARNm de Wnt5a en los tumores de próstata, se ha sugerido que la expresión anormal del Wnt5a no canónico está implicada en el PCa [13].

60 El Wnt5a, uno de los Wnt no canónicos más estudiados, es una proteína Wnt esencial para inducir y controlar la polaridad de la célula Wnt/planar (PCP) y las vías Wnt/Ca²⁺ [14,15]. Además, Wnt5a no solo ha demostrado contrarrestar la vía Wnt/β-catenina sino también, en contextos específicos, activar esta vía [16]. La posibilidad de que Wnt5a induzca diferentes eventos de señalización aguas abajo puede, al menos en parte, explicar la presencia de informes que sugieren una naturaleza ambigua de Wnt5a; que tiene una función ya sea supresora de tumores o promotora de tumores según el contexto y el tipo de tumor [16]. Estudios previos han demostrado que el Wnt5a está regulado a la baja en ciertas neoplasias malignas, incluyendo el cáncer colorrectal (expresión de proteínas) [17], el

neuroblastoma (niveles de ARNm) [18], los carcinomas de mama ductales invasivos (expresión de proteínas) [19,20] y las leucemias (niveles de ARNm) [21], lo que indica un efecto supresor de tumor de Wnt5a.

Curiosamente, otros informes han sugerido un efecto oncogénico de Wnt5a basado principalmente en una regulación positiva en las células de cáncer de mama (niveles de ARNm) [22], cáncer gástrico (expresión de proteínas) [23], melanoma (expresión de proteínas) [24], cáncer de pulmón y cáncer de próstata (expresión de ARNm) [13]. La expresión génica y de proteína aberrante de Wnt5a en Pca y los posibles mecanismos moleculares subyacentes se han descrito en informes anteriores [13,25,26,27]. En un estudio reciente, basado en los estudios de Affymetrix de líneas celulares de células epiteliales y de cáncer de próstata normales, Wang et al demostraron que el aumento de la transcripción del gen Wnt5a en PCa se debía a la hipometilación; lo que sugiere que la regulación epigenética de la expresión de Wnt5a puede ser importante en la progresión del PCa [28]. Cualquier conclusión a partir de los datos de un análisis de Affymetrix sin un análisis simultáneo de la expresión de la proteína Wnt5a es peligrosa, ya que el ARNm de Wnt5a tiene una larga región 3' sin transcribir abierta para la regulación de la traducción. Los datos que respaldan tal regulación traslacional de la expresión de la proteína Wnt5a se informaron anteriormente [19, 29].

Estudios recientes han mostrado un aumento de Wnt5a y niveles de proteína en PCa en comparación con el tejido benigno [25, 26]. Yamamoto et al demostraron in vitro que la caída de Wnt5a redujo las propiedades invasivas de DU145, y la sobreexpresión de Wnt5a estimuló la invasión de células PC3 [25]. En contraste, Wang Q y sus colaboradores demostraron que el Wnt5a recombinante no indujo un aumento de la motilidad en las mismas células PC3 [26]. Además, la inmunohistoquímica (IHC) ha demostrado que la expresión de Wnt5a se correlacionaba con la puntuación de Gleason ≥ 8 en 24 pacientes de una cohorte de 98 pacientes con PCa que se habían sometido a una prostatectomía radical. Esto podría indicar que Wnt5a promueve la agresividad, ya que los pacientes con niveles bajos de Wnt5a tuvieron una mejor supervivencia sin recaída en comparación con los pacientes con niveles altos de Wnt5a [25].

Realizaciones detalladas de la invención.

Las diferentes realizaciones de la invención se identifican a continuación en la siguiente lista detallada:

Ítem 1. Un péptido Wnt5a que posee propiedades de señalización de Wnt5a para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata, en el que el péptido Wnt5a consta de 6-20 aminoácidos y en el que los 6 aminoácidos en el extremo C terminal son XDGXEL (SEQ. ID. NO. 1), en la que X en la posición 1 es M o norleucina y X en la posición 4 es C o A.

Ítem 2. Un péptido Wnt5a para uso en el tratamiento del cáncer de próstata según el ítem 1, en el que dicho cáncer de próstata es causado por células cancerosas con baja expresión de proteína Wnt5a.

Ítem 3. Un péptido Wnt5a para uso en el tratamiento del cáncer de próstata según el ítem 1 o 2, en el que dicho cáncer de próstata es un cáncer de próstata localizado.

Ítem 4. Un péptido Wnt5a para uso en el tratamiento del cáncer de próstata según uno cualquiera de los ítems 1-3, en el que dicho paciente se ha sometido o se someterá a radioterapia y/o prostatectomía radical.

Ítem 5. Un péptido Wnt5a para uso en el tratamiento del cáncer de próstata según uno cualquiera de los ítems 1-4, en el que dicho péptido Wnt5a es un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

MDGCEL (SEQ. ID. NO. 2),

GMDGCEL (SEQ. ID. NO. 3),

EGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 4),

SEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 5),

TSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 6),

KTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 7),

NKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 8),

CNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 9),

LCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 10),

RLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 11),

GRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 12),

QGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 13),

5 TQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 14),

GTQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 15), y

10 LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 16),

o un derivado formilado de uno de estos péptidos.

Ítem 6. Un péptido Wnt5a para uso en el tratamiento del cáncer de próstata según el ítem 5, en el que dicho péptido Wnt5a es MDGCEL (SEQ. ID. NO. 2), o un derivado formilado del mismo.

15 Descripción detallada de la invención

Los estudios que condujeron a la presente invención pretendían evaluar el valor pronóstico de la expresión de la proteína Wnt5a en el tejido del cáncer de próstata y su potencial para predecir el resultado después de la prostatectomía radical en pacientes con cáncer de próstata localizado.

20 Los informes contradictorios sobre el papel de Wnt5a en la progresión de PCa e información escasa sobre la expresión de Wnt5a en relación con el resultado clínico, instaron a los inventores a investigar la expresión de proteínas de Wnt5a en una gran cohorte basada en la población y su posible papel para predecir el resultado después de la cirugía para PCa localizada y predominantemente de bajo grado. Esta investigación se complementó con experimentos in vitro para explorar las posibles razones de la capacidad de Wnt5a para actuar como biomarcador predictivo en esta categoría de pacientes. En el presente estudio, los inventores confirmaron que los niveles de proteína Wnt5a estaban regulados positivamente en PCa en comparación con el tejido benigno, pero los inventores encontraron que el aumento de la expresión de proteína Wnt5a tenía un efecto positivo en el resultado en pacientes con PCa, ya que los pacientes con niveles altos de proteína Wnt5a tenían un mejor resultado en comparación a pacientes con niveles bajos de Wnt5a después de una prostatectomía radical. De acuerdo, los inventores también encontraron que esta capacidad de Wnt5a para afectar positivamente el resultado en pacientes con PCa podría deberse a su capacidad para inhibir la invasión de células de PCa in vitro.

35 A continuación se mostrará que el análisis inmunohistoquímico de una micromatriz de tejido que contiene muestras de próstata de 503 pacientes con cáncer de próstata localizado mostró una expresión de la proteína Wnt5a significativamente mayor en el cáncer en comparación con los núcleos benignos de los mismos pacientes ($p < 0.0001$). Los pacientes con alta expresión de la proteína Wnt5a tuvieron un resultado significativamente mejor en términos de tiempo hasta la recurrencia bioquímica en comparación con los pacientes con bajos niveles de expresión ($p = 0.001$, 95% de CI 1.361-3.570, índice de riesgo 2.204). Una combinación de alta expresión de Wnt5a con niveles bajos de Ki-67 o expresión de receptor de andrógenos tuvo un resultado aún mejor en comparación con todos los otros grupos.

45 Adicionalmente, los inventores encontraron que la expresión de Wnt5a se correlacionaba significativamente con VEGF y con Ki-67 y la expresión del receptor de andrógenos, aunque no es muy significativa. In vitro, los inventores demostraron que el Wnt5a recombinante disminuyó la invasión de las células 22Rv1 y DU145 y que la modificación genética de ARNip de la proteína Wnt5a endógena llevó a una mayor invasión de las células 22Rv1 y LNCaP. Adicionalmente, de manera similar a los resultados in vitro obtenidos con Wnt5a recombinante, la adición del péptido derivado de Wnt5a, Foxy-5, inhibió significativamente la invasión de células tumorales de próstata 22Rv1 y DU145 (como se muestra en la figura 6).

50 Los inventores han demostrado que la sobreexpresión conservada de la proteína Wnt5a en pacientes con cáncer de próstata localizado predice un resultado favorable después de la cirugía. Este hallazgo, junto con los datos in vitro que ilustran la capacidad de Wnt5a para alterar las propiedades invasivas de las células de cáncer de próstata, demuestra un efecto supresor de tumor de Wnt5a en el cáncer de próstata localizado. Estos resultados muestran que Wnt5a se puede usar como marcador predictivo. Los resultados también muestran que la proteína Wnt5a y los péptidos de señalización Wnt5a, esto es, los péptidos que tienen esencialmente el mismo efecto biológico que la proteína Wnt5a, se puede usar en el tratamiento del cáncer de próstata localizado.

60 Como se indicó anteriormente, el cáncer de próstata que se puede tratar según la invención puede ser cáncer causado por células cancerosas con baja expresión de proteína Wnt5a. El significado de "bajo" en este contexto es claro para la persona experta en vista de los ejemplos a continuación. Para explicar esto, además se podría añadir que la expresión se puede evaluar mediante la inmunotinción del tejido que contiene las células cancerosas. Luego, una persona que tenga las habilidades y el entrenamiento para realizar estas consideraciones, tal como un patólogo, considerará la inmunotinción y obtendrá una puntuación de 0, 1, 2 o 3 en comparación con una escala arbitraria. 0 indica que no hay tinción y 1 indica tinción de la semana. En este contexto, 0 y 1 se considera que es el resultado de

una expresión baja. 2 indica tinción moderada y 3 indica tinción fuerte. En este contexto, 2 y 3 se consideran el resultado de una expresión alta. Al establecer la puntuación, el patólogo considerará el porcentaje de células que son positivas, esto es, teñidas y también la intensidad de la tinción. La elección de la concentración del anticuerpo primario usado para la inmunotinción se selecciona de modo que se obtenga toda la escala 0, 1, 2 y 3. El anticuerpo usado en este caso en cualquier anticuerpo que se una específicamente a Wnt5a y de este modo permite la detección de Wnt5a.

En algunas realizaciones, el cáncer de próstata puede ser cáncer de próstata con una puntuación de Gleason de $\leq 3+4$, esto es, una puntuación de Gleason de baja a intermedia o de bajo grado. Sin embargo, en otras realizaciones, el cáncer de próstata puede ser cáncer de próstata con una puntuación de Gleason de $\geq 4+3$.

La puntuación de Gleason o el grado de Gleason describe qué tan cerca se parece el tumor al tejido prostático normal. El sistema de clasificación de Gleason asigna un grado a cada una de las dos áreas más grandes de cáncer en las muestras de tejido. Los grados varían desde 1 a 5, siendo 1 el menos agresivo y 5 el más agresivo. Los dos grados se pueden sumar en una puntuación de Gleason. Un puntaje añadido de 2-7 (en el que 7 está constituido por 3+4 solamente y no 4+3) en este contexto se considera de bajo grado, mientras que una puntuación de Gleason de 7-10 (en donde 7 está constituido por 4+3 solamente y no 3+4) se considera de alto grado. A veces se ve la división en 2-4 como grado bajo, 5-7 como grado intermedio y 8-10 como grado alto, pero esto no se usa en la presente solicitud. La puntuación de Gleason ofrece una buena pista del comportamiento de su tumor: es probable que un tumor con una puntuación de Gleason más lento crezca lentamente, mientras que uno con un puntaje alto es más probable que crezca agresivamente o que ya se haya diseminado fuera de la próstata (metástasis).

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de próstata localizado.

Antes de la solicitud de la presente invención, el paciente puede haberse sometido a una prostatectomía radical y/o radioterapia. Alternativamente, el paciente podría someterse a una prostatectomía radical y/o radiación después de la solicitud de la presente invención. La invención se puede usar para evitar la diseminación del tumor antes o después de la prostatectomía radical y/o la radioterapia.

El péptido Wnt5a que posee las propiedades de señalización de Wnt5a para su uso como anteriormente se puede usar para el tratamiento del cáncer de próstata, tal como el cáncer de próstata localizado, en un paciente que se haya sometido o se someterá a una prostatectomía radical.

El hecho de que el péptido posea propiedades de señalización de Wnt5a significa, en el contexto de la presente divulgación, que el péptido tiene esencialmente la misma función biológica que la proteína Wnt5a con respecto a su capacidad para alterar la migración e invasión de células tumorales de próstata.

El péptido Wnt5a usado según la invención es un péptido que consiste en 6-20 aminoácidos y en el que los 6 aminoácidos en el extremo C terminal son XDGXEL (SEQ. ID. NO. 1), en el que X en la posición 1 es C o A y X en la posición 4 es M o norleucina.

