

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 337**

21 Número de solicitud: 201030905

51 Int. Cl.:

C07K 14/60 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **10.06.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
18.01.2012

71 Solicitante/s: **Servicio Andaluz de Salud
Avda. de la Constitución, 18
41001 Sevilla, ES
Universidad de Córdoba y
The Board of Trustees of the University of Illinois**

72 Inventor/es: **Benito López, Pedro;
Castaño Fuentes, Justo Pastor;
Luque Huertas, Raúl Miguel;
Gahete Ortiz, Manuel David;
Gracia Navarro, Francisco;
Martínez Fuentes, Antonio Jesús;
Córdoba Chacón, José y
Kineman, Rhonda Denisse**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Variante de la ghrelina y sus usos.**

57 Resumen:

Variante de la ghrelina y sus usos.

La presente invención se refiere a una nueva variante de *splicing* de la ghrelina/obestatina, denominada In2-ghrelina, y a su uso de manera aislada y/o en combinación con la ghrelin-O-aciltransferasa (GOAT) y/o el receptor troncado de ghrelina (GHS-R1b), para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix.

ES 2 372 337 A1

DESCRIPCIÓN

Variante de la ghrelina y sus usos.

5 La presente invención se encuentra dentro de la biología molecular y la medicina, y se refiere a una nueva variante de *splicing* de la ghrelina/obestatina, denominada In2-ghrelina, y sus usos. En concreto, se refiere al uso de esta variante, de manera aislada y/o en combinación con la ghrelina-O-aciltransferasa (GOAT) y/o el receptor truncado de ghrelina (GHS-R1b), para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix.

10

Estado de la técnica anterior

15 La ghrelina es una hormona sintetizada fundamentalmente por el estómago (Kojima *et al.*, 1999. *Nature*. 402 (6762): 656-60), aunque también se expresa en un amplio rango de tejidos donde actúa como factor paracrino o autocrino (Lago *et al.*, 2005. *Vitam Horm*. 71: 405-32.; Tena-Sempere, 2005. *Growth Horm IGF Res*. 15 (2): 83-8.; Leite-Moreira and Soares, 2007. *Drug Discov Today*. 12 (7-8): 276-88.; Leontiou *et al.*, 2007. *Pituitary*. 10 (3): 213-25.; Leite-Moreira *et al.*, 2008. *Vitam Horm*. 77: 207-38). La ghrelina puede ser acilada por la ghrelina-O-aciltransferasa (GOAT) y esta forma de ghrelina (AG) es el principal ligando endógeno del receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS-R) de tipo 1a (GHS-R1a). Actualmente se sabe que el sistema ghrelina-acilada (AG)/GHS-R1a ejerce acciones en múltiples tejidos, muchos de ellos relacionados con la regulación de las funciones metabólicas (Tschop *et al.*, 2000. *Nature* 407 (6806): 908-13; Horvath *et al.*, 2001. *Endocrinology*. 142. (10): 4163-9; Nakazato *et al.*, 2001. *Nature*. 409 (6817): 194-8; van der Lely *et al.*, 2004. *Endocr Rev*. 25 (3): 426-57).

25 La ghrelina humana es codificada por el gen *GHRL*, cuya transcripción da lugar a un prepro-péptido inmaduro de 117 residuos (prepro-ghrelina) que, como se menciona anteriormente, puede ser acilado por la enzima GOAT y que, en todo caso, es procesado posteriormente por convertasas de prohormonas (PC1, PC7, Furin), originando la hormona activa (AG) o la teóricamente inactiva (ghrelina no-acilada o UAG) (Zhu *et al.*, 2006. *J. Biol Chem*. 281 (50): 38867-70.; Garg, 2007. *J Clin Endocrinol Metab*. 92 (9): 3396-8). Clásicamente se ha considerado que el gen de la ghrelina humana consistía en 4 exones codificantes (Ex) y un Ex (Ex0) no codificante. El péptido señal de la prepro-ghrelina es codificado en Ex1, y la secuencia codificante (CDS) de la ghrelina madura es codificada por Ex2 y Ex3 (Kanamoto *et al.*, 2004. *Endocrinology*. 145 (9): 4144-53.; Nakai *et al.*, 2004. *Life Sci*. 75 (18): 2193-201).

35 Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la prepro-ghrelina también codifica otro péptido, la obestatina (Zhang *et al.*, 2005. *Science*. 310 (5750): 996-9) cuya expresión tisular difiere de la exhibida por la ghrelina y posee acciones biológicas específicas (Karaoglu *et al.*, 2009. *Mol Cell Biochem*. 323 (1-2): 113-8.; Tsolakis *et al.*, 2009. *Eur J Endocrinol*. 160 (6): 941-9; Volante *et al.*, 2009. *J Pathol*. Aug; 218(4):458-66). Además, un examen exhaustivo de la estructura genómica de la *GHRL* humana ha revelado que este gen, en realidad, ocupa 7,2 kb del DNA genómico (Seim *et al.*, 2007. *BMC genomics* 8:298) y de hecho, se ha identificado un nuevo Ex (-1) y varias regiones de los Ex0 y Ex1. La expresión de estas recientemente identificadas regiones exónicas origina múltiples transcritos tejido-específicos que pueden carecer de ghrelina u obestatina e incluso codificar nuevos péptidos (Seim I *et al.*, 2009. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 37(1):125-31.; Seim I *et al.*, 2007. *BMC Genomics* 8:298). Además, se han descrito variantes de la prepro-ghrelina que carecen del exón 3 y, por lo tanto, de la obestatina. Esta isoforma se ha denominado *exon3-deleted-ghrelin* y se presenta en varios tipos de tumores (Jeffery *et al.*, 2002. *J. Endocrinol*. 172 (3): R7-11; Jeffery *et al.*, 2005b. *Endocr Relat Cancer*. 12 (4): 839-50.; Yeh *et al.*, 2005. *Clin Cancer Res*. 11(23): 8295-303). Por último, se ha descrito la ocurrencia del proceso de retención de intrones en el gen de la ghrelina murina (Kineman *et al.*, 2007. *J Mol Endocrinol*. 38 (5): 511-21). Específicamente, la retención del intrón 2 (In2) da lugar a una nueva isoforma de ARNm, denominada In2-ghrelina, que contiene los Ex2 y 3, pero carece de los Ex1, 4 y 5. Aunque la traducción del ARNm de la In2-ghrelina no está aún demostrada, su expresión es entre 10 y 50 veces mayor que la de la ghrelina nativa en la hipófisis y el hipotálamo, respectivamente, y más importante, el nivel de expresión del ARNm de esta isoforma se regula bajo condiciones metabólicas extremas (ayuno y obesidad) (Kineman *et al.*, 2007. *J Mol Endocrinol*. 38 (5): 511-21).

Descripción de la invención

55 En la presente invención se demuestra la existencia de una nueva variante de *splicing* del gen *GHRL* humano, originada por la retención del In2, lo que da lugar a un transcrito alternativo que contiene Ex0, Ex1, In2, y Ex2 pero que carece de Ex3 y 4, denominado In2-ghrelina humana. Su traducción originaría un prepro-péptido de 117 aa que comparte con la prepro-ghrelina nativa el péptido señal (24 aa) y los 12 primeros aa y, por lo tanto, conserva el posible sitio de acilación por la GOAT en la Ser3. Este transcrito se expresa a diferentes niveles en los 22 tejidos humanos analizados, donde su expresión se correlaciona con la de GOAT ($R^2=0,921$). Estos datos sugieren que la In2-ghrelina podría ser un sustrato primario de esta enzima en tejidos humanos. La secuencia peptídica inferida a partir del ARNm de la In2-ghrelina posee varios sitios de procesamiento por convertasas de prohormonas, lo que sugiere que, a partir del prepro-péptido codificado por la In2-ghrelina, se podrían originar diferentes productos peptídicos.

65 Los niveles de expresión de la In2-ghrelina humana están consistentemente aumentados en muestras de cáncer de mama en comparación con muestras normales. Además, en estas muestras tumorales, los niveles de expresión de la In2-ghrelina se correlacionan no solo con los niveles de expresión de la GOAT o el GHS-R1b, sino también con los niveles de expresión de dos marcadores de proliferación celular (Ki67 y ciclina D3). En líneas celulares derivadas de

ES 2 372 337 A1

cáncer de mama, la sobreexpresión de esta variante provoca un incremento de la tasa basal de proliferación celular. Por último, tratamientos con la ghrelina nativa, la UAG y el tamoxifeno (la terapia endocrina estándar (antiestrogénica) usada en el tratamiento cáncer de mama) alteran los niveles de expresión de la In2-ghrelina en dichas líneas celulares.

5 Los niveles de expresión de la In2-ghrelina humana están consistentemente aumentados en muestras de tumores hipofisarios de distintos tipos (incluidos acromegalias, Cushing, prolactinoma, TSHoma (adenoma hipofisario secretor de tirotropina), así como tumores ectópicos) en comparación con muestras normales.

10 La In2-ghrelina humana presenta una expresión muy elevada en las líneas celulares derivadas de tumores de mama (MCF7, BT 549, SKBR 3, HBL 100), de ovario (SKOV 3, MDAH 2774), de endometrio (SKUT1, HEC 1B, AN3CA, HEC 265, KLE, ISHIKAWA) y de cérvix (HELA, SIHA).

15 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a la variante In2-ghrelina, cuya secuencia aminoacídica presenta una identidad de, al menos, un 80, y más preferiblemente al menos un 85, un 90, un 91, un 92, un 93, un 94, un 95, un 96, un 97, un 98, o un 99% con el péptido de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. Aún más preferiblemente, la secuencia aminoacídica de la In2-ghrelina es la secuencia recogida en la SEQ ID NO: 1. Por tanto, la SEQ ID NO: 1 constituye la secuencia aminoacídica de la In2-ghrelina, que es originada por el *splicing* alternativo del gen *GHRL* humano. La secuencia de ARNm se recoge en la SEQ ID NO: 10.

