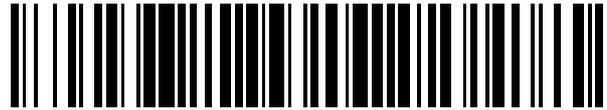


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 125**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2003 E 03776580 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **17.08.2005 EP 1563308**

54 Título: **Método y kits para diagnosticar una tumorigenicidad**

30 Prioridad:

28.10.2002 US 281160

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

08.02.2013

73 Titular/es:

**A & G PHARMACEUTICAL, INC. (100.0%)
9130 RED BRANCH ROAD SUITE U/V
COLUMBIA, MD 21045, US**

72 Inventor/es:

SERRERO, GINETTE

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 125 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

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere a biología celular, fisiología y medicina, y se refiere a un factor de crecimiento de la glicoproteína 88kDa ("GP88") PCDGF. Más específicamente la invención se refiere a un kit de productos, composiciones y métodos que son útiles para el diagnóstico de enfermedades incluido el cáncer.

REFERENCIAS

[0002] Se hace referencia en este documento a varias publicaciones con números arábigos entre paréntesis. Todas las citas para estas referencias pueden encontrarse al final de la especificación inmediatamente antes de las reivindicaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] La proliferación y diferenciación de las células en organismos multicelulares está sujeta a un proceso altamente regulado. Una característica distintiva de las células cancerosas es la ausencia de control sobre este proceso; la proliferación y diferenciación se desregulan dando lugar a un crecimiento descontrolado. Se han dedicado importantes esfuerzos de investigación hacia un mejor entendimiento de esta diferencia entre las células normales y tumorales. Un área de enfoque de la investigación es la de los factores de crecimiento y, más específicamente, la estimulación del crecimiento autocrino.

[0004] Los factores de crecimiento son polipéptidos que llevan mensajes a las células respecto al crecimiento, diferenciación, migración y expresión genética. Normalmente, los factores de crecimiento son producidos en una célula y actúan sobre otra célula para estimular la proliferación. Sin embargo, ciertas células malignas, en cultivo, demuestran una dependencia mayor o absoluta de un mecanismo de crecimiento autocrino. Las células malignas que observan este comportamiento autocrino eluden la regulación de la producción del factor de crecimiento por otras células y están por tanto no reguladas en su crecimiento.

[0005] El estudio del control de crecimiento autocrino avanza la comprensión de los mecanismos de crecimiento celular y lleva a avances importantes en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Con este fin, se ha estudiado una serie de factores de crecimiento, incluyendo los factores de crecimiento similares a insulina ("IGF1" y "IGF-b"), y el factor de crecimiento epidérmico ("EGF").

[0006] La presente invención está dirigida a un factor de crecimiento descubierto recientemente. Este factor de crecimiento fue descubierto primero en el medio de cultivo de "células PC" altamente tumorigénicas, una variante insulino-independiente aislada de la línea celular adipogénica 1246 derivada de teratoma. Este factor de crecimiento es referido en este documento como "GP88", como PCDGF. GP88 se ha purificado y caracterizado estructuralmente. La secuencia de aminoácidos del GP88 indica que GP88 tiene similitudes de secuencia de aminoácidos con el precursor de granulina/epitelina de ratón.

[0007] Las granulinas/epitelinas ("grn/epi") son polipéptidos 6kDa y pertenecen a una familia nueva de polipéptidos ricos en cisteína doble. La patente U.S. No. 5,416,192 (Shoyab et al.) está dirigida a epitelinas 6 kDa, particularmente epitelina 1 y epitelina 2. Según Shoyab, ambas epitelinas están codificadas por un precursor 63.5 kDa común, que es procesado en formas más pequeñas tan pronto es sintetizado, de modo que los únicos productos naturales encontrados en muestras biológicas son las formas 6 kDa. Shoyab et al enseña que el precursor epitelina es biológicamente inactivo.

[0008] Contrariamente a las enseñanzas de Shoyab et al., el laboratorio del inventor ha demostrado que el precursor no es siempre procesado tan pronto como se sintetiza. Unos estudios, conducidos en parte por este inventor, han demostrado que el precursor (e.d., GP88) es de hecho secretado como una glicoproteína 88kDa con una fracción de carbohidrato unido a N de 20kDa. Análisis de la secuencia N-terminal de GP88 indican que GP88 comienza en el aminoácido 17 del precursor grn/epi, demostrando que los primeros 17 aminoácidos de la secuencia de la proteína deducidos del ADNc precursor corresponden a un péptido señal compatible con la orientación para la localización o para la secreción de la membrana. También en contraste con las enseñanzas de Shoyab et al., GP88 está biológicamente activado y tiene actividad promotora de crecimiento, particularmente como un factor autocrino de crecimiento para las células productoras.

[0009] El diagnóstico de cáncer a menudo requiere el estudio de una biopsia de un tejido sospechoso de ser tumorigénico, ensayando la muestra de tejido para determinar si está presente un etiquetador tumoral, y determinar si la muestra de tejido es tumorigénica. Los procedimientos de biopsia pueden ser arriesgados y dolorosos dependiendo de la ubicación del tejido y la condición del paciente. Además, el trauma provocado por los procedimientos de biopsia puede incrementar el riesgo de malignidad. Un estudio publicado en el British Medical Journal identificó la biopsia como el factor de riesgo más fuerte para el cáncer testicular. Swerdlow et al., BMJ 1997;314:1507. La biopsia ha sido también identificada como un factor de riesgo en el cáncer de mama, cáncer de hígado, y otros tipos de cáncer. En adición, un estudio conducido en la Universidad Johns Hopkins concluyó que los diagnósticos erróneos después de las biopsias

sucedan a un ritmo significativo. Kronz et al., Cancer: Dec. 1, 1999, Vol. 86, no. 11 pp 2426-2435. Un diagnóstico erróneo puede ser debido, en parte, a los pequeños tamaños de muestras obtenidas de las biopsias con aguja y otros procedimientos que capturan sólo pequeñas muestras de tejido. Pequeños tamaños de las muestras de biopsia reducen el riesgo del paciente.

