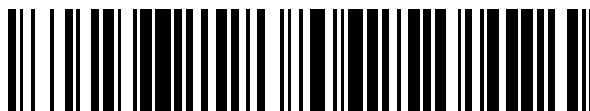


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 854**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2009** E 13157421 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020** EP 2599504

54 Título: **Uso de conjugados de ligandos del receptor de FSH y agentes antitumorales para la terapia del cáncer**

30 Prioridad:

18.02.2008 EP 08305026

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

12.08.2020

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) (50.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR y

ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI (50.0%)

72 Inventor/es:

GHINEA, NICOLAE y

RADU, AURELIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 778 854 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

Uso de conjugados de ligandos del receptor de FSH y agentes antitumorales para la terapia del cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la terapia y en particular a la terapia de numerosos tipos de cáncer, por medio de composiciones que se dirigen específicamente al receptor de FSH objetivo expresado por células endoteliales sanguíneas circulantes.

Antecedentes de la invención

Diagnóstico de cáncer

10 La evaluación microscópica de una sección de tejido tomada de un tumor sigue siendo el estándar de oro para determinar un diagnóstico de cáncer. El análisis de DNA genómico, los genes transcritos y las proteínas expresadas añaden información importante a las características histológicas detectadas en las imágenes del microscopio. El diagnóstico del mañana, la información pronóstica y la elección del tratamiento se basarán probablemente en una evaluación sinóptica de la morfología junto con el análisis de ácidos nucleicos y proteínas.

15 A pesar del notable progreso dentro de la biología molecular, el diagnóstico del cáncer todavía se basa en el uso de microscopía óptica. El desarrollo de herramientas moleculares ha jugado un papel importante, aunque hasta el momento incremental, para distinguir una célula cancerosa de una célula normal. El método más comúnmente utilizado además de la tinción histoquímica de las secciones de tejido es la inmunohistoquímica, que permite la detección de patrones de expresión de proteínas en tejidos y células utilizando anticuerpos específicos. El uso de la inmunohistoquímica en el diagnóstico clínico ha proporcionado una posibilidad no solo de analizar la arquitectura de los tejidos y la morfología celular, sino también de detectar la inmunoreactividad en diferentes poblaciones celulares. Esto ha sido importante para apoyar la clasificación exacta y la clasificación de diferentes tumores primarios, así como en el diagnóstico de metástasis de origen desconocido. Los anticuerpos más comúnmente utilizados en la práctica clínica actual incluyen anticuerpos frente a marcadores de tipo celular, por ejemplo, PSA, MelanA, Tiroglobulina y anticuerpos que reconocen filamentos intermedios, antígenos de CD, etc. y marcadores de potencial maligno, por ejemplo, Ki67, p53, HER-2. Todos los marcadores tumorales, medibles ya sea en suero o en muestras de tejido, son generalmente útiles en el cribado, diagnóstico, pronóstico o terapia de monitorización y/o para la indicación temprana de recaída. Un marcador tumoral ideal deber tener una alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad y debería incluirse en una prueba práctica, fácil y rentable. Tal marcador también debería tener que predecir el pronóstico y ser útil en el manejo del paciente. Quedan por descubrir marcadores que cumplan todas estas condiciones.

El cáncer de próstata

35 El cáncer de próstata (PCa) es el cáncer más común en hombres en los países desarrollados [Stenman et al., 2005; Wilson, 2005]. El PCa es la segunda causa de mortalidad por cáncer en hombres en Francia (11% de muertes por cáncer) [www.doctissimo.fr/html/dossiers/cancer_prostate.htm], afecta al 17% de la población masculina en los Estados Unidos [Wilson, 2005; Jemal et al., 2008], y supera al pulmón como el sitio de cáncer más frecuente en Italia [AIRT working group, 2006]. La incidencia de cáncer de próstata y la tasa de muerte debido a la enfermedad aumentan exponencialmente con la edad [Scardino, 2003]. Debido al aumento en el porcentaje de la población de edad, se espera que en los Estados Unidos el número de casos de cáncer de próstata aumente de 234000 en 2006 a 380000 en 2025 [Scardino, 2003].

40 La detección temprana es esencial para la terapia curativa del cáncer de próstata y para lograr una disminución en la mortalidad por cáncer de próstata. Desafortunadamente, las pruebas disponibles pueden detectar solo aquellos cánceres lo suficientemente grandes como para ser palpables, visibles en el ultrasonido o capaces de elevar el nivel sérico de antígeno prostático específico (PSA).

45 La detección se realiza con un examen rectal digital (DRE) y la medición del nivel de PSA (antígeno prostático específico) en suero. Este último es el marcador bioquímico más importante para la detección del cáncer de próstata [Ablin et al., 1970 a, b]. Sin embargo, la utilidad de las pruebas de PSA se limita por su incapacidad para diferenciar el cáncer de afecciones no malignas clínicamente irrelevantes (hiperplasia prostática benigna, prostatitis, trauma y retención urinaria) [Stenman et al., 2005; Zhu et al., 2006]. Además, se ha demostrado que la correlación entre el PSA y el cáncer es más débil de lo que se pensaba inicialmente, y el PSA se considera ahora solo como un marcador significativo del tamaño de la próstata [Stamey et al., 2004]. Los pacientes que tienen hallazgos anormales de DRE y/o niveles elevados de PSA deben ser evaluados adicionalmente con biopsia con aguja de próstata, a menudo guiada por ultrasonografía transrectal [para revisión, Akin and Hricak, 2007].

55 El diagnóstico y la agresividad del tumor se establecen rutinariamente mediante el uso del sistema Gleason, que se basa exclusivamente en el patrón arquitectónico de las glándulas del tumor de próstata. Este método histológico evalúa la eficacia con la que las células de cualquier tumor en particular son capaces de estructurarse en glándulas

que se asemejan a una arquitectura de glándula normal muy bien diferenciada. En el sistema de clasificación de Gleason, los tejidos del tumor de próstata se clasifican de grado 1 (muy bien diferenciados) a grado 5 (no diferenciados). La suma de los grados de las dos áreas tumorales más extendidas da la puntuación de Gleason para cada paciente, que varía de 2 a 10. Dado que solo se obtiene una pequeña cantidad de tejido prostático por biopsia con aguja, los errores de muestreo son comunes. Se necesitan grandes cantidades de muestras de biopsia de diferentes regiones de la próstata para mejorar la detección del cáncer y la evaluación del riesgo [Macchia, 2004; Remzi et al., 2005]. En los últimos años, las técnicas de alto rendimiento, tales como la espectrometría de masas y el análisis de micromatrices, condujeron al descubrimiento de varios transcritos y proteínas que se sobreexpresan en los tumores de próstata [para revisión, Bradford et al., 2006]. Sin embargo, ninguno de ellos es satisfactorio para fines de diagnóstico [Bradford et al., 2006].

Una de las proteínas recogidas que se expresa en los tumores de próstata, pero no en la próstata normal es el receptor de la hormona estimuladora del folículo (FSHR). Un anticuerpo policlonal anti-FSHR reveló la expresión focal de FSHR en las áreas basolaterales de los epitelios secretores en el tejido prostático hiperplásico humano, y la expresión focal, pero sin polaridad celular en los adenocarcinomas [Mariani et al., 2006]. A diferencia de los datos de la presente invención, Mariani et al., no mencionan ninguna señal de FSHR en los vasos sanguíneos.

Otro estudio de inmunohistoquímica que utiliza un anticuerpo policlonal diferente reportó una fuerte tinción de FSHR en estructuras glandulares de próstata cancerosas, y niveles más bajos de tinción en las células intersticiales, pero ninguna tinción en los vasos sanguíneos. No se detectó tinción para FSHR en las glándulas prostáticas normales [Ben-Josef, 1999]. Además, los datos son cuestionables, porque el peso molecular de la banda detectada por sus anticuerpos no corresponde al tamaño conocido de FSHR y, por lo tanto, podría ser una proteína no relacionada que reacciona de forma cruzada con su anticuerpo.

Finalmente, una revisión [Porter et al., 1991] sugiere que el FSH puede afectar la patogénesis y la progresión del cáncer de próstata y que la alteración de la producción de FSH puede llegar a ser un enfoque terapéutico activo. Sin embargo, los autores no reconocen que el direccionamiento de FSHR expresado en el tumor de próstata de tejido epitelial es difícil, porque los ligandos de FSHR suministrados a la sangre no pueden atravesar fácilmente la barrera endotelial [Vu Hai et al., 2004]. Hasta el momento, no existe un método terapéutico o diagnóstico para dirigir a los tumores de próstata para su uso clínico. En 2002 se describió un péptido que se une a microvasos tumorales de próstata en una cepa de ratones transgénicos [Arap et al., 2002]. Sin embargo, hasta ahora no se sabe si el péptido es adecuado para el diagnóstico o la terapia en humanos.

Se han propuesto anticuerpos radiomarcados de antígeno de membrana específicos anti-prostático (PSMA) para el diagnóstico y terapia del cáncer de próstata. Sin embargo, solo el 16% de los pacientes con adenocarcinoma de próstata tienen inmunotinción positiva de PSMA asociada con la neovascularización tumoral [Chang et al., 1999]. En conclusión, no existen procedimientos alternativos validados para el direccionamiento específico de la vasculatura tumoral de próstata.

35 **Compendio de la invención**

La presente invención se basa en la identificación de la presencia de FSHR en células endoteliales en tumores o en células circulantes de pacientes con tumor, que nunca se ha mencionado en la técnica anterior.

Más particularmente, los inventores presentan evidencia de que el FSHR, que está ausente en el tejido prostático normal, está altamente expresado por las células endoteliales de los vasos sanguíneos, más particularmente en microvasos, asociados con tumores de próstata. Este es el primer marcador de tumor de próstata que se expone en la superficie de las paredes de los vasos sanguíneos del tumor y, como consecuencia, ofrece oportunidades únicas para obtener imágenes y terapia del cáncer de próstata. Los inventores presentan además evidencia de que el FSHR se expresa igualmente por las células endoteliales de los vasos, más particularmente los microvasos, asociados con tumores de riñón, ovario, páncreas, colon, vejiga urinaria, pulmón, mama, testículo, estómago, cerebro e hígado.