20 El término “identidad”, tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos secuencias. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

25 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la variante de *splicing* del gen *GHRL* humano (Gene ID: 51738), el ARNm que codifica para la In2-ghrelina o sus productos de traducción, como marcadores para el diagnóstico, pronóstico, y/o seguimiento del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el ARNm que codifica para la variante In2-ghrelina o sus productos de traducción se podrían usar en combinación con los productos de expresión (ARNm o proteína) de la ghrelin-O-aciltransferasa (GOAT) o del receptor truncado de ghrelina (GHS-R1b).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix. de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- 35
- (a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
 - (b) detectar el ARNm de la variante In2-ghrelina, o sus productos peptídicos.

40 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el paso (b) del primer método de la invención además comprende detectar los productos de expresión de la ghrelin-O-aciltransferasa (GOAT), del receptor truncado de ghrelina (GHS-R1b), o de ambos.

45 En otra realización más preferida, el primer método de la invención además comprende:

- (c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.

50 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico de cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a)-(c) del método primero de la invención, que además comprende:

- 55
- (d) asignar los pacientes que presentan una cantidad de los productos de expresión obtenidas en el paso (b) superior y estadísticamente significativa a la cantidad de referencia, al grupo de individuos con cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix.

60 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de seguimiento de la evolución del de cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende realizar al menos dos veces la secuencia de pasos (a)-(c) del primer y segundo método de la invención, en muestras obtenidas de un mismo individuo de manera no simultánea. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el seguimiento se realiza post-tratamiento.

65 Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

ES 2 372 337 A1

El término “producto de expresión de los genes ...”, tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a los productos de transcripción y/o de traducción (ARN y/o proteína) de dichos genes, o a cualquier forma resultante del procesamiento de dichos productos de transcripción o traducción.

5 El término “diagnóstico”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de discriminar entre individuos que padecen o no cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix. También se refiere, pero sin limitarnos, a la capacidad de discriminar entre muestras procedentes de pacientes y de individuos sanos.

10 El término “pronóstico” en la presente invención se refiere a la capacidad de detectar pacientes o sujetos asintomáticos que presentan una alta probabilidad de padecer cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix, aún cuando en el momento del diagnóstico no presenten dichas patologías.

15 Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

25 Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. La muestra biológica puede ser un tejido, por ejemplo, pero sin limitarse, una biopsia o un aspirado por aguja fina, o puede ser una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, linfa, fluido ascítico u orina. Preferiblemente, las células son células tumorales. Los términos “tumor” o “tumoral”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a células transformadas que presentan un crecimiento incontrolado. Dependiendo de su posible evolución puede tratarse de un tumor benigno, que permanece en su lugar de inicio y no produce metástasis; o tumor maligno, invasivo o que produce metástasis. El término “cáncer” o “canceroso” tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier tumor maligno.

35 La detección de la In2-ghrelina (tanto del ARNm como la propia proteína) y de los productos de expresión de la ghrelina-O-aciltransferasa (GOAT), o del receptor truncado de ghrelina (GHS-R1b) en una muestra biológica aislada de un individuo en una proporción superior a la cantidad de referencia es indicativa de que dicho individuo padece cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix. El término “individuo” no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

40 La detección puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Los autores de la presente invención han demostrado que la detección de los niveles de ARNm de estos transcritos de manera cuantitativa, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), podría ser útil para el diagnóstico del cáncer de mama.

45 La medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de los productos de expresión, basada en una señal que se obtiene directamente de los productos de expresión, y que está correlacionada con el número de moléculas de dichos productos de expresión. Dicha señal -a la que también podemos referirnos como señal de intensidad- puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

55 El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los productos de expresión, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los productos de expresión obtenidos mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

60 Así pues, la “determinación del nivel de expresión” de los genes puede ser llevada a cabo por cualquier método de determinación de la cantidad del producto de la expresión de los genes conocido en el estado de la técnica.

65 En una realización preferida, la detección del producto de la expresión de los genes se realiza determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, donde el análisis del nivel de ARNm de In2-ghrelina, de la ghrelina-O-aciltransferasa (GOAT) y/o del ARNm que codifica el receptor truncado de ghrelina (GHS-R1b) se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos

nucleicos; chips de DNA elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; *microarrays* de DNA elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

El ARNm puede ser analizado, por ejemplo, pero sin limitarse, en muestras de tejido fresco, tejido congelado, tejido fijado o tejido fijado y embebido en parafina. El uso de muestras de tejido fijado y embebido en parafina presenta importantes ventajas con respecto a las muestras de tejido fresco o congelado: son estables a temperatura ambiente, fáciles de almacenar y existe un amplio archivo de muestras clínicas disponibles junto con su información clínica y el seguimiento de la enfermedad. Por tanto, en una realización preferida el analizado en se extrae de muestras de tejido fijado y embebido en parafina.

El ARN obtenido de muestras de tejido fijadas y embebidas en parafina suele encontrarse muy degradado. Mientras que los estudios mediante *microarrays* son muy sensibles a la degradación del ARN, el uso de la RT-PCR, y en particular, de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) ha demostrado ser una técnica que ofrece mejores resultados ante la degradación del ARN. Además, el análisis de expresión mediante *microarrays* es una técnica compleja que requiere de equipos sofisticados que no están disponibles en muchos laboratorios. Por tanto, en una realización preferida, la detección del ARNm de los genes se realiza mediante la técnica de RT-PCR; y en una realización, más preferida, la detección se realiza mediante la técnica de qRT-PCR.

En otra realización preferida, la detección del producto de la expresión de los genes se realiza determinando el nivel de proteína derivado de su transcripción y traducción, donde el análisis del nivel de los productos peptídicos de la In2-ghrelina, de la ghrelin-O-aciltransferasa (GOAT) y/o del ARNm que codifica el receptor truncado de ghrelin (GHS-R1b) se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante la incubación con un anticuerpo específico en un inmunoensayo. El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de una anticuerpo con la muestra obtenida. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunohistoquímica o *microarrays* de proteína.

El término “anticuerpo” tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con cualquiera de los productos peptídicos de la In2-ghrelina, de la ghrelin-O-aciltransferasa (GOAT), o del receptor truncado de ghrelin (GHS-R1b). Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de los productos peptídicos de la In2-ghrelina, de la ghrelin-O-aciltransferasa (GOAT), y del receptor truncado de ghrelin (GHS-R1b) y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga.

Los anticuerpos empleados para llevar a cabo los métodos de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales capaces de reconocer a los productos peptídicos de In2-ghrelina, GOAT, y el receptor truncado de ghrelin (GHS-R1b). Los anticuerpos que reconocen a los productos peptídicos de In2-ghrelina y GOAT pueden ser empleados para llevar a cabo los métodos de la presente invención mediante, por ejemplo, pero sin limitarse, *immunoblot*, ELISA, RIA, inmunohistoquímica o *microarray* de proteínas.

En otra realización preferida, el inmunoensayo es un inmunoblot o Western blot. Para llevar a cabo un inmunoblot o Western blot, se obtiene un extracto de proteínas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto y se separan las proteínas en un medio de soporte capaz de retenerlas mediante electroforesis. Una vez separadas las proteínas se transfieren a un soporte diferente donde pueden ser detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen a los productos peptídicos de In2-ghrelina, GOAT y/o el receptor truncado de ghrelin (GHS-R1b).

En otra realización preferida, el inmunoensayo es una inmunohistoquímica (IHQ). Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas de determinantes antigénicos característicos. El análisis mediante inmunohistoquímica se realiza sobre cortes de tejido, ya sea congelado o incluido en parafina, procedente de una muestra biológica aislada de un sujeto. Estos cortes se hibridan con un anticuerpo monoclonal o policlonal que reconoce a los productos peptídicos de la In2-ghrelina, GOAT y/o el receptor truncado de ghrelin (GHS-R1b).

ES 2 372 337 A1

Entre las técnicas inmunohistoquímicas que pueden emplearse para obtener los perfiles de expresión se encuentra el *microarray* tisular. El *microarray* tisular (TMA) es considerado hoy en día una potente herramienta para el análisis masivo del perfil molecular del cáncer de múltiples muestras de tejido simultáneamente, proporcionando la posibilidad de estudiar nuevos marcadores, o los ya existentes de manera masiva. A su vez, el TMA preserva las muestras originales de tejido que con los métodos tradicionales disminuyen en cuantía y se deterioran por el uso frecuente.

Los términos “perfil de expresión génica” o “perfil de expresión de los genes”, tal y como se utilizan en la presente descripción, se refieren a los niveles de expresión del ARNm y/o de la proteína producida por los genes de interés en una muestra biológica.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende los medios adecuados para llevar a cabo los métodos de la invención. En una realización preferida, comprende los medios para detectar los productos de expresión de los genes *GHRL* (el ARNm de la variante In2-ghrelina y sus productos peptídicos), y preferiblemente de GOAT y/o el receptor truncado de ghrelina (GHS-R1b), en una muestra biológica aislada.

Dicho kit puede comprender cebadores, sondas, anticuerpos poli o monoclonales, y todos aquellos reactivos necesarios para analizar las técnicas descritas anteriormente en este documento y/o conocidos en el estado de la técnica. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, enzimas, enzimas polimerasas, co-factores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit puede contener además otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el primer método de la invención.

En otra realización más preferida, el kit comprende los elementos necesarios para detectar los productos de expresión de la variante In2-ghrelina mediante RT-PCR. En otra realización más preferida, los productos de expresión se detectan mediante los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. En otra realización aún más preferida, el kit de la invención también comprende los cebadores necesarios para la detección de GOAT (SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5), y aún más preferiblemente, para la detección de GHS-R1b (SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7).

Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencia SEQ ID NO: 2.

Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencia SEQ ID NO: 3.

Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencia SEQ ID NO: 4.

Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencia SEQ ID NO: 5.

Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencia SEQ ID NO: 6.

Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencia SEQ ID NO: 7.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para identificar sustancias químicas útiles en el tratamiento del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix, que comprende:

- a. establecer líneas celulares de cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix,
- b. detectar la cantidad de ARNm de la variante In2-ghrelina o sus productos peptídicos en dichas células,
- c. administrar la sustancia química test a las líneas celulares de (a),
- d. detectar la cantidad de ARNm de la variante In2-ghrelina o sus productos peptídicos según (b) tras la administración de la sustancia química test según (c), y
- e. asignar la sustancia química test según (c) al grupo de sustancias químicas útiles en el tratamiento del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix cuando la cantidad de los productos de expresión de la variante In2- ghrelina detectada en el paso (d) es menor y estadísticamente significativa a la detectada en el paso (b).

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “productos peptídicos” “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura. 1. Representación esquemática de la variante humana In2-ghrelina. (A) Organización clásica del gen humano ghrelina/obestatina consistente en 5 exones (EXO-4) y 4 intrones (In1-4). Estructura de la prepro-ghrelina/obestatina, también están indicados los ARNm precursores prepro-In2-ghrelina. (B) Diagrama esquemático mostrando la posición de los cebadores (indicada con flechas, s: sentido, as; antisentido) empleados para detectar, clonar y/o amplificar cuantitativamente la In2-ghrelina humana. Los exones se representan como cajas y los intrones como líneas. (C-H) Productos de PCR separados en gel de agarosa. (I) Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la In2-ghrelina. Se indican los codones putativos de inicio y parada.

Figura. 2. Distribución en tejidos de la variante humana In2-ghrelina. (A) Niveles de expresión cuantitativa de la In2-ghrelina. (B) Bandas de PCR de los transcritos de ghrelina amplificados de tejidos humanos, donde el orden de las pistas corresponde con el orden mostrado en el panel A. Correlación entre In2-ghrelina y GOAT (C) o la expresión en tejidos humanos de la ghrelina nativa (D). (E) Valores de correlación entre la expresión en tejidos humanos de la In2-ghrelina y/o ghrelina nativa con GOAT y GHSR1a/1b.

Figura. 3. Variante humana In2-ghrelina en muestras de mama. (A) Niveles de expresión cuantitativa de la In2-ghrelina en muestras normales y cancerosas. (B) Correlaciones entre la expresión de In2-ghrelina y ghrelina, GOAT, GHSR1a/1b en muestras de cáncer de mama. (C) Niveles de expresión cuantitativa de Ki67 y ciclina D3 en muestras normales y cancerosas. (D) Valores de correlación entre la expresión de In2-ghrelina y GOAT con Ki67 o ciclina-D3 en muestras de cáncer de mama: Los valores se muestran como medias \pm S.E.M (** P<0,01; indica diferencia frente a los controles).

Figura. 4. Efecto y regulación de la expresión de la variante In2-ghrelina en células MDA-MB-231 *in vitro*. (A) Cinética de proliferación de MDA-MB-231 transfectadas con In2-ghrelina o control. (B) Regulación de la ghrelina nativa y de la expresión de In2-ghrelina en MDA-MB-231. Los datos representan las medias \pm SEM. Asteriscos (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001; indican diferencias de los controles).

Figura. 5. Análisis de la expresión de la In2-ghrelina en tumores hipofisarios. Un total de 68 tumores hipofisarios fueron incluidos en este estudio (23 tumores no funcionantes, 35 acromegalias, 4 cushing, 1 prolactinoma y 1 TSHoma, así como 3 tumores ectópicos). De forma paralela se analizaron mediante PCR cuantitativa los niveles de expresión de esta isoforma en hipófisis normal (n=3). Los valores representan número total de copias del transcrito de la In2-ghrelina ajustado con un factor de normalización (obtenido a partir de los niveles de expresión de 3 genes constitutivos: GAPDH, HPRT y β -actina). Las diferencias se consideraron significativas con una $p \leq 0,005$.

Figura. 6. Análisis de la expresión de la In2-ghrelina en líneas celulares derivadas de tumores ginecológicos mediante PCR convencional. Un total de 14 líneas celulares fueron incluidas en este estudio (4 líneas derivadas de tumores de mama, 2 derivadas de tumores de ovario, 5 de tumores de endometrio y 2 de cérvix). Como control, se analizaron, de forma paralela, los niveles de expresión del ARN ribosómico 18s.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los métodos de la invención.

Pacientes y muestras

Las muestras de carcinomas mamarios ductales esporádicos de 40 pacientes así como 4 muestras de mama normal se obtuvieron del Banco de Tumores del CNIO (Madrid). La media de edad de las pacientes en el momento de la cirugía fue de 53 años (rango, de 27 a 87 años). El panel comercial de ARN total de varios tejidos humanos se obtuvo de Clontech (Human Total Master Panel II y human pituitary gland poly-A RNA; Palo Alto, CA). La muestras de tumores hipofisarios se obtuvieron tras la cirugía transfenoidal de 35 pacientes y correspondían a: 22 adenomas hipofisarios no funcionantes (NFPAs), 6 GHomas, 5 corticotropinomas, 1 prolactinoma, y 1 TSHoma. Tras la cirugía, los tumores se congelaron inmediatamente hasta la extracción de ARN, tal y como se ha descrito previamente (Martínez-Fuentes *et al.*, 2006). Este estudio fue aprobado por los Comités de Ética de la Universidad de Córdoba, del Banco de Tumores del CNIO (Madrid) y de los hospitales Reina Sofía (Córdoba), Virgen del Rocío (Sevilla), y Sant Pau (Barcelona). Antes de entrar en el estudio, cada paciente firmó el consentimiento informado.

ES 2 372 337 A1

Líneas celulares

Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 (ATCC, Manassas, VA) se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de antibiótico-antimicótico y 2 mM de L-glutamina. Ambas líneas celulares se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂. Para los tratamientos *in vitro*, las células se cultivaron durante 24 h con DMEM complementado con suero tratado con carbón activo y 10⁻⁷M de SST, CST, ghrelina, DAG, estradiol o tamoxifeno.

Las líneas celulares derivadas de tumores de mama (BT 549, SKBR 3, HBL 100), de ovario (SKOV 3, MDAH 2774), de endometrio (SKUT1, HEC 1B, AN3CA, HEC 265, KLE, ISHIKAWA) y de cérvix (HELA, SIHA) se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de antibiótico-antimicótico y 2 mM de L-glutamina a 37°C y 5% CO₂.

15 Aislamiento de ARN y transcripción reversa (RT)

Los ácidos nucleicos se aislaron con Trizol (Invitrogen, Barcelona, Spain) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se trataron con DNasa tal y como está previamente descrito (Luque *et al.*, 2006. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291 (2): E395-403.; Luque *et al.*, 2006. *J Mol Endocrinol.* 37 (1): 25-38; Luque *et al.*, 2006. *J Mol Endocrinol.* 36 (3): 547-56). Para la determinación de la cantidad de ARN recuperado se usó el kit de Ribogreen RNA quantification (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). La transcripción reversa se llevó a cabo con 2 µg de ARN total, usando el kit cDNA First-Strand Synthesis (Fermentas, Hanover, MD, USA).

25 Selección de cebadores y RT-PCR convencional o cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La selección de los cebadores empleados en RT-PCR convencional o cuantitativa (Tabla 1) se realizó usando como molde la secuencia génica de la ghrelina humana (Genebank accession # NM_016362) y el software primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>; Steve Rozen, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, CA, USA). Para la PCR convencional, se usó ADNc de los tejidos de interés y los reactivos de la 2X Master Mix PCR (MRE Fermentas). El volumen final de estas reacciones de PCR fue de 25 µl: 1 µl molde (50 ng ADNc), 12,5 µl de 2X Master Mix, 1 µl de cada cebador, y 9,5 µl H₂O.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 372 337 A1

TABLA 1

Número absoluto de copias de ARNm en tejidos humanos

	Tejido	Ghrelin	In2- ghrelina	GOAT	GHSR1a	GHSR1b	β-actina
5							
10	Médula ósea	4.750	720	1.150	n.d.	2	1.880.000
	Cerebro	1.783	1.140	1.170	13	1	2.680.000
	Cerebro fetal	879	1.740	2.500	259	23	5.470.000
15	Hígado fetal	1.287	84	1.360	n.d.	n.d.	1.010.000
	Corazón	1.689	365	1.400	n.d.	2	677.000
20	Riñón	6.235	1.140	972	n.d.	1	2.430.000
	Hígado	788	295	658	n.d.	n.d.	837.000
	Pulmón	3.427	778	2.360	12	3	5.330.000
25	Placenta	928	512	1.680	3	19	2.150.000
	Próstata	1.434	969	953	n.d.	4	1.370.000
30	Músculo esquelético	433	361	154	n.d.	2	243.000
	Bazo	4.498	615	2.580	n.d.	1	2.440.000
35	Testículos	2.341	2.490	1.270	186	19	2.900.000
	Timo	3.618	6.520	17.200	2	3	6.690.000
40	Tráquea	2.100	510	421	5	3	1.730.000
	Útero	1.218	975	1.510	n.d.	2	5.730.000
	Colon	980	641	1.080	11	3	3.460.000
45	Intestino delgado	18.516	985	1.040	11	2	3.350000
50	Médula espinal	2.756	1.050	907	292	11	3.570.000
	Estómago	44.229	680	1.630	15	8	2.360.000
55	Pituitaria	634	129	732	3.060	554	313.000

60 El programa de la PCR consistió en un ciclo de 94°C durante 4 min, seguido de 30-40 ciclos de 94°C durante 30 s, 58-62°C (dependiendo de la pareja de cebadores) durante 30 s, y 72°C durante 30-60 s (dependiendo del tamaño del producto), y un ciclo final de 72°C durante 5 min.