5 Id. Sin embargo, el riesgo de un diagnóstico erróneo aumenta solo cuando una pequeña muestra de tejido es utilizada. Id.

US 6,309,826 enseña métodos de diagnóstico de tumorigenicidad que comprenden la medición del ácido nucleico de GP88.

10 US 6,309,826 también divulga anticuerpos anti-GP88 y el hecho que GP88 se encuentra en el suero de los ratones, tejido adiposo, cerebro, testículos, ovarios, hígado y riñón.

[0010] Lo que se necesita son nuevos métodos y kits para el diagnóstico, tratamiento, y prevención del cáncer, y particularmente métodos y kits que eviten riesgos asociados con la biopsia del tejido.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 **[0011]** El inventor ha descubierto inesperadamente que una glicoproteína (GP88), que se expresa de manera bien regulada en células normales, es sobreexpresada y no regulada en células altamente tumorigénicas derivadas de las células normales, que GP88 actúa como un estimulador de crecimiento rigurosamente necesario para las células tumorigénicas y que la inhibición de la expresión o acción de GP88 en las células tumorigénicas resulta en una inhibición de las propiedades tumorigénicas de las células sobreproductoras.

20 **[0012]** El inventor ha descubierto además métodos para la detección de GP88 en fluidos biológicos en concentraciones tan bajas como 0,1 nanogramos de GP88 por mililitro (ng/ml). La invención proporciona métodos y kits no invasivos para la detección de GP88 en un fluido biológico (ej., sangre entera, plasma, suero, linfa, saliva, y orina).

25 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para medir la concentración de GP88/PCDGF en una muestra de fluido biológico que comprende contactar dicha muestra con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-GP88/PCDGF de la misma y medir la concentración de GP88/PCDGF en el que PCDGF es capaz de ser detectado a una concentración tan baja como 0,1 nanogramos de GP88/PCDGF por mililitro, en el que el anticuerpo anti-GP88/PCDGF es producido de una línea celular de hibridoma seleccionada del grupo consistente en Número de Acceso ATCC PTA-5262 (6B3), Número de Acceso ATCC PTA-5261 (6B2), Número ATCC PTA-5589 (2A5), Número ATCC PTA-5593 (4D1), Número ATCC PTA-5259 (3F5), Número ATCC PTA-5260 (5B4), y Número ATCC PTA-5591 (3F8). La muestra de fluido biológico puede ser una muestra de suero. La invención además proporciona un método para el diagnóstico de la actividad tumorigénica en células que comprende: medir el nivel de proteína GP88/PCDGF en una primera muestra de fluido biológico tomada de un paciente; medir el nivel de proteína GP88/PCDGF en una segunda muestra de fluido biológico tomada de un paciente; y diagnosticar la actividad tumorigénica en las células determinando si el nivel medido de la proteína GP88/PCDGF en dicha segunda muestra es mayor que el nivel en dicha primera muestra en una cantidad suficiente para indicar actividad tumorigénica en las células, en el que la medición del nivel de GP88/PCDGF se lleva a cabo usando el método del primer aspecto de la invención.

30 La presente invención también proporciona un método para el diagnóstico de actividad tumorigénica en células que comprende medir el nivel de GP88/PCDGF en una muestra de fluido biológico usando un anticuerpo anti-GP88/PCDGF, y determinar si el nivel de GP88/PCDGF en dicha muestra es suficiente para indicar actividad tumorigénica en las células, en el que la medición del nivel de GP88/PCDGF se lleva a cabo usando el método del primer aspecto de la invención.

35 La invención aún proporciona además un método para determinar si un paciente responde o es receptivo a la terapia anti-tumorigénica, que comprende medir la concentración de GP88/PCDGF en una muestra de fluido biológico de un paciente y determinar si la concentración de GP88/PCDGF en dicha muestra es suficiente para indicar que dicho paciente no responde o es receptivo a terapia anti-tumorigénica, en el que la medición del nivel de GP88/PCDGF se lleva a cabo usando el método del primer aspecto de la invención.

40 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-GP88/PCDGF producido de una línea celular de hibridoma seleccionada del grupo consistente de ATCC Número de Acceso PTA-5262 (6B3), Número de Acceso ATCC PTA-5261 (682), Número ATCC PTA-5589 (2A5), Número ATCC PTA-5593 (4D1), Número ATCC PTA-5259 (3F5), Número ATCC PTA-5260 (5B4), y Número ATCC PTA-5591 (3F8), en el que dicho anticuerpo anti-GP88/PCDGF es capaz de detectar GP88 a una concentración tan baja como 0,1 nanogramos por mililitro.