Un objetivo de la invención es un ligando del receptor de FSH endotelial vascular (VE-FSHR) que está acoplado a un agente antitumoral, para su uso en el tratamiento de un cáncer, en donde el ligando es un anticuerpo anti-FSHR, en donde el ligando VE-FSHR acoplado al agente antitumoral se administrará por vía intravenosa.

El cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cáncer de próstata, páncreas, colon, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, hígado, mama, testículo, estómago, cerebro y vejiga urinaria.

En una realización particular, el cáncer de próstata es un adenocarcinoma de próstata.

En la presente memoria se describe una composición farmacéutica que comprende un ligando del receptor VE-FSH (VE-FSHR) que se acopla a un agente antitumoral.

Se describe además un método para el tratamiento del cáncer, mediante la administración intravenosa de un ligando del receptor de FSH (FSHR) que se acopla a un agente antitumoral.

En este último, el agente antitumoral se dirige al tumor mediante el ligado FSHR al que está acoplado.

Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle en la presente memoria.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 5 Como se utiliza en la presente memoria, el término "FSHR" se refiere al receptor al que se aplican los métodos de la invención. El receptor de la hormona estimuladora del folículo o receptor de FSH (FSHR) es un receptor de transmembrana que interactúa con la hormona foliculoestimulante (FSH) y representa un receptor acoplado a proteínas G (GPCR).
- 10 Como se utiliza en la presente memoria, el término "FSHR" se refiere también al antígeno reconocido por el anticuerpo anti FSHR 323 (ATCC como CRL-2689TM) y, en particular, los productos del gen FSHR.
- 15 La hormona estimuladora del folículo, una hormona central de la reproducción de mamíferos, se produce principalmente en la glándula pituitaria anterior y los órganos diana clásicos son el ovario y los testículos. En las mujeres, el FSH estimula la maduración folicular y la producción de estrógenos mediante de la aromatización de andrógenos [revisado en Macklon and Fauser, 1998]. En los hombres, se han propuesto funciones de FSH tales como la estimulación de la proliferación de células de Sertoli en testículos inmaduros y el mantenimiento de espermatogénesis normal cualitativa y cuantitativamente [revisado en Plant and Marshall, 2001].
- El FSH ejerce su papel biológico por unión al receptor de FSH de la membrana plasmática (FSHR).
- 20 Minegish et al., 1990, aislaron y secuenciaron un cDNA que codifica el receptor de FSH humano (FSHR). La secuencia de aminoácidos deducida de 678 restos contiene 7 segmentos transmembrana putativos y muestra similitud de secuencia con los receptores acoplados a proteínas G. El dominio extracelular de 359 restos contiene 4 sitios de glicosilación unidos a N. Mientras que la proteína es aproximadamente un 90% idéntica en general con los receptores de FSH de rata y ratón, las regiones más altamente conservadas son los segmentos transmembrana putativos, que muestran un 95% de similitud.
- 25 Se sabe que el receptor de FSH se expresa mediante células de Sertoli del testículo y células de granulosa ovárica (Sprengel R, 1990, Simoni M. et al., 1997).
- Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos del FSHR está disponible en la base de datos SWISSPROT bajo el número de acceso: P23945.
- 30 El FSHR purificado por afinidad por los inventores del tejido prostático tiene un peso molecular de 87 kDa, de acuerdo con estudios previos en ovarios que utilizaron los mismos u otros anticuerpos [Vannier et al., 1996; Ji et al., 2004]. El receptor está glicosilado, y después de la desglucosilación, el peso molecular llega a ser de 76 kDa, próximo al peso molecular calculado de 76,5 kDa [Vannier et al., 1996].
- Dado que se descubrió que el FSHR se expresaba por las células endoteliales de los vasos asociados con tumores, el receptor también se denomina FSHR endotelial vascular o VE-FSHR.
- 35 Un "tumor" se refiere a un crecimiento anormal del tejido que resulta de una multiplicación anormal de células. Un tumor puede ser benigno, premaligno o maligno (es decir, canceroso). Un tumor puede ser un tumor primario o una lesión metastásica.
- 40 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres que se asocian con la formación de tumores incluyen cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de tráquea, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de piel, cáncer rectal y linfomas. Un experto habitual en la técnica estaría familiarizado con las muchas entidades de enfermedades que pueden asociarse con la formación de tumores.
- 45 En ciertas realizaciones particulares, el tumor es un cáncer, tal como cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de testículo, cáncer de cerebro y cáncer de hígado. En una realización particular el tumor es un cáncer de próstata.
- 50 El término "ligando de FSHR" se refiere a cualquier compuesto que puede unirse específicamente a FSHR como se definió anteriormente. De este modo, un ligando puede comprender o puede consistir en uno o varios restos de unión. En particular, cuando un ligando comprende uno o varios restos de unión, también puede comprender al menos un "marcador detectable", que es un resto cuya presencia puede detectarse fácilmente según los métodos bien conocidos por el experto en la técnica.

En los ligandos según la invención, al menos un resto de unión es específico para VE-FSHR.

Al menos un resto de unión se selecciona del grupo que consiste en FSH, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo específico de antígeno, un fragmento de anticuerpo variable monocatenario (scFv). Los métodos para producir un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo específico de antígeno, o un scFv, son bien conocidos por el experto en la técnica.

El término "agente de bloqueo de FSHR" se refiere a cualquier compuesto que inhibe o suprime la expresión o actividad del receptor. En la invención, es un anticuerpo anti-FSHR.

Más preferiblemente, el ligando o agente de bloqueo de FSHR es un anticuerpo monoclonal frente a FSHR. Los anticuerpos monoclonales para FSHR se describen, por ejemplo, en Vannier et al., 1996. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales disponibles para FSHR incluyen el anticuerpo referenciado en The American Type Culture Collection (ATCC) como CRL-2689TM.

Los anticuerpos monoclonales de la invención o un fragmento de los mismos se pueden preparar y aislar utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares permanentes en cultivo. Las técnicas para producción y aislamiento incluyen, pero no se limitan, a la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de células B humanas (Cote et al., 1983).

Como se pretende en la presente memoria, un "fragmento de anticuerpo específico de antígeno" se refiere a un fragmento de anticuerpo que conserva sus propiedades de unión específicas hacia VE-FSHR según la invención. Dichos fragmentos abarcan notablemente los fragmentos Fab (que pueden producirse mediante la escisión de anticuerpos de papaína), los fragmentos F(ab')₂ (que pueden producirse mediante la escisión de anticuerpos de pepsina) o los fragmentos Fab' (que pueden producirse mediante la escisión de anticuerpos de pepsina seguido de un tratamiento reductor).

Un "scFv" se refiere a un fragmento variable monocatenario de un anticuerpo, que es una región variable de cadena corta de inmunoglobulina y una región variable de cadena larga de inmunoglobulina unida una con otra mediante un péptido.

Según la invención, el término "paciente", se destina a un mamífero humano o no humano afectado o que pueda verse afectado con una afección asociada con un tumor. Dicho paciente es preferiblemente un ser humano.

Aplicación terapéutica

La localización de FSHR en las células endoteliales, como lo muestran los inventores, permite la terapia mediante el ataque a los vasos sanguíneos tumorales.

En la presente memoria se describe un agente de bloqueo del receptor de FSH (FSHR), que es un anticuerpo de anti-FSHR, para el tratamiento de una afección asociada con un tumor.

El agente de bloqueo de FSHR puede actuar suprimiendo la actividad del receptor de FSHR. En la presente memoria se describe una composición farmacéutica que comprende un ligando del receptor de FSH (FSHR) que se acopla a un agente antitumoral. Dicha composición es particularmente útil para tratar una afección asociada con un tumor.

El ligando de FSHR se utiliza después como una herramienta específica para el ataque directo del tumor para la administración *in vivo* de agentes antitumorales.

Según la invención, el tumor es un cáncer, tal como cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de testículo, cáncer de cerebro y cáncer de hígado. En una realización particular, el tumor es un cáncer de próstata. En una realización más preferida, el cáncer de próstata es un adenocarcinoma de próstata.

Los agentes antitumorales pueden bloquear el flujo en los vasos tumorales o destruir las células endoteliales del tumor, o destruir o bloquear la proliferación de células tumorales.

Se pueden elegir entre fármacos contra el cáncer, toxinas, genes, siRNAs, y moléculas pequeñas.

Ejemplos de agentes antitumorales son:

1. radioterapia dirigida al anticuerpo: el anticuerpo acoplado a radioisótopos, que mata por irradiación solo las células tumorales en las inmediaciones y evita el tejido sano, como alternativa a la radiación de semillas o haz (véase Parry et al., 2006);
2. péptidos que destruyen las células objetivo (véase Arap et al., 2002; Leuschner and Hansel, 2005);

3. genes que codifican proteínas que destruyen preferentemente los vasos sanguíneos recién formados (véase Hood et al., 2002);

4. fármacos anti cáncer (es decir, agentes quimioterapéuticos) que pueden destruir células cancerosas, cuando se acoplan a un ligando de FSHR. El término "quimioterapia" se refiere generalmente a fármacos citotóxicos que afectan a las células que se dividen rápidamente en general. Los fármacos de quimioterapia interfieren con la división celular de varias maneras posibles, por ejemplo, con la duplicación de DNA o la separación de cromosomas recién formados. La mayoría de las formas de quimioterapia se dirigen a todas las células que se dividen rápidamente y no son específicas para las células cancerosas, aunque cierto grado de especificidad puede provenir de la incapacidad de muchas células cancerosas para reparar el daño del DNA, mientras que las células normales generalmente si pueden. Por lo tanto, la quimioterapia tiene el potencial para dañar el tejido sano, especialmente aquellos tejidos que tienen una alta tasa de reemplazo (por ejemplo, el revestimiento intestinal). Estas células generalmente se reparan a sí mismas después de la quimioterapia.

5. Moléculas pequeñas, específicas para las proteínas desreguladas de las células cancerosas. Dichas moléculas pequeñas son generalmente inhibidores de dominios enzimáticos en proteínas mutadas, sobreexpresadas o de otro modo críticas dentro de la célula cancerosa. Ejemplos destacados son los inhibidores de la tirosina quinasa imatinib y gefitinib.