El péptido Wnt5a usado según la invención es, en algunas realizaciones, un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

- MDGCEL (SEQ. ID. NO. 2),
- GMDGCEL (SEQ. ID. NO. 3),
- EGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 4),
- SEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 5),
- TSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 6),
- KTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 7),
- NKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 8),
- CNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 9),
- LCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 10),
- RLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 11),
- GRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 12),

QGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 13),

TQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 14),

5 GTQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 15), y

LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 16),

10 o un derivado formilado de uno de estos péptidos. Tales péptidos se describen con más detalle en los documentos WO 01/32708 y WO 2006/130082.

En algunas realizaciones, el péptido Wnt5a usado según la invención es MDGCEL (SEQ. ID. NO. 2).

15 En algunas realizaciones, el péptido Wnt5a usado según la invención es un derivado formilado de MDGCEL (SEQ. ID. NO. 2), esto es, el hexapéptido N-formilado Foxy5.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en este documento, se refiere a una cantidad que conducirá al efecto terapéutico deseado.

20 También se describe, pero no se reivindica, un método para determinar un pronóstico para un paciente que tiene cáncer de próstata, que comprende las etapas de:

25 a) evaluar una cantidad de proteína Wnt5a presente en al menos parte de una muestra obtenida anteriormente del paciente y determinar un valor de muestra correspondiente a la cantidad evaluada;

b) comparar el valor de muestra obtenido en la etapa a) con un valor de referencia asociado con un pronóstico de referencia; y, si dicho valor de muestra es más alto que dicho valor de referencia,

30 c) concluyendo que el pronóstico para dicho paciente es mejor que dicho pronóstico de referencia.

También se describe, pero no se reivindica, un kit para llevar a cabo para determinar un pronóstico, en el que el kit comprende:

35 a) un ligando de afinidad cuantificable o semicuantificable capaz de interacción selectiva con una proteína Wnt5a; y

b) los reactivos necesarios para cuantificar la cantidad de dicho ligando de afinidad cuantificable.

El ligando de afinidad cuantificable o semicuantificable capaz de interacción selectiva con una proteína Wnt5a puede ser un anticuerpo o un fragmento o un derivado de dicho anticuerpo.

40 Guiado por la presente divulgación, el experto en el arte puede seleccionar valores de referencia relevantes sin una carga indebida. Al menos un ejemplo de cómo se puede seleccionar el valor de referencia se ilustra en los ejemplos a continuación. Adicionalmente, la relación entre los valores de la muestra y los datos de supervivencia en un grupo relevante de pacientes con cáncer se puede examinar según lo que se describe en los ejemplos a continuación.

45 Un médico puede usar el método de predicción para obtener información adicional con respecto al pronóstico de un paciente con cáncer de próstata, que a su vez puede ayudarlo o ayudarla a tomar decisiones informadas con respecto a las siguientes acciones. En general, al decidir una estrategia de tratamiento apropiada para un paciente con cáncer de próstata, el médico responsable del tratamiento puede tener en cuenta varios parámetros, como el resultado de una evaluación inmunohistoquímica, los resultados de un análisis de sangre de PSA, la edad del paciente, tipo de tumor, estadio, tales como el estadio T del tumor primario, grado según la condición general de escala de Gleason e historial médico. Para ser guiado en la decisión, el médico puede realizar una prueba de proteína Wnt5a u ordenar una prueba de proteína Wnt5a. Además, el médico puede asignar a otra persona, tal como un trabajador de laboratorio, para que realice la etapa a), y opcionalmente la etapa b), mientras realiza la etapa c), y opcionalmente b), él mismo.

50 Como los pronósticos para los pacientes que muestran una tinción inmunológica alta de Wnt5a en relación con el epitelio benigno son generalmente mejores que los de los pacientes que muestran niveles bajos de proteína Wnt5a, como se muestra a continuación, el médico puede elegir o abstenerse de un determinado régimen de tratamiento.

60 En el contexto de la presente divulgación, "establecer un pronóstico" se refiere a establecer un pronóstico específico o un intervalo de pronóstico.

65 En el contexto de la presente divulgación, "pronóstico" se refiere a la predicción del curso o resultado de una enfermedad y su tratamiento. Por ejemplo, el pronóstico también se puede referir a una determinación de la posibilidad de supervivencia o recuperación de una enfermedad, así como a una predicción del tiempo de

supervivencia esperado de un paciente. Un pronóstico puede implicar específicamente el establecimiento de la probabilidad de supervivencia de un paciente durante un período de tiempo futuro, como tres años, cinco años, diez años o cualquier otro período de tiempo. Un pronóstico también puede implicar establecer la probabilidad de recaída del cáncer de próstata. Un pronóstico puede además representarse por un solo valor o un intervalo de valores.

Además, en el contexto de los métodos de la presente divulgación, "obtenido anteriormente" se refiere a los obtenidos antes de que se realice el método. En consecuencia, si una muestra obtenida previamente de un paciente se usa en un método, el método no implica obtener la muestra del paciente, esto es, la muestra se obtuvo previamente del paciente en una etapa separada del método

El método de pronóstico descrito se puede realizar, a menos que se indique lo contrario, completamente in vitro.

El término "paciente", como se usa en este documento, se refiere a cualquier macho mamífero humano o no humano que necesite tratamiento según la invención. Más precisamente, en el contexto de la presente divulgación, "un paciente que tiene cáncer de próstata" se refiere a un mamífero masculino, tal como un humano, que tiene un tumor de próstata primario o un mamífero masculino, tal como un humano, que ha tenido un tumor primario de próstata extirpado, en el que la extirpación del tumor se refiere a la erradicación del tumor mediante cualquier tipo de cirugía o terapia apropiada. En algunas realizaciones, la extirpación de cirugía es la opción preferida. En el método y los aspectos de uso de la presente divulgación, "un paciente con cáncer de próstata" también incluye los casos en los que se sospecha que el paciente tiene cáncer de próstata en el momento del uso o la realización del método y se establece el diagnóstico de cáncer de próstata luego.

Además, en el contexto de la presente divulgación, el "valor de referencia" se refiere a un valor predeterminado que se considera relevante para tomar decisiones o sacar conclusiones con respecto al pronóstico o una estrategia de tratamiento apropiada para el paciente.

También, en el contexto de la presente divulgación, un valor de referencia que está "asociado" con un pronóstico de referencia se refiere a que al valor de referencia se le asigna un pronóstico de referencia correspondiente, basado en datos empíricos y/o supuestos clínicamente relevantes. Por ejemplo, el valor de referencia puede ser el valor promedio de la proteína Wnt5a en un grupo relevante de pacientes y el pronóstico de referencia puede ser una supervivencia promedio en el mismo grupo. Además, el valor de referencia no tiene que asignarse a un pronóstico de referencia derivado directamente de los datos de pronóstico de un grupo de pacientes que presentan el valor de referencia.

El experto en el arte conoce numerosas formas de obtener un valor de muestra correspondiente a un nivel de proteína Wnt5a en una muestra de un paciente.

La muestra normalmente es tejido de una biopsia. Alternativamente, se pueden usar células obtenidas de la próstata.

La etapa a) del método anterior implica evaluar una cantidad de proteína Wnt5a presente en al menos parte de la muestra, y determinar un valor de muestra correspondiente a la cantidad. La "al menos parte de la muestra" se refiere a una parte o partes relevantes de la muestra para establecer el pronóstico o sacar conclusiones con respecto a los tratamientos apropiados. El experto en el arte entiende qué parte o partes que son relevantes en las circunstancias presentes cuando se realiza el método. Por ejemplo, si evalúa una muestra que comprende células, el experto en el arte solo puede considerar las células tumorales, o solo los núcleos de las células tumorales, de la muestra.

Además, en la etapa a) se evalúa una cantidad y se determina un valor de muestra correspondiente a la cantidad. En consecuencia, no se requiere una medición exacta de la cantidad de proteína Wnt5a para obtener el valor de la muestra. Por ejemplo, la cantidad de proteína Wnt5a se puede evaluar mediante inspección visual de una muestra de tejido preparada y teñida y el valor de la muestra se puede clasificar como, por ejemplo, alto o bajo basado en la cantidad evaluada.

La evaluación y determinación de la etapa a) requiere algún tipo de procesamiento o manipulación de la muestra. No es posible determinar el valor de la muestra simplemente inspeccionando la muestra como tal. Diversas técnicas, de las cuales algunas se presentan a continuación, para tal evaluación y determinación, son bien conocidas por el experto. Los métodos de la presente divulgación, por lo tanto, no se limitan a ninguna técnica o técnicas específicas para la ejecución de la etapa a).

El pronóstico puede ser una probabilidad de supervivencia. La supervivencia de la presente divulgación puede ser, por ejemplo, supervivencia global o supervivencia libre de enfermedad. Además, la "supervivencia" se puede medir en diferentes períodos, tales como cinco, diez o 15 años. De acuerdo con lo anterior, la supervivencia puede ser una supervivencia de cinco años, diez años o 15 años. Cuando se emplea un pronóstico de referencia, es del mismo tipo que el pronóstico del paciente.

En el contexto de la presente divulgación, los términos "valor de muestra" y "valor de referencia" se deben interpretar en sentido amplio. La cuantificación de la proteína Wnt5a para obtener estos valores se puede realizar por medios automáticos, a través de un sistema de puntuación basado en la inspección visual o microscópica de muestras, o por medio de combinaciones de las mismas. Sin embargo, también es posible que un experto, tal como un experto en el arte de histopatología, determine la muestra y los valores de referencia mediante la inspección, por ejemplo, de portaobjetos de tejido que se hayan preparado y teñido para la expresión de la proteína Wnt5a. De este modo, determinar que el valor de la muestra es más alto que el valor de referencia puede corresponder a determinar, después de una inspección visual o microscópica, que un portaobjetos de tejido de muestra está teñido más densamente y/o exhibe una mayor fracción de células teñidas que un portaobjetos de tejido de referencia. El valor de muestra también se puede comparar con un valor de referencia dado por una referencia literal, tal como un valor de referencia descrito en la redacción o por una imagen de referencia. En consecuencia, la muestra y/o los valores de referencia pueden ser, en algunos casos, valores mentales que la persona experta determina en la inspección y comparación.

Se puede proporcionar un valor de referencia, que se considera relevante para establecer el pronóstico o tomar decisiones de tratamiento con respecto a los pacientes con cáncer de próstata, para su uso como comparación con el valor de muestra del paciente, de varias maneras. En vista de las enseñanzas de la presente divulgación, el experto en el arte puede, sin una carga excesiva, proporcionar valores de referencia relevantes para realizar los métodos de la presente divulgación.

La persona que realiza el método de pronóstico como se describe puede, por ejemplo, adaptar el valor de referencia a la información deseada. Por ejemplo, el valor de referencia se puede adaptar para proporcionar la información de pronóstico más significativa, que corresponde a la mayor diferencia en la supervivencia entre el primer y el segundo grupo del primer aspecto. Alternativamente, el valor de referencia se puede seleccionar de manera que se distinga un grupo de pacientes que tienen pronósticos particularmente buenos o pronósticos particularmente malos.

En algunas realizaciones del método de pronóstico como se describe, el valor de referencia puede corresponder a la cantidad de expresión de la proteína Wnt5a en un tejido sano del paciente del método. Como otro ejemplo, el valor de referencia puede ser proporcionado por la cantidad de expresión de la proteína Wnt5a medida en una muestra estándar de tejido normal de otro paciente comparable. Como otro ejemplo, el valor de referencia se puede proporcionar por la cantidad de expresión de la proteína Wnt5a medida en una muestra de referencia que comprende células tumorales. La cantidad de expresión de proteína de la muestra de referencia se puede establecer de preferencia previamente. En consecuencia, el valor de referencia se puede proporcionar por la cantidad de proteína Wnt5a medida en una muestra de referencia que comprende células que expresan una cantidad predeterminada de proteína Wnt5a.

En consecuencia, el valor de referencia puede ser un valor predeterminado correspondiente a la cantidad de expresión de la proteína Wnt5a en una muestra de referencia.

Se pueden usar como referencia las líneas celulares que expresan una cantidad controlada de proteína Wnt5a.

Una o más imágenes también se pueden proporcionar como la "muestra de referencia". Por ejemplo, dicha imagen puede mostrar un ejemplo de un portaobjetos de tejido tumoral teñido con un cierto anticuerpo durante ciertas condiciones y exhibiendo una cierta intensidad y/o fracción nuclear. La discusión anterior sobre la "muestra de referencia" se aplica *mutatis mutandis* a las imágenes.

Las líneas o imágenes celulares también pueden formar parte del kit como se describe.

El método de pronóstico se puede realizar de la siguiente manera. El tejido obtenido previamente a través de una biopsia del tumor del paciente se tiñe mediante el procesamiento inmunohistoquímico estándar para la tinción con Wnt5a. Luego, la tinción es evaluada por al menos una persona que tiene las habilidades y el entrenamiento para realizar dicha evaluación, tales como un patólogo y, preferiblemente, por al menos un patólogo experimentado. Luego, el patólogo revisa el grado de inmunotinción y puntúa el grado de tinción como 0, 1, 2 o 3. Al decidir el grado de tinción, el patólogo considerará el porcentaje de células cancerosas que son positivas, esto es, teñidas, y también la intensidad de la tinción. El pronóstico del paciente se puede considerar bueno si se encuentra que las células cancerosas tienen una alta expresión de proteína Wnt5a, esto es, una puntuación de 2 o 3, y peor si las células cancerosas tienen una baja expresión de proteína Wnt5a, esto es, una puntuación de 0 y 1.