45 La invención proporciona además un kit para diagnosticar actividad tumorigénica en células midiendo la concentración de PCDGF según el método del primer aspecto de la invención, que comprende un recipiente, y un anticuerpo PCDGF anti-humano como se describe en el primer aspecto de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

50 La invención aún proporciona además un kit para determinar si un paciente responde o es receptivo a terapia anti-tumorigénica midiendo la concentración de PCDGF según el método del primer aspecto de la invención, que

comprende un recipiente y un anticuerpo PCDGF anti-humano como se describe en el primer aspecto de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

5 **[0013]** El uso del término “expresión alterada” en este documento significa expresión aumentada o sobreexpresión de GP88 por un factor de por lo menos dos veces, y a veces por un factor de 10 o más, en base al nivel de ARNm o proteína en comparación con las células normales correspondientes o células periféricas circundantes. El término “expresión alterada” también significa la expresión que se vuelve no regulada o constitutiva sin ser necesariamente elevada. El uso de los términos “respuesta” aumentada o alterada a la GP88 significa un estado en el que el incremento de cualquiera de las funciones biológicas (ej., crecimiento, diferenciación, inefectividad viral) conferidas por GP88 da lugar a la misma o equivalente condición que la expresión alterada de GP88.

10 **[0014]** El uso del término “GP88” como PCDGF en este documento significa precursor epitelio/granulina en extractos de células y fluidos extracelulares, y pretende incluir no sólo GP88 según las secuencias de aminoácidos incluidas en las figuras 8 o 9, los cuales son de origen ratón y humano, sino también GP88 de otras especies. En adición, el término también incluye derivados funcionales del mismo que tienen componentes adicionales tales como una fracción carbohidrato que incluye una glicoproteína u otras estructuras modificadas.

15 **[0015]** También se entiende por el término GP88 cualquier fragmento de polipéptido con al menos 10 aminoácidos presente en las secuencias mencionadas anteriormente. Las secuencias de esta longitud son útiles como antígenos y para hacer conjugados inmunogénicos con portadores para la producción de anticuerpos específicos para distintos epítopos de la proteína entera. Tales polipéptidos son útiles para la detección de tales anticuerpos y para métodos dirigidos a la detección de GP88 en fluidos biológicos. Es bien sabido en la técnica que los péptidos son útiles en la generación de anticuerpos contra proteínas más grandes (7).

Péptidos de 12-19 aminoácidos de longitud se han utilizado con éxito para desarrollar anticuerpos que reconozcan la GP88 de longitud total.

25 **[0016]** El polipéptido puede existir unido a otra molécula de forma covalente o no covalente. Por ejemplo, puede estar fusionado a uno u otros polipéptidos más via uno o más enlaces peptídicos tales como glutatión transferasa, poli-histidina, o etiqueta myc.

[0017] El polipéptido es suficientemente grande para abarcar un determinante o epítipo antigénicamente distinto que puede usarse como un inmunógeno para reproducir o ensayar anticuerpos contra GP88 o un derivado funcional de la misma.

30 **[0018]** Un “fragmento” de GP88 se refiere a cualquier subconjunto de la molécula que es un péptido más corto que retiene las propiedades tumorigénicas de GP88. Esto corresponde por ejemplo a regiones tales como K19T y S14R para GP88 de ratón, y E19V y A14R (equivalente a K19T y S14R de ratón, respectivamente) para GP88 humano.

[0019] Una “variante” de GP88 se refiere a una molécula sustancialmente similar ya sea al péptido completo o a un fragmento del mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 **[0020]** FIG. 1A compara el nivel de expresión de la proteína GP88 en las líneas celulares 1246, 1246-3A y PC. Las células se cultivaron en medio DME-F12 suplementado con 2% de suero fetal bovino (FBS). Los niveles de expresión de GP88 se midieron por inmunoprecipitación y análisis de Western blot con anticuerpos anti-K19T.

[0021] FIG. 1B compara el nivel de expresión de ARNm de GP88 en las líneas celulares 1246, 1246-3A y PC. El ARNm para RPL32 es utilizado como un control de intervalo para cantidades iguales de carga de ARN.

40 **[0022]** FIG. 1C compara la expresión de ARNm de GP88 en células 1246 (panel izquierdo) y en células PC (panel derecho) en el medio con suero y sin suero. Los resultados muestran que la expresión de GP88 en células 1246 se inhibe por la adición de suero fetal bovino mientras que tal exhibición no se observa en las células PC altamente tumorigénicas.

45 **[0023]** FIG. 2 ilustra el efecto del tratamiento de células PC altamente tumorigénicas con concentraciones crecientes de anticuerpos neutralizantes anti-GP88.

[0024] FIG. 3 muestra ratones C3H inyectados por vía subcutánea con 10^6 células PC transfectadas con GP88 antisentido (abajo) y con células PC de control con vector vacío transfectadas (arriba).

[0025] FIG. 4 muestra niveles de expresión de GP88 *in vivo* en tejidos tumorales de ratones C3H y en tejidos normales circundantes.

50 **[0026]** FIG. 5 muestra niveles de expresión de ARNm de GP88 en líneas celulares de carcinomas de mama humano con receptor de estrógeno positivo y receptor de estrógeno negativo.

[0027] FIG. 6 muestra el efecto de concentraciones crecientes de GP88 en el crecimiento de la línea celular C57 epitelial mamaria de ratón.

5 [0028] FIG. 7 muestra las propiedades de crecimiento y capacidad tumorigénica de células PC transfectadas con un vector de expresión controlada promotor de citomegalovirus que contiene GP88 en orientación antisentido y células PC transfectadas con un vector vacío.

[0029] FIGS. 8A-8C muestran el nucleótido y la secuencia deducida de aminoácidos de GP88 de ratón. Las regiones péptidas usadas como antígenos para conseguir anticuerpos anti-GP88 K19T y S14R están subrayadas. La región clonada en la orientación antisentido en el vector de expresión de mamíferos pCMV4 se indica entre paréntesis.