La localización de FSHR en las células sanguíneas circulantes, como muestran los inventores, permite además la terapia dirigiéndose a dichas células sanguíneas circulantes.

Por lo tanto, se describe un ligando del receptor de FSH (FSHR) que modula la abundancia de células sanguíneas circulantes que expresan FSHR, o la expresión o señalización de FSHR por las células sanguíneas circulantes, para su uso en el tratamiento del cáncer, en una forma de administración intravenosa.

Se describe además un método para tratar el cáncer, cuyo método implica modular (es decir, reducir o estimular) la abundancia de células sanguíneas circulantes que expresan FSHR, o la expresión o señalización de FSHR por las células sanguíneas circulantes.

Administración

Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente en combinación con un vehículo biocompatible, en una forma adecuada para la administración en mamíferos.

El "vehículo biocompatible" es un fluido, especialmente un líquido, en el que se suspende o disuelve el agente de formación de imágenes, de modo que la composición es fisiológicamente tolerable, es decir, se puede administrar al cuerpo de los mamíferos sin toxicidad o molestias indebidas. El medio del vehículo biocompatible es adecuadamente un líquido portador inyectable tal como agua estéril para inyección; una solución acuosa tal como solución salina; una solución acuosa de una o más sustancias que ajustan la tonicidad (por ejemplo, sales de cationes plasmáticos con contraiones biocompatibles), azúcares (por ejemplo, glucosa o sacarosa), alcoholes de azúcar (por ejemplo, sorbitol o manitol), glicoles (por ejemplo, glicerol) u otros materiales de poliol no iónicos (por ejemplo, polietilenglicoles, propilenglicoles y similares).

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona equipos para la preparación de las composiciones farmacéuticas de la invención. El medio de la reacción para la reconstitución de tales equipos es preferiblemente un "vehículo biocompatible" como se definió anteriormente, y lo más preferiblemente es acuoso. Los contenedores de los equipos adecuados comprenden un contenedor sellado que permite el mantenimiento de la integridad estéril y/o la seguridad radioactiva, además de opcionalmente un gas inerte en el espacio de cabeza (por ejemplo, nitrógeno o argón), al tiempo que permite la adición y extracción de disoluciones con una jeringa.

Opcionalmente, los equipos pueden comprender además componentes adicionales tales como, cuando sea necesario, un radioprotector, un conservante antimicrobiano, un agente de ajuste de pH o una carga.

El término "radioprotector" se refiere a un compuesto que inhibe las reacciones degradativas, tales como los procesos redox, al atrapar los radicales libres altamente reactivos, tales como los radicales libres que contienen oxígeno que surgen de la radiólisis del agua. Los radioprotectores de la presente invención se eligen adecuadamente entre: ácido ascórbico, ácido para-aminobenzoico, ácido gentísico (es decir ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y sus sales con un catión biocompatible. El "catión biocompatible" y las realizaciones preferidas del mismo son como se describieron anteriormente.

El término "conservante antimicrobiano" se refiere a un agente que inhibe el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos como bacterias, levaduras o mohos. El conservante antimicrobiano también puede mostrar algunas propiedades bactericidas, dependiendo de la dosis. El papel principal de los conservantes antimicrobianos de la presente invención es inhibir el crecimiento de cualquiera de dichos microorganismos en la composición después de la reconstitución. Los conservantes antimicrobianos adecuados incluyen: los parabenos, es decir,

parabenos de metilo, etilo, propilo o butilo o mezclas de los mismos, alcohol bencílico, fenol, cresol, cetrimida y timerosal.

5 El término "agente de ajuste de pH" significa un compuesto o mezcla de compuestos útiles para asegurar que el pH del equipo reconstituido esté dentro de los límites aceptables (aproximadamente pH de 4,0 a 10,5) para la administración humana o de mamíferos. Dichos agentes de ajuste de pH adecuados incluyen tampones farmacéuticamente aceptables, tales como tricina, fosfato o TRIS, y bases farmacéuticamente aceptables tales como carbonato de sodio, bicarbonato de sodio o mezclas de los mismos. Cuando el precursor se emplea en forma de sal ácida, el agente de ajuste de pH puede proporcionarse opcionalmente en un vial o recipiente separado, de modo que el usuario del equipo pueda ajustar el pH como parte de un procedimiento de múltiples etapas.

10 El término "carga" significa un agente de carga farmacéuticamente aceptable que puede facilitar la manipulación del material durante la producción y la liofilización. Las cargas adecuadas incluyen sales inorgánicas tales como cloruro de sodio y azúcares solubles en agua o alcoholes de azúcar tales como sacarosa, maltosa, manitol o trehalosa.

La invención se ilustrará además mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Leyendas de las Figuras

15 Figura 1. El receptor de FSH se expresa en tumores de próstata, pero no en próstata normal. Se inmunoprecipitaron cantidades iguales (1 mg de proteína total) de extractos de Triton X-100 de tejidos cancerosos (PCa) y normales (N) con el anticuerpo monoclonal de FSHR323, se resolvieron en la reducción de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las muestras se probaron con el anticuerpo de FSHR323. La posición de los marcadores de masa molecular se muestra a la izquierda. Una situación similar se encontró en el tejido obtenido de
20 otros cuatro pacientes. La banda débil corresponde a la IgG de ratón utilizada para la inmunoprecipitación.

Figura 2. Expresión de FSHR en cáncer de próstata versus tejido de próstata normal: la inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal de FSHR323. (a, b) Tejidos de cáncer de próstata de pacientes con valores de Gleason (GS) 6 y 8, respectivamente. La tinción de FSHR sugiere una expresión abundante del receptor en los vasos sanguíneos (flechas) asociados con el cáncer de próstata. Una señal débil es visible en las células epiteliales (puntas de flecha).
25 (c) Tejido prostático normal procesado como en a y b. Téngase en cuenta la ausencia de tinción con el anticuerpo del receptor de anti-FSH. Barra, 20 µm.

Figura 3. El endotelio arteriolar expresa FSHR solo por encima del valor de Gleason de 6. GS, valor de Gleason; EC, célula endotelial arteriolar; punta de flecha, célula muscular lisa. Barra, 20 µm.

30 Figura 4. Expresión de FSHR en próstata. Intensidad de la señal de FSHR sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Barras cerradas, intensidad promedio sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos individuales utilizando imágenes digitales similares a las de la Figura 2. Barras abiertas, intensidad de la señal de FSHR medida para áreas de tejido que excluyen los vasos sanguíneos.

Figura 5. Los vasos sanguíneos cercanos a los infiltrados inflamatorios de leucocitos expresan fuertemente FSHR. #, lumen de las glándulas normales; *, centroide del área inflamatoria compacta. Barra, 50 µm.

35 Figura 6. Los nervios de la próstata y sus vasos sanguíneos asociados en los tejidos cancerosos expresan FSHR. Imágenes de microscopía confocal: a, FSHR; b, proteína S-100 - un marcador de células de Schwann; c, contraste de interferencia diferencial; y d, fusión. VN, vasa nervorum; flechas, vainas perineurales. Barra: 20 µm.

Figura 7. Los nervios de próstata y sus vasos sanguíneos asociados en BPH no expresan FSHR. VN - vasa nervorum. Barra: 20 µm.

40 Figura 8. FSHR se expresa por vasos sanguíneos en otros tipos de tumores.

A) Tumor de colon, adenocarcinomas de estómago, adenocarcinomas pulmonares no microcíticos (NSCL) y adenocarcinomas de hígado. B) Tumor testicular (seminoma) y tumor renal de células claras. En el tejido testicular normal, las células de Sertoli (SC), conocidas por expresar FSHR, son positivas. Una señal débil de FSHR es apenas visible en el vaso sanguíneo presente en la misma imagen (flecha). Se sabe que los vasos sanguíneos en los testículos normales expresan FSHR, que es responsable de la transcitosis de FSH a través de la barrera testicular (Vu Hai et al., 2004). C) Imágenes representativas para el tejido de control de mama (a), cáncer de mama in situ (b) y cáncer de mama invasivo (c). Los paneles de la derecha muestran tejido pancreático normal (d), un tumor endocrino pancreático (e) y adenocarcinomas pancreáticos (f). Barra, 50 µm. Los controles para todos los tipos de tumor consistieron en tejido de apariencia normal situado a más de 10 mm fuera de los tumores, en las
45 muestras obtenidas mediante cirugía realizada para la extirpación del tumor.
50

Figura 9. Distribución de vasos teñidos con FSHR en la periferia de los tumores de próstata.

Los vasos sanguíneos se visualizaron utilizando anticuerpos del anti Factor von Willebrand seguido de anticuerpos secundarios Alexa 488 (verde), mientras que los vasos teñidos con FSHR se visualizaron con el anticuerpo

5 FSHR323 seguido de anticuerpos secundarios marcados con Alexa 555 (rojo). Los vasos se contaron con 148 imágenes digitales de microscopía de tumores de 5 pacientes. Eje horizontal - la distancia desde la línea de demarcación entre el tumor y el tejido que aparece normalmente (el área sombreada y los valores negativos representan el interior del tumor). Eje vertical izquierdo - el % de vasos que expresan FSHR. Eje vertical derecho - el número de vasos/mm². Cuadrados: el número de vasos por mm²; los discos y la línea interrumpida representan el % de vasos que expresan FSHR.

10 Figura 10. FSHR se expresa en células polimorfonucleares de pacientes con cáncer de próstata. Las células positivas para FSHR que tiene el aspecto de células polimorfonucleares (flechas) son visibles en el lumen de los vasos sanguíneos de los tumores (A) y también a más de 10 mm de distancia del borde del tumor (B), lo que sugiere que estas células están presentes en la circulación general y no solo en los tumores. C. Una preparación enriquecida en células polimorfonucleares de pacientes con cáncer de próstata revela la tinción de FSHR en células similares a polimorfonucleares, pero no en otros leucocitos. D. Una preparación similar de un donante sano no muestra células sanguíneas circulantes para FSHR.