En este caso anterior, la etapa a) del método de pronóstico incluye, de este modo, la evaluación de la cantidad de proteína Wnt5a presente en la muestra por inmunotinción de la muestra seguido de la determinación de la intensidad de la tinción. El valor dado a la intensidad de la tinción de la muestra constituye de este modo el valor de la muestra. El valor de referencia de la etapa b) sería entonces 0 o 1, para el cual el pronóstico de referencia es menos favorable.

El resultado de la tinción con Wnt5a como se describe anteriormente también se puede evaluar en combinación con la evaluación de los análisis de la expresión de las células tumorales de al menos otra proteína, tales como el receptor de andrógenos (AR), Ki-67 y/o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

5 La expresión de estas proteínas se evalúa de la misma manera que la expresión de Wnt5a. De este modo, el tejido obtenido previamente mediante una biopsia del tumor del paciente se tiñe mediante el procesamiento inmunohistoquímico estándar para AR, Ki-67 o VEGF, respectivamente. Luego, la tinción es evaluada por al menos un patólogo, preferiblemente por al menos un patólogo experimentado. El patólogo luego revisa la intensidad de la inmunotinción y puntúa el grado de tinción en 0, 1, 2 o 3, donde 0 y 1 son bajos y 2 y 3 son altos. Una baja expresión de AR, Ki-67 y/o VEGF en combinación con una alta expresión de proteína Wnt5a es indicativa de un buen pronóstico, y las combinaciones de alta expresión de proteína Wnt5a+baja expresión de AR, alta expresión de proteína Wnt5a+baja expresión de Ki-67 y/o alta expresión de proteína Wnt5a+baja expresión de VEGF constituyen mejores bases para un buen pronóstico para el paciente en comparación con alta expresión de proteína Wnt5a sola.

15 Como se mencionó anteriormente, el resultado de los análisis de tinción de proteínas se puede usar en combinación con otros indicadores de cáncer de próstata, tales como el estadio clínico y patológico del tumor, la puntuación de Gleason y el resultado de los análisis de sangre de PSA para brindar una visión completa de la condición del paciente antes de establecer un pronóstico final.

20 Un paciente que se encuentra que tiene un mal pronóstico por los métodos de pronóstico descritos anteriormente puede ser un paciente con una necesidad particular de tratamiento según la invención. Dicho paciente se puede beneficiar particularmente mediante el tratamiento con una proteína Wnt5a o con un péptido Wnt5a según la invención.

25 Breve descripción de los dibujos

En los siguientes ejemplos, se hace referencia a los dibujos adjuntos en los que:

30 Figura 1: muestra la expresión inmunohistoquímica de Wnt5a, AR y VEGF en núcleos de micromatrices de tejidos de tumores primarios y muestras benignas obtenidas después de una prostatectomía radical. A y B) Los paneles muestran inmunotinciones representativas de Wnt5a en áreas de tejido benigno y canceroso del mismo paciente. C y D) Los paneles muestran inmunotinciones de AR nuclear representativas en áreas de tejido benigno y cáncer. E y F) Los paneles describen la inmunotinción con VEGF en áreas de tejido benigno y con cáncer del mismo paciente. Todas las inserciones en los paneles representan imágenes de ampliación (40X) del área indicada por la flecha en la imagen más grande vista a una ampliación de 15X. G, H e I) Los paneles representan ilustraciones gráficas de las expresiones de proteínas Wnt5a, AR y VEGF en muestras benignas y de cáncer en pacientes con PCa. La barra en cada panel esboza 100 μ m.

40 Figura 2: muestra el análisis de cómo la expresión de la proteína Wnt5a sola o en combinación con otros biomarcadores afecta el resultado clínico de los pacientes con PCa. Todos los casos de cáncer se separaron en 2 grupos basado en las intensidades de tinción de Wnt5a, Ki-67, AR y VEGF. Los grupos bajos incluyeron tumores con puntuaciones 0 o 1 y los grupos altos incluyeron tumores con puntuaciones 2 o 3. A) El panel muestra curvas de supervivencia trazadas entre la expresión de proteínas Wnt5a alta o baja y el tiempo libre de BCR. B) El panel muestra curvas de supervivencia trazadas entre Wnt5a alta o bajo y expresiones de proteína Ki-67 alta y baja. En consecuencia, los tumores se dividieron en los siguientes 4 grupos; Wnt5a bajo y Ki-67 bajo, Wnt5a bajo y Ki-67 alto, Wnt5a alta y Ki-67 bajo y Wnt5a alta y Ki-67 alto. C) El panel muestra curvas de supervivencia trazadas entre Wnt5a alta o bajo y expresiones de proteína AR alta y baja. En consecuencia, los tumores se dividieron en los siguientes 4 grupos; Wnt5a bajo y AR bajo, Wnt5a bajo y AR alto, Wnt5a alta y AR bajo y Wnt5a alta y AR alto D) El panel muestra curvas de supervivencia trazadas entre Wnt5a alta o bajo y expresiones de proteína VEGF alta y baja. En consecuencia, los tumores se dividieron en los siguientes 4 grupos; Wnt5a bajo y VEGF baja, Wnt5a bajo y VEGF alto, Wnt5a alta y VEGF baja y Wnt5a alta y VEGF alto. En todos los paneles, la expresión alta de una proteína se indica con \uparrow mientras que \downarrow indica una expresión baja. Cada etapa en las curvas representa una recaída en PCa. Los valores de p dados en la parte inferior derecha de los paneles indican diferencias significativas en el resultado entre el grupo más favorable y el grupo menos favorable (véase la tabla 4 para obtener información más detallada)

60 Figura 3: muestra el análisis de la expresión de la proteína Wnt5a en diferentes líneas celulares de próstata y su efecto sobre la invasividad de las células de PCa. A) Este panel muestra la expresión endógena de Wnt5a y AR en cuatro líneas celulares PCa indicadas (células LNCaP, 22Rv1, DU145 y PC3) y en una línea celular epitelial de próstata humana inmortalizada (células PNT2). La banda de proteína Wnt5a se identificó ejecutando rWnt5a en paralelo en el mismo gel. Las transferencias se reanalizaron para β -actina como control de carga. Las transferencias presentadas son representativas de 4 experimentos separados. B) El panel representa la invasión relativa de las líneas celulares LNCaP, 22Rv1, DU145 y PC3 después de 24 h en ausencia o presencia de rWnt5a (0.4 μ g/ml) en el ensayo descrito en la sección de materiales y métodos. Los resultados se dan como medias \pm SEM de 5 experimentos separados. Las diferencias en la invasión entre las células tratadas con vehículo solo o con rWnt5a se evaluaron para determinar su significación estadística ($p = 0.0001$ para 22Rv1 y $p < 0.0001$ para DU145). C) El panel

muestra los efectos de la modificación genética de ARNip de Wnt5a en LNCaP y 22Rv1. Las transferencias se reanalizaron para α -tubulina como control de carga. Las transferencias presentadas son representativas de 4 experimentos separados. D) El panel representa la invasión relativa de células LNCaP y 22Rv1 después del tratamiento con ARNip de Wnt5a (modificación genética de Wnt5a) o ARNip de secuencia aleatoria (control), en el mismo ensayo que se usó previamente en el panel B. Los resultados se proporcionan como media \pm SEM de 5 experimentos separados. La diferencia en la invasión entre las células de secuencia aleatoria y modificadas genéticamente si-Wnt5a fue estadísticamente significativa para ambas líneas celulares ($p < 0.0001$).

Figura 4: Representantes de inmunotinciones de fracción nuclear Ki-67. A) El panel representa el núcleo del cáncer sin tinción nuclear Ki-67. B) El panel representa el núcleo del cáncer con 1-3% de tinción nuclear con Ki-67, C) El panel muestra el núcleo del cáncer con 4-10% de los núcleos con tinción positiva para Ki-67 D) El panel muestra el núcleo del cáncer con más del 10% de núcleos teñidos positivos para Ki-67. Todas las inserciones en los paneles representan imágenes de ampliación (40X) del área indicada por la flecha en la imagen más grande vista a una ampliación de 15X. La barra en cada panel representa 100 μ m.

Figura 5: Validación del material del paciente usado en este estudio. A) El material tumoral del paciente se dividió en 2 grupos según su puntuación de Gleason (GS). Como se indica en el panel, un grupo tuvo una puntuación de Gleason de $\leq 3+4$ y el otro una puntuación de Gleason de $\geq 4+3$. Luego se generaron curvas de Kaplan-Meier para cada uno de los 2 grupos con las puntuaciones de Gleason indicadas y su tiempo libre respectivo de BCR. B) El panel muestra las curvas de Kaplan-Meier trazadas entre la expresión de Ki-67 baja o alta y su respectivo tiempo libre de BCR. C) El panel muestra las curvas de Kaplan-Meier trazadas entre la expresión de AR baja o alta y su tiempo libre respectivo de BCR. D) El panel muestra las curvas de Kaplan-Meier trazadas entre la expresión de VEGF baja o alta y su respectivo tiempo libre de BCR.

Figura 6: Esta figura representa la invasión de células de próstata humana 22Rv1 (A) y DU145 (B) mostradas para responder a Wnt5a recombinante con una reducción de su capacidad invasiva (véase la figura 3). Los resultados en esta figura muestran la invasión relativa después de 24 h en ausencia y presencia de Foxy-5 (100 μ M) en el ensayo de invasión descrito en la sección de materiales y métodos. Los resultados se dan como medias \pm SEM de 2-3 experimentos separados.

Ejemplos

Materiales y métodos

Construcción de micromatrices de tejidos (TMA) y pacientes

Se construyó una TMA a partir de una cohorte poblacional de 503 pacientes con PCa que se sometieron a una prostatectomía radical entre 1988 y 2003 en the Department of Urology, Skåne University Hospital, Malmö, Suecia, como se describió anteriormente [36]. De cada paciente, se montaron núcleos benignos y malignos en duplicado en un total de 17 bloques de parafina. Se usaron secciones consecutivas para IHC. Un patólogo certificado por la Junta Nacional examinó los tejidos teñidos con hematoxilina y eosina para el grado de Gleason y para detectar la presencia de neoplasia intraepitelial prostática. Las características clínicas y patológicas de los pacientes con PCa se obtuvieron de la lectura detallada de las historias clínicas y se muestran en la Tabla 1. El tiempo medio de seguimiento fue de 41.6 meses (intervalo de 1.51 a 205.90). El BCR se definió como un nivel de PSA en sangre de al menos 0.2ng/ml con un valor de confirmación posterior.

Fuente de anticuerpos.

Se usaron los siguientes anticuerpos para la inmunotinción: Wnt5a (policlonal de conejo): el anticuerpo se desarrolló en el laboratorio de los inventores contra una secuencia de Wnt5a con 100% de homología entre humano y ratón [20]; receptor de andrógenos (AR) (código AR 441, ratón monoclonal, Thermo Fisher Scientific Inc., Freemont, CA), Ki-67 (ratón monoclonal, código MIB-1 M7240, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca); VEGF A-20 (policlonal de conejo, código sc-152, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); β -actina (ratón monoclonal, código C4, MP Biomedicals, Solon, OH), α Tubulina (ratón monoclonal, sc-32293, Santa Cruz Biotechnology).

Inmunohistoquímica (IHC)

Se montaron secciones consecutivas de 4 μ m de espesor en portaobjetos de vidrio Superfrost Plus (Menzel Gläser, Braunschweig, Alemania) y se desparafinaron con xileno y se rehidrataron en concentraciones decrecientes de soluciones de etanol. Para la recuperación de antígeno, los portaobjetos de TMA se calentaron en PT Link (Dako) de 65 °C a 98 °C durante 40 minutos y luego se procesaron para tinción inmunohistoquímica para Wnt5a (dilución final 1:100), AR (1:100), Ki67 (1:100) y VEGF (1:100) con EnVision™ 382 Flex, reactivo de pH alto (código K8010, Dako) en Autostainer Plus según el protocolo del fabricante (Dako). La inmunotinción de Wnt5a, Ki-67, AR y VEGF se calificaron de forma independiente por los patólogos LH, AE y RE. En general, el patrón de puntuación coincidió en casi el 80% de los casos en las intensidades de tinción, así como en el porcentaje de células positivas. El 20% restante de los casos en los que hubo un desacuerdo sobre la puntuación se volvieron a examinar juntos y se

puntuaron después de llegar a una conclusión. En general, los núcleos se puntuaron con 0 (sin tinción), 1 (tinción débil), 2 (tinción moderada) o 3 (tinción fuerte) según las intensidades de tinción y/o el porcentaje de células positivas. Los portaobjetos de Wnt5a y VEGF se puntuaron basado en la tinción citoplásmica, mientras que la tinción nuclear se evaluó para la tinción AR. Los portaobjetos de Ki-67 se calificaron como 0 (0-1%), 1 (1-3%), 2 (4-10%) y 3 (11-20%) según la positividad de la fracción nuclear. Al realizar las estadísticas, las puntuaciones de expresión de proteínas se dividieron en dos grupos según sus intensidades de tinción; las puntuaciones 0 y 1 se agrupan en débil/bajo y el grupo fuerte/alto contiene puntuaciones de 2 y 3.