10 [0030] FIG. 9A muestra la secuencia nucleótida de ADNc GP88 humano. Indicada entre paréntesis está la región clonada en la orientación antisentido en el sistema de expresión de mamíferos ADNpc3; y

[0031] FIG. 9B muestra la secuencia deducida de aminoácidos de GP88 humano. La región E19V usada como antígeno para desarrollar anticuerpos neutralizantes de GP88 anti-humano se subraya. También indica la región A14R equivalente a la región S14R de ratón.

15 [0032] FIG. 10 muestra la secuencia de aminoácidos de GP88 de ratón dispuesta para mostrar las repeticiones 7 y media definidas como granulinas g, f, B, A, C, D y e (lado derecho). Esta representación muestra que la región K19T y S14R usada para conseguir anticuerpos de GP88 para desarrollar anticuerpos neutralizantes anti-GP88 se encuentra entre dos repeticiones epitelina/granulina en lo que se considera una región variante. Indicada en el lado derecho está la clasificación de granulina de las repeticiones según Bateman et al (6). La granulina B y granulina A también se definen como epitelina 2 y epitelina 1 respectivamente según Plowman et al., 1992 (5).

20

[0033] FIG. 11 muestra una representación esquemática de pCMV4 y un clon de ADNc de GP88 que indica los sitios de restricción usados para clonar ADNc antisentido de GP88 en el vector de expresión.

25 [0034] FIG. 12 muestra la reticulación de ¹²⁵I-rGP88 a receptores de superficie celular de GP88 en células CCL-64. La reacción de reticulación se llevó a cabo con suberato de disuccinimidilo (DSS). Los productos de reacción fueron analizados por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 7%.

[0035] FIG. 13 muestra la reticulación de ¹²⁵I-rGP88 a los receptores de superficie celular GP88 en fibroblastos 3T3, células PC y células epiteliales mamarias C57MG. Los resultados muestran que estas distintas líneas celulares exhiben receptores de superficie celular de GP88 de peso molecular similar como las de las células CCL64 (FIG. 12).

30 [0036] FIG. 14 muestra niveles de expresión de GP88 en células epiteliales mamarias no tumorigénica MCF 10A y en malignas (MCF 7, MDA-468).

[0037] FIG. 15 muestra que la expresión de GP88 se inhibe por transfección de ADNc antisentido de GP88 en células MDA-468 de carcinoma de mama.

35 [0038] FIG. 16 es un gráfico que muestra la densidad óptica (eje-y) de muestras de suero que contienen cantidades conocidas de GP88 (eje-x). El gráfico puede usarse como una referencia para determinar la concentración de GP88 en una muestra de fluido biológico como suero sanguíneo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Actividad Biológica de GP88

40 [0039] La invención se refiere a GP88 y a métodos y kits útiles para ayudar en el diagnóstico de enfermedades vinculadas a la expresión alterada (aumentada) de GP88. Usando un sistema de modelo de ratón que consta de tres líneas celulares, el inventor ha mostrado que las células que sobreexpresan GP88 forman tumores. La línea celular madre, 1246, es una línea celular adipogénica C3H de ratón que prolifera y se diferencia en adipocitos en un medio definido bajo regulación estricta por insulina. Las células 1246 no pueden formar tumores en un animal singénico (ratón C3H) incluso cuando se inyecta en una alta densidad celular. Una línea celular independiente de insulina, 1246-3A, fue aislada de células 1246 mantenidas en un medio libre de insulina. Las células 1246-3A perdieron la capacidad de diferenciarse y formaron tumores cuando se inyectan 10⁶ por vía subcutánea en ratones singénicos. Una línea celular altamente tumorigénica, PC, fue desarrollada a partir de células 1246-3A por una técnica de lanzadera *in vitro-in vivo*. Las células PC formaron tumores cuando fueron inyectadas 10⁴ células en ratones singénicos.

45

50 [0040] GP88 está sobreexpresada en líneas celulares tumorigénicas independientes de insulina respecto a la línea celular madre no tumorigénica dependiente de insulina. Por otra parte, el grado de sobreexpresión de GP88 se correlaciona positivamente con el grado de tumorigenicidad para estas células, demostrando por primera vez que GP88 es importante en la tumorigénesis (FIG. 1). Con referencia a la FIG. 1, dado que GP88 se sintetiza por las células pero también se secreta en medio de cultivo, el nivel de GP88 se determinó en lisados celulares y en medio de cultivo

(CM). Todas las células fueron cultivadas en medio nutritivo DME/F12 suplementado con 2% de suero fetal bovino. Cuando las células alcanzaron confluencia, el medio de cultivo (CM) se recogió y se prepararon lisados celulares mediante incubación en tampón que contiene detergente seguido por una centrifugación de 10,000 x g. Los lisados celulares y el medio acondicionado fueron normalizados por el número de células. Las muestras de lisado celular y el medio acondicionado fueron analizados por análisis de Western blot usando un anticuerpo anti-GP88, como se explica a continuación.