15 Figura 11. El porcentaje de células sanguíneas circulantes que expresan FSHR aumenta con la gravedad de la enfermedad. Eje vertical – porcentaje de células positivas para FSHR entre la fracción celular aislada de la sangre como se describe en el texto. Barras de error – errores estándar; BPH – hiperplasia benigna de próstata; GS – valores de Gleason;

Materiales y métodos

20 Muestras de tejido. Los donantes no recibieron ningún medicamento. Las muestras tumorales se fijaron en formol al 10% durante 48 horas, se cortaron en secciones de tejido de 5 mm de grosor, se lavaron completamente con PBS, se deshidrataron en etanol y xileno graduado, y se embebieron en parafina. Se cortaron secciones grandes de 5 µm de 1,5-2,5 cm de los bloques de parafina. Varias muestras de próstata no fijadas se congelaron en hielo seco y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta que se seccionaron con un criostato para microscopía de inmunofluorescencia y/o experimentos de inmunoprecipitación e inmunotransferencia.

25 Las muestras de tumor han sido revisadas histológicamente por cinco investigadores del estudio. Para el cáncer de próstata, los grados y etapas de Gleason se asignaron según las pautas de la Organización Mundial de la Salud 2004. Los otros tipos de tumores se han clasificado histológicamente según los estándares del AJCC. Los tipos de tumores analizados y el número y sexo de los pacientes se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de Tumor

TUMOR		Nº de pacientes	
TIPO HISTOPATOLÓGICO		Femenino	Masculino
PRÓSTATA	Adenocarcinomas		550
	Hiperplasia benigna		300
MAMA	Carcinomas <i>in situ</i>	56	
	Carcinomas invasivos	112	
COLON	Carcinomas	6	9
PÁNCREAS	Carcinomas	27	36
	Tumores endocrinos	22	19
VEJIGA URINARIA	Carcinomas uroteliales <i>in situ</i>	62	64
	Adenocarcinomas	41	36
RIÑÓN	Carcinomas renales de células claras	25	39
PULMÓN	Adenocarcinomas	9	6
HÍGADO	Carcinomas hepatocelulares	4	11
ESTÓMAGO	Adenocarcinomas	3	3

TESTÍCULOS	Seminoma		5
	Carcinoma de células de Sertori		1
	Tumores de células de Leydig		2
OVARIO	Carcinomas epiteliales	6	

También se analizó un paciente con tumor cerebral.

5 Las micromatrices de tejidos (TMA) se construyeron utilizando embebidos en parafina y fijados con formalina archivados [Kononen et al., 1998]. En resumen, los patólogos de estudio revisaron las diapositivas originales, y las diapositivas que contenía tumor o tejido de apariencia normal se seleccionaron y se marcaron con tinta de color. Para cada paciente, se transfirieron 3-4 núcleos cilíndricos (0,6 mm de diámetro) de tumor y 3-4 núcleos de tejido prostático normal (no maligno, no displásico) desde las áreas seleccionadas de los bloques de parafina a los bloques receptores. Cada bloque receptor reagrupó tumores para 28 a 40 pacientes. Grandes secciones en serie de 10 5 µm de espesor de los bloques de TMA, que contienen todos los núcleos, se cortaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina para verificar que los núcleos representaban adecuadamente las áreas diagnósticas. Las imágenes que cubren el área completa de cada núcleo se obtuvieron de una sección de cada TMA.

15 Inmunohistoquímica. El procedimiento estándar de inmunoperoxidasa indirecta se utilizó para inmunohistoquímica. Las secciones de tejido se unieron a portaobjetos SuperFrost, se desparafinaron con tolueno, se deshidrataron gradualmente en etanol y se lavaron con agua corriente durante 60 minutos. El acceso a los sitios de antígeno tisular para la unión del anticuerpo se mejoró incubando los portaobjetos a 90°C durante 40 minutos con tampón de citrato 10 mM, pH 6. Después de enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente y después de cada etapa posterior, los portaobjetos se enjuagaron con PBS. Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 6% (15 minutos a temperatura ambiente). Se utilizó borohidruro de sodio (50 mg/ml) para eliminar los grupos aldehído libres (20 minutos). La unión no específica de anticuerpos se bloqueó 20 incubando los portaobjetos con suero de cabra al 2% en PBS (tampón de bloqueo) durante 2 horas a temperatura ambiente. El FSHR se detectó incubando los portaobjetos con 5 µg/ml del anticuerpo monoclonal anti-FSHR 323 [Vannier et al., 1996] en tampón de bloqueo (durante la noche, 4°C). Se utilizó IgG anti ratón de cabra (específica de Fc) acoplado a peroxidasa de rábano picante (Sigma, dilución 1:200) como anticuerpo secundario. Como cromógeno utilizamos 3-amino-9-etil carbazol (AEC; Sigma). El desarrollo cromogénico se controló durante 15 minutos a través 25 de un microscopio óptico. Las secciones se lavaron en agua destilada y se contratiñeron con una hematoxilina de Mayer débil. Los portaobjetos se montaron en medio de montaje Dako Glycergel.

30 Inmunocitoquímica de las células sanguíneas circulantes. La sangre recogida en EDTA se trató con cloruro de amonio para lisar los glóbulos rojos y las células polimorfonucleares se han enriquecido por centrifugación a 55 g (Eggleton et al., 1989). Las células se fijaron durante la noche con formaldehído al 4% a 4°C y se unieron a portaobjetos de microscopio recubiertos con polilisina. El FSHR se detectó con el anticuerpo monoclonal anti-FSHR 323 como se describió anteriormente.

35 Microscopía confocal de inmunofluorescencia indirecta. Se recogieron secciones de criostato en serie (7 µm) de próstatas congeladas no fijadas embebidas en Tissue-Tek en portaobjetos SuperFrost y se secaron al aire. Las secciones se fijaron con paraformaldehído al 3% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los grupos aldehído libres se eliminaron tratando las secciones con NH₄Cl 50 mM en PBS durante 15 minutos. Para bloquear la unión no específica de los anticuerpos, los portaobjetos se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con suero de cabra al 2% en PBS. El FSHR se detectó incubando secciones secuencialmente con el anticuerpo anti-FSHR 323 (3 µg/ml) en GS-PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y con IgG anti ratón de cabra-Alexa 555 (sondas 40 moleculares; dilución 1:750 en tampón de bloqueo; 1 hora). Se han realizado experimentos de marcado doble con secciones de próstata incubadas con una mezcla de anticuerpo anti FSH 323 (3 µg/ml en tampón de bloqueo) y el factor policlonal anti von Willebrand de conejo, un marcador específico de células endoteliales (Sigma; dilución 1:1000). Una mezcla de IgG anti ratón de cabra-Alexa 555 e IgG anti conejo de cabra-Alexa 488 (sondas moleculares; dilución 1:750) se ha utilizado como anticuerpos secundarios. En algunos experimentos, los núcleos se 45 detectaron incubando los portaobjetos durante 10 minutos con TOTO-3 (sondas moleculares; dilución 1:1000 en PBS). Los portaobjetos se montaron en medio de montaje fluorescente Dako® que contenía azida de sodio 15 mM y se examinaron con un microscopio de escaneo láser confocal Zeiss 510. Los controles negativos consistieron en muestras de próstata incubadas solo con mezclas de anticuerpos secundarios fluorescentes. La microscopía confocal de inmunofluorescencia también se realizó en secciones de parafina utilizando un método similar, excepto que la concentración del anticuerpo FSHR 323 fue de 5 µg/ml.

Las inmunoprecipitaciones seguidas de SDS-PAGE y transferencia de Western se llevaron a cabo como se describió previamente [Vannier et al., 1996] utilizando 200 mg de tejido prostático húmedo como material de partida. El FSHR inmunopurificado de las células L que expresan establemente el receptor de proteína se utilizó como control.

5 Cuantificación de la señal de FSHR en vasos sanguíneos en imágenes de inmunohistoquímica. En resumen, para cada perfil de vaso calculamos el área del vaso excluyendo el lumen, así como la señal de FSHR total sobre esta área. La intensidad promedio de la señal de FSHR sobre cada vaso se calculó dividiendo la señal de FSHR total en el área. Los valores anteriores se han extraído de las imágenes digitales de cada perfil de vaso utilizando Adobe Photoshop, como se describe a continuación. El contorno exterior del vaso se delineó utilizando la herramienta "Lasso", y el área seleccionada se copió y pegó en un nuevo archivo (denominado aquí como archivo A). Las áreas teñidas se delinearon en este archivo utilizando los comandos "Select" y "Colour range" [Tolivia et al., 2006] utilizando borrosidad 30. (El color marrón-rojo específico para el producto de reacción de peroxidasa se seleccionó inicialmente de una imagen representativa y se almacenó en un archivo utilizando el comando Save del menú "Colour range". Este archivo se cargó posteriormente para el análisis de cada imagen). El área seleccionada se copió en un nuevo archivo (B). Se realizaron operaciones similares para el diámetro interno del vaso, generando los archivos C y D. (El fondo de los archivos A-C era negro). El comando "Merge Layers" se aplicó a todos los archivos y los archivos B y D se convirtieron a escala de grises. En una segunda etapa de análisis, se extrajeron valores numéricos de los archivos A-C utilizando el software NIH ImageJ. Las áreas internas y externas de cada perfil del vaso se han medido a partir de los archivos A y C utilizando la herramienta "Freehand" seguida de los comandos "Analyze" y "Measure". Después, se seleccionó toda el área de las imágenes B y D utilizando la herramienta "Rectangle", y la suma de todos los píxeles se obtuvo utilizando "Analyze" y "Measure". (Las áreas fuera de los vasos no tienen contribución, porque son negras). Los valores se han introducido en un archivo Excel. Los valores correspondientes a la pared del vaso se han obtenido substrayendo los valores del lumen de los valores del perfil completo del vaso. La intensidad promedio de la tinción de la pared del vaso se calculó dividiendo la señal total sobre la pared del vaso en el área del contorno del vaso.

25 Resultados

1. El receptor de FSH se expresa en tumores de próstata

30 Las preparaciones de receptor de tejidos de próstata, enriquecidas por inmunoprecipitación con anticuerpo FSHR 323, se analizaron mediante inmunotransferencia utilizando el anticuerpo FSHR18. Se detectó una banda de aproximadamente 87 kDa en tejidos de cáncer de próstata (Figura 1, carril PCa). No se observó FSHR en extractos de tejido que aparece normalmente en próstatas de pacientes con cáncer de próstata (carril N). El tamaño de la banda detectada es la misma que la forma glicosilada madura de 87 kDa previamente detectada en tejidos ováricos humanos [Vannier et al., 1996].

