



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 106**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
C07K 14/80 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04019264 .3**
96 Fecha de presentación : **25.09.1996**
97 Número de publicación de la solicitud: **1475639**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2004**

54 Título: **Proteína P450 específica de tumores.**

30 Prioridad: **25.09.1995 GB 9519490**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.05.2011

73 Titular/es: **The University Court of the University of
Aberdeen
University Office, Regent Walk
Aberdeenshire, Aberdeen AB24 3FX, GB
University of Massachusetts**

72 Inventor/es: **Melvin, William Thomas;
Murray, Graeme Ian;
Burke, Michael Danny y
Greenlee, William Frank**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 358 106 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

Proteína p450 específica de tumores

5 Campo de la invención

[0001] Esta invención se refiere al diagnóstico y la terapia de tumores, y a los materiales y procedimientos de uso en los mismos.

10 **[0002]** Más particularmente, la invención se basa en la identificación de una forma del citocromo P450, específicamente la CYP1B1, en una amplia gama de tumores, con una elevada frecuencia de expresión en cada tipo, y propone el uso de esta enzima como marcador tumoral, y como la base de un enfoque terapéutico selectivo que implica el diseño de fármacos, por ejemplo que se activan a una forma citotóxica mediante la acción del CYP1B1.

15

Antecedentes de la invención

[0003] La meta principal en la quimioterapia contra el cáncer es el desarrollo de fármacos anticancerosos que sean eficaces contra una amplia gama de cánceres y no produzcan efectos tóxicos sobre los tejidos normales. La diana de este tipo de fármacos debe expresarse únicamente en células tumorales y no en las células normales. Sin embargo, hasta el momento, no se ha identificado una diana tumoral específica que sea general para todos los tipos de cáncer.

25 **[0004]** Los citocromos P450 son una familia multigénica de enzimas constitutivas e inducibles que tienen un papel primordial en la activación del metabolismo oxidativo y de detoxificación tanto de una amplia gama de xenobióticos (2-4) y de varios grupos de compuestos endógenos activos en la regulación celular y en la señalización celular incluyendo el ácido araquidónico (5), hormonas esteroideas (6) y ácidos grasos (7). Cada una de las familias principales de P450 implicadas en el metabolismo xenobiótico está constituida por varias formas individuales con mecanismos de regulación y especificidades de sustrato diferentes (2). La mayoría de los P450 se expresan principalmente en el hígado (2) aunque las formas individuales de P450 también se expresan en tejidos extrahepáticos específicos (8) incluyendo el intestino delgado, el riñón y los pulmones.

35 **[0005]** La familia del gen CYP1 humano (las formas individuales de P450 se identifican con el prefijo CYP según la actual nomenclatura del P450 (3)), que es una de las principales familias de P450 implicadas en el metabolismo de los xenobióticos, se sabe ahora que está compuesta por tres formas individuales clasificadas en dos subfamilias. La subfamilia CYP1A contiene dos miembros altamente homólogos y bien caracterizados pero diferentes, CYP1A1 (9) y CYP1A2 (10). CYP1A1 es un P450 inducible expresado principalmente en tejidos extrahepáticos (11) mientras que CYP1A2 es una forma importante de P450 que se expresa constitutivamente en el hígado (12). Recientemente se ha identificado una segunda subfamilia del CYP1 humano que hasta el momento contiene un miembro, CYP1B1 (1).
40 Este P450 es inducible por dioxina, y el análisis de la secuencia del CYP1B1 muestra una homología del 40% con ambos CYP1A1 y CYP1A2. Aunque CYP1B1 fue asignado a la familia CYP1 sobre la base de su secuencia, parece que es estructuralmente diferente tanto de CYP1A1 como de CYP1A2.

45 **[0006]** Se considera que varias formas del P450 tienen un papel importante en el desarrollo tumoral puesto que pueden metabolizar muchos carcinógenos y mutágenos potenciales (13). Adicionalmente, la actividad del P450 puede afectar la respuesta de tumores ya establecidos a fármacos anticancerosos: algunos agentes quimioterapéuticos anticancerosos pueden tanto activarse como detoxificarse mediante este sistema enzimático (14). La presencia de formas individuales del P450 se había investigado anteriormente en tipos diferentes de cáncer incluyendo cáncer de mama (15), cáncer de pulmón (16), cáncer de colon (17) y cáncer de cuello y cabeza (18) para
50 determinar si tiene lugar metabolismo intratumoral de los agentes anticancerosos debido al P450 y por tanto esto afecta a la respuesta tumoral a dichos agentes. Estos estudios han demostrado de forma general que el nivel de las formas P450 investigadas están significativamente reducido o ausente en tumores, en comparación con el tejido normal adyacente al que se ha desarrollado el tumor. Sin embargo, los estudios recientes de los inventores realizados sobre varios tipos de cáncer (19) incluyendo cáncer de mama, cáncer esofágico y sarcomas de tejidos
55 blandos han demostrado que puede existir una expresión específica del tumor de una forma CYP1 del P450.

[0007] Aunque el ARN de CYP1B1 se había identificado con anterioridad mediante transferencia Northern en varios tejidos humanos normales (1), la presencia de la propia proteína CYP1B1 no se había demostrado.

Resumen de la invención

[0008] La presente invención está basada en el descubrimiento de que el citocromo CYP1B1 es una forma específica tumoral del P450 presente en una amplia gama de tumores malignos y no detectado en tejidos normales.

5

[0009] Según esto, un primer aspecto de la presente invención proporciona el uso de un agente de reconocimiento que reconoce un epítipo del citocromo humano P450 CYP1B1 sobre la superficie de una célula tumoral, tanto formando parte de la proteína CYP1B1 completa como en forma degradada sobre la superficie de una célula unida a la proteína MHC, para la fabricación de un fármaco citotóxico, otro agente terapéutico, o un agente para formación de imagen dirigido a células tumorales, en el que dicho agente de reconocimiento comprende la región de unión a antígeno de un anticuerpo o aptámero de ARN.

10

[0010] También se proporciona un fármaco citotóxico, otro agente terapéutico o agente para formación de imagen dirigidos a células tumorales, para usar en el tratamiento o diagnóstico del cáncer, que comprende un agente de reconocimiento que reconoce un epítipo del citocromo humano P450 CYP1B1 sobre la superficie de una célula tumoral, tanto como parte de la proteína CYP1B1 completa o como en forma degradada sobre la superficie de una célula unida a la proteína MHC, en el que dicho agente de reconocimiento comprende la región de unión a antígeno de un anticuerpo o aptámero de ARN.