[0041] El desarrollo de un anticuerpo neutralizante confirmó el papel clave de GP88 en la tumorigénesis. Cuando se añadió al medio de cultivo un anticuerpo anti-GP88 dirigido a la región K19T de la GP88 de ratón, el crecimiento de células PC altamente tumorigénicas fue inhibido de manera dosis-dependiente (FIG. 2). Con referencia a la FIG. 2, las células PC fueron cultivadas en placas de 96 pocillos con una densidad 2×10^4 células/pocillo en el medio DME/F12 suplementado con fibronectina humana (2 µg/ml) y transferrina humana (10 µg/ml). Se añadieron concentraciones crecientes de fracción IgG anti-GP88 se añadieron a los pocillos después de que las células fueron unidas. Las células de control fueron tratadas con concentraciones equivalentes de IgG no inmune. Dos días más tarde, se añadió 0,25 mCi de ³H-timidina por pocillo durante 6 horas. Las células fueron cosechadas para contar ³H-timidina incorporada en el ADN como una medida para la proliferación celular.

[0042] Por otra parte, cuando la expresión de GP88 fue específicamente inhibida por ADNc antisentido de GP88 en células PC, la producción de GP88 se redujo y estas células PC ya no podían formar tumores en ratones C3H singénicos. En adición, estas células PC recuperaron receptividad a la insulina. Con referencia a la FIG. 3 y las Tablas 1 y 2, los ratones C3H hembra fueron inyectados vía subcutánea con 10^6 células PC transfectadas de GP88 antisentido (como se explica a continuación) o 10^6 células PC transfectadas de vector vacío. Los ratones fueron supervisados a diario en cuanto a aparición del tumor. Se tomaron fotografías 45 días después de la inyección de las células. Los resultados muestran que los ratones inyectados con células PC GP88 antisentido no desarrollan tumores, en contraste con los ratones inyectados con células PC transfectadas de vector vacío usadas como control.

Tabla 1. COMPARACIÓN DE PROPIEDADES TUMORIGÉNICAS DE CÉLULAS TRANSFECTADAS ANTISENTIDO DE GP88, CÉLULAS TRANSFECTADAS DE CONTROL Y CÉLULAS PC

CÉLULAS INYECTADAS	DIA PROMEDIO DE DETECCIÓN DEL TUMOR	NÚMERO DE RATONES CON TUMORES	PESO PROMEDIO DEL TUMOR (g)
PC	15±3.0	5/5	9.0±3.2
P14	15±3.7	5/5	7.8±2.7
ASGP88	---	0/5	---

PC: Células no transfectadas de control

P-14: Células PC transfectadas de vector vacío

ASGP88: Células PC transfectadas con vector de expresión que contiene ADNc antisentido de GP88

Los tumores fueron extirpados y pesados a los 45 días. – indica que no hay formación de tumores.

Tabla 2. COMPARACIÓN DE PROPIEDADES DE CÉLULAS 1246, CÉLULAS PC Y CÉLULAS GP88 ANTISENTIDO

Células 1246	Células PC de independencia de insulina	Células GP88 antisentido transfección de GP88 antisentido
--------------	---	---

Receptiva a insulina para crecimiento y diferenciación	Insulina-independiente para diferenciación de crecimiento deficiente	Recuperación de receptividad a insulina para crecimiento (¿diferenciación?)
alta expresión del receptor de insulina de superficie celular	Producción autocrina de factor relacionado con insulina muy baja expresión del receptor de insulina de superficie celular	elevada expresión del receptor de insulina de superficie celular
baja expresión de GP88	constitutivamente alta expresión de GP88	expresión de GP88 inhibida por antisentido
expresión de GP88 inhibida por suero	no inhibición por suero	
expresión de GP88 regulada por insulina	expresión de GP88 constitutiva	recuperación de regulación de insulina para expresión endógena de GP88
no tumorigénico	altamente tumorigénico	no tumorigénico

- 5 **[0043]** La comparación de la expresión de GP88 indica que los niveles GP88 *in vivo* en tumores es mucho más alta que en tejidos normales (FIG. 4). Se inyectaron ratones C3H con 10^6 células PC. Los ratones con tumores fueron sacrificados. Los tumores, almohadillas de grasa y el tejido conjuntivo fueron recogidos. Se prepararon lisados celulares por incubación en detergente con tampón como se describe anteriormente en la FIG. 1. La concentración de proteína de extractos de tejido fue determinada, y se analizaron cantidades equivalentes de proteínas para cada muestra por SDS-PAGE seguido por análisis de Western blot usando anticuerpo anti-GP88 para medir el contenido de GP88 en extractos de tejidos. Los resultados mostraron que el nivel de GP88 en extractos de tumor es al menos 10 veces mayor que en tejidos conectivos y tejidos grasos circundantes.
- 10 **[0044]** En células normales (células 1246, fibroblastos) la expresión de GP88 está regulada, en particular por la insulina, e inhibida por suero fetal bovino. En células tumorigénicas, una pérdida de regulación de crecimiento normal lleva al aumento de expresión de GP88 y la adquisición de dependencia de GP88 para el crecimiento. Por tanto, la inhibición de la expresión y/o la acción de GP88 es un enfoque eficaz para la supresión de la tumorigénesis. La detección de una elevada expresión de GP88 en biopsias proporciona análisis diagnósticos de los tumores que son
- 15 sensibles a la terapia de inhibición de GP88.
- [0045]** GP88 es también un factor inductor de tumores en cánceres humanos. Como se ve en la línea celular 1246-3A, una pérdida de sensibilidad a la insulina (o a IGF-I) y un aumento simultáneo de la malignidad han sido bien documentados en varios cánceres humanos incluyendo pero no limitándose a los cánceres de mama. Específicamente, el carcinoma de mama es acompañada por la adquisición de un bucle autocrino de insulina/IGF-I, que es también el
- 20 punto de partida del desarrollo de propiedades tumorigénicas en el sistema de modelo de ratón discutido anteriormente. Por otra parte, la expresión de GP88 es elevada en carcinomas de mama humano. Más específicamente, con referencia a la FIG. 5, la GP88 humana fue altamente expresada en células altamente malignas independientes de insulina/IGF-I positivas para el receptores de estrógenos y también negativas para el receptor de estrógenos. También, GP88 es un factor potente de crecimiento para células epiteliales mamarias (FIG. 6). Los datos en la FIG. 5 se
- 25 obtuvieron cultivando células MCF7, MDA-MB-453 y MDA-MB-468 en medio DME/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Se extrajo ARN de cada línea celular por el método ARNzol y se preparó ARN poli-A+. La expresión de ARNm GP88 se examinó por análisis de Northern blot con 3 µg de ARN poli-A+ para cada línea celular usando una sonda de ADNc GP88 marcada ^{32}P .