2. Los estudios inmunohistoquímicos indican que FSHR se expresa abundantemente en los vasos sanguíneos en los tumores de próstata, pero no en tejidos normales.

35 La localización del FSHR se investigó a continuación mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo FSH323. Se han utilizado grandes secciones rectangulares (1,5-2,5 cm). La mayoría de estas secciones contenían tanto tejido tumoral como áreas que aparecen normalmente. Como se sabe en general, la mayoría de los tumores de próstata se localizan en la periferia de la próstata y casi ninguno surge en la zona central [De Marzo et al., 2007]. En las imágenes obtenidas de las áreas tumorales periféricas de pacientes con valores de Gleason de cinco o más, era visible una débil señal en las células epiteliales (punta de flecha en las figuras 2a y b). En contraste, la gran mayoría de las células epiteliales en áreas de apariencia normal en la periferia no muestran tinción de FSHR (Figura 2c). [Las áreas focales pequeñas de tinción basolateral de FSHR asociadas con células secretoras son poco frecuentes en el tejido periférico de apariencia normal (no ilustrado)]. No se detecta señal de FSHR en células epiteliales en tejido que aparece normalmente en el área central de las mismas próstatas. La mayoría de los vasos sanguíneos en el tejido tumoral se tiñen abundantemente (flechas en la Figura 2, a y b), mientras que la mayoría de los vasos sanguíneos en el tejido periférico que aparece normalmente no se tiñen (flechas en la Figura 2c). La abundante expresión de FSHR en los vasos sanguíneos tumorales se observó sin excepción en los 50 pacientes que han sido diagnosticados con valores de Gleason de cinco o más. (No hubo tejidos de pacientes con valores de Gleason inferior a cinco disponibles para el análisis). No hubo expresión de FSHR en los perfiles de vasos sanguíneos de tejido normal en áreas centrales (no ilustrado). Como excepción, los vasos sanguíneos se tiñen en áreas inflamatorias que se encuentran en áreas normales en localizaciones periféricas y centrales (véase a continuación). Las hiperplasias benignas de la próstata no expresan FSHR ni en las células epiteliales ni en las paredes de los vasos sanguíneos, con la excepción de algunas áreas inflamatorias (véase a continuación).

3. Las células endoteliales son los principales sitios de expresión de FSHR en los vasos tumorales.

55 El tamaño y la apariencia de los perfiles de los vasos sanguíneos teñidos para FSHR es compatible con la conclusión de que representan capilares, vénulas y arteriolas. Algunos de estos vasos están constituidos, además de las células endoteliales, de pericitos (algunos capilares y vénulas postcapilares (periciticas)) y células musculares lisas (arteriolas y vénulas musculares) [Simionescu and Simionescu, 1988]. Por lo tanto, es relevante aclarar cuáles de estas células expresan FSHR en tumores. Un marcador específico para las células endoteliales, el factor von

Willebrand, indicó que en los capilares y las vénulas el FSHR se expresa por las células endoteliales y por ningún otro tipo de células que constituyen las paredes de los vasos sanguíneos. En las arteriolas, además del endotelio, las células del músculo liso se tiñen en todos los valores de Gleason analizados (5 a 10) (Figura 3). En comparación, las células del músculo liso en las vénulas musculares no se tiñen con ningún valor de Gleason (no ilustrado).
 5 Mientras que el endotelio de los capilares y las vénulas se tiñen para FSHR en todos los valores de Gleason analizados (5 a 10), el endotelio arteriolar se tiñe solo en los valores de Gleason 6 y superiores (Figura 3b, c). Este patrón de tinción de células endoteliales y de músculo liso fue válido para tejidos de los 50 pacientes analizados.

4. Cuantificación de la expresión de FSHR en función del valor de Gleason.

10 La intensidad de señal promedio sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos individuales se determinó utilizando imágenes digitales similares a las de la Figura 2. Solo se han medido los capilares y las vénulas postcapilares. Las arteriolas no se han medido debido a la complicación introducida por la presencia, además de las células endoteliales teñidas, de las células del músculo liso teñidas. Existe una clara tendencia a una mayor expresión de FSHR con valores altos de Gleason (en promedio 118 ± 8 (SEM) unidades para valores de 9 y 10 vs 64 ± 7 para valores de Gleason de 5 y 8, $p < 0,0005$) (Figura 4, barras cerradas). La intensidad de la señal de FSHR
 15 también se midió para áreas de tejido que excluyen los vasos sanguíneos (Figura 4, barras abiertas). También en este caso la expresión es más alta en el valor más alto ($18,4 \pm 1,1$ unidades en el valor de Gleason de 10 vs. $3,8 \pm 0,3$ unidades para los valores de Gleason de 5 a 9, $p < 1,7 \times 10^{-11}$). Cabe señalar que la señal de FSHR es mucho mayor para las células endoteliales que para el resto del tejido (aproximadamente 6 a 10 veces mayor).

5. El FSHR vascular también aparece en el tejido prostático no tumoral en las proximidades de los infiltrados inflamatorios de leucocitos.
 20

Para cada uno de los cincuenta pacientes, las grandes secciones de parafina contenían al menos un área compacta de alta densidad de células inflamatorias (Figura 5), sin una asociación clara con el tumor o las zonas normales. Una observación consistente fue que la gran mayoría de los vasos sanguíneos en el interior o en la proximidad de los infiltrados de leucocitos expresaron fuertemente FSHR, incluso si el tejido circundante tenía un aspecto normal, no
 25 tumoral. Este efecto se observó en los vasos sanguíneos hasta una distancia de 3,5 mm (promedio $2 \pm 0,75$ (desviación estándar), $n = 34$) desde el borde proximal del área inflamatoria.

Curiosamente, el lumen de la mayoría de los vasos sanguíneos asociados con las áreas inflamatorias está ocupado, además de los eritrocitos, por numerosas células nucleadas. En contraste, el lumen de la mayoría de los vasos sanguíneos que no tienen leucocitos cercanos está vacío o muestra eritrocitos y muy pocas células nucleadas.

30 En las hiperplasias prostáticas benignas, que ocurren en la zona de transición de la próstata [De Marzo et al., 2007], 5 de los 20 pacientes analizados tenían infiltrados inflamatorios. Aproximadamente el 20% de las áreas inflamatorias mostraron expresión de FSHR tanto en los vasos sanguíneos como en la débil tinción basolateral en las células epiteliales secretoras.

6. Los nervios y sus vasos asociados expresan FSHR.

35 La próstata es un órgano ricamente innervado. Dos haces neurovasculares corren lateralmente a lo largo de la superficie rectal de la glándula, y otros nervios corren a lo largo de la superficie interna de la cápsula antes de ramificarse en el parénquima prostático [Powell, 2005]. Todos los nervios están acompañados por vasos sanguíneos (vasa nervorum), algunos de los cuales penetran en las vainas epineuriales. Notamos una intensa tinción de FSHR de las células de Schwann en todas las fibras nerviosas en las áreas periféricas afectadas por el cáncer en todos los
 40 valores de Gleason. Los vasos sanguíneos asociados con estos nervios expresan también FSHR (Figura 6). Se observó una tinción más fuerte de los vasos sanguíneos en áreas que contienen tanto nervios como infiltrados inflamatorios.

En los tejidos periféricos de pacientes con cáncer que aparecen normalmente, los nervios muestran también una intensa tinción de FSHR de las células de Schwann y vasa nervorum en todos los valores de Gleason analizados (5-
 45 10).

En un paciente que no tenía tumores, pero fue sometido a prostatectomía radical debido a PBH, la mayoría de los nervios y sus vasos asociados en las áreas periféricas de la próstata no expresan FSHR (Figura 7). La ausencia de tinción en los nervios y los vasos sanguíneos también se observó en un ganglio nervioso en la zona periférica (no
 50 ilustrada).

7. FSHR se expresa en los vasos sanguíneos de otros cánceres humanos.

Se han realizado experimentos de inmunohistoquímica similares para otros tipos de tumores humanos (véase Tabla 1). Los controles para todos los tumores consistieron en tejido de apariencia normal localizado a más de 10 mm fuera de los tumores, en el tejido obtenido mediante cirugía realizada para la extirpación del tumor. La mayoría de los tumores analizados (aproximadamente 70%) eran de grados I y II, aproximadamente, el 25% de grado III y el
 55 resto fueron los más avanzados – grado IV. Las imágenes representativas para cada tipo de tumor y los controles

normales correspondientes se muestran en la Figura 8. Al igual que en la próstata, las células tumorales también se tiñen de forma ocasional y leve en tumores de mama y tumores pancreáticos exocrinos (no se muestran). Los inventores observaron además la expresión de FSHR en vasos sanguíneos asociados con un tumor cerebral (no mostrado).

- 5 Una característica general de los vasos cuyas células endoteliales expresan FSHR es que están localizados en la periferia de los tumores, en cubiertas que tienen un grosor de aproximadamente 10 mm (intervalo de 7-15 mm) y se extienden unos pocos milímetros tanto dentro como fuera del tumor, en el tejido aparentemente normal. No se encuentran vasos que expresan FSHR en las áreas más profundas de los tumores. La Figura 9 presenta cuantitativamente la distribución de los vasos que expresan FSHR para tumores de próstata. Además de la
10 distribución en forma de campana de los vasos positivos para FSHR, los datos indican que la densidad del número total de vasos (que expresan o no FSHR) es mayor en el interior del tumor que en el exterior (37 ± 2 (error estándar) vs. 25 ± 1 vasos/mm² ($p = 6 \times 10^{-7}$, ensayo-t, dos colas).