15

[0011] Así, se pueden utilizar los fragmentos del dominio de unión a antígeno de los anticuerpos, como los fragmentos Fab. También se pueden usar los denominados aptámeros de ARN (36, 37). Cuando se utilizan anticuerpos, pueden ser policlonales o monoclonales. Opcionalmente, el anticuerpo se puede producir por un procedimiento por el que reconozca un epítipo preseleccionado de dicha proteína CYP1B1.

20

[0012] Según se describe en la presente memoria, la presencia de la proteína CYP1B1 selectivamente en tumores, por ejemplo, en tumores renales y no en el tejido renal normal, combinado con la ausencia de la expresión de la proteína CYP1B1 en el hígado normal, es lo que proporciona un mecanismo para la dirección selectiva de fármacos anticancerosos basados en el metabolismo del CYP1B1 en tumores. Los fármacos pueden diseñarse para, o cribarse para, el metabolismo específico del CYP1B1 en tumores en los que este metabolismo convierte un resto no tóxico en uno tóxico, que mata o inhibe el tumor o lo vuelve más susceptible a otros agentes.

30

[0013] En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una secuencia del citocromo P450 CYP1B1 que es capaz de estimular el sistema inmune humano al activar linfocitos T colaboradores citotóxicos que reconocen los epítetos del citocromo humano P450 CYP1B1 en la preparación de un medicamento para implementar una respuesta mediada por células o humoral inmune contra una célula en la que se expresa CYP1B1.

35

[0014] La activación del sistema inmune se puede conseguir por inmunización con secuencias de CYP1B1.

[0015] Como la expresión de CYP1B1 es muy habitual en tumores de muchos tipos diferentes, es probable que esta enzima realice una función esencial para las células tumorales, por ejemplo, inactivando los compuestos antitumorales endógenos tales como 2-metoxiestradiol. En consecuencia, otro aspecto de la invención proporciona el uso de un ARN de sentido contrario que disminuye la síntesis del CYP1B1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

40

[0016] También se proporciona un ARN de sentido contrario capaz de disminuir la síntesis del CYP1B1 para uso en el tratamiento del cáncer.

45

Breve descripción de los dibujos

[0017]

50

La Fig. 1 muestra los procedimientos SDS-PAGE e inmunotransferencia usando un anticuerpo dirigido contra CYP1B1 para localizar la proteína CYP1B1 en tejido renal normal y tumoral y en tejido hepático normal.

La Fig. 2 muestra un SDS-PAGE e inmunotransferencia para detectar la proteína CYP1B1 en un tumor de mama y en tejido hepático normal.

55

La Fig. 3 muestra una inmunotransferencia de CYP1B1 en distintos tipos de tumores y tejidos normales.

La Fig. 4 muestra el ARNm de CYP1B1 y β -acción en muestras normales (A y B) y los correspondientes tumores (C

y D) que se han detectado mediante RT-PCR.

Descripción detallada de la invención

5 **[0018]** Se ha investigado la expresión de CYP1B1 en diferentes tipos de cáncer desarrollados en una amplia gama de lugares anatómicos (vejiga, mama, colon, riñón, pulmón, esófago, ovario, piel, estómago, útero, hueso y tejido conectivo, nódulos linfáticos, cerebro y testículos). Los tumores malignos primarios de estos tejidos constituyen tipos histogenéticos diferentes (carcinomas, linfomas, sarcomas, tumores neopitales y tumores de células germinales) con una conducta biológica diferenciada individualmente. Estos tumores también representan una gama de tipos
10 frecuentes y menos frecuentes de cáncer. La presencia de CYP1B1 también fue investigada en una amplia gama de tejidos normales.

[0019] La inmunohistoquímica de CYP1B1 mostró que en todos los tipos diferentes de tumores había una fuerte inmunorreactividad respecto de CYP1B1. La inmunorreactividad respecto de CYP1B1 se localizó específicamente
15 en células tumorales. Las células no tumorales, incluyendo las células de estroma, células inflamatorias, y células endoteliales presentes en las secciones de tumor no mostraron inmunorreactividad respecto de CYP1B1.

[0020] No se apreció heterogeneidad intratumoral significativa respecto de CYP1B1 y únicamente no se detectó CYP1B1 en cinco de 133 tumores. No hubo inmunorreactividad respecto de CYP1B1 en ninguno de los tejidos
20 normales estudiados entre los que se incluyeron hígado, riñón, intestino delgado y pulmón.

[0021] La ausencia o un bajo nivel de formas individuales del P450 en la mayoría de estudios de cáncer humano (15-18), combinada con una extrapolación de estudios sobre carcinogénesis hepática en roedores (25), ha llevado a la creencia general que las células tumorales no expresan significativamente P450. Sin embargo, los inventores han
25 demostrado ahora que CYP1B1 se expresa en una amplia gama de tumores malignos de tipos histogenéticos diferentes, y no está presente en tejidos normales, indicando que este P450 es una forma específica de tumor del P450. Los tumores están compuestos por una proporción variable de células tumorales y células no tumorales. Para identificar que una proteína es específica de un tumor, es importante demostrar que la proteína se localiza únicamente en células tumorales. La inmunohistoquímica permite la visualización directa de células tumorales y
30 tiene suficiente resolución espacial para separar las células tumorales de las células no tumorales. Además, es importante demostrar que no hay degradación diferencial de proteínas en las muestras de tejido normal en comparación con las muestras tumorales, y la inmunotransferencia de la β -actina (como proteína de control positivo) se demuestra que está presente en todas y cada una de las muestras normales y tumorales indicando que no se produce la degradación proteica. Adicionalmente, la tinción con azul de Coomassie de los geles de poliacrilamida no
35 mostró evidencia de degradación proteica, además, la inmunohistoquímica de las muestras tumorales proporcionó su propio control interno ya que las secciones de tumores contienen células no tumorales.

[0022] La presencia de CYP1B1 en muchos tipos de tumores sugiere que este P450 puede tener una función endógena crucial en las células tumorales y que CYP1B1 puede contribuir a la resistencia a fármacos que se
40 observa en muchos tipos de tumores. CYP1B1 puede que también sea importante en el desarrollo y progreso del tumor. Su identificación en una gama diversa de cánceres de tipos histogenéticos diferentes y su ausencia de los tejidos normales parece que convierte a CYP1B1 en uno de los cambios habituales de un producto génico en neoplasias malignas (26).