[0046] Para el análisis Northern blot de expresión de ARNm de GP88 en células o tejidos de roedores (ratones o ratas), usamos una sonda de ADNc GP88 de ratón de 311 bp de longitud comenzando en el nucleótido 551 al 862 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos 160 a 270). El ARN puede extraerse por una variedad de métodos (Sambrook, manual de Biología Molecular: 35) bien conocido por los expertos en la técnica. El método elegido fue extraer ARN usando soluciones ARNzol (Cinnabiotech) o Trizol (GibcoBRL) que consiste de un solo paso de extracción por isotiocianato de guanidinio y fenol-cloroformo.

[0047] Para el análisis Northern blot de la expresión de ARNm de GP88 en líneas celulares humanas, fue desarrollada una sonda de ADNc de GP88 humano de 672 bp correspondiente al nucleótido 1002 al 1674 (correspondiente a la secuencia aminoácida 334 a 558) de GP88 humano.

[0048] Con respecto a la FIG. 6, se cultivaron células C57MG en presencia de concentraciones crecientes de GP88 purificado de medio acondicionado de células PC (panel superior), y se expresó GP88 recombinante en células de insecto (panel inferior), para demostrar el efecto estimulador de crecimiento de concentraciones crecientes de GP88 en el crecimiento de la línea celular epitelial mamaria de ratón C57MG.

[0049] Una correlación entre la producción autocrina de IGF-I y la malignidad aumentada también han sido bien establecidas para glioblastomas, teratocarcinomas y carcinomas de mama. En estos cánceres, la expresión de GP88 es también elevada en tumores humanos en comparación con los fibroblastos humanos no tumorigénicos y otras líneas celulares humanas. GP88 promueve el crecimiento de células de carcinoma mamario.

Anticuerpos Anti-GP88

[0050] La invención proporciona métodos para medir GP88 en fluidos biológicos que pueden ser usados para el diagnóstico de enfermedades vinculadas a una mayor sensibilidad a GP88.

[0051] Proporcionamos un anticuerpo específico para un epítipo de GP88. Tal anticuerpo puede ser usado para detectar la presencia o medir la cantidad o concentración de la molécula GP88, un derivado funcional del mismo o un homólogo de diferentes especie animal en una célula, un extracto de célula o tejido, medio de cultivo o fluido biológico (ej., sangre entera, suero, plasma, linfa, y orina).

[0052] Para uso como antígeno para el desarrollo de anticuerpos, la proteína GP88 producida naturalmente o expresada en forma recombinante o derivado funcional de la misma, preferentemente teniendo al menos 9 aminoácidos, es obtenida y usada para inmunizar un animal para la producción de anticuerpo policlonal o monoclonal. Un anticuerpo se dice que es capaz de unirse a una molécula si es capaz de reaccionar con la molécula a la que se une para por ello unir la molécula al anticuerpo. La reacción específica pretende indicar que el antígeno reaccionará de una manera altamente selectiva con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser evocados por otros antígenos.

[0053] El término anticuerpo en este documento incluye anticuerpos policlonales humanos y no humanos, anticuerpos monoclonales humanos y no humanos (mABs), anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-idAb) y anticuerpos humanizados. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas ya sea de sueros de animales inmunizados con un antígeno o de huevos de gallina. Los anticuerpos monoclonales ("mABs") son poblaciones sustancialmente homogéneas de anticuerpos a antígenos específicos. Los mABs pueden obtenerse por métodos conocidos por los expertos en la técnica (Patente US N° 4,376,110). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase inmunológica incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce anticuerpos humanos y no humanos a GP88 puede ser cultivado *in vitro* o *in vivo*. Para la producción de una gran cantidad de mABs, *in vivo* es el método de producción preferido actualmente. Brevemente, se inyectan células de los hibridomas individuales por vía intraperitoneal en ratones Balb/c preparados con pristane o ratones desnudos para producir fluido de ascitis que contiene altas concentraciones de los mABs deseados. Los mABs pueden ser purificados a partir de tales fluidos de ascitis o de sobranadantes de cultivo usando métodos estándar de cromatografía bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0054] El anticuerpo monoclonal humano para GP88 humana puede prepararse inmunizando ratones transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana. El hibridoma producido usando linfocitos a partir de estos animales transgénicos producirá inmunoglobulina humana en vez de inmunoglobulina de ratón.