- 15 La misma distribución de tipo cubierta de la EC que expresa FSHR se produce en todos los tipos de tumores examinados, con la excepción de aproximadamente un tercio de los tumores renales de células claras, donde no solo los vasos en la periferia, sino también en el interior de los tumores expresan uniformemente FSHR. El porcentaje de vasos que expresan FSHR alcanza un máximo de 40-100% en la línea de demarcación entre el tumor y el tejido normal, y disminuye gradualmente a cero tanto hacia el interior como hacia el exterior del tumor. El intervalo más bajo, así como el grosor de la cubierta y el porcentaje máximo de vasos de FSHR positivos, se produce para el páncreas exocrino y los hepatocarcinomas hepáticos, se encuentran valores intermedios para la
20 vejiga urinaria, los ovarios, los pulmones y el estómago, y el intervalo más alto se produce para la próstata, los riñones, colon, mama y testículos. El grosor de la cubierta no parece depender significativamente del tamaño del tumor.

8. FSHR se expresa en células sanguíneas circulantes. Las células polimorfonucleares aisladas de pacientes con cáncer de próstata expresan FSHR (Figura 10 C). Las células mononucleares que también son visibles en la
25 preparación no muestran ninguna señal de FSHR. Las células intravasculares positivas para FSHR también son visibles en secciones de tumores de próstata (Figura 10A y B) y tumores de colon, riñón, vejiga urinaria, páncreas, mama, ovario, testículo, pulmón, estómago e hígado. La microscopía confocal de mayor aumento revela que la proteína que genera la señal se localiza en la membrana plasmática, como se esperaba para FSHR, que es un receptor de membrana (Figura 10 C, recuadro).

- 30 Los datos cuantitativos para todo el conjunto de pacientes y controles, que se muestran en la Figura 11, confirman que las células de los controles sanos y los pacientes con BPH no expresan FSHR. La observación importante para futuras aplicaciones clínicas es que el porcentaje de células teñidas en pacientes con cáncer es claramente proporcional a la gravedad de las enfermedades, aumentando rápidamente de aproximadamente el 15% para un valor de Gleason de 6 a más del 80% para un valor de Gleason de 8.

- 35 La importancia es que una prueba basada en FSHR podría evaluar fácilmente la gravedad de la enfermedad y podría utilizarse para monitorear el progreso de la enfermedad y la eficacia de los tratamientos.

Discusión

- 40 Con respecto a la razón de la expresión de FSHR en los vasos sanguíneos tumorales, se puede avanzar la siguiente hipótesis. Es concebible que durante el desarrollo temprano, cuando la próstata crece a un ritmo muy alto, se necesitan grandes cantidades de FSH para mantener el crecimiento. El FSH circulante no atraviesa fácilmente la barrera endotelial [Vu Hai et al., 2004], y pueden necesitarse grandes cantidades de FSHR en la superficie endotelial para facilitar una alta tasa de transporte por transcitosis. Este transporte de FSH mediado por el receptor probablemente esté regulado negativamente cuando la próstata alcanza el tamaño maduro, pero puede reactivarse cuando el epitelio vuelve a entrar en un estado proliferativo alto en los tumores.

- 45 Con respecto al mecanismo que conduce a la expresión de FSHR en el tejido tumoral, un posible factor inductor es el NGF. Se reportó que el NGF exógeno activa la expresión de FSHR en ovarios humanos [Salas et al., 2006]. El NGF se expresa en las células epiteliales del tumor de próstata [Pflug et al., 1995] y, por lo tanto, la expresión de FSHR en los tumores puede ser inducida por el NGF producido por estas células.

- 50 El NGF también es producido por las células de Schwann [para revisión, Sofroniew et al., 2001], lo que puede explicar la expresión de FSHR en nervios y vasa nervorum. *In vitro*, la expresión de NGF por las células de Schwann está regulada por las citoquinas y otros mediadores inflamatorios [Lindholm et al., 1987], lo que puede explicar la tinción más fuerte en áreas que contienen tanto nervios como infiltrados inflamatorios.

- 55 El NGF biológicamente activo también es producido y liberado por las células endoteliales vasculares, que expresan receptores de NGF de alta y baja afinidad, TrkA y p75NGFR, respectivamente [Tanaka et al., 2004]. La interleucina-1, una de las citoquinas proinflamatorias, estimula la liberación de NGF de las células endoteliales en cultivo. El NGF añadido exógenamente a las células endoteliales en cultivo indujo rápidamente la fosforilación de la tirosina de TrkA, lo que indica que el TrkA expresado en las células endoteliales es capaz de responder al NGF y transducir las

señales de NGF. También se han predicho posibles efectos autocrinos y/o paracrinos de NGF en las células endoteliales vasculares [Tanaka et al., 2004].

5 Un estudio cuantitativo previo llegó a la conclusión de que no se produce una neoangiogénesis significativa en los tumores de próstata [Rubin et al., 1999]. Por lo tanto, la tinción generalizada de FSHR no se puede restringir a los pocos o nuevos vasos recién formados, y, por lo tanto, la expresión de FSHR no parece desencadenarse ni asociarse con el proceso de angiogénesis.

10 Nuestro estudio demuestra efectivamente que los receptores de FSH se expresan en los vasos dentro de los tumores malignos de próstata. Hasta donde sabemos, esta es la primera demostración de receptores de FSH en vasos de cualquier tumor maligno. El hecho de que el FSHR se exprese en los vasos dentro de los tumores de próstata, pero esté ausente del endotelio normal, puede tener importantes implicaciones terapéuticas. Como una proteína integral de la membrana plasmática asociada con el cáncer de próstata, FSHR ofrece un excelente objetivo selectivo potencial para la inmunoterapia y las imágenes basadas en anticuerpos monoclonales.

15 El hecho de que la expresión de FSHR por el endotelio de los vasos sanguíneos se detectó en todos los tipos de tumores analizados hasta ahora sugiere que el FSHR endotelial constituye un marcador tumoral general, independiente del origen de las células transformadas.

20 Desde la perspectiva del uso de la expresión de FSHR para la formación de imágenes tumorales *in vivo*, debe tenerse en cuenta que la cubierta que expresa FSHR representa un volumen sustancial en comparación con el volumen total del tumor. Por ejemplo, para un tumor con un diámetro de 30 mm y un volumen de aproximadamente 14 cm³, una cubierta similar a la de la Figura 9, que se extiende desde aproximadamente 3 mm dentro del tumor hasta 7 mm fuera del tumor, tiene un volumen de aproximadamente 37 cm³, 2,6 veces más grande que el tumor mismo. La parte positiva de FSHR de la cubierta fuera del tumor compensa con creces la falta de expresión de FSHR en la parte central del tumor. La relación entre la cubierta y los volúmenes tumorales disminuye para tumores más grandes, pero la detección de tumores pequeños es de gran interés para la obtención de imágenes de tumores *in vivo*.

25 La presencia de FSHR en la superficie de las células endoteliales tumorales en una amplia gama de tumores lo convierte en un objetivo muy prometedor tanto para la imagenología del tumor como para la terapia. El FSHR podría ser útil para enviar a los agentes tumorales que destruirían los vasos sanguíneos tumorales o bloquearían el flujo sanguíneo induciendo la coagulación. Los agentes de direccionamiento podrían ser anticuerpos anti FSHR humanizados, o FSH, o ligandos artificiales como aptámeros. Una posibilidad interesante, que distinguiría FSHR de otros marcadores de la vasculatura tumoral, es que FSHR puede mediar la transcitosis de ligandos a través del endotelio tumoral. Como se mencionó, se encontró que la transcitosis de FSHR se produce a través del endotelio testicular normal (Vu Hai et al., 2004). Las rondas repetidas de transcitosis pueden conducir a la acumulación de los agentes dirigidos en el tumor, lo que podría aumentar fuertemente la sensibilidad a la imagen y la eficacia terapéutica. Además, la transcitosis permitiría la administración selectiva de agentes que destruirían las células tumorales, no solo las ECs tumorales.

40 La presencia de FSHR en las células polimorfonucleares circulantes asociadas con varios tipos de tumores hace posible además diagnosticar tumores mediante un simple análisis de sangre. Los datos presentados establecen la viabilidad de utilizar FSHR para detectar la presencia de cáncer de próstata comenzando al menos con un valor de Gleason de 6, y posiblemente más bajo. (El valor de Gleason de 6 es el más bajo para el que se recomienda la cirugía). Además, la prueba permitirá monitorear el progreso de la enfermedad y ayudará a tomar decisiones sobre la selección y la eficacia de las estrategias terapéuticas.

Referencias

- Ablin RJ, Bronson P, Soanes WA, Witebsky E. 1970a. Tissue- and species-specific antigens of normal human prostatic tissue. *J Immunol* 104: 1329-1339.
- 5 Ablin RJ, Soanes WA, Bronson P, Witebsky E. Precipitating antigens of the normal human prostate. 1970b. *J Reprod Fertil* 22: 573-574.
- Akin O, Hricak H. 2007. Imaging of prostate cancer. *Radiol Clin N Am* 45: 207-222. AIRT Working Group. 2006. Italian cancer figures-report 2006: 1. Incidence, mortality and estimates. *Epidemiol Prev* 30 (1 Suppl 2): 8-10.
- 10 Arap W, Haedicke W, Bernasconi M, Kain R, Rajotte D, Krajewski S, Ellerby HM, Bredesen DE, Pasqualini R, Ruoslahti E. 2002. Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1527-1531.
- Ben-Josef E, Yang SY, Ji TH, Bidart JM, Garde SV, Chopra DP, Porter AT, Tang DG. 1999. Hormone-refractory prostate cancer cells express functional follicle stimulating hormone receptor (FSHR). *J Urol* 161: 970-976.
- Bradford TJ, Tomlins SA, Wang X, Chinnaiyan AM. 2006. Molecular markers of prostate cancer. *Urologic Oncology* 24 : 538-551.
- 15 Chang SS, Reuter VE, Heston WDW, Bander NH, Grauer LS ,Gaudin PB.1999. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res* 59: 3192-3198.
- Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R. 1996. Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 380: 548-550.
- 20 Cote RJ, Morrissey DM, Houghton AN, Beattie EJ Jr, Oettgen HF, Old LJ. 1983. Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80: 2026-2030.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7: 256-269.
- 25 Eggleton P, Gargan R, Fisher D. 1989. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *J Immunol Methods* 121: 105-113.
- Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, Cheresch DA. 2002. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 296: 2404-2407.
- Jayasena SD.1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 45: 1628-1650.
- 30 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 56: 71-96
- Ji Q, Liu PI, Chen PK, Aoyama C. 2004. Follicle stimulating hormone-induced growth promotion and gene expression profiles on ovarian surface epithelial cells. *Int J Cancer* 112: 803-814.
- 35 Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J Immunol*. 174: 2453-2455.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. 1998. Tissue microarrays for highthroughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4: 844-847.
- 40 Leuschner C, Hansel W. 2005. Targeting breast and prostate cancers through their hormone receptors. *Biol Reprod* 73: 860-865.
- Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. 1987. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330: 658-659.
- Macchia RJ. 2004. Biopsy of the prostate-an ongoing evolution. *J Urol* 171: 1487-1488.
- Macklon NS, Fauser BCJM. 1998. Follicle development during the normal menstrual cycle. *Maturitas* 30: 181-188.
- 45 Maecke HR, Hofmann M, Haberkorn U. 2005. 68Ga-labeled peptides in tumor imaging. *J Nucl Med* 46 (Suppl 1): 172S-178S.