[0023] Una investigación anterior (1) encontró ARNm en tejidos normales. En algunos tumores, se encontró un aumento (2-4X) del ARNm en comparación con la normalidad. Esto puede deberse al aumento en la transcripción
45 mediada por un factor inducible de hipoxia. Este es un factor de transcripción heterodimérico novedoso que se induce por hipoxia, y en este caso el estímulo puede ser el microambiente hipóxico que puede aparecer en los tumores, y este factor puede tener como uno de sus componentes el translocador nuclear del receptor Ah (27). Sin embargo, la regulación de otras formas del P450 es compleja (2, 28) y la regulación del CYP1B1 en tumores es casi
50 tan compleja también, con múltiples mecanismos implicados entre los que se incluyen factores transcripcionales y post-transcripcionales.

[0024] La expresión específica de tumor de CYP1B1 tiene consecuencias importantes tanto para el diagnóstico
55 como para el tratamiento del cáncer. Se pueden desarrollar nuevos procedimientos diagnósticos basados en la presencia de CYP1B1 en células cancerosas, mientras que la expresión de CYP1B1 en células tumorales proporciona una diana molecular para el desarrollo de nuevos fármacos anticancerosos que se seleccionan activamente por el CYP1B1 contenido en las células tumorales. Como el CYP1B1 se encuentra en una amplia gama de tumores, sería de esperar que estos fármacos fueran eficaces para tratar muchos tipos de cáncer. Un rasgo

importante que se podría anticipar que estos fármacos no se asociarían a la toxicidad sistémica que limita el uso de los actuales fármacos anticancerosos ya que CYP1B1 no se aparece en tejidos normales especialmente del hígado, intestino delgado y riñón, que son los principales tejidos implicados en el metabolismo de los fármacos. Así, un problema principal para dirigir los fármacos a los tumores basándose en su activación selectiva mediante P450 ha sido el marcado metabolismo hepático del P450 de los fármacos, dando por resultado una disminución en la biodisponibilidad y/o toxicidad excesiva. La ausencia de la proteína CYP1B1 en el hígado resuelve este problema.

[0025] Con respecto al diagnóstico de tumores, se conocen y se pueden utilizar numerosos procedimientos para usar anticuerpos para detectar una proteína específica, incluyendo CYP1B1, en una muestra biológica, como se da a conocer en la presente memoria descriptiva. Si se desea, se pueden utilizar dos o más procedimientos que se complementen entre sí.

[0026] Un procedimiento preferido para usar según la presente revelación es el análisis inmunohistoquímico. El análisis inmunohistoquímico evita ventajosamente el efecto de dilución cuando un número relativamente pequeño de células cancerosas se encuentran en las células normales. Una etapa temprana del análisis inmunohistoquímico es la fijación del tejido, que preserva las proteínas en su lugar en el interior de las células. Esto evita el mezclado sustancial de proteínas procedentes de células diferentes. Como resultado, las células normales circundantes no disminuyen la detectabilidad de las células cancerosas que contienen CYP1B1. Esto se diferencia de los procedimientos de ensayo que implican la homogeneización del tejido. Tras la homogeneización del tejido, la proteína CYP1B1 procedente de las células cancerosas se mezcla con las proteínas de cualesquiera células normales circundantes presentes en la muestra de tejido. La concentración de la proteína CYP1B1 se reduce por tanto en la muestra preparada, y queda por debajo de los límites detectables. El análisis inmunohistoquímico tiene al menos otras tres ventajas. Primero, requiere menos tejido que el necesario en procedimientos alternativos como el análisis por transferencia Western o el inmunoensayo. En segundo lugar, proporciona información sobre la localización intracelular y la distribución del material inmunorreactivo. En tercer lugar, se puede obtener información sobre la morfología celular a partir de la misma sección fina usada para ensayar la presencia de la proteína CYP1B1. Preferiblemente, en el análisis inmunohistoquímico, se prefiere preparar y analizar varias secciones finas procedentes de cada muestra de tejido. Esto aumenta la probabilidad de encontrar pequeños tumores.

[0027] Otro procedimiento de anticuerpos preferido que se da a conocer en la presente memoria descriptiva es el análisis mediante transferencia Western, es decir, la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) seguida por inmunotransferencia. La preparación de la muestra para el análisis por transferencia Western incluye la homogeneización del tejido y opcionalmente el aislamiento de microsomas. El análisis por transferencia Western tiene la ventaja de detectar la inmunorreactividad para proteínas que se han separado con alta resolución, según su peso molecular (aparente).

[0028] Los inmunoensayos como los ensayos de captura de anticuerpos, ensayos con anticuerpos en sándwich y los ensayos de captura de antígeno también se pueden utilizar según la presente memoria descriptiva. La preparación de la muestra para los inmunoensayos incluye la homogeneización del tejido y opcionalmente el aislamiento de microsomas. Los inmunoensayos tienen la ventaja de permitir que grandes cantidades de muestras se prueben relativamente rápido, y a menudo ofrecen precisión cuantitativa.

[0029] Los principios y prácticas de la inmunohistoquímica, análisis por transferencia Western y los inmunoensayos son bien conocidos. La persona normalmente experta en la técnica puede seleccionar los protocolos adecuados y realizar los análisis inmunohistoquímicos, los análisis por transferencia Western y los inmunoensayos (30).

Detalles experimentales

1. Preparación de los anticuerpos

[0030] Como ya se ha indicado, los procedimientos diagnósticos que se dan a conocer en la presente memoria pueden utilizar convenientemente un anticuerpo que reconozca la CYP1B1 humana. La especificidad de anticuerpo respecto de la proteína CYP1B1 es preferible, pero no necesaria. Preferiblemente, cualquier proteína no CYP1B1 reconocida por el anticuerpo se distingue rápidamente de la CYP1B1, por ejemplo según el peso molecular aparente en una transferencia Western. Con la selección de un protocolo de ensayo adecuado, que está entre las capacidades normales del experto en la técnica, los procedimientos descritos en la presente memoria se pueden llevar a la práctica con un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

[0031] Un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal adecuado para usar en los procedimientos que se dan

a conocer en la presente memoria se puede obtener según procedimientos convencionales (30). La preparación de anticuerpos que reaccionan con la proteína CYP1B1 es conocida (31). Los procedimientos para obtener anticuerpos que reaccionan con la proteína CYP1B1 humana se pueden llevar a cabo utilizando la preparación de una proteína CYP1B1 no humana, por ejemplo, una proteína CYP1B1 de murino. Una preparación de la proteína CYP1B1 adecuada para generar anticuerpos útiles en los procedimientos que se dan a conocer en la presente memoria se puede obtener según diferentes procedimientos, incluyendo los que están descritos (31).