[0055] Dado que muchos anticuerpos monoclonales se derivan de origen ratón y otros orígenes no humanos, su eficiencia clínica puede ser limitada debido a la inmunogenicidad de los mABs de roedores administrado a humanos, regeneración débil de función efectora y rápida eliminación del suero. Para evitar estos problemas, las propiedades de unión a antígeno de anticuerpos de ratón pueden ser conferidas a anticuerpos humanos a través de un proceso llamado humanización. Un anticuerpo humanizado contiene las secuencias de aminoácidos para las 6 regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del mAb padre de ratón que se injertan en un marco de anticuerpos humanos. El bajo contenido de secuencias no humanas en anticuerpos humanizados (alrededor de 5%) ha demostrado ser eficaz en la reducción de la inmunogenicidad y en la prolongación de la vida media del suero en humanos. Métodos tales como los que usan presentación de fagos monovalentes y estrategia de biblioteca combinatoria para humanización de anticuerpos monoclonales son ampliamente aplicados a la humanización de una

variedad de anticuerpos y son conocidos por los expertos en la técnica. Estos anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos desarrollados con animales transgénicos como se describe anteriormente son de gran uso terapéutico para diversas enfermedades incluyendo el cáncer.

5 **[0056]** Los sobrenadantes de hibridoma y sueros son analizados respecto a la presencia de anticuerpo específico para GP88 mediante cualquier número de inmunoensayos incluyendo dot blots y inmunoensayos estándares (EIA o ELISA) que son bien conocidos en la técnica. Una vez ha sido identificado que un supernatante tiene un anticuerpo de interés, puede ser además analizado por Western blot para identificar el tamaño del antígeno al que se une el anticuerpo. Un experto en la técnica sabrá cómo preparar y analizar tales hibridomas sin experimentación indebida con el fin de obtener un anticuerpo policlonal o monoclonal deseado.

10 **[0057]** Los anticuerpos quiméricos tienen diferentes porciones derivados de diferentes especies animales. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede tener una región variable de un mAb de ratón y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son también conocidos por los expertos en la técnica.

15 **[0058]** En consecuencia, pueden ser usados mAbs generados contra GP88 para inducir anti-IdABs humanos y no humanos en animales adecuados. Se usan células de bazo de tales ratones inmunizados para producir hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales anti-Id humanos y no humanos. Por otra parte, los anticuerpos monoclonales anti-Id pueden acoplarse a un portador como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o albumina de suero bovino (BSA) y usarse para inmunizar ratones adicionales. Los sueros de estos ratones contendrán anti-anti-IdAb humano o no humano que tiene las propiedades de unión del anticuerpo monoclonal original específico para un epítipo polipéptido de GP88. Los anticuerpos monoclonales anti-Id por lo tanto tienen sus propios epítopos idiotípicos o idiotipos estructuralmente similares al epítipo evaluado.

20

[0059] El término anticuerpo también pretende incluir moléculas intactas así como sus fragmentos tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂, que son capaces de unirse al antígeno. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, desaparecen más rápidamente de la circulación y pueden tener menos tejidos no específicos de unión que un anticuerpo intacto. Tales fragmentos son normalmente producidos por escisión proteolítica, usando enzimas como la papaína (para generar fragmentos Fab) y la pepsina (para generar fragmentos F(ab')₂). Se apreciará que Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención pueden ser usados para la detección o cuantificación de GP88.

25

[0060] Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos útiles en la presente invención pueden también ser usados para detectar en forma cuantitativa o cualitativa la presencia de células que expresan la proteína GP88. Esto se puede lograr por técnicas de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo etiquetado con fluorescencia (ver abajo) con detección fluorescente microscópica, citométrica de flujo, o fluorométrica. La reacción de anticuerpos y polipéptidos de la presente invención pueden detectarse por métodos de inmunoensayo conocidos en la técnica.

30

[0061] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser empleados histológicamente como en microscopia óptica, inmunofluorescencia o inmunomicroscopia, para la detección *in situ* de la proteína GP88 en muestras de tejidos, biopsias, y fluidos biológicos. La detección *in situ* puede llevarse a cabo extrayendo una muestra histológica de un paciente y aplicando el anticuerpo debidamente etiquetado de la presente invención. El anticuerpo (o fragmento) se proporciona preferiblemente aplicando o recubriendo el anticuerpo etiquetado a la muestra biológica. Por el uso de tal procedimiento, es posible determinar no sólo la presencia de la proteína GP88 sino también su distribución en el tejido examinado o concentración en un fluido biológico. Usando la presente invención, los expertos normales en la técnica percibirán fácilmente que cualquier amplia variedad de métodos biológicos (tales como procedimientos de tinción) pueden modificarse con el fin de lograr tal detección *in situ*.

35

40

[0062] Los ensayos para GP88 normalmente comprenden incubar una muestra biológica tal como un fluido biológico, un extracto de tejido, células recién cosechadas o cultivadas o su medio de cultivo en presencia de un anticuerpo detectablemente etiquetado capaz de identificar la proteína GP88 y de detectar el anticuerpo por cualquiera de una serie de técnicas conocidas en la técnica.

45

[0063] La muestra biológica puede ser tratada con un soporte o portador en fase sólida tal como la nitrocelulosa u otro soporte sólido capaz de inmovilizar células o partículas de células o proteínas solubles. El soporte puede luego ser lavado seguido de tratamiento con el anticuerpo anti-GP88 detectablemente etiquetado. Esto es seguido por lavado del soporte para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de etiquetador unido en dicho soporte puede entonces ser detectada por medios convencionales. Por soporte en fase sólida se entiende cualquier soporte capaz de unir antígeno o anticuerpos tales como pero no limitados a vidrio, poliestireno, polipropileno, nilón, celulosa modificada, o poliacrilamida.

50

[0064] La actividad de unión de un determinado lote de anticuerpo a la proteína GP88 puede ser determinada según métodos bien conocidos. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar condiciones operativas y óptimas de ensayo para cada determinación empleando experimentación de rutina.