Para los estudios de IHC y los análisis de correlación en Wnt5a, Ki-67, AR y VEGF, se excluyeron los pacientes sin información de puntuación de Gleason (29) y los pacientes que recibieron terapia hormonal y/o radioterapia (39), dejando 464 pacientes para análisis. Durante la construcción de TMA, algunos núcleos ya sea se perdieron, o no se colocaron correctamente en los portaobjetos, o se dañaron 398 y no estaban disponibles para puntuar; por consiguiente, los datos de inmunotinción de proteínas contienen valores perdidos. (Tabla 2).

Líneas celulares

Se adquirieron cuatro líneas celulares humanas de PCa, LNCaP, 22Rv1, PC-3 y DU145 de American Type Culture Collection [ATCC] (Manassas, VA). Las células epiteliales de próstata humanas normales PNT2 inmortalizadas (No. de cat. 95012613) se obtuvieron de European Collection of Cell Cultures (ECACC), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las líneas celulares LNCaP, 22Rv1, DU145 y PNT2 se cultivaron en medio RPMI-1640, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de inhibición (penicilina y estreptomycin). Las células PC-3 se cultivaron en medio F12 de Hyclone Ham complementado con un 10% de FBS y un 1% de inhibición. Todos los experimentos in vitro se realizaron cuando las células tenían una confluencia del ~ 70%. Para experimentos de ensayo de invasión, las células se cultivaron en medio sin suero (SFM) durante 24 horas. El medio RPMI-1640 (R0883), FBS (F6178), penicilina estreptomycin (P0781) se adquirieron de Sigma-Aldrich, mientras que el medio F12 de Ham (SH30026.01) se obtuvo de Thermo-Scientific (Waltham, MA). Todas las líneas celulares se analizaron regularmente para detectar la ausencia de infección por micoplasma.

Análisis de transferencia Western

La expresión de la proteína se examinó mediante análisis de transferencia Western. En resumen, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron (en tripsina durante 3 minutos), se centrifugaron a 1000 rpm durante 4 minutos. Las células se lisaron en hielo en solución reguladora RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, Triton x-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, dodecil sulfato de sodio al 0.1%, EDTA 1 mM, 0.1 mg/mL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo con la adición del cóctel inhibidor de la proteasa Complete Mini (Roche, Mannheim, Alemania) durante 30 minutos, se centrifugó a 15,000 rpm durante 25 minutos a +4 °C y se recogieron los lisados de proteínas como sobrenadantes. Después de medir la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford, 100 µg de cada muestra de proteína se cargó en un 10% de SDS - geles de poliacrilamida. Las proteínas se separaron usando electroforesis en gel y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa ECL de Hybond (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido). Para bloquear la unión no específica, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa en 5% de leche en polvo durante 45 minutos a temperatura ambiente, se lavó dos veces en solución reguladora (0.05% de Tween en PBS) durante 10 minutos, y luego se incubó durante la noche por separado con anticuerpo policlonal de conejo Wnt5a (1:750 en 2.5% de leche seca) o AR monoclonal de ratón (1: 500 en 2.5% de leche en polvo) a +4 °C. Después de la incubación (durante 60 min a temperatura ambiente) 429 con anticuerpo secundario anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Amersham Life Science, Alesbury, Reino Unido) (1:10000 en leche en polvo al 5%) para Wnt5a y anticuerpo secundario antiratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Dako) (1:10000 en leche en polvo al 5%) para AR y lavando los anticuerpos no unidos, el anticuerpo unido a la membrana se detectó mediante el uso de Reactivo de Luminol de transferencia Western (Santa Cruz). Las membranas se eliminaron luego usando una solución de extracción (Solución reguladora de Restore PLUS Western Blot Stripping, Thermo Scientific) y se reanalizaron para detectar β-actina (1:3,000 en 2.5% de leche en polvo) o α Tubulina (1:1000 en 2.5% de leche en polvo).

Transfección con ARNip de Wnt5a

Se compraron dos ARNip de Wnt5a (S1 y S2) prediseñados (Inventoried) de Silencer® Select diferentes y ARNip de control negativo Silencer® Select de Applied Biosystems (Ambion, CA). Un cóctel de dos ARNip diferentes (120 nM) en agua libre de nucleasas se transfectó en 1×10^5 células en un volumen total de 250 µL de medio sin suero usando 10 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El medio se cambió después de 5 horas de transfección. Después de 24 horas de transfección, los medios se cambiaron a SFM, y las células se usaron 24 horas después para el análisis de su expresión de proteína Wnt5a y sus capacidades invasivas.

Ensayo de invasión

Las capacidades de invasión celular se midieron en un ensayo de invasión comercial estándar. En este estudio, los inventores usaron las cámaras de invasión Matrigel™ de BD BioCoat™ (BD Biosciences, Bedford, MA) según el

protocolo del fabricante. En resumen, las células se cultivaron en SFM durante 24 h, se recogieron usando versene (Invitrogen, Carlsbad, CA), se lavaron en PBS y se resuspendieron a una concentración de 50,000 células/ml en SFM. Al pocillo inferior se añadieron 0.7 ml de medio que contenía suero (FBS al 10%). A la cámara de invasión se le añadieron 0.5 ml (25,000 células) de la suspensión celular, que contenía ya sea 0.4 µg/ml de Wnt5a recombinante (rWnt5a, R&D Systems, Minneapolis, MN) o PBS (con BSA al 0.2%) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Después de 24 h, las células que invadieron el Matrigel se fijaron en paraformaldehído al 4% y se tiñeron con cristal violeta al 0,2% en metanol al 20% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.). Los restos del Matrigel se eliminaron con un bastoncillo de algodón humedecido en PBS. Las membranas de las cámaras de invasión se separaron y se montaron en un portaobjetos de vidrio usando un medio de montaje VectaShield® con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las células invadidas se contaron en un microscopio invertido 460 o en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 (Olympus optical Co. Ltd, Japón).

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS versión 17.0 (SPSS, Chicago, IL) y Microsoft Excel 2010. Como las muestras de los pacientes estaban presentes en duplicados, se usó la mejor puntuación de los dos núcleos (si está disponible) para los análisis estadísticos. Los pacientes que recibieron tratamiento hormonal o radioterapia preoperatoria (n = 39), los pacientes sin información disponible sobre la puntuación de Gleason (29) y los pacientes en los que los niveles de PSA no eran completamente 0 después de la prostatectomía radical y, por consiguiente, no se excluyó el BCR (n = 75), dejando un total de 397 pacientes para análisis de supervivencia y estadísticos multivariantes. Para los análisis estadísticos, el material del paciente se dividió en dos grupos según la puntuación de Gleason; los pacientes con puntuación de Gleason 5 a 7 (con 3+4 casos solamente) se agruparon como "cánceres de grado bajo", y los pacientes con puntuación de Gleason 7 (4+3 casos solamente) a 10 se agruparon como grupo de "cáncer de grado alto". Se usó la prueba Wilcoxon Signed Ranks para examinar cualquier diferencia significativa en la expresión de la proteína Wnt5a entre el cáncer y los tejidos benignos. La correlación de orden de intervalo de Spearman se realizó para conocer correlaciones significativas entre Wnt5a, AR, Ki-67 y tinción de VEGF. Se usó el método de Kaplan-Meier para determinar la supervivencia libre de BCR (resultado) y se usó la prueba Log Rank (Mantel-Cox) para comparar la supervivencia libre de BCR entre los diferentes grupos de expresión de Wnt5a. Para el análisis de supervivencia, las intensidades de tinción de diferentes proteínas se agruparon en dos; Tinción sin/débil en el grupo "1" (baja) y tinción moderada/fuerte en el grupo "2" (alta). En algunos análisis, el patrón de expresión de dos proteínas diferentes se agrupó, por ejemplo, mientras se realizaban las curvas de supervivencia y los análisis de regresión de Cox, las intensidades de tinción de Wnt5a y AR se agruparon, formando cuatro grupos diferentes. Los pacientes con tinción de Wnt5a baja y AR baja constituyeron el grupo 1, el grupo 2 tenía pacientes con tinción de Wnt5a baja y AR alta, los pacientes con Wnt5a alta y AR baja se mantuvieron en el grupo 3, mientras que el grupo 4 consistió en pacientes con intensidades de tinción de Wnt5a alta y AR alta. Se aplicó el mismo criterio al combinar las intensidades de tinción de Wnt5a con los puntuaciones Ki-67/VEGF.

Resultados

Evaluación inmunohistoquímica de Wnt5a, AR, Ki-67 y VEGF

Una construcción de micromatrices tisular (TMA) con núcleos duplicados de tejidos tanto benignos como malignos de 503 pacientes (características de los pacientes en la Tabla 1) que se habían sometido a una prostatectomía radical, fue inmunoteñida para Wnt5a, AR, Ki-67 y VEGF (Fig. 1 AF). La expresión de la proteína Wnt5a se detectó en el compartimento citoplásmico de las células epiteliales y, ocasionalmente, en células estromales tanto de cáncer como en muestras de tejido benigno. Los tejidos cancerosos de la mayoría de los pacientes (82%) mostraron una inmunotinción citoplásmica fuerte homogénea, mientras que la mayoría de los tejidos benignos (65%) mostró una inmunorreacción débil que respalda que se produzca una regulación al alza de la proteína Wnt5a en el tejido canceroso. Los resultados de la puntuación manual de las intensidades de tinción citoplásmica en células epiteliales malignas y benignas se ilustran en la figura 1 G-I. La diferencia entre las intensidades de tinción de Wnt5a en el cáncer y las muestras benignas resultó ser significativa (p <0.0001) cuando se realizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon emparejada. En casi el 80% de los pacientes, los inventores encontraron una fuerte intensidad de tinción con Wnt5a (unidades 2 o 3 arbitrarias) en los núcleos de cáncer, mientras que solo el 35% de los pacientes mostraron una tinción fuerte en muestras de tejido benigno. En la Tabla 2 se dan más detalles sobre los datos de puntuación de los núcleos teñidos con Wnt5a, AR, Ki-67 y VEGF.

Tabla 1: Resumen de las características del paciente 643 (n = 503)

Característica	Mediana (IQR) o Frecuencia (%)
Edad en el momento del diagnóstico (años)	63.13 (59.33, 66.18)
PSA preoperatorio (ng/ml)	7.2 (5.03, 11.07)
Estadio clínico	

(continuación)

Característica	Mediana (IQR) o Frecuencia (%)
T1	181
T2	233
T3	9
Puntuación patológica de Gleason	
≤ 3+4	423 (84.1%)
≥ 4+3	51 (10.1%)
Extensión extracapsular	250 (49.7%)
Invasión de vesículas seminales	55 (10.9%)
Márgenes quirúrgicos positivos	259 (51.5%)
Implicación de ganglios linfáticos (LNI) *	3 (2%)
Abreviatura: IQR, intervalo intercuartil	
* La información sobre LNI estaba disponible solo para 153 pacientes	

Tabla 2: Datos de puntuación de los núcleos inmunoteñidos de Wnt5a, AR, VEGF y Ki-67 de tejidos benignos y cancerosos en duplicados montados en una TMA

5

Puntuación	Wnt5a		AR		VEGF		Ki-67	
	Benigno	Cáncer	Benigno	Cáncer	Benigno	Cáncer	Benigno	Cáncer
0	60 (15)	14 (4)	6 (1.5)	2(0.5)	14 (3)	16 (5)	55 (14.2)	21 (5.3)
1	205 (50)	53 (14)	186 (45.6)	126 (30.1)	184 (46)	80 (23)	323 (83.2)	341 (85.5)
2	123 (30)	162 (44)	165 (40.4)	179 (42.7)	175 (44)	180 (52)	9 (2.3)	33 (8.3)
3	19 (5)	141 (38)	51 (12.5)	112 (26.7)	29 (7)	72 (21)	1 (0.2)	4 (1)
Total	407 (100)	370 (100)	408 (100)	419 (100)	402 (100)	348 (100)	388 (100)	431 (100)
Ausente	57	94	56	45	62	116	76	65
Total	464	464	464	464	464	464	464	464
Valor P		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001

10

La puntuación se basa en unidades arbitrarias, donde 0 representa ninguna tinción, 1 como tinción débil, 2 como tinción moderada y 3 como tinción fuerte. Para Ki-67, el porcentaje de positividad nuclear se calificó como 0 (0-1% de núcleos positivos), 1 (1-3% de núcleos positivos), 2 (4-10% de núcleos positivos) y 3 (11-20% de núcleos positivos). Los valores de p en la fila inferior de la tabla indican diferencias estadísticamente significativas entre las muestras benignas y de cáncer del mismo paciente cuando se realizaron las pruebas de la suma de rangos de Wilcoxon. Los valores entre paréntesis representan el número de pacientes (%) según la puntuación más alta de cada duplicado individual. Los pacientes que se sometieron a radioterapia y/o terapia hormonal antes de la prostatectomía radical se excluyeron del análisis de IHC.