[0032] Los anticuerpos para usar como agentes de reconocimiento según se definen en las reivindicaciones se pueden obtener por inmunización de un animal con una preparación que contiene la proteína CYP1B1 intacta. Alternativamente, se pueden obtener anticuerpos útiles por inmunización de un animal con un polipéptido u oligopéptidos que corresponda a uno o más de los epítomos de la proteína CYP1B1.

Preparación

[0033] Para preparar un anticuerpo según el último enfoque, se sintetizaron dos péptidos de 15 mer correspondientes a los epítomos de la proteína CYP1B1 humana. Cada uno corresponde a una posible región bucle superficial de la enzima CYP1B1. El primer péptido (designado como 217A) está compuesto por 14 aminoácidos, es decir, ESLRPGAAPR DMMD (SEQ ID NO: 1). El péptido 217A representa los aminoácidos en las posiciones 312-325 de la secuencia de aminoácidos deducida. Se incluyó una cisteína carboxiterminal para usar en una reacción de conjugación. El segundo péptido (designado como 218A) está compuesto por 14 aminoácidos, es decir EKKAAGDSHG GGAR (SEQ ID NO: 2). El péptido 218A representa las posiciones 332-345 de la secuencia de aminoácidos deducida. Se incluyó una cisteína carboxiterminal para usar en una reacción de conjugación. Cada uno de estos péptidos se conjugó directamente a KLH.

[0034] Se inmunizaron conejos New Zealand macho en varios lugares anatómicos utilizando 100 µg del péptido 217A conjugado o con el péptido 218A conjugado. Los conjugados se disolvieron en 300 µl de PBS mezclado con 300 µl de Adyuvante completo de Freund. Tres semanas después de la inmunización inicial, se proporcionó a los conejos una dosis de refuerzo con 50 µg de cada uno de los conjugados (contenidos en 300 µl de PBS mezclado con 300 µl de Adyuvante incompleto de Freund, inyectado en varios sitios. Una semana después (cuatro semanas después de la inyección inicial) se proporcionó de nuevo a los conejos una dosis de refuerzo, usando el mismo protocolo. Una semana después de esta segunda dosis de refuerzo, se recogió la primera muestra de suero. A continuación, se dio a los conejos un nuevo refuerzo, y se recogieron semanalmente muestras de suero. Las muestras de suero se cribaron respecto al título de anticuerpo dirigido contra CYP1B1 y la especificidad por transferencia Western respecto a una proteína de fusión de unión CYP1B1 humana-maltosa expresada en *E. coli*, y de la proteína CYP1B1 humana expresada en células COS-1.

[0035] Los anticuerpos dirigidos contra IgG de CYP1B1 se purificaron mediante cromatografía de inmunoafinidad. La cromatografía se llevó a cabo usando el péptido CYP1B1 adecuado unido directamente a un éster de N-hidroxisuccinamida comercial o un soporte en lecho de gel de agarosa reticulado derivatizado (AffiGel 10; Biorad, Richmond, CA). La conjugación y la cromatografía se llevaron a cabo según los protocolos recomendados por el vendedor.

2. Detección de la proteína CYP1B1 y su ARNm

[0036] En general en los experimentos que siguen, las muestras de tejido normal se obtuvieron a partir de especímenes de tejido que se obtuvieron de pacientes que se sometieron a cirugía debido a una enfermedad cancerosa. El hígado, estómago e intestino delgado normales se obtuvieron igualmente de donantes de trasplante de órganos. Todas las muestras de tejido se procesaron inmediatamente tras la extirpación para evitar cualquier degradación de la proteína o el ARNm y asegurar que no hay deterioro en la morfología tisular. Los inventores previamente habían demostrado que el hígado humano obtenido de esta forma no tiene pérdidas o degradación de las formas individuales del P450 hepático (20). Los bloques de tejido para inmunohistoquímica se fijaron en formalina neutra tamponada al 10% durante 24 h y a continuación se incluyeron en cera, mientras que las muestras de tejido para análisis mediante inmunotransferencia y ARNm se congelaron rápidamente en nitrógeno y se almacenaron a -80°C antes del uso.

[0037] La presencia de la proteína CYP1B1 en muestras tisulares se investigó mediante inmunohistoquímica (21) y electroforesis en gel de poliacrilamida con docecil sulfato sódico (SDS-PAGE) combinada con inmunotransferencia (22). La inmunohistoquímica asegura la identificación de tipos específicos de células que contienen CYP1B1 y es

una técnica ideal para investigar la presencia de CYP1B1 en células tumorales ya que los tumores están compuestos por una proporción variable de células tumorales y no tumorales.

5 **[0038]** Se utilizó la inmunohistoquímica para determinar la ubicación y distribución celular de CYP1B1 y se llevó a cabo en secciones incluidas en cera fijadas con formalina usando dos anticuerpos que reconocen CYP1B1. Los sitios de inmunorreactividad se detectaron usando una técnica de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP) (21). Las muestras de tejido normal y tumoral se fijaron en formalina neutra tamponada al 10% durante 24 h y a continuación se incluyeron en cera. Las secciones se cortaron y extendieron sobre portas de vidrio y para la inmunohistoquímica, se eliminó la cera de las secciones de tejidos normales y tumorales con xileno, se rehidrataron en alcohol y después se lavaron secuencialmente en agua fría y Tris-HCl 0,05M (pH 7,6) que contenía cloruro de sodio 0,15 M (TBS). A continuación, las secciones se inmunotifieron con los anticuerpos de CYP1B1. Posteriormente, se aplicaron secuencialmente inmunoglobulina monoclonal de ratón dirigida contra conejo (1/100, Dako Ltd, High Wycombe, Bucks; Reino Unido), inmunoglobulina de conejo dirigida contra ratón (1/100, Dako) y APAAP monoclonal de ratón (1/100, Dako) a las secciones de tejido durante 30 minutos cada una. Entre las aplicaciones de anticuerpo, las secciones se lavaron con TBS para eliminar el anticuerpo no unido. Los sitios de unión de la fosfatasa alcalina se identificaron mediante la técnica del bromo-cloro-indol fosfato y nitroazul de tetramonio como sustrato para la enzima. Tras incubar las secciones durante 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo lavando las secciones con agua corriente fría. Las secciones se secaron al aire a continuación y se montaron en gelatina de glicerina. Las secciones se examinaron con microscopía óptica de campo brillante para establecer la presencia o ausencia de inmunotinción, y su distribución.