65 La determinación de los niveles de expresión de ghrelina, In2-ghrelina, GOAT y GHSR1a/b se realizó mediante qRT-PCR usando cebadores específicos para cada transcrito (Tabla 2). La selección de los cebadores, así como verificación de su especificidad, y la confirmación de su eficiencia se ha realizado de manera similar a lo descrito previamente para otros genes (Taboada *et al.*, 2007. *Eur J Endocrinol.* 156 (1): 65-74; Neto *et al.*, 2009. *J Clin Endocrinol Metab.* 94 (6) 1931-7). El volumen final de la reacción de PCR fue de 25 µl incluyendo 100 ng de muestra

ES 2 372 337 A1

y 12,5 ml de IQ™ SYBR Green Supermix (Biorad). El programa de la PCR consistió en 40 ciclos a 94°C durante 30 s, 61°C durante 30 s, y 72°C durante 30 s. Además, en cada placa se corrió un control sin ADN para monitorizar posibles contaminaciones exógenas. En todos los casos, la amplificación se llevó a cabo con el sistema iCycler IQ (Bio-Rad, Madrid) y para confirmar que se amplificó una sola banda del tamaño esperado, los productos se corrieron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Esta banda fue purificada y secuenciada posteriormente para confirmar que correspondía con la secuencia esperada.

TABLA 2

Nivel de expresión en tejidos y líneas celulares de mama

	In2-ghrelina	Ghrelina	GOAT	GHSR1a	GHSR1b
Mama normal	595	442	202	3	n.d.
Mama tumoral	5.155	664	991	6	373
MDA-MB-231	5.783	3	552	3	193

Los valores representan la media del número de copias de cada transcrito por 100 ng de ARNm total.

Análisis estadístico

Se procesaron al mismo tiempo (qRT-PCR) las muestras de todos los pacientes, tejidos o líneas celulares del mismo experimento, se determinaron las variaciones dentro del mismo tumor mediante el test de la t de Student, y se determinó la correlación entre la expresión tisular de los transcritos mediante el test de correlación de Pearson. $P \leq 0,05$ fue considerado como significativo. Todos los valores se expresaron como medias \pm SEM.

Identificación de la variante In2-ghrelina humana usando RT-PCR

Para esta identificación se diseñaron varios sets de cebadores en los Ex1 (sentido) y Ex2 (antisentido) del gen de la ghrelina humana (GHRL) de manera que flanqueaban al In2. Utilizando ADNc de cerebro humano como molde, se amplificaron dos bandas con cada set de cebadores, una de ellas correspondía a la ghrelina nativa (99pb y 239pb, respectivamente) y otra a la In2-ghrelina (293pb y 433pb, respectivamente). La secuenciación de estas bandas confirmó que las bandas de menor tamaño correspondían con la ghrelina nativa y las de mayor tamaño con una variante de ARNm que retiene el intrón 2. Además, se diseñó una pareja de cebadores que exclusivamente amplificaría la In2-ghrelina, lo que resultó en un única banda del tamaño esperado (215pb), mientras que no aparecieron bandas en los controles no retrotranscritos o sin ADNc, demostrando que lo observado no era consecuencia de contaminación genómica o externa, respectivamente. Ya que la In2-ghrelina comparte con la ghrelina nativa el Ex1, se postuló que ambas podrían compartir el codón de inicio (ATG) localizado en dicho Ex. Si esto fuera así, la transcripción de la In2-ghrelina originaría una proteína de 117aa (prepro-In2-ghrelina) que compartiría con la prepro-ghrelina nativa el péptido señal y los 12 primeros aa de la ghrelina madura. Sin embargo, la retención del In2 altera el marco de lectura y, por lo tanto, la In2-ghrelina codifica para una cola C-terminal completamente diferente. Además, se identificaron varios posibles sitios de procesamiento proteolítico (p.e., Arg-42 y Lys-63) en la secuencia de la In2-ghrelina, cuyo procesamiento podría originar diversos péptidos derivados de la In2-ghrelina.

Niveles de expresión de la In2-ghrelina en tejidos humanos

Usando una pareja de cebadores específicos para la In2-ghrelina se encontró que esta variante de *splicing* se expresa en los 22 tejidos humanos analizados. Sin embargo, los niveles de expresión eran bastante variables, siendo más abundante en tejidos endocrinos como la hipófisis o el estómago. Se observó que estos niveles de expresión no se correlacionaron con los de la ghrelina nativa, pero sí con los de la GOAT ($R^2=0,921$).

La In2-ghrelina se sobre-expresa en muestras de cáncer de mama

Los datos de PCR cuantitativa demuestran que la In2-ghrelina se expresa en glándula mamaria normal pero que su expresión está 8 veces aumentada en una batería de 40 muestras de carcinomas de mama ductales invasivos ($p=0,0042$). Por el contrario, la ghrelina nativa que también se expresa en mama normal, no ve alterada su expresión en las muestras tumorales. También se observó una sobreexpresión de la GOAT y el GHSR1b en esta batería de muestras y, en ambos casos, sus niveles de expresión estuvieron positivamente correlacionados con los de la In2-ghrelina.

Además, se observó que, como era de esperar, los niveles de expresión de los marcadores Ki67 (proliferación celular) y ciclina D3 (inductor de ciclo celular) estaban sobreexpresados en las muestras tumorales en comparación con las muestras control. Interesantemente, los niveles de expresión de la In2-ghrelina y de la GOAT se correlacionaron positivamente o tendieron a hacerlo con los niveles de Ki67 y de ciclina D3.

5

La In2-ghrelina incrementa la proliferación de la línea celular derivada de carcinomas mamarios MDA-MB-231 y su expresión se regula por ghrelina y tamoxifeno

10 Experimentos de cinética de proliferación celular *in vitro* realizados con MDA-MB-231 transfectadas con la In2-ghrelina mostraron que la sobreexpresión de esta variante de *splicing* incrementaba la tasa de proliferación basal de estas células en comparación con su control negativo (transfectadas con un plásmido vacío). Específicamente, las células que sobreexpresaban la In2-ghrelina exhibieron tiempos de duplicación inferiores a las células control, siendo estas diferencias significativas a los días 2, 3 y 4 tras la transfección.

15

Además, en esta línea celular que presenta un patrón de expresión del sistema de la ghrelina similar al de los tumores mamarios (es decir, altos niveles de In2-ghrelina, GOAT y GHSFMb y bajos niveles de expresión de la ghrelina nativa y el GHSFMa), la expresión de la In2-ghrelina se vio regulada por la ghrelina nativa (tanto la acilada como la no acilada redujeron sus niveles de expresión) y por el tamoxifeno (una droga antihormonal ampliamente utilizada para el tratamiento de tumores de mama que incrementa la expresión de la In2-ghrelina).

20

Conclusiones

25 Los resultados de estos experimentos indican que el gen de la ghrelina humana, al igual que el gen de la ghrelina murina, puede sufrir la retención del intrón 2 (In2-ghrelina). Puesto que la ghrelina nativa y la In2-ghrelina comparten el exón 0 y 1, se postula que ambas comparten el codón de inicio situado en el exón 1. De manera que los 36 primeros aminoácidos de la In2-ghrelina (incluyendo el péptido señal y la Ser3, sitio de acilación por la GOAT) serían idénticos a los de la ghrelina nativa. Sin embargo, la retención del intrón altera el marco de lectura y la In2-ghrelina posee una cola C-terminal totalmente nueva con varios sitios de posible corte proteolítico, lo que sugiere que se podrían originar nuevos péptidos.

30

Los autores de la presente invención demuestran que In2-ghrelina se expresa en una amplia variedad de tejidos humanos, lo que sugiere que podría tener relevancia fisiológica. Los niveles de expresión de esta variante no se correlacionaron con los niveles de expresión de la ghrelina normal en estos tejidos, lo que indica que la regulación de la expresión de ambos transcritos es tejido-dependiente, lo que pudiera estar controlado por factores de reconocimiento de sitios de *splicing* como elementos o proteínas reguladoras de ARN. Sin embargo, se observa una estrecha relación entre los niveles de expresión de la In-ghrelina y la GOAT en estos tejidos. Puesto que la In2-ghrelina conserva la Ser3, parece razonable sugerir que esta variante pudiera ser un sustrato primario de la GOAT en tejidos humanos.

40

Además, los datos indican que la In2-ghrelina podría tener un papel relevante en cáncer de mama. Específicamente, su expresión está incrementada en muestra de cáncer de mama ductal, donde se correlaciona con unos mayores niveles de expresión de dos importantes marcadores de proliferación celular (ciclina D3 y Ki67).

45 Este es el primer estudio donde se demuestra que la GOAT está presente en muestras de tumores de mama y que su expresión está incrementada en comparación con muestras control, donde además, al igual que la In2-ghrelina, esta expresión se correlaciona con la de ciclina D3 y Ki67.

Además, al igual que en la batería de tejidos humanos, la expresión de In2-ghrelina está estrechamente correlacionada con la de la GOAT, apoyando la idea de que la In2-ghrelina puede ser un sustrato primario de la GOAT.

50

Aunque previamente se había observado una sobre-expresión del receptor truncado de ghrelina (GHS-R1b) en cáncer de mama mediante IHC, este es el primer estudio que demuestra esta sobreexpresión mediante PCR cuantitativa, indicando además que los niveles de expresión de este receptor son mucho mayores que los del receptor clásico (GHS-R1a). Se ha demostrado que el GHS-R1b actúa como dominante negativo del GHS-R1a; sin embargo los niveles mucho más elevados del primero con respecto al segundo mostrados en este trabajo sugieren que el GHS-R1b debe tener un papel diferente al de dominante negativo.

55

Por lo tanto, estos datos serían relevantes desde un punto de vista clínico ya que los ejemplos de la invención demuestran la presencia y expresión diferencial de la In2-ghrelina, GOAT y GHS-R1b en muestras de cáncer de mama, por lo que pueden considerarse marcadores nuevos para el diagnóstico o pronóstico del cáncer de mama.

60

En líneas celulares de tumores de mama (MDA-MB-231) con un patrón de expresión del sistema de la ghrelina similar al observado en los tumores primarios, ghrelina nativa y tamoxifeno (una droga antihormonal para el tratamiento de tumores de mama) alteran la expresión de la In2-ghrelina. Esta última observación podría tener implicaciones patofisiológicas, ya que el tamoxifeno es usado en la actualidad para el tratamiento de cánceres de mama positivos para receptores de estrógenos (RE).