15

La tinción del receptor de andrógenos fue predominantemente nuclear como se esperaba y, en general, más intensa en el cáncer en comparación con muestras de tejido benigno como se detalla en la Tabla 2. El setenta por ciento de los núcleos tumorales se tiñeron intensamente en comparación con el 53% de los núcleos benignos.

20

Se usó la expresión de Ki-67 nuclear como marcador de proliferación (véase la figura 4). Hubo diferencias significativas en la tinción de Ki-67 entre el cáncer y los núcleos benignos, ya que el 14% de los núcleos benignos fueron negativos para el Ki-67, mientras que solo el 5% de los núcleos de cáncer fueron negativos para el Ki-67. Respecto a la tinción nuclear con Ki-67 positiva, casi el 9% de los núcleos de cáncer tenían una puntuación de tinción superior a 2, mientras que el número correspondiente a los núcleos benignos era solo del 2.5% (Tabla 2).

25

La expresión de VEGF, como un marcador sustituto para la angiogénesis, se observó en el citoplasma de las células epiteliales malignas y benignas, con áreas de cáncer que muestran una mayor tinción en comparación con las benignas. Más del 73% de los núcleos de cáncer mostraron una fuerte inmunotinción con VEGF, mientras que solo el 51% de los núcleos benignos mostraron una fuerte inmunorreacción (Tabla 2).

La diferencia entre las intensidades de tinción de AR, Ki-67 y VEGF en el cáncer frente a los núcleos benignos fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) cuando se realizó la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon (Tabla 2).

Correlación de la expresión del tejido de Wnt5a con AR, Ki-67 y VEGF

En la presente cohorte, la expresión de Wnt5a mostró una correlación positiva y estadísticamente significativa con la expresión de VEGF (ρ de Spearman (p) = 0.396, $p < 0.0001$), correlaciones débiles pero aun estadísticamente significativas con la expresión de AR ($p = 0.159$, $p = 0.007$) y la expresión de Ki-67 ($p = 0.233$, $p < 0.0001$) (Tabla 3). La mayoría de los pacientes (220/365, 60%) con fuerte inmunotinción con Wnt5a en tejidos cancerosos también mostró una intensa tinción de AR (Tabla 4). Se observó una tendencia similar cuando se compararon Wnt5a y VEGF; El 65% (219/339) de los núcleos de cáncer exhibió una fuerte tinción tanto para Wnt5a como para VEGF. Los inventores no encontraron diferencias en la intensidad de la inmunotinción de Wnt5a cuando los inventores compararon grupos de pacientes con diferentes puntuaciones de Gleason. Entre los pacientes con una puntuación de Gleason patológica de hasta 3+4 ("bajo grado"), el 81% tenía una expresión elevada de la proteína Wnt5a en comparación con el 86% de los pacientes con una puntuación de Gleason más alta (datos no mostrados). De manera similar, no se observó correlación entre la tinción con Wnt5a y la etapa T patológica, la etapa T clínica, el estado del margen quirúrgico o la invasión de vesículas seminales (datos no mostrados).

Tabla 3: Coeficientes de correlación de Spearman (ρ) cuando se analizó la expresión de 706 de la proteína Wnt5a para determinar la posible correlación con otros biomarcadores tisulares en los núcleos de cáncer de 464 pacientes con PCa

		Ki-67 ρ	AR	VEGF
Wnt5a	ρ	0.212**	0.142**	0.395**
	valor P	<0.0001	0.007	<0.0001

** La correlación es significativa a un nivel de 0.01 (2 colas).

Tabla 4: Análisis multivariado de los factores que influyen en la supervivencia libre de recaída bioquímica

Factores	Grupos	n (%)	Proporción de riesgo (95% CI)	X ²	Valor P
Tinción de Wnt5a	Alta	321 (80.7)	1 (Referencia)	10.863	0.001
	Baja	77 (19.3)	2.204 (1.361 - 3.570)		
Tinción de Wnt5a & Ki67	Wnt5a alta Ki67 baja	255 (73.1)	1 (Referencia)	36.638	
	Wnt5a baja Ki67 baja	59 (16.9)	2.335 (1.344 - 4.054)		0.003
	Wnt5a baja Ki67 alta	3 (0.6)	14.501 (4.412 - 47.658)		<0.0001
	Wnt5a alta Ki67 alta	32 (9.2)	2.215 (1.128 - 4.351)		0.021
Tinción de Wnt5a & AR	Wnt5a alta AR baja	81 (22.2)	1 (Referencia)	19.769	
	Wnt5a baja AR baja	28 (7.7)	3.044 (1.067 - 8.685)		0.037
	Wnt5a baja AR alta	36 (9.9)	6.060 (2.489 - 14.756)		<0.0001
	Wnt5a alta AR alta	220 (60.3)	2.503 (1.129 - 5.546)		0.024
Tinción de Wnt5a & VEGF	Wnt5a alta VEGF baja	63 (18.6)	1 (Referencia)	13.955	
	Wnt5a baja VEGF baja	29 (8.6)	2.843 (1.121 - 7.211)		0.028
	Wnt5a baja VEGF alta	28 (8.3)	3.501 (1.407 - 8.712)		0.007

(continuación)

Factores	Grupos	n (%)	Proporción de riesgo (95% CI)	X ²	Valor P
	Wnt5a alta VEGF alta	219 (64.6)	1.323 (0.617 - 2.836)		0.472
Puntuación Patol. Gleason	≤ 3+4	398 (90.5)	1 (Referencia)	9.302	0.002
	≥ 4+3	42 (9.5)	2.247 (1.317 - 3.835)		
Estadio T Patol.	T2	226 (50.4)	1 (Referencia)	22.05	<0.0001
	T3	222 (49.6)	2.655 (1.738 - 4.056)		
n = Frecuencia; IC = intervalo de confianza; χ^2 = Chi-cuadrado; Pato. = Patológica					

Expresión de la proteína Wnt5a y predicción del resultado clínico

5 A continuación, los inventores evaluaron si la expresión de la proteína Wnt5a en tejidos cancerosos analizada después de una prostatectomía radical para determinar una PCa local podría predecir el resultado clínico según lo medido por el tiempo hasta la recaída bioquímica (BCR), usando PSA > 0.2 ng/mL en muestras de sangre con un valor de confirmación como un marcador sustituto. La expresión de la proteína Wnt5a como lo ilustra la IHC fue significativamente mayor en las áreas de cáncer en comparación con las áreas benignas (Fig. 1, Tabla 2).
 10 Curiosamente, cuando se trazó la curva de Kaplan-Meier entre la expresión de la proteína Wnt5a y el tiempo libre de BCR, fue evidente un resultado favorable ($p = 0.001$) para los pacientes con una alta expresión de la proteína Wnt5a en comparación con los pacientes con una baja expresión de la proteína Wnt5a (Fig. 2A). Como se esperaba, la baja expresión de AR y de Ki-67 se asoció con un resultado favorable, mientras que la expresión de VEGF no se asoció significativamente con el tiempo libre de BCR (Fig. 5).

15 Además, los inventores examinaron si la expresión de la proteína Wnt5a también podía predecir el resultado cuando se combinaba con cualquiera de los otros biomarcadores tisulares. El mejor modelo de predicción se obtuvo cuando la expresión de la proteína Wnt5a se combinó con la expresión AR o Ki-67 (Fig. 2 B, C), ya que los pacientes con expresión alta de Wnt5a y AR baja o Ki-67 baja mostraron una mejor supervivencia libre de recaída ($p < 0.0001$),
 20 mientras que los pacientes con baja expresión de Wnt5a y AR alta o alta expresión de Ki-67 tuvieron el peor resultado después de la cirugía. Los pacientes con alta expresión de Wnt5a y baja de VEGF tuvieron mejores resultados en comparación con otros grupos ($p = 0.003$) o con cada marcador solo. Sin embargo, la combinación de Wnt5a alta y VEGF baja fue inferior a cuando Wnt5a se analizó en combinación con AR o Ki-67, lo que indica que VEGF no es tan fuerte como AR o Ki-67 para predecir el resultado en combinación con Wnt5a en el contexto actual
 25 (Fig. 2 D). El análisis regresivo de Cox se usó para los análisis multivariados y reveló que la expresión de Wnt5a, la puntuación de Gleason y el estadio T patológico eran factores independientes que influyen en la supervivencia libre de recaída en PCa (Tabla 4).

Expresión de la proteína Wnt5a y sus efectos sobre la invasión de líneas celulares PCa

30 Los datos de los inventores muestran que los pacientes con alta expresión de proteína Wnt5a tienen un resultado más favorable en comparación con los pacientes con baja expresión de proteína Wnt5a. Para comprender mejor este hallazgo, se examinó la expresión de la proteína Wnt5a en una línea celular epitelial de próstata humana normal inmortalizada con SV40 (PNT2) y cuatro líneas celulares de PCa diferentes. Las células PNT2 tenían una
 35 expresión baja de la proteína Wnt5a endógena, mientras que había una expresión considerable de Wnt5a en las líneas celulares de PCa LNCaP y 22Rv1 (Fig. 3A). Estos datos están según los hallazgos de la expresión de la proteína Wnt5a en la cohorte actualmente analizada de PCa y un estudio reciente también realizado en líneas de células epiteliales de próstata y células de PCa normales [26]. Sin embargo, los análisis de las dos líneas celulares de PCa más agresivas (PC3 y DU145) revelaron una expresión muy baja de la proteína Wnt5a, comparable a la de
 40 la línea celular epitelial de próstata PNT2 normal (Fig. 3A). Curiosamente, los niveles de proteína Wnt5a coinciden con las expresiones de proteína AR en estas líneas celulares (Fig. 3 A).

Los inventores usaron las cuatro líneas celulares de cáncer (LNCaP, 22Rv1, PC3 y DU145) para los experimentos de invasión posteriores. La adición de Wnt5a recombinante (rWnt5a) disminuyó el comportamiento invasivo de las
 45 células cancerosas tanto 22Rv1 como DU145 (Fig. 3 B). Ni el LNCaP ni las células PC3 respondieron a rWnt5a con un cambio en su comportamiento invasivo. El resultado con las células PC3 está según un informe publicado recientemente por Wang et al [26], en el que las células PC3 no respondieron a la adición de rWnt5a en un ensayo de migración de rasguño de la herida. Se sabe que las células LNCaP tienen una actividad de invasión muy baja, y esto podría explicar por qué estas células no respondieron cuando se añadió rWnt5a. Sin embargo, cuando la
 50 expresión de Wnt5a en las células LNCaP se eliminó usando ARNip (Fig. 3 C), hubo un aumento significativo en el comportamiento invasivo de las células LNCaP (Fig. 3 D). Además, la modificación genética de Wnt5a por el ARNip en las células cancerosas 22Rv1 también produjo un aumento de la invasión de estas células (Fig. 3C y 3D).

Discusión

Según el conocimiento de los inventores, solo un estudio con un número limitado de pacientes ha demostrado hasta ahora un papel de la proteína Wnt5a para predecir el resultado clínico en PCa [25]. Esto instó a los inventores a realizar un estudio sobre la expresión de la proteína Wnt5a en una cohorte más amplia de pacientes con PCa bien definidos con enfermedad localizada y predominantemente de bajo grado y relacionar los resultados con la expresión de otros biomarcadores de tejidos conocidos y, lo más importante, con BCR. El presente estudio implicó una serie consecutiva de pacientes con PCa que se habían sometido a una prostatectomía radical durante 1988-2003 en Skåne University Hospital, Malmö, Suecia, con un tiempo de seguimiento medio de 41.6 meses (intervalo 1.51 - 205.90). Esta cohorte de pacientes es grande, se basa en la población y los pacientes están bien caracterizados (Tabla 1). En los portaobjetos de TMA, los tejidos benignos y malignos del mismo paciente están presentes en duplicados. Sobre la base de los grados de Gleason, el material del paciente se caracterizó aún más en los cánceres de grado bajo (puntuación de Gleason hasta 3+4) y los cánceres de grado alto (Gleason 4+3 o superior). Casi el 89% de los pacientes se clasificaron como cánceres de bajo grado, lo que se espera en un grupo de pacientes con PCa localizada apropiado para la prostatectomía radical. Como control del material clínico, los inventores comprobaron que había una diferencia estadísticamente significativa en el resultado clínico entre los pacientes con cáncer de grado bajo y de grado alto usando los análisis de Kaplan-Meier de supervivencia libre de BCR (Fig. 5A). El control adicional del material clínico también reveló que lo mismo era cierto cuando se estudió la proliferación mediante la expresión de Ki-67, un biomarcador de tejido validado en PCa [30]. Los pacientes con alta expresión de Ki-67 habían reducido el tiempo de supervivencia libre de recaída en comparación con los pacientes con un número bajo de células tumorales que expresan Ki-67 (Fig. 5 B).