10 **[0039]** SDS-PAGE e inmunotransferencia fueron seguidas de la técnica de quimioluminiscencia potenciada (ECL) como se describe a continuación. También se llevó a cabo la inmunotransferencia con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la β -actina (clon nº AC-15, Sigma, Poole, Dorset, Reino Unido) para demostrar la presencia de una proteína de control positivo en las muestras tumorales y normales y para indicar que no hay evidencia de degradación de proteínas en ninguna de las muestras tisulares.

15 **[0040]** La presencia de CYP1B1 en cada tumor que demostró CYP1B1 mediante inmunohistoquímica, y la ausencia de CYP1B1 detectable en tejidos normales, se confirmó por análisis mediante análisis por transferencia Western. Las proteínas sometidas a análisis por transferencia Western procedían de preparaciones aisladas de microsomas.

20 **[0041]** Los microsomas se prepararon esencialmente según se ha descrito (32). Las muestras de tejido se descongelaron en 25 ml de tampón Tris-HCl 0,01 M pH 7,4, que contenía KCl al 1,15% antes de homogeneizarse en tampón Tris-HCl 0,01 M pH 7,4, que contenía sacarosa 0,25 M, glicerol al 15%, utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax (tipo TP 18/2; Janke y Kunkel AG, Staufen Breisgau, Alemania). Tras centrifugar a 15.000 x g durante 20 min, el sobrenadante se retiró y se volvió a centrifugar a 116.000 x g durante 50 min. El aglomerado se volvió a suspender en un primer momento en tampón Tris-HCl 0,1 M Tris-HCl pH 7,4, que contenía glicerol al 15%, EDTA 1 mM, y se volvió a centrifugar 116.000 x g durante 50 min. El aglomerado se volvió a suspender por segunda vez en el tampón Tris-HCl-glicerol- EDTA. Se determinó la concentración de proteína microsomial (34).

25 **[0042]** Se empleó un sistema discontinuo con gel de acrilamida, ya descrito (33) con modificaciones (32), para la separación de proteínas de los microsomas. Se cargaron en el gel 20 μ l de una preparación de 1 mg/ml de muestras normales y 40 μ l de una preparación de 0,5 mg/ml de muestras tumorales, en Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, que contenía docecil sulfato de sodio al 2,35% (p/v), 2-mercaptoetanol al 5% (v/v), y azul de bromofenol como colorante de rastreo al 0,005%. 10 μ l de una preparación 1 mg/ml de microsomas hepáticos humanos se utilizaron como controles positivos. Las muestras se analizaron con un gel sin gradiente al 10% a 30 mA.

30 **[0043]** Tras el SDS-PAGE, las proteínas resueltas se inmunotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell; Dassel, Alemania) durante la noche según se ha descrito (35). Los sitios de unión no específica se bloquearon con PBS que contenía leche desnatada al 2% (p/v), TWEEN 20™ al 0,05% (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación continua. Este tampón también se usó en las etapas de lavado. La membrana de nitrocelulosa se incubó a continuación con anticuerpo específico de CYP1B1 (1:1000) durante 90 minutos y con inmunoglobulina de cabra dirigida contra conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (1:2000) durante 60 minutos. La membrana se lavó durante tres periodos sucesivos de 15 minutos y un periodo de 60 minutos tras cada incubación para eliminar el anticuerpo no unido. La peroxidasa de rábano picante se visualizó a continuación con un kit Enhanced Chemiluminescence (ECL) (Amersham International, Aylesbury, Bucks, Reino Unido). La detección se llevó a cabo según se describe en

el protocolo ECL con película de rayos X (Hyperfilm-ECL; Amersham) expuesta durante 30 segundos.

Ejemplos

5 Ejemplo 1

[0044] Se investigó la expresión de CYP1B1 en el riñón normal y en riñones tumorales.

10 [0045] Se utilizaron especímenes de nefrectomía (n=10) extirpados de un carcinoma de células renales primarias. Las muestras o el riñón normal se toman al menos varios centímetros lejos del borde de cada tumor, y solo se muestrearon los tumores macroscópicamente viables. Los hígados normales humanos (n=5) se obtuvieron de donantes de trasplantes y se almacenaron a -80°C antes del uso.

15 [0046] Los microsomas de riñón normal, tumores renales e hígado normal se prepararon y sometieron a procedimientos SDS-PAGE e inmunotransferencia con una técnica de quimioluminiscencia potenciada (21, 22) usando un anticuerpo policlonal dirigido contra CYP1. El reconocimiento de CYP1B1 humano se demostró usando una proteína de fusión CYP1B1 recombinante unida a maltosa expresada en E coli. Los CYP1A1 y CYP1A2 expresados fueron suministrados por el Dr C L Crespi, Gentest Corp, Ma, EEUU. Los resultados se muestran en la Fig. 1: banda 1 hígado humano, banda 2 proteína CYP1B1 recombinante expresada, bandas 3, 5, 7, 9, 11 muestras
20 de riñón normal, bandas 4, 6, 8, 10, 12 tumores de riñón correspondientes. La misma cantidad de proteína microsomial (30 µg) se cargó en cada banda, permitiendo de este modo una comparación directa entre las muestras renales y hepáticas.

25 [0047] Como se muestra en la Fig. 1, los tumores renales y el CYP1B1 expresado muestra una única banda inmunorreactiva a 60 kDa correspondiente al peso molecular del CYP1B1 expresado. En el riñón normal, ninguna de las muestras mostró una banda inmunorreactiva a 60kDa. Además, ninguna de las muestras de tumores renales ni de riñón normal mostró la presencia de CYP1A1.