- Mariani S, Salvatori L, Basciani S, Arizzi M, Franco G, Petrangeli E, Spera G, Gnessi L. 2006. Expression and cellular localization of follicle-stimulating hormone receptor in normal human prostate, benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol* 175: 2072-2077.
- 5 Minegish, T.; Nakamura, K.; Takakura, Y.; Ibuki, Y.; Igarashi, M. 1991. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175: 1125-1130.
- Parry R, Schneider D, Hudson D, Parkes D, Xuan JA, Newton A, Toy P, Lin R, Harkins R, Alicke B, Biroc S, Kretschmer PJ, Halks-Miller M, Klocker H, Zhu Y, Larsen B, Cobb RR, Bringmann P, Roth G, Lewis JS, Dinter H, Parry G. 2005. Identification of a novel prostate tumor target, mindin/RG-1, for antibody-based radiotherapy of prostate cancer. *Cancer Res.* 65: 8397-8405
- 10 Pflug BR, Dionne C, Kaplan DR, Lynch J, Djakiew D. 1995. Expression of a Trk high affinity nerve growth factor receptor in the human prostate. *Endocrinology* 136: 262-268.
- Plant TM, Marshall GR. 2001. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev* 22: 764-786.
- 15 Powell MS, Li R, Dai H, Sayeeduddin M, Wheeler TM, Ayala GE. 2005. Neuroanatomy of the normal prostate. *Prostate* 65: 52-57.
- Remzi M, Fong YK, Dobrovits M, Anagnostou T, Seitz C, Waldert M, Harik M, Marihart S, Marberger M, Djavan B. 2005. The Vienna nomogram: validation of a novel biopsy strategy defining the optimal number of cores based on patient age and total prostate volume. *J Urol* 174: 1256-1260.
- 20 Rubin MA, Buyyounouski M, Bagiella E, Sharir S, Neugut A, Benson M, de la Taille A, Katz AE, Olsson CA, Ennis RD. 1999. Microvessel density in prostate cancer: lack of correlation with tumor grade, pathologic stage, and clinical outcome. *Urology* 53: 542-547.
- Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C, Kerr B, Ojeda SR, Lara HE, Romero C. 2006. Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2396- 2403.
- 25 Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. 1997. The follicle stimulating hormone receptor. *Biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology.* *Endocr Rev* 18: 739-773,
- Simionescu N, Simionescu M. 1988. The cardiovascular system. In: *Cell and Tissue Biology. A textbook of histology.* Weiss L (ed) Sixth edition, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich, pp 355-400.
- Scardino PT. 2003. The Prevention of Prostate Cancer. *The Dilemma Continues.* *N Engl J Med* 349: 297-299.
- 30 Sofroniew MV, Hove CL, Mobley WC. 2001. Nerve growth factor signalling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24: 1217-1281.
- Sprengel R, Braun T, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. 1990. The testicular receptor for follicle-stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol* 4: 525-530.
- 35 Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M, Downs J. 2004. The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: What happened in the last 20 years? *J Urol* 172: 1297-1301.
- Stenman UH, Abrahamsson PA, Aus G, Lilja H, Bangma C, Hamdy FC, Boccon-Gibod L, and Ekman P. 2005. Prognostic value of serum markers for prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 216: 64-81.
- Tanaka A, Wakita U, Kambe N, Iwasaki T, Matsuda H. 2004. An autocrine function of nerve growth factor for cell cycle regulation of vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 1009-1104.
- 40 Tolviva J, Navarro A, del Valle E, Perez C, Ordonez C, Martinez E. 2006. Application of Photoshop and Scion Image analysis to quantification of signals in histochemistry, immunocytochemistry and hybridocytochemistry. *Anal Quant Cytol Histol.* 28: 43-53.
- Tuerk C. 1997. Using the SELEX combinatorial chemistry process to find high affinity nucleic acid ligands to target molecules. *Methods Mol Biol* 67: 219-230.
- 45 Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, Pichon C, Milgrom E. 1996. Anti-human FSH receptor monoclonal antibodies: immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor. *Biochemistry* 35: 1358-1366.
- Vu Hai MT, Lescop P, Loosfelt H, Ghinea N. 2004. Receptor-mediated transcytosis of follicle stimulating hormone through the rat testicular microvasculature. *Biol Cell* 96: 133-144.

Wilson, SS. 2005. Prostate cancer screening. *Comprehensive Therapy* 31: 119-123.

Zhu L, Koistinen H, Wu P, Narvanen A, Schallmeiner E, Fredriksson S, Landegren U, Stenman UH. 2006. Asensitive proximity ligation assay for active PSA. *Biol Chem* 387: 769-772.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ligando del receptor de FSH endotelial vascular (VE-FSHR) que se acopla a un agente anti tumoral, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el ligando es un anticuerpo anti-VE-FSHR, en donde el ligando de VE-FSHR acoplado al agente antitumoral es para administrarse por vía intravenosa.
2. El ligando de VE-FSHR que se acopla a un agente antitumoral para su uso en el tratamiento de un cáncer según la reivindicación 1, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cánceres de próstata, testículos, riñón, ovario, pulmón, hígado, páncreas, estómago, mama, colon, cerebro y vejiga urinaria.
- 10 3. El ligando de VE-FSHR que se acopla a un agente antitumoral para su uso en el tratamiento de un cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el agente antitumoral es una toxina.
4. El ligando de VE-FSHR que se acopla a un agente antitumoral para su uso en el tratamiento de un cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el agente antitumoral es un agente quimioterapéutico.
5. El ligando de VE-FSHR que se acopla a un agente antitumoral para su uso en el tratamiento de un cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el cáncer es un adenocarcinoma de próstata.