En el presente estudio de TMA, los inventores muestran claramente que la expresión de la proteína Wnt5a aumentó en el tejido de PCa localizado en comparación con el tejido benigno de los mismos pacientes, un efecto que exhibió una gran significación estadística ($p < 0.0001$; Fig. 1 A, B y G, Tabla 2). Estos resultados están según los hallazgos recientes obtenidos de una cohorte más pequeña [25]. La conclusión clínica de que la expresión de la proteína Wnt5a aumenta en el tejido de PCa localizado en comparación con el tejido normal/benigno también se apoya en el análisis de diferentes líneas celulares de próstata humana. Los inventores observaron claramente que la línea celular PNT2, una línea celular inmortalizada con SV40 derivada del epitelio prostático humano normal, expresa niveles muy bajos de proteína Wnt5a endógena, mientras que la expresión de la proteína Wnt5a era alta en las líneas celulares de PCa, LNCaP y 22Rv1. Las líneas celulares más agresivas, PC3 y DU145, tenían una expresión de proteína Wnt5a muy baja. Esto está en línea con el resultado menos favorable observado en los tumores con baja Wnt5. Sin embargo, en el material de TMA, Wnt5a no fue regulado a la baja en los casos de PCa de alto grado (puntuación de Gleason $\geq 4+3$). Es difícil decir si estos resultados aparentemente contradictorios indican una función no relacionada con el grado de Wnt5a o solo reflejan las características individuales de los dos tumores de los que se derivaron las líneas celulares. Como explicación alternativa, el número de PCa de alto grado en la presente cohorte ($n = 41$) puede ser demasiado pequeño para detectar una regulación negativa de Wnt5a relacionada con el grado.

Los inventores también encontraron una expresión aumentada de las proteínas AR, Ki-67 y VEGF en tejido de PCa localizado en comparación con el tejido benigno (Fig. 1 C-F, H-I, Tabla 2). Para obtener una primera visión de los posibles mecanismos de cómo Wnt5a funciona en PCa, los inventores realizaron análisis estadísticos de las posibles correlaciones entre la expresión de la proteína Wnt5a y la de AR, Ki-67 y VEGF, los tres bien conocidos por estar regulados positivamente en PCa progresivo. Wnt5a se correlacionó significativamente con VEGF, un marcador para la angiogénesis, lo que indica que Wnt5a podría estar relacionado con el crecimiento del tumor (Tabla 3). En este sentido, los datos actuales son algo diferentes de los informados en los análisis de cáncer de pulmón de células no pequeñas en los que Wnt5a no se correlacionó con la expresión de VEGF en el tejido canceroso, sino con VEGF en el tejido estromal circundante [31]. Adicionalmente, la expresión de Wnt5a en el tejido de PCa en este estudio está débil pero significativamente asociada con la expresión de AR (Tabla 3). El análisis de la expresión de la proteína por transferencia de western indicó que los niveles de Wnt5a y la expresión de AR en una línea celular epitelial de próstata inmortalizada y 4 líneas celulares de PCa diferentes coincidían entre sí, lo que indica una posible correlación entre Wnt5a y AR en PCa (Fig. 3 A). A pesar de estos datos, recientemente se ha demostrado que Wnt5a inhibe la actividad transcripcional AR en células 22Rv1 cuando estas células se transfectaron con un plásmido Wnt5a [32]. Finalmente, la expresión de la proteína Wnt5a se asoció débil pero significativamente con la expresión de Ki-67 (Tabla 3). Este resultado está según el informe sobre el cáncer de pulmón de células no pequeñas, donde la expresión intratumoral de Wnt5a se correlacionó significativamente con el índice de proliferación Ki-67 [31], pero en contraste con el estudio sobre carcinoma hepatocelular en el que Wnt5a tiene un efecto supresor de tumores y la pérdida de Wnt5a tiene una fuerte correlación con el alto índice de proliferación Ki-67 [33]. En conjunto, estos datos indican que el papel de la señalización de Wnt5a en la regulación de la proliferación de células tumorales es incierto.

En la presente investigación, los inventores no encontraron una correlación entre la expresión de la proteína Wnt5a y la puntuación de Gleason, aunque este último puede ser el mejor indicador pronóstico de resultados disponible en PCa [34]. Sin embargo, la puntuación de Gleason tiene sus limitaciones debido a la variabilidad interobservador entre los patólogos y, por consiguiente, existe la necesidad de marcadores complementarios. Para determinar si se

puede usar o no la expresión de la proteína Wnt5a para predecir el resultado (supervivencia sin recaída) después de la cirugía en pacientes con PCa localizados en esta cohorte basada en la población, se representaron curvas de Kaplan-Meier entre la expresión de la proteína Wnt5a y el tiempo libre de BCR (Fig. 2 A). De manera interesante, los pacientes con una expresión de proteína Wnt5a alta tuvieron un resultado más favorable estadísticamente significativo en comparación con los pacientes con una expresión de proteína Wnt5a baja, lo que indica que la proteína Wnt5a 306 tiene una función supresora de tumores en el contexto de PCa localizado. En la mayoría de los casos, la señalización de Wnt5a tiene efectos opuestos a la señalización de Wnt/ β -catenina, por ejemplo en el melanoma maligno [35]. Aunque Chen y colaboradores usaron un material de PCa diferente y más avanzado, su hallazgo de que la expresión de Wnt1 y β -catenina puede servir como marcadores para la progresión de PCa [12] es compatible con los datos de que Wnt5a predice un resultado más favorable en Pacientes con PCa.

La combinación de la expresión de la proteína Wnt5a con otros marcadores de PCa bien conocidos podría mejorar aún más el poder predictivo de Wnt5a como se mencionó anteriormente. La hipótesis de que Wnt5a tiene una función supresora de tumores fue respaldada por los datos de invasión en tres de las cuatro líneas celulares de PCa investigadas. La adición de rWnt5a condujo a una disminución de la invasión en las células 22Rv1 y DU145. No fue sorprendente que las células LNCaP, que se sabe que tienen un comportamiento invasivo muy bajo, no presenten una reducción detectable en su comportamiento invasivo en respuesta a rWnt5a. Sin embargo, se realizaron experimentos de modificación genética de Wnt5a en células LNCaP, así como en células 22Rv1, los ARNip de Wnt5a aumentaron la actividad invasiva de células LNCaP y 22Rv1; lo que indica que para que las células de PCa invadan, Wnt5a se debe silenciar activamente.

Recientemente se ha sugerido que Wnt5a promueve la agresividad de PCa y los pacientes con expresión de Wnt5a baja/negativa tienen una mejor supervivencia libre de recaída después de la prostatectomía radical [25]. Estos resultados contrastan bastante con los resultados actuales. Sus resultados contrastantes se pueden atribuir a menos muestras de pacientes y al hecho de que en su material, el 24.5% (24 de 98 pacientes) de los tumores tenía una puntuación de Gleason de 8 o superior, mientras que en el estudio que llevó a la invención solo el 11% de los tumores tenían una puntuación de Gleason tan alta. Adicionalmente, se usaron diferentes anticuerpos Wnt5a en los dos estudios. El anticuerpo de Wnt5a se ha evaluado mediante experimentos de bloqueo de péptidos durante la IHC [20], la pérdida de Wnt5a tras la modificación genética de ARNip y la sobreexpresión de Wnt5a. Sin embargo, no se puede excluir que Wnt5a ejerce diferentes efectos sobre la progresión del tumor en diferentes etapas de la enfermedad. Los diferentes resultados del ensayo de invasión *in vitro* se pueden explicar posiblemente por el hecho de que los inventores han usado una concentración definida de rWnt5a y el otro grupo usó células transfectadas para sobreexpresar Wnt5a sin ningún control de la concentración estimulante real de Wnt5a.

Hay estudios dentro de la comunidad científica sobre el posible papel de Wnt5a en la supresión o la promoción de la progresión tumoral. Se debe señalar que una regulación al alza del ARNm de Wnt5a en un tipo de cáncer específico no indica por sí sola una función promotora del tumor, ya que esto podría ir de la mano con un nivel reducido de proteína Wnt5a. Incluso si esto se tiene en cuenta, parece que Wnt5a tiene diferentes funciones en diferentes tipos de tumores [16]. En conclusión, este estudio indica que aunque la expresión de la proteína Wnt5a está elevada en el PCa, su expresión en las células de PCa se asocia con un resultado más favorable para los pacientes con enfermedad localizada. Un mecanismo importante para dicho efecto de Wnt5a en la progresión de PCa es la presente demostración de que Wnt5a puede afectar el comportamiento invasivo de las células de PCa *in vitro*. En conjunto, estos resultados sugieren un enfoque terapéutico novedoso para los pacientes con PCa localizado, dirigiéndose a Wnt5a para impedir la progresión de PCa en estos pacientes.

Referencias

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60: 277-300.
2. Heinlein CA, Chang C (2004) Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 25: 276-308.
3. Feldman BJ, Feldman D (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 34-45.
4. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, et al. (2004) Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 10: 33-39.
5. Debes JD, Tindall DJ (2004) Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 351: 1488-1490.
6. Chesire DR, Ewing CM, Gage WR, Isaacs WB (2002) *In vitro* evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis. *Oncogene* 21:2679-2694.
7. Truica CI, Byers S, Gelmann EP (2000) Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Res* 60: 4709-4713.

8. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, et al. (1991) A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* 64: 231.
- 5 9. Cadigan KM, Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11: 3286-3305.
- 10 Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- 10 11. Tsukamoto AS, Grosschedl R, Guzman RC, Parslow T, Varmus HE (1988) Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* 55: 619-625.
- 15 12. Chen G, Shukeir N, Potti A, Sircar K, Aprikian A, et al. (2004) Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer* 101: 1345-1356.
13. Iozzo RV, Eichstetter I, Danielson KG (1995) Aberrant expression of the growth factor Wnt- 5A in human malignancy. *Cancer Res* 55: 3495-3499.
- 20 14. Qian D, Jones C, Rzadzinska A, Mark S, Zhang X, et al. (2007) Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev Biol* 306: 121-133.
- 25 15. Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT (1997) Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* 182: 114-120.
16. McDonald SL, Silver A (2009) The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *Br J Cancer* 101: 209-214.
- 30 17. Dejmek J, Dejmek A, Safholm A, Sjolander A, Andersson T (2005) Wnt-5a protein expression in primary dukes B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis. *Cancer Res* 65: 9142-9146.
- 35 18. Blanc E, Roux GL, Benard J, Raguenez G (2005) Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. *Oncogene* 24: 1277-1283.
19. Dejmek J, Leandersson K, Manjer J, Bjartell A, Emdin SO, et al. 533 (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.
- 40 20. Jonsson M, Dejmek J, Bendahl PO, Andersson T (2002) Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 62: 409-416.
21. Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, et al. (2003) Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 4: 349-360.
- 45 22. Fernandez-Cobo M, Zammarchi F, Mandeli J, Holland JF, Pogo BG (2007) Expression of Wnt5A and Wnt10B in non-immortalized breast cancer cells. *Oncol Rep* 17: 903-907.
23. Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, et al. (2006) Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* 66: 10439-10448.
- 50 24. Da Forno PD, Pringle JH, Hutchinson P, Osborn J, Huang Q, et al. (2008) WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. *Clin Cancer Res* 14: 5825-5832.
25. Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Matsubara A, et al. (2010) Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* 29: 2036-2046.
- 55 26. Wang Q, Symes AJ, Kane CA, Freeman A, Nariculam J, et al. (2010) A novel role for Wnt/Ca²⁺ 553 signaling in actin cytoskeleton remodeling and cell motility in prostate cancer. *PLoS One* 5: e10456.
27. Thiele S, Rauner M, Goettsch C, Rachner TD, Benad P, et al. (2011) Expression profile of WNT molecules in prostate cancer and its regulation by aminobisphosphonates. *J Cell Biochem* (e-published ahead of print).
- 60 28. Wang Q, Williamson M, Bott S, Brookman-Amissah N, Freeman A, et al. (2007) Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene* 26: 6560-6565.
- 65 29. Leandersson K, Riesbeck K, Andersson T (2006) Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells. *Nucleic Acids Res* 34: 3988-3999.

30. Berney DM, Gopalan A, Kudahetti S, Fisher G, Ambroisine L, et al. (2009) Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study. *Br J Cancer* 100: 888-893.

5 31. Huang CL, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, et al. (2005) Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23: 8765-8773.

10 32. Kawano Y, Diez S, Uysal-Onganer P, Darrington RS, Waxman J, et al. (2009) Secreted Frizzled-related protein-1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer. *Br J Cancer* 100: 1165-1174.

33. Liu XH, Pan MH, Lu ZF, Wu B, Rao Q, et al. (2008) Expression of Wnt-5a and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 40: 560-567.

15 34. Humphrey PA (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol* 17: 292-306.

35. Chien AJ, Moore EC, Lonsdorf AS, Kulikauskas RM, Rothberg BG, et al. (2009) Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1193-1198.

20 36. Wegiel B, Bjartell A, Tuomela J, Dizeyi N, Tinzl M, et al. (2008) Multiple cellular mechanisms related to cyclin A1 in prostate cancer invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 100: 1022-1036.