65

ES 2 372 337 A1

Por último, la sobreexpresión de la In2-ghrelina en esta línea celular incrementa la tasa de proliferación de dichas células. Por lo tanto, nuestros resultados extienden el papel pro-proliferativo de la ghrelina nativa a su variante de *splicing* (In2-ghrelina), que parece influenciar la proliferación a través de un bucle auto o paracrino.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Variante In2-ghrelina cuya secuencia aminoacídica presenta una identidad de, al menos:

- a. Un 80%,
- b. Un 85%,
- c. Un 90%,
- d. Un 95%, o
- e. Un 99%

con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

2. Variante In2-ghrelina según la reivindicación anterior, cuya secuencia aminoacídica es la secuencia recogida en la SEQ ID NO: 1.

3. Uso del ARNm que codifica para la variante In2-ghrelina o de sus productos peptídicos según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, como marcadores para la obtención de datos útiles en el diagnóstico pronóstico, o seguimiento del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix.

4. Uso del ARNm que codifica para la variante In2-ghrelina o de sus productos peptídicos según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en combinación con los productos de expresión del gen de la ghrelina-O-aciltransferasa (GOAT), del ARNm o proteína de la variante truncada del receptor de la ghrelina (GHS-R1b), o ambos, como marcadores para la obtención de datos útiles en el diagnóstico pronóstico, o seguimiento del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix.

5. Método de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix que comprende:

- a. obtener una muestra biológica aislada de un individuo,
- b. detectar el ARNm de la variante In2-ghrelina, o sus productos peptídicos según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- c. comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.
- d. asignar los pacientes que presentan una cantidad de los productos de expresión obtenidas en el paso (b) superior y estadísticamente significativa a la cantidad de referencia, al grupo de individuos con cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix.

6. Método de diagnóstico y/o pronóstico del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix según la reivindicación anterior, donde el paso (b) además comprende detectar los productos de expresión del gen de la ghrelina-O-aciltransferasa (GOAT), el ARNm o proteína de la variante truncada del receptor de la ghrelina (GHS-R1b), o ambos.

7. Método de seguimiento de la evolución del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix que comprende realizar al menos dos veces la secuencia de pasos (a)-(c) según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en muestras obtenidas de un mismo individuo de manera no simultánea.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde la detección de los productos de expresión se realiza mediante RT-PCR.

9. Kit o dispositivo que comprende cebadores y/o sondas para analizar la cantidad de ARNm de la variante In2-ghrelina, o la In2-ghrelina según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en una muestra biológica aislada.

10. Kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

11. Kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, que además comprende los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

ES 2 372 337 A1

12. Método para identificar sustancias químicas útiles en el tratamiento del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix que comprende:

- 5
- a. establecer líneas celulares de cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix,
 - b. detectar el ARNm de la variante In2-ghrelina, o sus productos peptídicos según cualquiera de las reivindicaciones 1-2,
 - 10 c. administrar la sustancia química test a las líneas celulares de (a),
 - d. detectar el ARNm de la variante In2-ghrelina, o sus productos pept según (b) tras la administración de la sustancia química test según (c), y
 - 15 e. asignar la sustancia química test según (c) al grupo de sustancias químicas útiles en el tratamiento del cáncer de mama, de tumores hipofisarios, tumores de ovario, de endometrio y de cérvix cuando la cantidad de ARNm de la variante In2-ghrelina, o la In2-ghrelina detectada en el paso (d) es menor y estadísticamente significativa a la detectada en el paso (b).
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

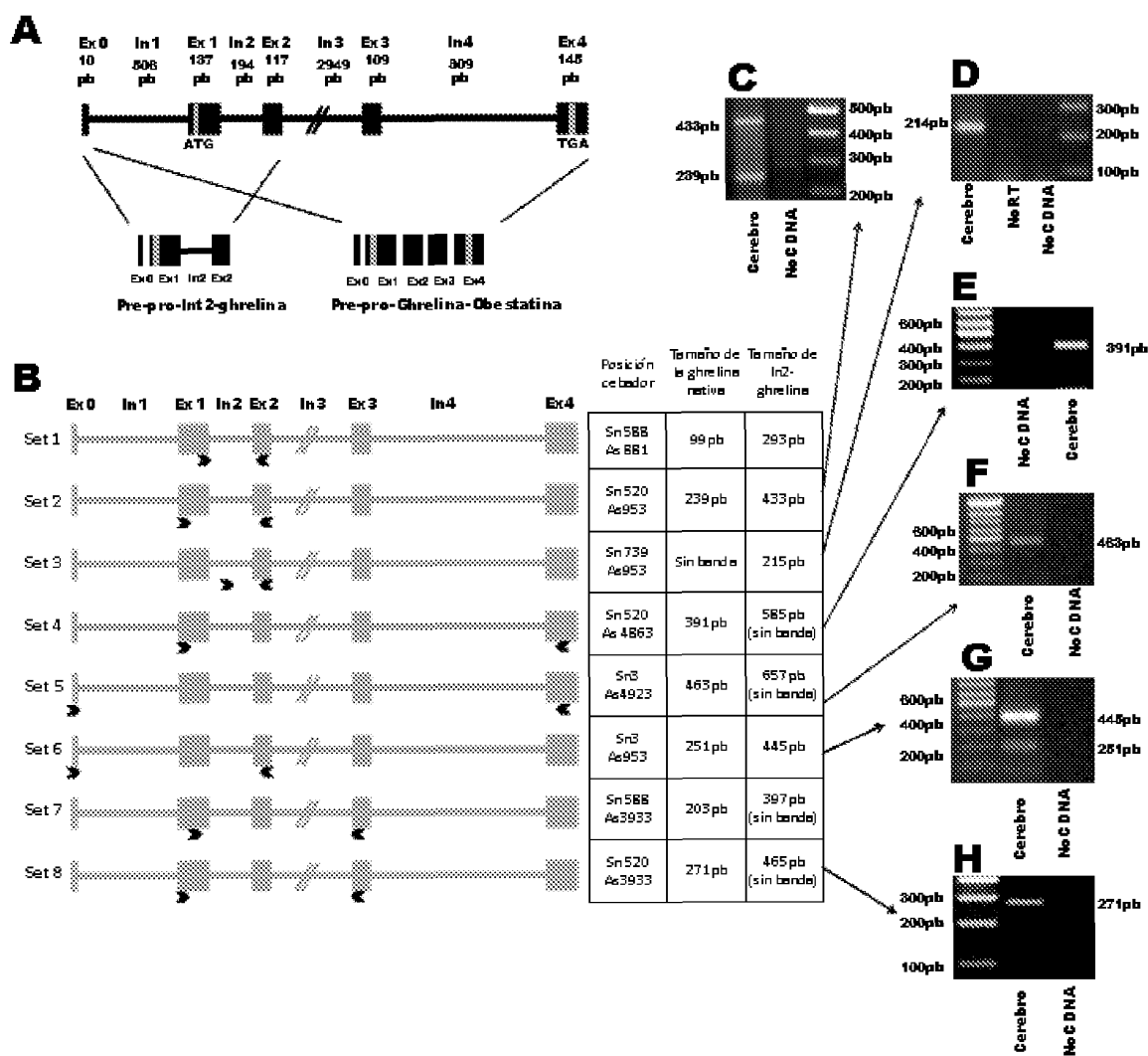


FIG. 1

ES 2 372 337 A1

1	GGA	ACT	GCA	GGC	CCA	CCT	GTC	TGC	AAC	CCA	GCT	GAG	GCC	ATG	CCC	45
1														M	P	2
46	TCC	CCA	GGG	ACC	GTC	TGC	AGC	CTC	CTG	CTC	CTC	GGC	ATG	CTC	TGG	90
3	S	P	G	T	V	C	S	L	L	L	L	G	M	L	W	17
91	CTG	GAC	TTG	GCC	ATG	GCA	GGC	TCC	AGC	TTC	CTG	AGC	CCT	GAA	CAC	135
18	L	D	L	A	M	A	G	S	S	F	L	S	P	E	H	32
136	CAG	AGA	GTC	CAG	GTG	AGA	CCT	CCC	CAC	AAA	GCC	CCA	CAT	GTT	GTT	180
33	Q	R	V	Q	V	R	P	P	H	K	A	P	H	V	V	47
181	CCA	GCC	CTG	CCA	CTT	AGC	AAC	CAG	CTC	TGT	GAC	CTG	GAG	CAG	CAG	225
48	P	A	L	P	L	S	N	Q	L	C	D	L	E	Q	Q	62
226	CGC	CAT	CTC	TGG	GCT	TCA	GTC	TTC	TCC	CAG	AGC	ACA	AAG	GAC	TCT	270
63	R	H	L	W	A	S	V	F	S	Q	S	T	K	D	S	77
271	GGG	TCT	GAC	CTC	ACT	GTT	TCT	GGA	AGG	ACA	TGG	GGG	CTT	AGA	GTC	315
78	G	S	D	L	T	V	S	G	R	T	W	G	L	R	V	92
316	CTA	AAC	AGA	CTG	TTT	CCC	CCT	TCC	AGC	AGA	GAA	AGG	AGT	CGA	AGA	360
93	L	N	R	L	F	P	P	S	S	R	E	R	S	R	R	107
361	AGC	CAC	CAG	CCA	AGC	TGC	AGC	CCC	GAG	CTC	TAG	CAG	GCT	GGC	TCC	405
108	S	H	Q	P	S	C	S	P	E	L	*					117
406	GCC	CGG	AAG	ATG	GAG	GTC	AAG	CAG	AAG	GGG	CAG	AGG	ATG	AAC	TGG	450
451	AAG	TCC														456