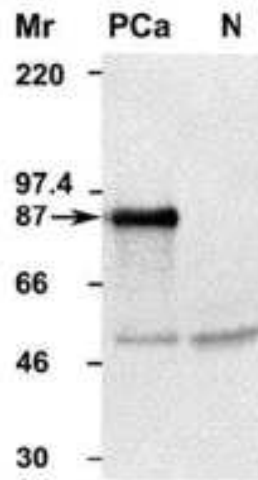


Figura 1

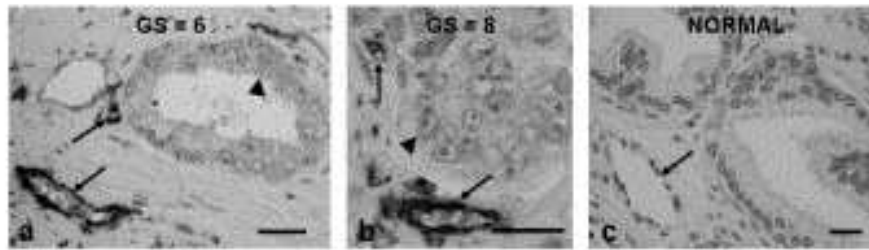


Figura 2

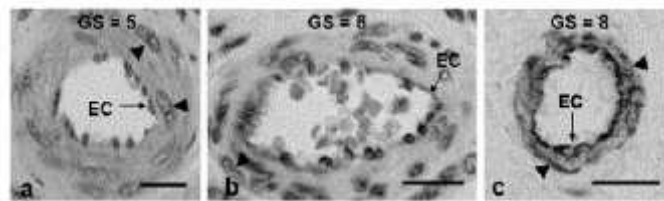


Figura 3

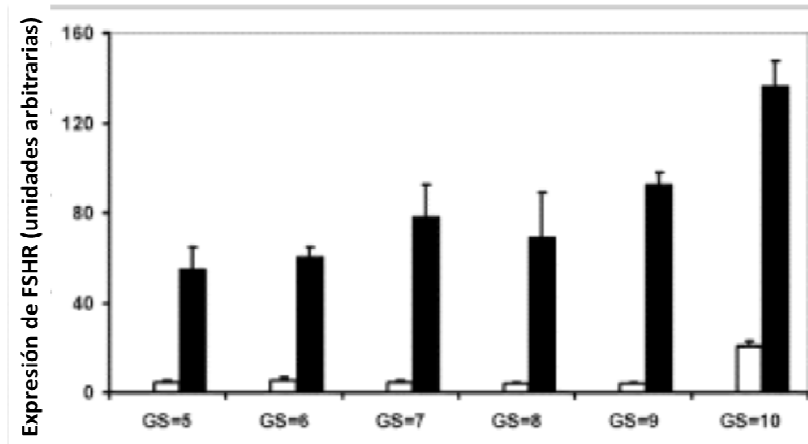


Figura 4

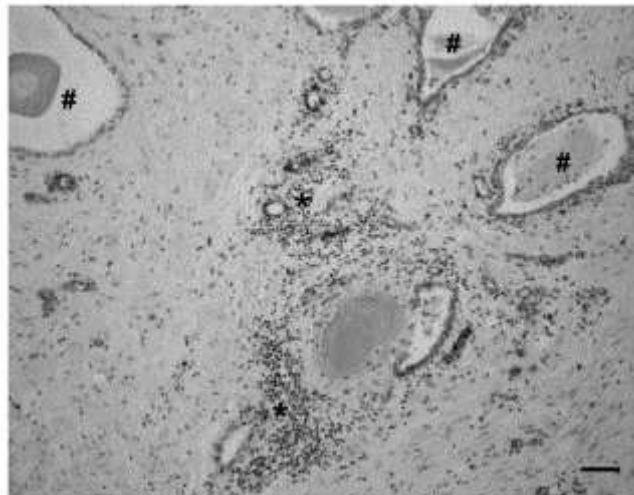


Figura 5

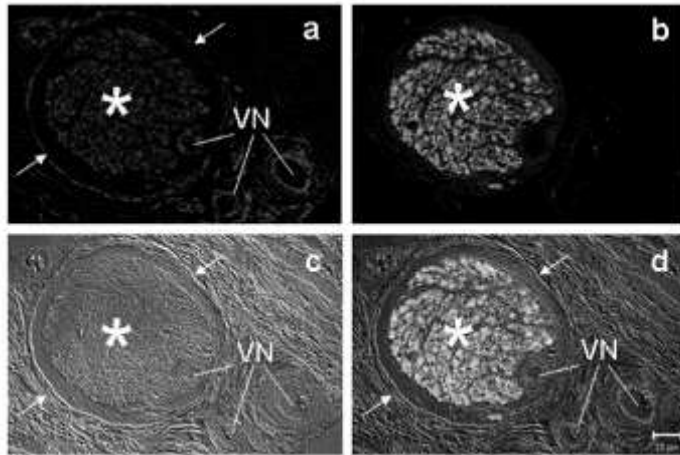


Figura 6

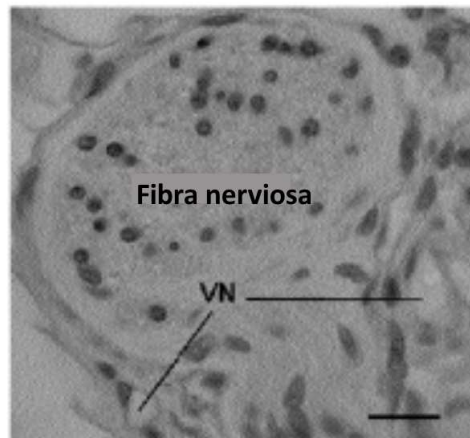


Figura 7

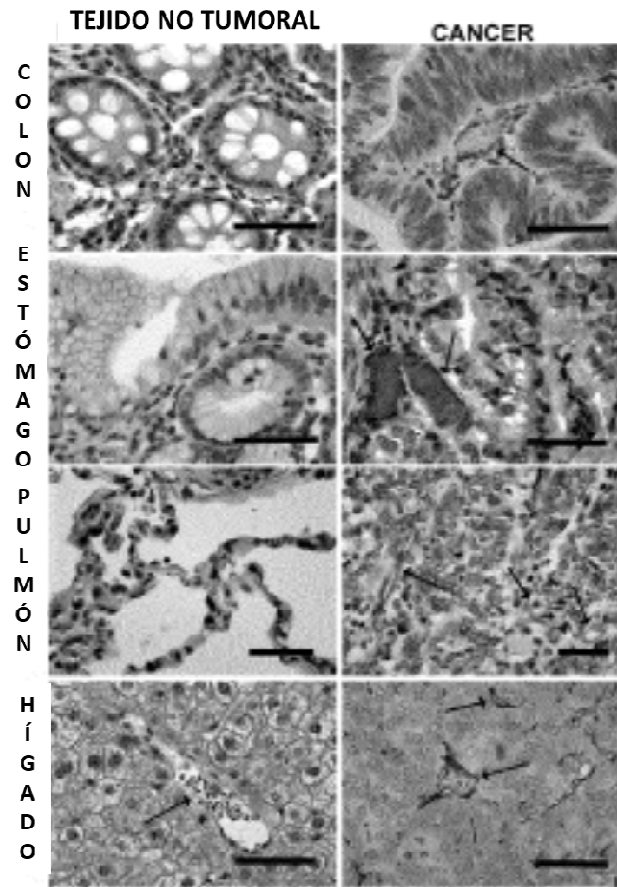


Figura 8A

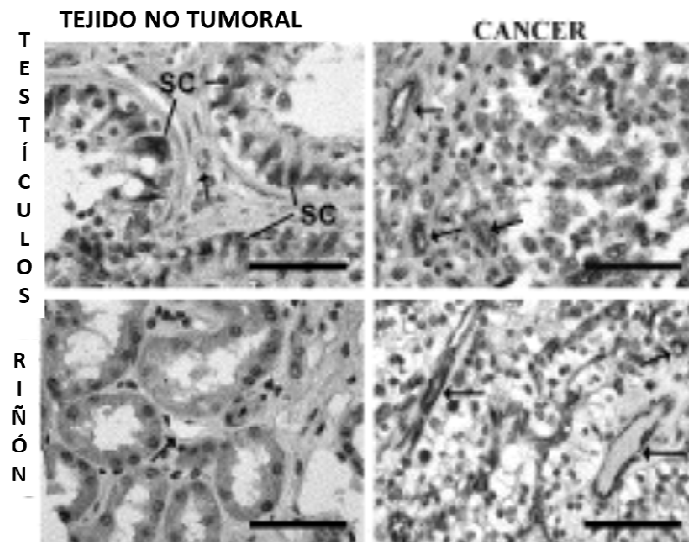


Figura 8B

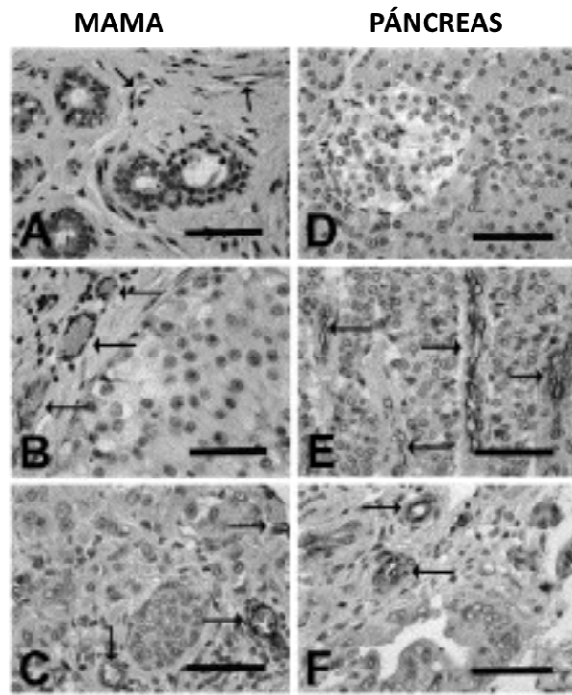


Figura 8C

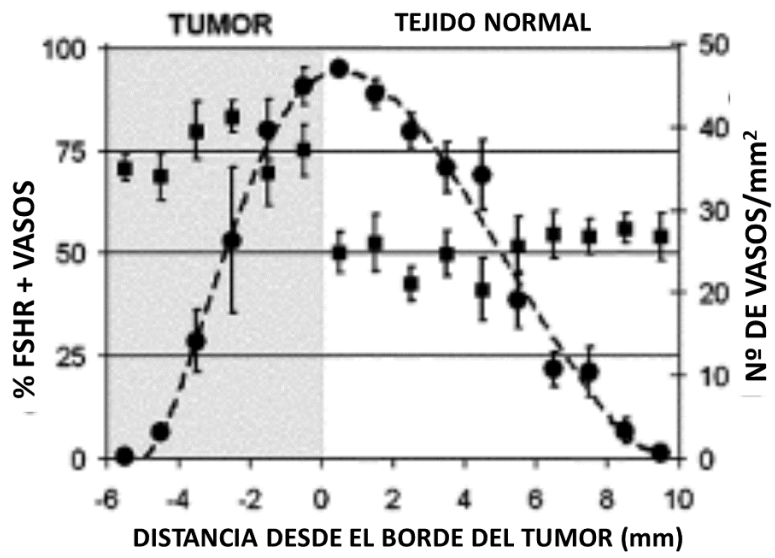


Figura 9

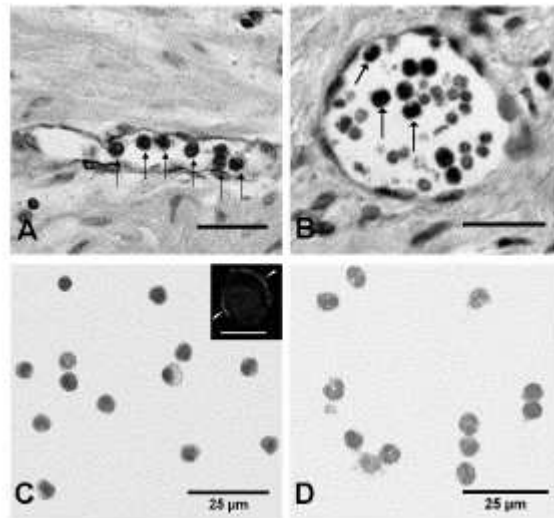


Figura 10

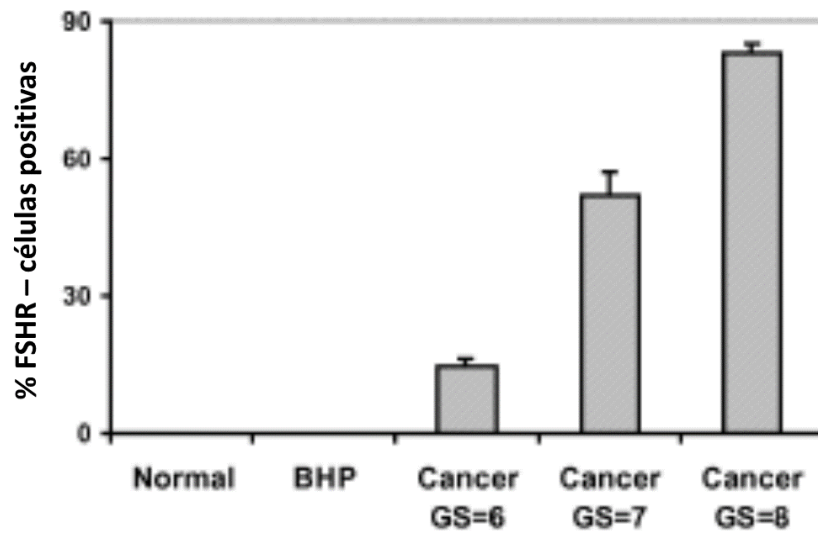


Figura 11