25 Lista de secuencias

<110> WNTRESEARCH AB

30 <120> Tratamiento del cáncer de próstata y un método para determinar el pronóstico para pacientes de cáncer de próstata

<130> PC-21058411

35 <150> SE 1150619-3

<151> 2011-07-01

<160> 16

40 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

45 <211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

50 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS DE MISC

55 <222> (1)..(1)

<223> Xaa en la posición 1 es metionina o norleucina

<220>

60 <221> CARACTERÍSTICAS DE MISC

<222> (4)..(4)

65 <223> Xaa en la posición 4 es cisteína o alanina

ES 2 735 540 T3

<400> 1

Xaa Asp Gly Xaa Glu Leu
1 5

5 <210> 2

<211> 6

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5

15

<210> 3

<211> 7

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 3

Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5

30 <210> 4

<211> 8

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5

40

<210> 5

<211> 9

45 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

50

Ser Glu Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu
1 5

<210> 6

55 <211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 735 540 T3

<400> 6

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

5

<210> 7

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

15

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

<210> 8

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 8

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

30 <210> 9

<211> 13

<212> PRT

35

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

40

<210> 10

<211> 14

45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

50 <400> 10

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

55

<210> 11

<211> 15

ES 2 735 540 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 11

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

<210> 12

10

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

20

<210> 13

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

30

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

Leu

<210> 14

35 <211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 14

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

Glu Leu

45 <210> 15

<211> 19

<212> PRT

50

<213> Homo sapiens

<400> 15

ES 2 735 540 T3

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

Cys Glu Leu

<210> 16

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 16

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido Wnt5a que posee propiedades de señalización de Wnt5a para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata, en el que el péptido Wnt5a consta de 6-20 aminoácidos y en el que los 6 aminoácidos en el extremo C terminal son XDGXEL (SEQ. ID. NO. 1), en el que X en la posición 1 es M o norleucina y X en la posición 4 es C o A.
2. Un péptido Wnt5a para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata según la reivindicación 1, en el que dicho cáncer de próstata es causado por células cancerosas con baja expresión de proteína Wnt5a.
- 10 3. Un péptido Wnt5a para uso en el tratamiento del cáncer de próstata según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho cáncer de próstata es un cáncer de próstata localizado.
4. Un péptido Wnt5a para uso en el tratamiento del cáncer de próstata según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho paciente se ha sometido o se someterá a radioterapia y/o prostatectomía radical.
- 15 5. Un péptido Wnt5a para uso en el tratamiento del cáncer de próstata según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho péptido Wnt5a es un péptido seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 MDGCEL (SEQ. ID. NO. 2),
- GMDGCEL (SEQ. ID. NO. 3),
- EGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 4),
- 25 SEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 5),
- TSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 6),
- 30 KTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 7),
- NKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 8),
- CNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 9),
- 35 LCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 10),
- RLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 11),
- 40 GRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 12),
- QGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 13),
- TQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 14),
- 45 GTQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 15), y
- LGTQGRLCNKTSEGMDGCEL (SEQ. ID. NO. 16),
- 50 o un derivado formilado de uno de estos péptidos.
6. Un péptido Wnt5a para uso en el tratamiento del cáncer de próstata según la reivindicación 5, en el que dicho péptido Wnt5a es MDGCEL (SEQ. ID. NO. 2), o un derivado formilado del mismo.