FIG. 11

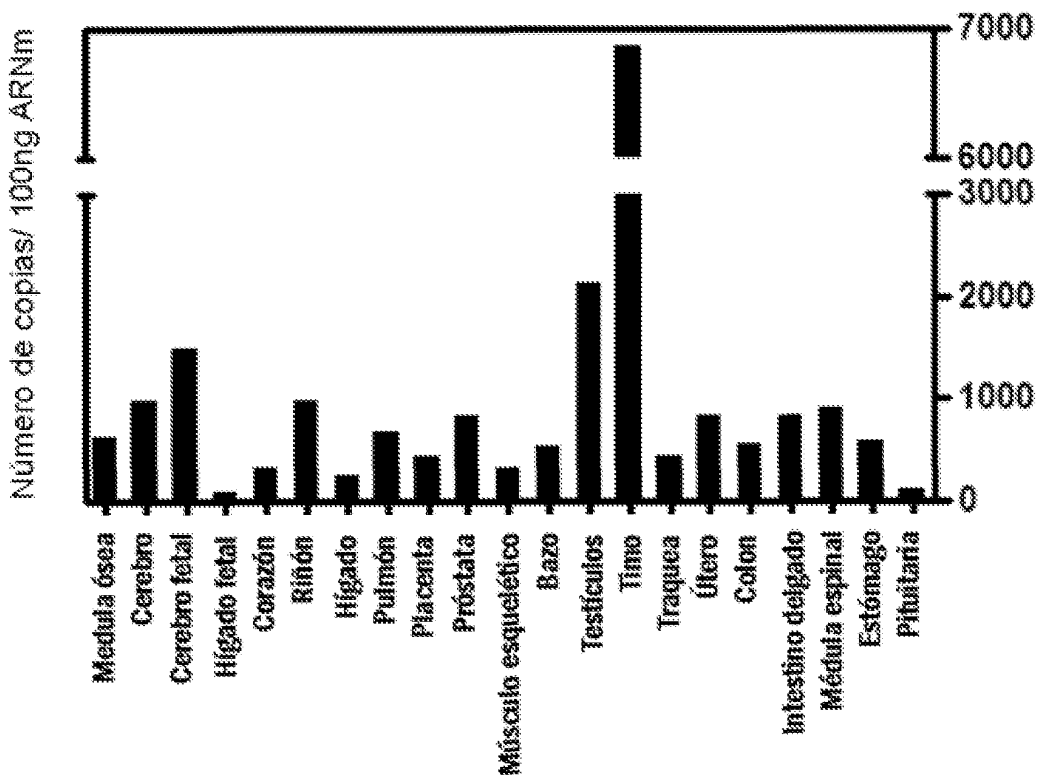
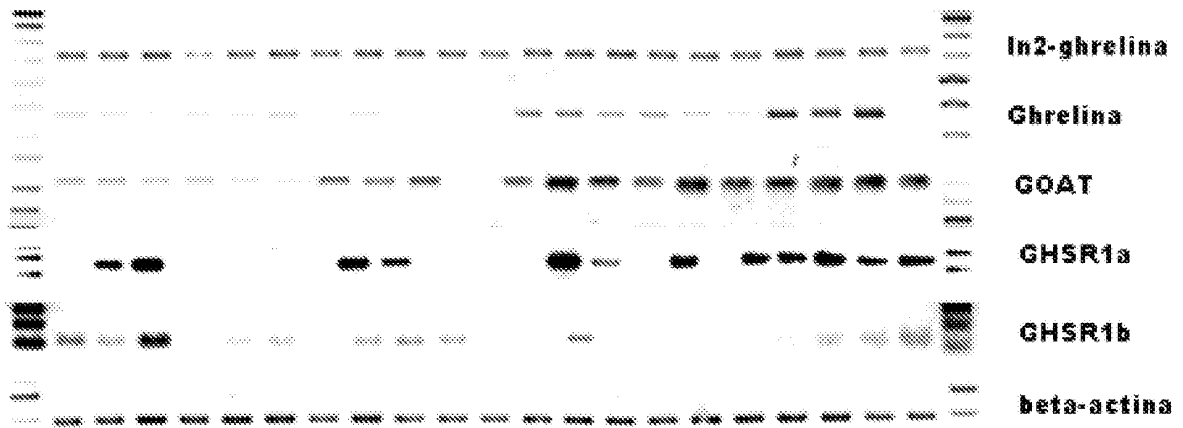
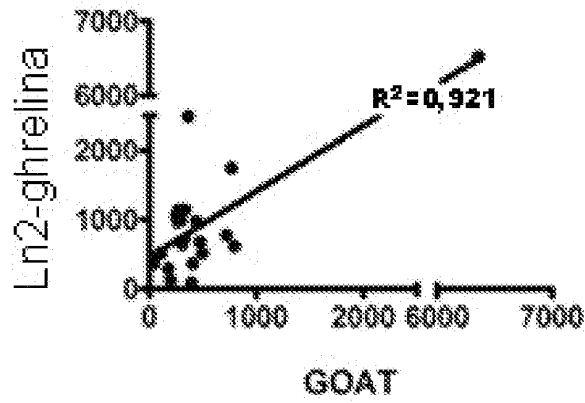


FIG. 2 A

B



C



D

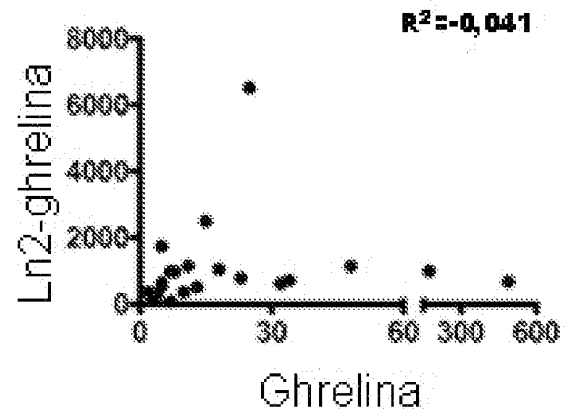


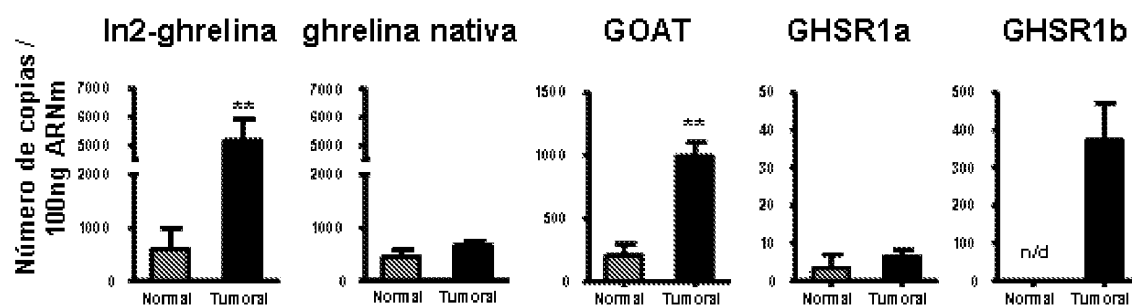
FIG. 2

		Ghrelina	In 2-ghrelina	GOAT	GHSR1a	GHSR1b
Ghrelina	Correlación Pearson	1	-0,041	-0,025	-0,165	-0,099
	Sig. (bilateral)		0,858	0,915	0,607	0,688
	N	21	21	21	12	19
In 2-ghrelina	Correlación Pearson		1	0,921**	-0,234	-0,176
	Sig. (bilateral)			0,000	0,464	0,471
	N		21	21	12	19

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

FIG. 2 E

A



B

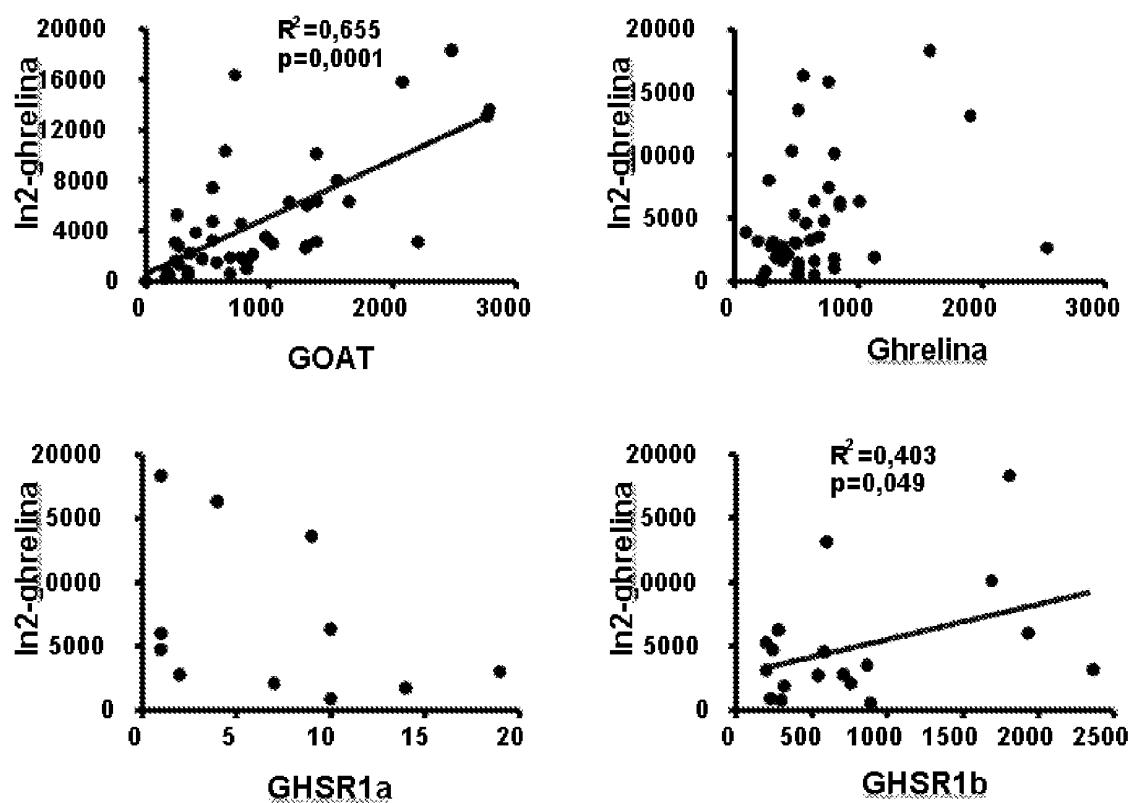
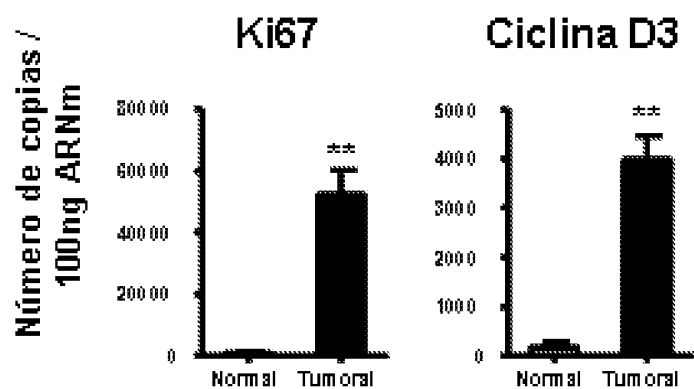