30 [0048] La inmunotransferencia de muestras de hígado mostró una banda inmunorreactiva a 54 kDa correspondiente a un peso molecular de CYP1A2. La intensidad de la banda a 54 kDa mostró variación de hígado a hígado, mientras que no se apreció banda inmunorreactiva de CYP1B1 a 60 kDa en cualquiera de las muestras hepáticas.

35 Ejemplo 2

[0049] También se investigó la expresión de CYP1B1 en cáncer de mama mediante inmunotransferencia.

40 [0050] Las muestras de tejido mamario se obtuvieron de pacientes sometidos a cirugía tanto por cáncer de mama primario o enfermedad mamaria no neoplásica. Se llevó a cabo la inmunotransferencia en cánceres de mama obtenidos de seis pacientes (intervalo de edades 45-67; tres no fumadoras, información no disponible para tres pacientes), e histológicamente todos los tumores fueron carcinomas sin tipo especial. Las muestras de tejido se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C antes del análisis.

45 [0051] El SDS-PAGE y la inmunotransferencia se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente. CYP1B1 se detectó usando el anticuerpo policlonal dirigido contra CYP1 al que se ha hecho referencia anteriormente. Los resultados se muestran en la Fig. 2: banda 1 hígado humano, banda 2 CYP1B1 expresado, bandas 3-8 tumores de mama. Como puede observarse, se identificó una única banda de proteína con un peso molecular de 60 kDa correspondiente al peso molecular de la proteína CYP1B1 expresada. Como anteriormente, CYP1B1 no fue detectable en la muestra hepática, pero sí se detectó CYP1A2.

50 Ejemplo 3

[0052] Se utilizó la inmunohistoquímica para demostrar la presencia de CYP1B1 específicamente en una variedad de tejidos normales y tumorales. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Fig. 3.

55 [0053] Se investigó la localización inmunohistológica de CYP1B1 en tumores y tejidos normales desde el carcinoma ductal invasivo de mama, adenocarcinoma endometrial, carcinoma de células transicionales de la vejiga, linfoma maligno difuso de alto grado, astrocitoma del cerebro de alto grado, sarcoma de tejido blando (histiocitoma

fibroso maligno) hígado normal, riñón normal, intestino delgado normal. El anticuerpo usado fue el anticuerpo policlonal dirigido contra CYP1B1 218A que se ha descrito anteriormente.

- 5 **[0054]** La Fig. 3 muestra una inmunotransferencia de CYP1B1 en diferentes tipos de tumores y tejidos normales. Banda 1 colon normal, banda 2 adenocarcinoma de colon, banda 3 riñón normal, banda 4 carcinoma de riñón, banda 5 mama normal, banda 6 cáncer de mama, banda 7 yeyuno normal, banda 8 estómago normal, banda 9 hígado normal, banda 10 tumor de Müllerian mixto maligno, banda 11 adenocarcinoma endometrial, banda 12 carcinoma de ovario, banda 13 linfoma difuso de linfocitos B, banda 14 carcinoma de células transicionales, banda 15 carcinoma de pulmón, banda 16 control positivo (células tumorales de riñón ACHN inducidas por dioxina (panel A solo). En el panel B, la misma serie de muestras de tejido se ha sometido a inmunotransferencia para β -actina, que está presente en todas las muestras tumorales y normales. Una tinción con azul de Coomassie de los geles de poliacrilamida de la misma serie de muestras tisulares no mostró evidencia de degradación proteica. Los resultados demuestran que este P450 está específicamente localizado en células tumorales y que no hay inmunoreactividad respecto del CYP1B1 en tejidos normales.
- 15

Tabla 1

Expresión de CYP1B1 en tejidos tumorales y tejidos normales.			
Tejido	Normal	Tumor	
	no pos./ no ensayado	no pos./ no ensayado	Diagnóstico histopatológico
Vejiga	0/8	8/8	carcinoma de células transicionales
Cerebro	0/12	11/12	astrocitoma
Mama	0/10	12/12	carcinoma ductal invasivo
Colon	0/10	11/12	adenocarcinoma
Tejido conectivo	0/9	8/9	sarcoma
Riñón	0/11	11/11	carcinoma de células transparentes n= 10; carcinoma de células transicionales n=1
Hígado	0/8	no ensayado	no ensayado
Pulmón	0/8	7/8	carcinoma escamoso
Nódulo linfático	0/5	9/9	linfoma no de Hodgkin
Esófago	0/8	8/8	carcinoma escamoso
Ovario	no ensayado	7/7	adenocarcinoma
Piel	0/6	6/6	carcinoma escamoso
Intestino delgado	0/5	no ensayado	no ensayado
Estómago	0/10	9/10	adenocarcinoma
Testículo	0/8	14/14	tumores malignos de células germinales
Útero	0/5	7/7	adenocarcinoma n=5; tumor de Mullerian maligno mixto n=2
Total	0/123	128/133	

Ejemplo 4

- 20 **[0055]** Se realizaron experimentos para detectar el ARN de CYP1B1 en varios tejidos tumorales y sanos.

[0056] Se llevaron a cabo experimentos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para detectar el ARNm de CYP1B1 según se ha descrito en McKay y col. (23). El ARN se extrajo de las

muestras tisulares y se sintetizó el ADNc a partir del ARN aislado usando oligo (dT). Los cebadores de CYP1B1 tuvieron las siguientes secuencias: sentido directo 5'-AAC TCT CCA TCA GGT GAG GT-3' (nt 2104-2123); sentido contrario 5'-TAA GGA AGT ATA CCA GAA GGC -3' (nt 2573-3593) dando un producto de PCR con 489 pb. Se utilizó la β -actina como control positivo para confirmar la presencia y la integridad del ARNm en cada muestra, y los

5 cebadores de la β -actina se adquirieron de Stratagene (Cambridge, Reino Unido) y tenían las siguientes secuencias: sentido directo 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3' (nt 1067-1105); sentido contrario 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG-3' (nt 1876-1905). Se llevó a cabo la PCR con 35 ciclos de amplificación tanto para CYP1B1 como para la β -actina según se ha descrito (23). El control positivo de CYP1B1 fue un ADNc de 2,78 kb de CYP1B1 y el control negativo fue agua esterilizada en lugar del ADNc. Tras la PCR, 10 μ l de

10 producto de la PCR se sometieron a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,5% que incorporaba bromuro de etidio al 0,007% p/v y se visualizó con iluminación UV. El producto de la PCR de CYP1B1 se secuenció, tras purificación, mediante la técnica didesoxi de secuenciación directa con un kit de secuenciación T7 (Farmacia, Milton Keynes, Reino Unido) usado según el protocolo del fabricante. Para investigar adicionalmente la cantidad relativa de ARNm de CYP1B1 en tejidos normales y tumorales, se llevó a cabo una RT-PCR semicuantitativa de muestras renales

15 normales y tumorales usando la dilución en serie del ADNc (24). Se utilizó el ARNm de la β -actina como control interno (29).