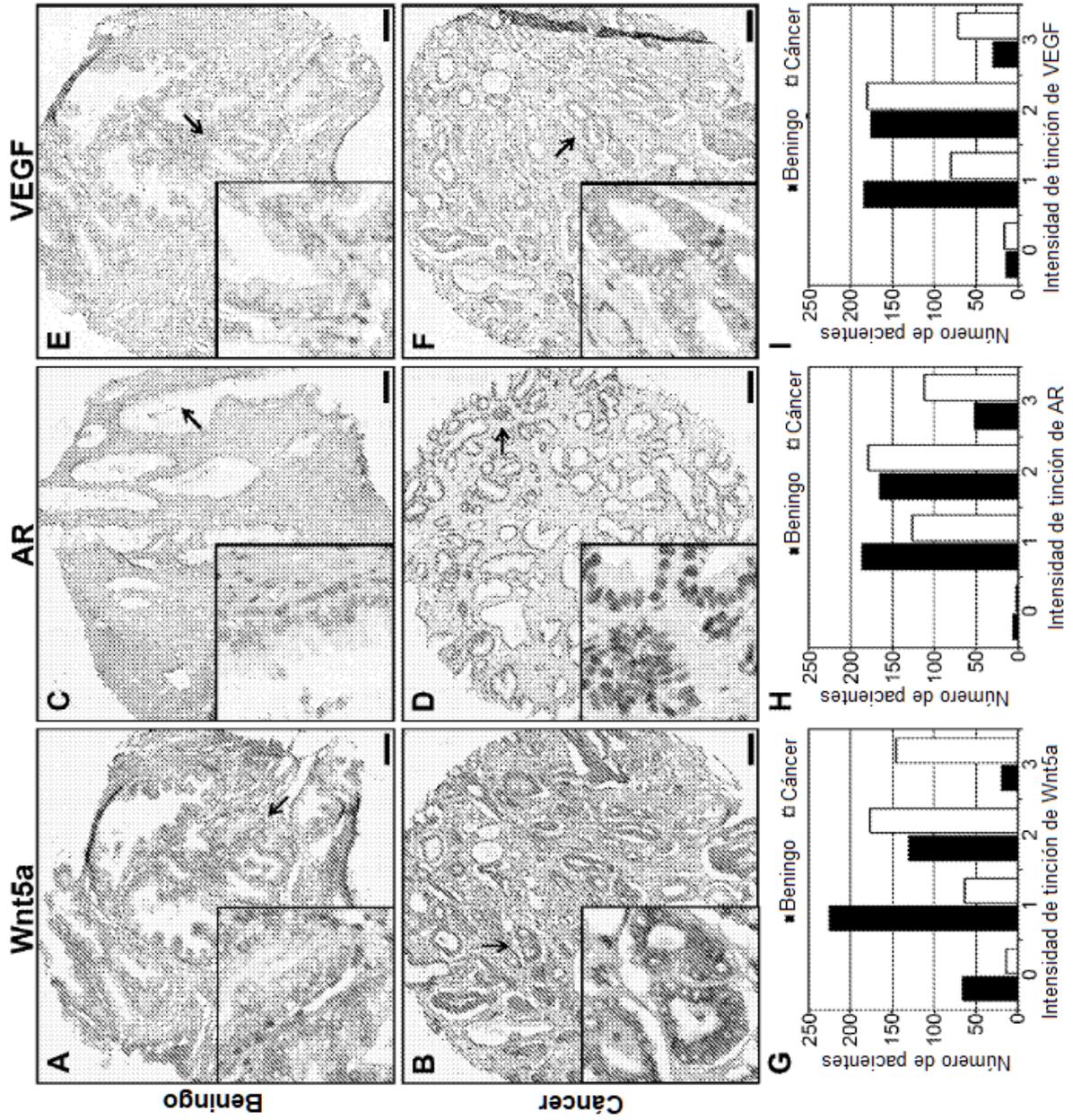


Fig. 1

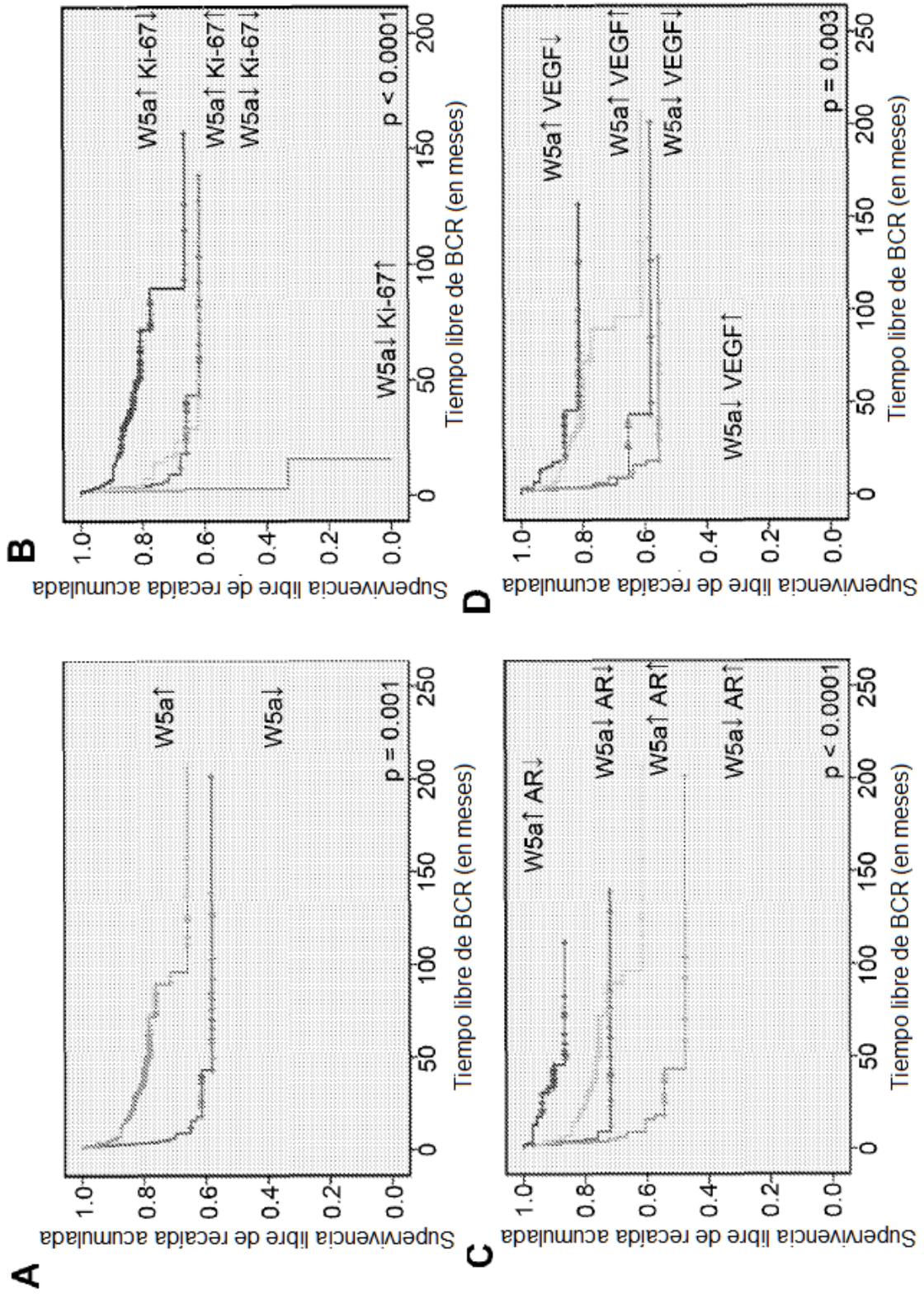


Fig. 2

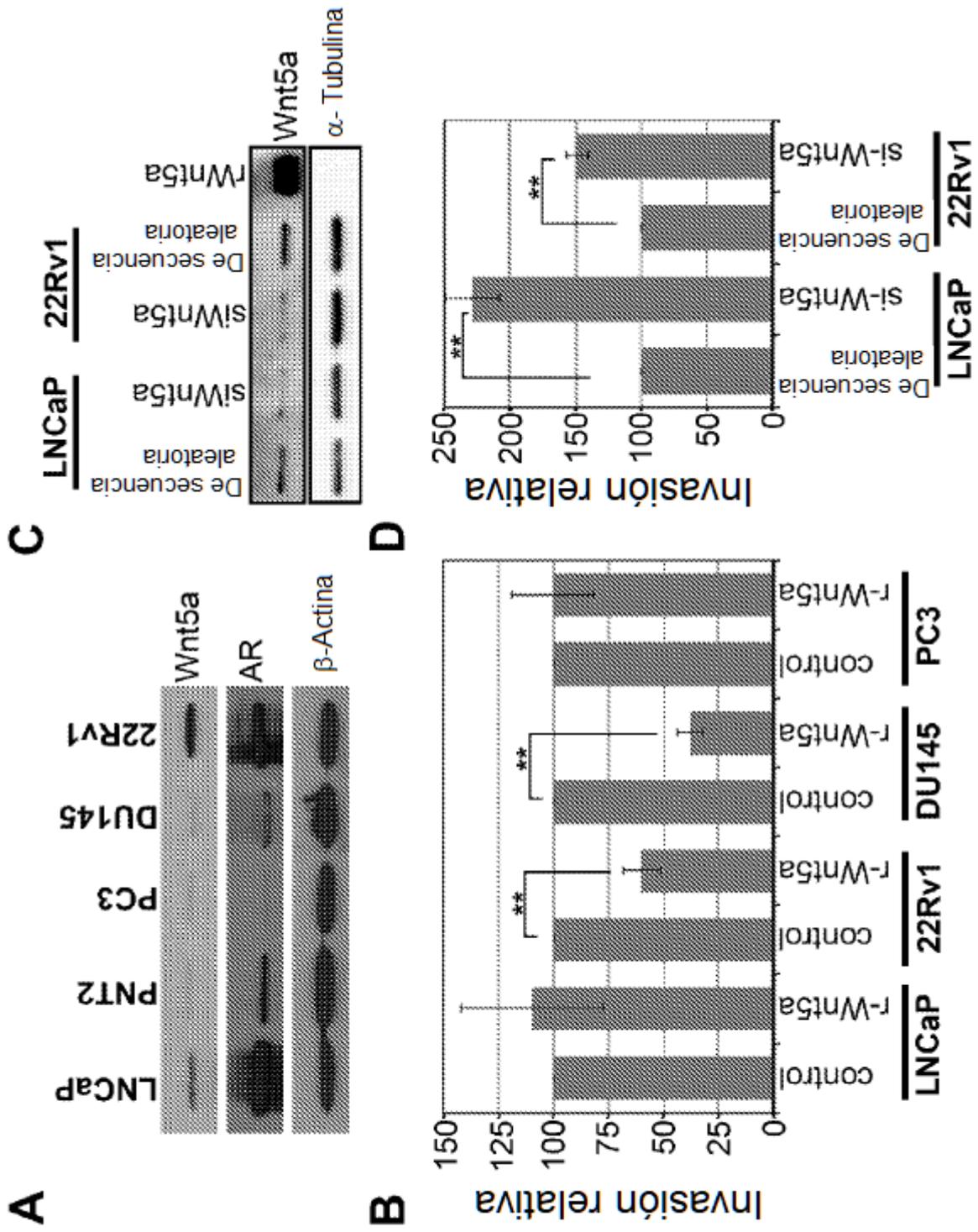


Fig. 3

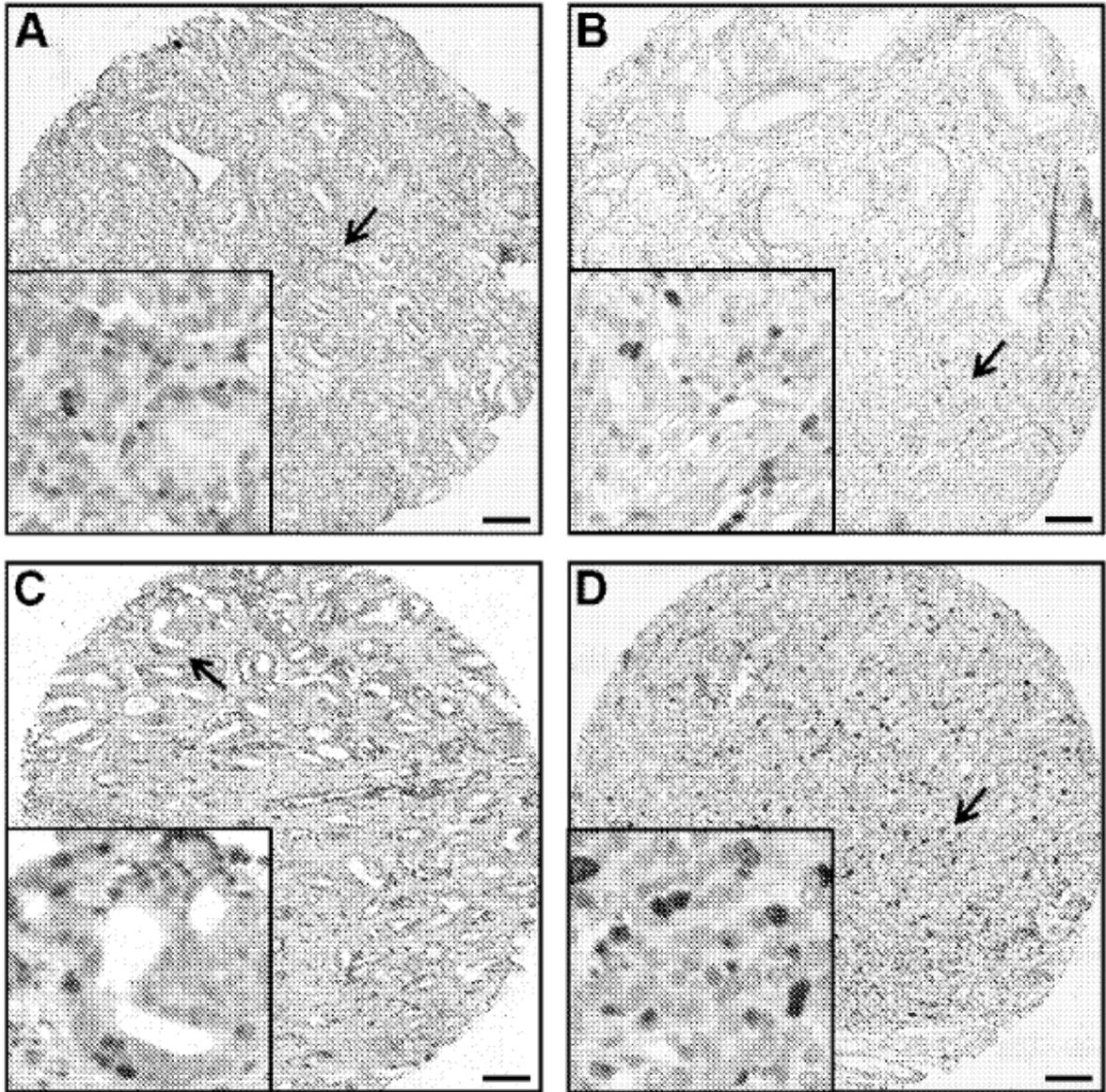


Fig. 4

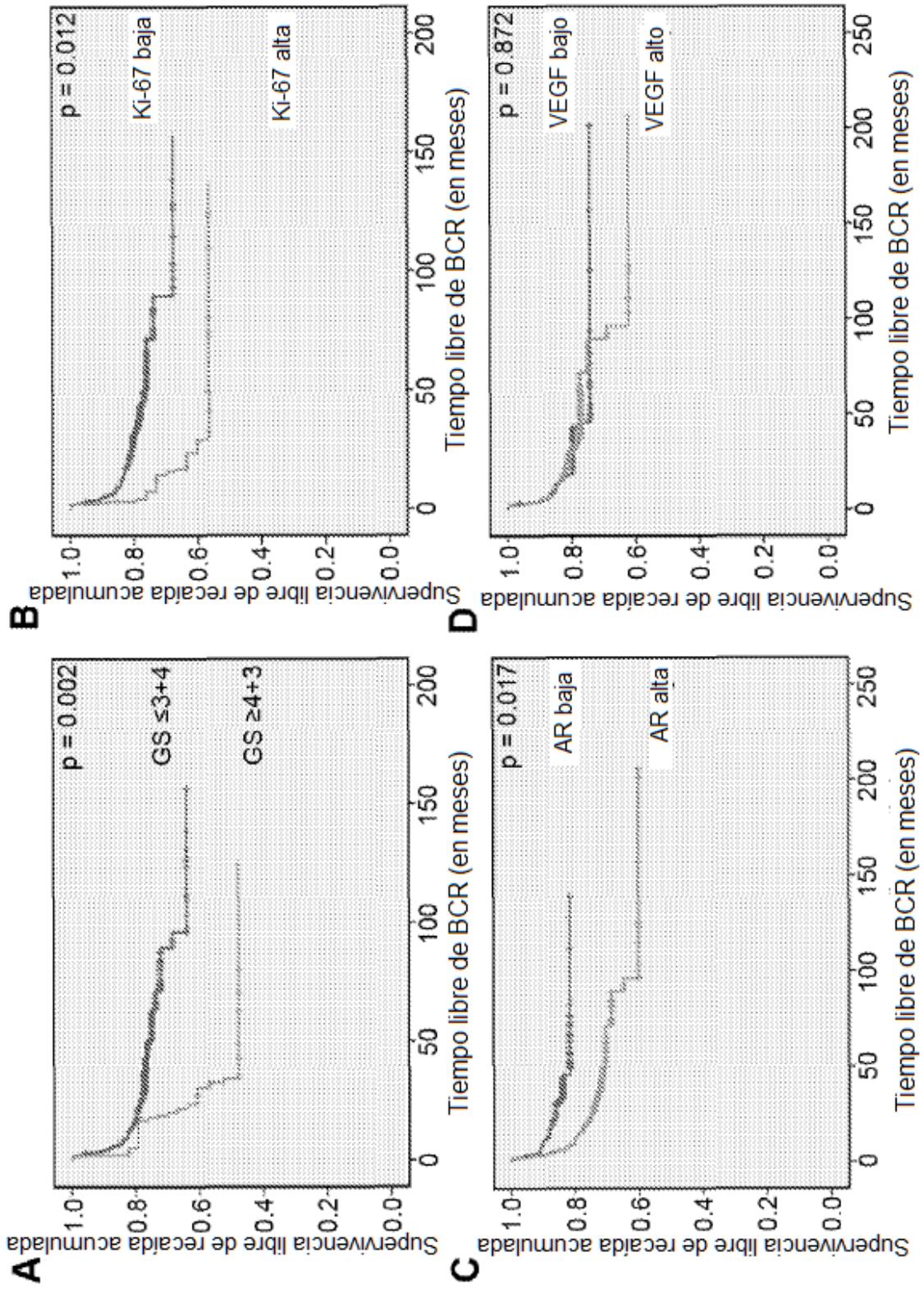
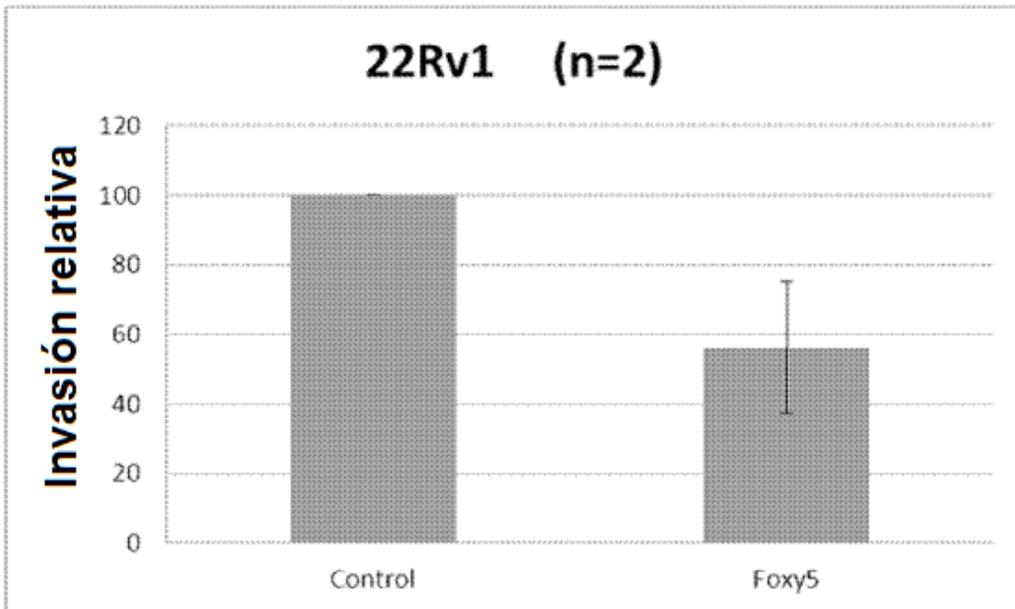
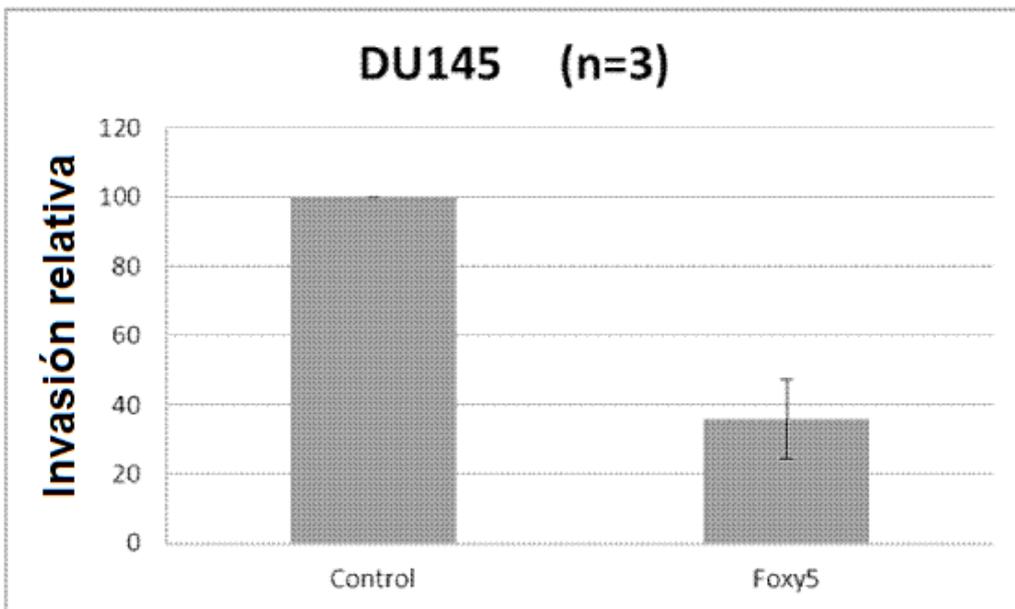


Fig. 5



A



B

Fig. 6