FIG. 3

C



D

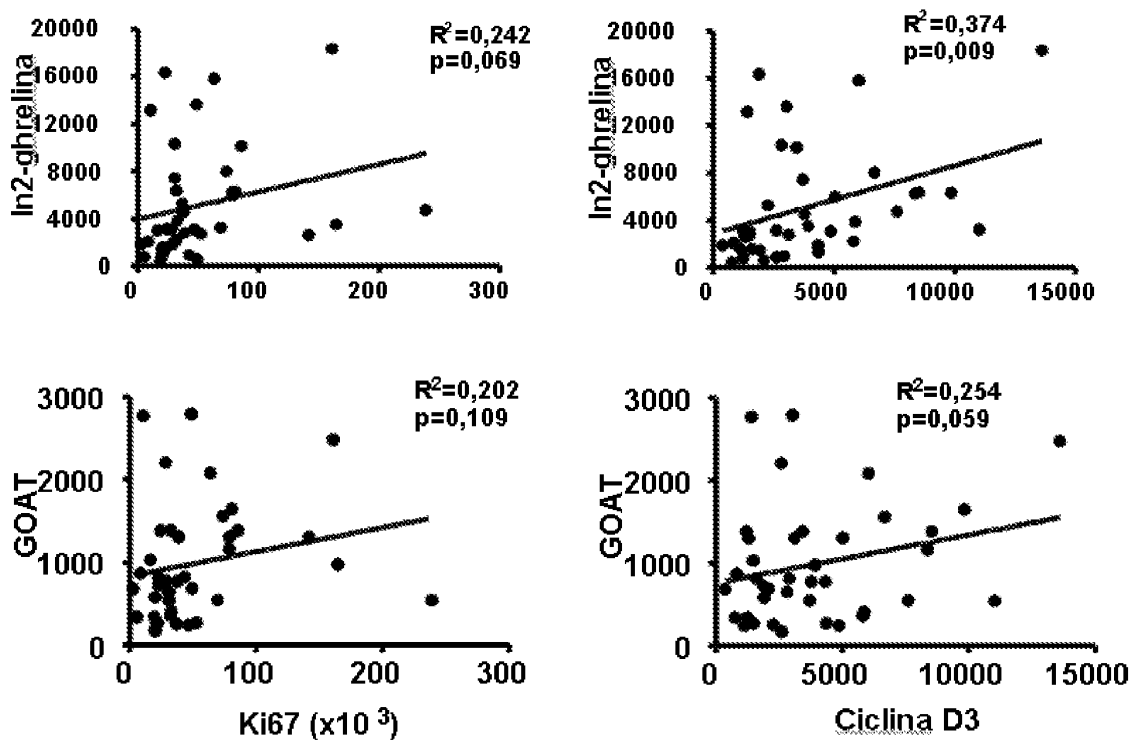
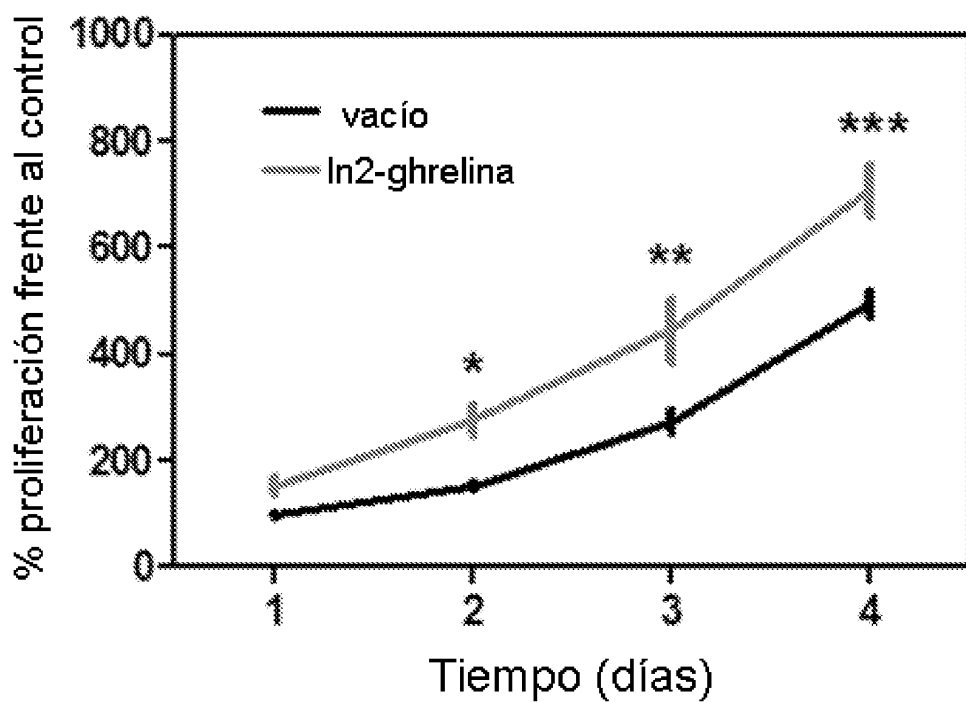