[0057] La Fig. 4 muestra el ARNm de CYP1B1 y β -actina en muestras normales (A y B) y las correspondientes tumorales (C y D) que se habían detectado mediante RT-PCR. Bandas 1 riñón, banda 2 colon, banda 3 piel, banda 4

20 esófago, banda 5 estómago, banda 6 nódulo linfático, banda 7 mama.

[0058] El análisis de los tumores mediante RT-PCR mostró que todas las muestras tumorales en las que se había identificado CYP1B1 contenían el ARNm de CYP1B1. El producto de la PCR tuvo el tamaño molecular esperado cuando fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa. La secuenciación del producto de la PCR confirmó

25 la identidad con CYP1B1.

Notas de conclusión

[0059] La ausencia o un bajo nivel de formas individuales del P450 en la mayor parte de estudios de cáncer humano (15-18), combinada con la extrapolación de estudios de carcinogénesis hepática en roedores (25), ha llevado a la creencia general de que las células tumorales no expresan el P450 de forma significativa. Sin embargo, los inventores han demostrado ahora que CYP1B1 se expresa en una amplia variedad de tumores malignos de tipos histogénéticos diferentes y no está presente en tejidos normales, indicando que este P450 es una forma tumoral específica de P450. Los tumores están compuestos por una proporción variable de células tumorales y células no tumorales. Para identificar si una proteína es específica de un tumor, es importante demostrar que la proteína solo se localiza en células tumorales. La inmunohistoquímica permite la visualización directa de las células tumorales, y tiene la resolución espacial suficiente para separar células tumorales de las células no tumorales. Además, es importante demostrar que no se produce una degradación diferencial de las proteínas del tejido normal en comparación con las muestras tumorales, y la inmunotransferencia de la β -actina (como proteína de control positivo) demostró estar presente en todas y cada una de las muestras normales y tumorales indica que no se produce la degradación proteica. Además, la tinción con azul de Coomassie de los geles de poliacrilamida no mostró evidencias de degradación proteica. Adicionalmente, la inmunohistoquímica de las muestras tumorales proporcionó su propio control interno puesto que las secciones de tumor contienen células no tumorales.

45 Referencias

[0060]

1. T.R. Sutter y col., J. Biol. Chem. 269, 10392 (1994)
2. S.A. Wrighton y J.C. Stevens, Crit. Rev. Toxicol. 22, 1 (1992)
- 50 3. D.R. Nelson y col., Pharmacogenetics 6, 1 (1996)
4. T. Shimada y F.P. Guengerich, Chem. Res. Toxicol. 4, 391 (1991); V. Nedelcheva y I. Gut, Xenobiotica 24, 1151 (1994); B.K. Park, M. Pirmohamed, N.R. Kitteringham, Pharmac. Ther. 58, 385 (1995).
5. J.H. Capdevila, J.R. Falck, R.W. Estabrook, FASEB J. 6, 731 (1992)
6. W.L. Miller, Endocrine Rev. 9, 295 (1988) 7. E.H. Oliw, Prog. Lipid Res. 33, 329 (1994)
- 55 8. G.I. Murray y M.D. Burke, Biochem. Pharmacol. 50, 895 (1995); L.S. Kaminsky y M.J. Fasco, Crit. Rev. Toxicol. 21, 407 (1992); E.G. Scheutz y col., Arch. Biochem. Biophys. 294, 206 (1992)
9. A.K. Jaiswal, F.J. Gonzalez, D.W. Nebert, Science 228, 80 (1985)
10. A.K. Jaiswal, D.W. Nebert, F.J. Gonzalez, Nucl. Acid Res. 14, 6773 (1986)

11. D. Sesardic, M. Pasanen, O. Pelkonen, *Carcinogenesis* 11, 1183 (1990)
12. H. Schweikl y col., *Pharmacogenetics* 3, 239 (1993)
13. F.J. Gonzalez y H.V. Gelboin, *Drug Metab. Rev.* 26, 165 (1994); F.P. Guengerich, *Cancer Res.* 48, 2946 (1988); K. Kawajiri e Y. Fujii-Kuriyama, *Jpan. J. Cancer Res.* 82, 1325 (1991); F.P. Guengerich, *Pharmac. Ther.* 54, 17 (1992)
14. G.A. Le Blanc y D.J. Waxman, *Drug Metab. Rev.* 20, 395 (1989); K.T. Kivisto, H.K. Kroemer, M. Eichelbaum. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 40, 523 (1995)
15. N. Albin y col., *Cancer Res.* 53, 3541 (1993)
16. C. Toussaint y col., *Cancer Res.* 53, 4606 (1993); M. Czerwinski y col., *Cancer Res.* 54, 1085 (1994)
17. W.H.M. Peters y col., *Gastroenterology* 103, 448 (1992); I. de Waziers y col., *Carcinogenesis* 12, 905 (1991); L. Massad y col., *Cancer Res.* 52, 6567 (1992); K. Mekhail-Ishak y col., *Cancer Res.* 49, 4866 (1989)
18. F. Janot y col., *Carcinogenesis* 14, 1279 (1993)
19. G.I. Murray y col., *Br. J. Cancer* 63, 1021 (1991); G.I. Murray y col., *J. Pathol.* 171, 49 (1993); G.I. Murray y col., *Gut* 35, 599 (1994)
20. R.J. WeaveR y col., *Biochem. Pharmacol.* 47, 763 (1994)
21. J.A. McKay y col., *J. Histochem. Cytochem.* 43, 615 (1995)
22. D.C. Spink y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 242-348 (1992)
23. J.A. McKay y col., *FEBS Letts.* 374, 270 (1995)
24. M. J. Dallman y A.C.G. Porter, in *PCR, A practical approach*, eds J. McPherson, P. Quirke y G.R.Taylor (IRL Press, Oxford) p 215-224.
25. A. Buchmann y col., *Carcinogenesis* 6, 513 (1985); M.W. Roomi, R.K. Ho, D.S.R. Sarma, E. Farber, *Cancer Res.* 45, 564 (1985); A. Buchmann y col., *Cancer Res.* 47, 2911 (1987)
26. T.G. Krontiris, *N. Engl. J. Med.* 333, 303 (1995); L.M. Ponz de Leon, *Recent Res. Cancer Res.* 136, 35 (1994); S.K. Bahra, B.K.A. Rasheed, S.H. Bigner, D.D. Bigner, *Lab. Invest.* 71, 621 (1994)
27. G.L. Wang, B-H. Jiang, E.A. Rue, G.L. Semenza, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5510 (1995)
28. J.P. Whitlock y col., *FASEB. J.* 10, 809 (1996)
29. T. Horishiki y col., *Cancer Res.* 52, 108 (1992)
30. Harlow y col., *Antibodies - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY (1988)
31. Otto y col., *Endocrinology* 129:970-982 (1991)
32. Weaver y col. *Biochem. Pharmacol.* 46:1183-1197 (1993)
33. Laemmli, *Nature* 227:68 (1970)
34. Lowry, J. *Biol. Chem.* 193:265 (1951)
35. Towbin y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350 (1979)
36. J. R. Williamson, *Nature* 382:112-113 (1996)
37. A. D. Ellington y col., *Nature* 346:818-822 (1990)