FIG. 3

A



B

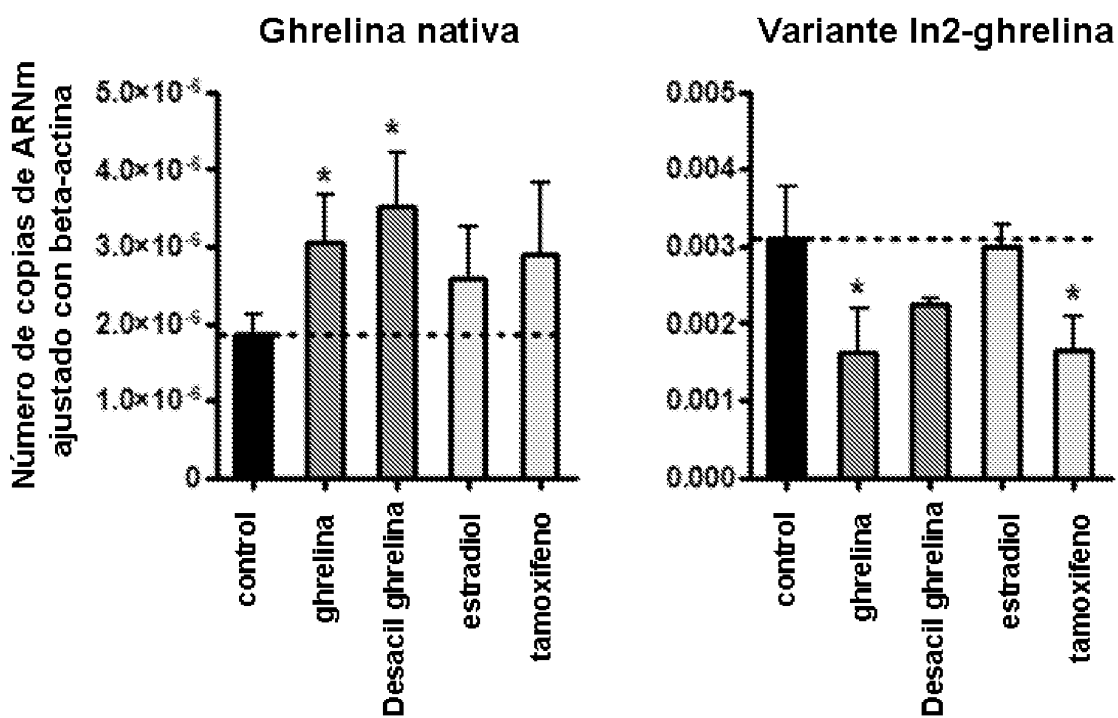


FIG. 4

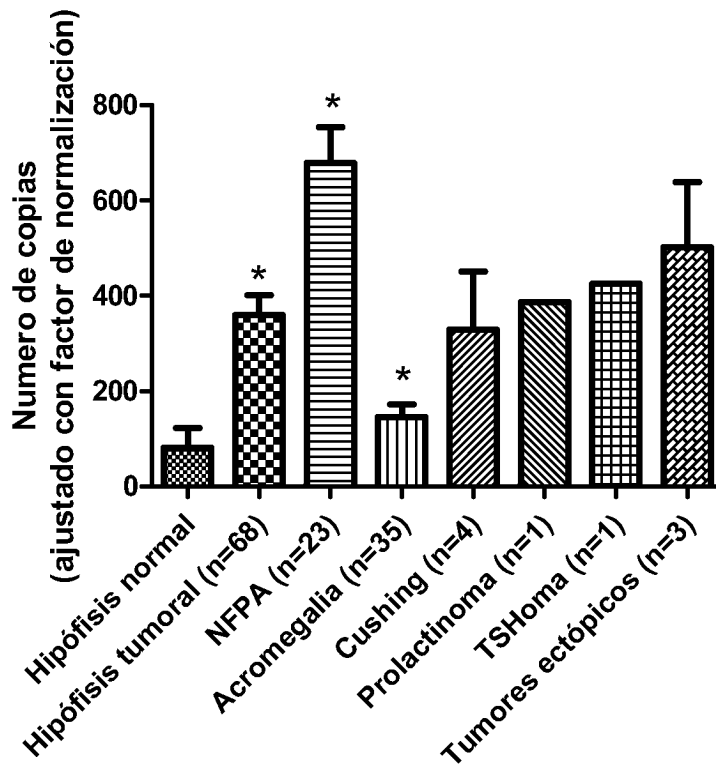


FIG. 5

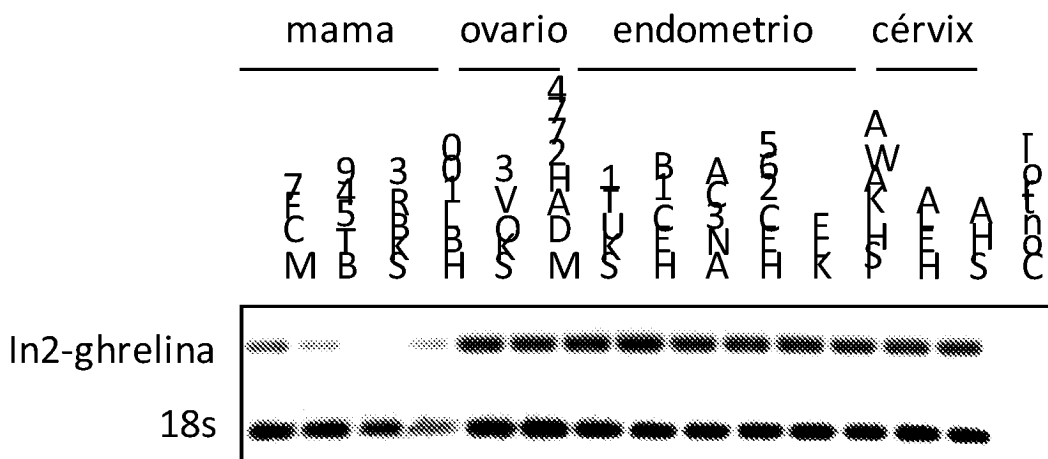


FIG. 6

ES 2 372 337 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Servicio Andaluz de Salud
Universidad de Córdoba
5 THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS
- <120> Variante de la ghrelina y usos
- 10 <130> ES1985.55
- <160> 10
- 15 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 117
20 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- <400> 1
25
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | Ser | Pro | Gly | Thr | Val | Cys | Ser | Leu | Leu | Leu | Leu | Gly | Met | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- 30
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Leu | Asp | Leu | Ala | Met | Ala | Gly | Ser | Ser | Phe | Leu | Ser | Pro | Glu | His |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
- 35
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Arg | Val | Gln | Val | Arg | Pro | Pro | His | Lys | Ala | Pro | His | Val | Val | Pro |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
- 40
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Leu | Pro | Leu | Ser | Asn | Gln | Leu | Cys | Asp | Leu | Glu | Gln | Gln | Arg | His |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
- 45
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Trp | Ala | Ser | Val | Phe | Ser | Gln | Ser | Thr | Lys | Asp | Ser | Gly | Ser | Asp |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
- 50
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Thr | Val | Ser | Gly | Arg | Thr | Trp | Gly | Leu | Arg | Val | Leu | Asn | Arg | Leu |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
- 55
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Pro | Pro | Ser | Ser | Arg | Glu | Arg | Ser | Arg | Arg | Ser | His | Gln | Pro | Ser |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
- 60
- | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Ser | Pro | Glu | Leu |
| | | 115 | | |
- 65 <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- 65 <220>
<223> cebador In2-ghrelina (sentido)

ES 2 372 337 A1

	<code><400> 2</code>			
		<code>tctgggcttc agtcttctcc</code>		20
5	<code><210> 3</code>			
	<code><211> 20</code>			
	<code><212> DNA</code>			
	<code><213> Artificial Sequence</code>			
10	<code><220></code>			
	<code><223> cebador In2-ghrelina (antisentido)</code>			
15	<code><400> 3</code>			
		<code>gttcaccttc tgccccttct</code>		20
	<code><210> 4</code>			
20	<code><211> 21</code>			
	<code><212> DNA</code>			
	<code><213> Artificial Sequence</code>			
25	<code><220></code>			
	<code><223> cebador GOAT (sentido)</code>			
30	<code><400> 4</code>			
		<code>ttgctctttt tcctgctct c</code>		21
	<code><210> 5</code>			
35	<code><211> 21</code>			
	<code><212> DNA</code>			
	<code><213> Artificial Sequence</code>			
40	<code><220></code>			
	<code><223> cebador GOAT (antisentido)</code>			
45	<code><400> 5</code>			
		<code>actgccacgt ttaggcattc t</code>		21
	<code><210> 6</code>			
50	<code><211> 20</code>			
	<code><212> DNA</code>			
	<code><213> Artificial Sequence</code>			
55	<code><220></code>			
	<code><223> cebador GHSR1b (sentido)</code>			
60	<code><400> 6</code>			
		<code>ggaccagaac cacaagcaaa</code>		20
	<code><210> 7</code>			
	<code><211> 21</code>			
65	<code><212> DNA</code>			
	<code><213> Artificial Sequence</code>			

ES 2 372 337 A1

<220>
 <223> cebador GHSR1b (antisentido)

5 <400> 7
 agagagaagg gagaaggcac a 21

<210> 8
 10 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> cebador GHSR1a (sentido)

20 <400> 8
 tgaaaatgct ggctgtagtg g 21

<210> 9
 25 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> cebador GHSR1a (antisentido)

35 <400> 9
 aggacaaagg acacgaggtt g 21

<210> 10
 40 <211> 394
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 10
 atgccctccc cagggaccgt ctgcagcctc ctgctcctcg gcatgctctg gctggacttg 60
 gccatggcag gctccagctt cctgagccct gaacaccaga gagtccaggt gagacctccc 120
 50 cacaaagccc cacatgttgt tccagccctg ccaacttagca accagctctg tgacctggag 180
 cagcagcgcc atctctgggc ttcagtcttc tcccagagca caaaggactc tgggtctgac 240
 ctcactgttt ctggaaggac atgggggctt agagtcctaa acagactggt tcccccttcc 300
 55 agcagagaaa ggagtcgaag aagccaccag ccaagctgca gccccgagct ctagcaggct 360
 ggctccgccc ggaagatgga ggtcaagcag aagg 394

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201030905

②² Fecha de presentación de la solicitud: 10.06.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20070086997 A1 (MINTZ, L.) 19.04.2007, SEQ ID nº 32.	1,2
X	GAHETE, M.D. "Somatostatin, cortistatin, ghrelin and their receptors: from an endocrine system to a pleiotropic system of pathophysiologic relevance". TESIS DOCTORAL. [en línea] 08.03.2010. [recuperado el 16.09.2011]. Recuperado de internet: <URL:tdx.cat/handle/10803/14917>. Todo el documento, especialmente página 21, apartado 3.2.2.	1-12
X	WO 02090387 A1 (QUEENSLAND UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 14.11.2002, reivindicaciones.	4-9,12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.12.2011

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/60 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

G01N33/74 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, G01N, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, GOOGLE, EMBL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en una variante de ghrelina de SEQ ID nº 1 y su uso como marcador del cáncer de mama, ovario, endometrio, etc.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20070086997 A1 (MINTZ, L.)	19.04.2007
D02	GAHETE, M.D. "Somatostatin, cortistatin, ghrelin and their receptors: from an endocrine system to a pleiotropic system of pathophysiologic relevance". TESIS DOCTORAL. [en línea] 08.03.2010. [recuperado el 16.09.2011]. Recuperado de internet: <URL: tdx.cat/handle/10803/14917>. Todo el documento, especialmente página 21, apartado 3.2.2.	
D03	WO 02090387 A1 (QUEENSLAND UNIVERSITY OF TECHNOLOGY)	14.11.2002

El documento D01, describe una variante de ghrelina humana de secuencia SEQ ID nº 32, idéntica a la secuencia SEQ ID nº 1 de la presente solicitud. La secuencia SEQ ID nº 32 del documento se utiliza como marcador de la obesidad y la diabetes.

El documento D02, es la Tesis Doctoral de Manuel Gahete, uno de los inventores de la solicitud objeto de este informe. En la página 32, apartado 3.2.2 de dicha Tesis, se menciona que la expresión de la variante In2 de la invención, está aumentada en líneas celulares de cáncer de mama. También está aumentada la expresión de GOAT (ghrelina aciltransferasa) y del receptor truncado de ghrelina GHS-R1b. La tesis doctoral se defendió en una fecha anterior a la fecha de presentación de la solicitud de patente objeto de este informe.

El documento D03, describe el aumento en la expresión del receptor GHS-R1b de ghrelina que se produce en células de cáncer de mama. Se reivindica un método de diagnóstico de cáncer en el que se miden los niveles de GHS-R1b o GHS-R1b y además, una preproghrelin que carece del Exon3, en una muestra de tejido celular. El cáncer puede ser de próstata, ovario, mama, cervical, coriocarcinoma o de útero.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-2

La variante de ghrelina de secuencia SEQ ID nº 1, ha sido descrita previamente en el documento D01. Las reivindicaciones 1 y 2 no son nuevas y no tienen actividad inventiva; incumplen por tanto, los requisitos de los Art. 6 y 8 de la LP.

Reivindicaciones 3-12

El contenido de la presente solicitud internacional, ha sido descrito previamente en el documento D02, donde en el apartado 3.2.2, se describe que los niveles de expresión de la variante In2 de ghrelina, de GOAT y de GHS-R1b, están aumentados en células de cáncer de mama. En el documento D03, también se describe un método de diagnóstico de varios tipos de cáncer entre los que se encuentra el cáncer de mama, en el que se determina en una muestra de tejido, el nivel del receptor GHS-R1b. Una variación del método es determinar también una variante de ghrelina que carece del exón3 (Ex3), exón que tampoco se expresa en la variante reivindicada en la presente solicitud. El contenido de las reivindicaciones 3-14, ha sido descrito previamente. Dichas reivindicaciones no cumplen los requisitos de novedad y de actividad inventiva de acuerdo a los Art. 6 y 8 de la LP.