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente de reconocimiento que reconoce un epítipo de citocromo humano P450 CYP1B1 sobre la superficie de una célula tumoral, tanto como parte de la proteína CYP1B1 completa o en una forma degradada sobre
5 la superficie de una célula unida a una proteína MHC, para la fabricación de un fármaco citotóxico, otro agente terapéutico, o un agente para formación de imagen que se dirige a células tumorales, en el que dicho agente de reconocimiento comprende la región de unión a antígeno de un anticuerpo o aptámero de ARN.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho agente de reconocimiento es un anticuerpo policlonal o
10 monoclonal.
3. Un fármaco citotóxico, otro agente terapéutico, o un agente para formación de imagen que se dirige a células tumorales, para uso en el tratamiento o diagnóstico del cáncer, que comprende un agente de reconocimiento que reconoce un epítipo de citocromo humano P450 CYP1B1 sobre la superficie de una célula tumoral, tanto como
15 parte de la proteína CYP1B1 completa o en una forma degradada sobre la superficie de una célula unida a una proteína MHC, en el que dicho agente de reconocimiento comprende la región de unión a antígeno de un anticuerpo o aptámero de ARN..
4. Un fármaco citotóxico, otro agente terapéutico, o un agente para formación de imagen según la reivindicación
20 3 en el que dicho agente de reconocimiento es un anticuerpo policlonal o monoclonal.
5. Uso de la secuencia de un citocromo P450 CYP1B1 que es capaz de estimular el sistema inmune humano por activación de los linfocitos citotóxicos o T colaboradores que reconoce los epítipos del citocromo humano P450 CYP1B1 en la preparación de un medicamento para implementar una respuesta inmune mediada por células o
25 humoral contra una célula en la que se expresa CYP1B1.
6. Uso de un ARN de sentido contrario que disminuye la síntesis de CYP1B1 en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer.
- 30 7. Un ARN de sentido contrario capaz de disminuir la síntesis de CYP1B1 para usar en el tratamiento del cáncer.



Fig 1

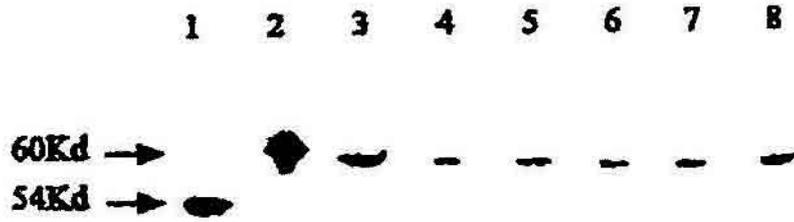


Fig 2

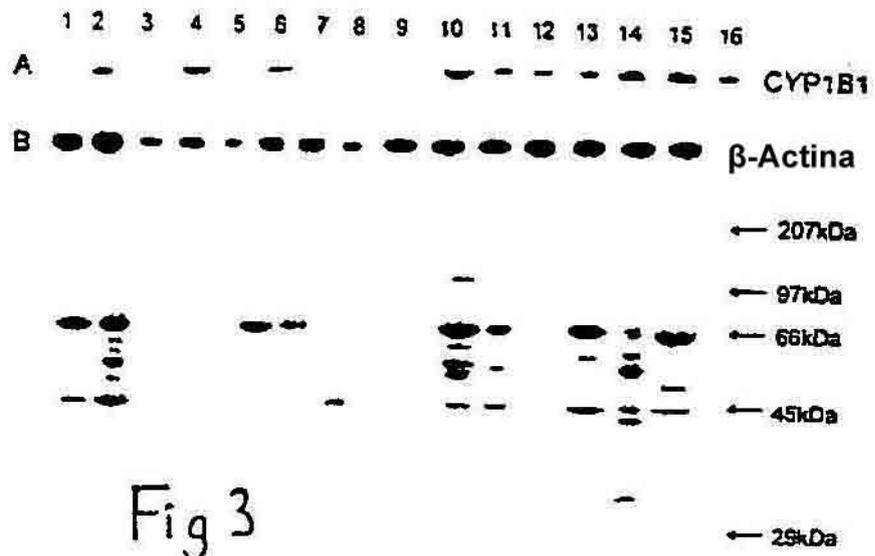


Fig 3

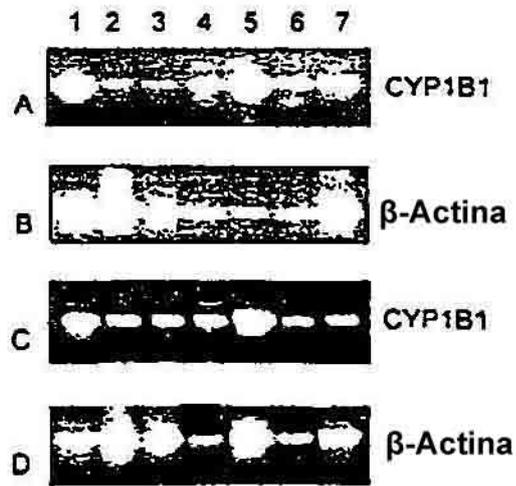


Fig 4