55

[0065] La detección de la proteína GP88 o derivado funcional de la misma y de un anticuerpo específico para la

proteína puede lograrse por una variedad de inmunoensayos conocidos en la técnica tales como los inmunoensayos vinculados a enzima (EIA) o radioinmunoensayos (RIA). Tales ensayos son bien conocidos en la técnica y un experto sabrá fácilmente cómo llevar a cabo tales ensayos usando los anticuerpos anti-GP88 y la proteína GP88 de la presente invención.

5 **[0066]** Tales inmunoensayos son útiles para detectar y cuantificar la proteína GP88 en suero u otro fluido biológico así como en tejidos, células, extractos celulares, o biopsias. En una realización preferida, la concentración de GP88 se mide en una muestra de tejido como un medio para el diagnóstico de cáncer u otra enfermedad asociada con una expresión aumentada de GP88. En otra realización preferida, la concentración de GP88 en una muestra de fluido
10 biológico se usa para determinar si es probable que un paciente sea sensible, o responde, a la terapia anti-tumorigénica.

[0067] La presencia de ciertos tipos de cánceres (ej., cáncer de mama) y el grado de malignidad se dice que es “proporcional” a un aumento en el nivel de la proteína GP88. El término “proporcional” como se usa en este documento no pretende limitarse a una relación lineal o constante entre el nivel de proteína y las propiedades malignas del cáncer. El término “proporcional” como se usa en este documento, pretende indicar que un mayor nivel de la proteína GP88
15 está relacionado con la aparición, reaparición, o presencia de las propiedades malignas de un cáncer u otra enfermedad asociada con una mayor expresión de GP88 a intervalos de concentración de la proteína que pueden ser fácilmente determinados por un experto en la técnica.

[0068] Otra realización de la invención se refiere a evaluar la eficacia del fármaco o agente anti-cáncer o anti-viral midiendo la capacidad del fármaco o agente de inhibir la expresión o producción de GP88. Los anticuerpos de la presente invención son útiles en un método para evaluar fármacos anti-cáncer o anti-virales porque se pueden emplear para determinar la cantidad de proteína GP88 en uno de los inmunoensayos mencionados. Alternativamente, la cantidad de la proteína GP88 producida se mide por bioensayo (ensayo de proliferación celular) como se describe en este documento. El bioensayo y el inmunoensayo pueden ser usados en combinación para una evaluación más
20 precisa.

25 Detección de GP88 en Fluidos Biológicos

[0069] Realizaciones preferidas de la invención están dirigidas a métodos y kits para la detección de GP88 en fluidos biológicos. Como se describió anteriormente, las células cancerosas expresan niveles elevados de GP88. La presente invención demuestra que GP88 puede ser detectada en fluidos biológicos a una concentración tan baja como 0,1 ng/ml. Como se describió anteriormente, GP88 se sobreexpresa en células cancerosas y niveles elevados de GP88 son
30 indicativos de tumorigenicidad. Normalmente, se requiere una muestra de tejido o biopsia para detectar la presencia de un etiquetador tumoral. Por ejemplo, los pacientes de cáncer de mama a menudo son sometidos a procedimientos de biopsia con aguja con el fin de extraer muestras de tejido mamario para examen para determinar si está presente un particular etiquetador tumoral. Los procedimientos de biopsia, como cualquier procedimiento quirúrgico, están asociados con un mayor riesgo para el paciente. Los procedimientos de biopsia, en particular, han sido asociados con un mayor riesgo de formación de tumores.
35

[0070] A diferencia de los procedimientos de biopsia de tejidos, la muestra de sangre es un procedimiento rutinario y seguro que puede ser llevado a cabo por un paciente si es necesario. Por ejemplo, puede usarse una lanceta estéril para pinchar una yema de dedo del paciente y obtener una pequeña muestra de sangre. La muestra de sangre puede ser procesada por cualquier procedimiento adecuado para aislar las fracciones de suero o plasma. Alternativamente, puede utilizarse una muestra de sangre entera. Un ensayo, por ejemplo un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), utilizando anticuerpos anti-GP88 puede ser usado para detectar la presencia y cuantificar la cantidad de GP88 en la muestra de suero. El muestreo de sangre evita los riesgos asociados con las biopsias de tejido. En adición, la obtención de muestras de sangre del mismo paciente sobre una base regular (ej., exámenes semanales) permite la supervisión del paciente para determinar el nivel de GP88 en el suero con el tiempo. Si el nivel de GP88
40 aumenta, el médico puede tratar al paciente en consecuencia (ej., administrando antagonistas de GP88) antes de que pueda ocurrir un crecimiento significativo del tumor.
45

[0071] Al llevar a cabo un método para medir la concentración de GP88 en un fluido biológico, un fluido biológico (ej., sangre entera, plasma, suero, linfa, saliva, y orina) es contactado con un anticuerpo anti-GP88 y se mide la concentración de GP88. La GP88 puede ser detectada, por ejemplo, a una concentración tan baja como 0,1 ng/ml. Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-GP88 se pueden unir a GP88 y usarse para determinar la cantidad de GP88 en una muestra. Los anticuerpos anti-GP88 que pueden usarse para medir la concentración de GP88 en una muestra de fluido biológico incluyen anticuerpos producidos a partir de las siguientes líneas celulares de hibridomas N° de Acceso ATCC 6B3 PTA-5262 y 6B2 PTA-5261 (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110).
50

[0072] Los ensayos ELISA son rápidos, sensibles, y reproducibles para cuantificar la cantidad de un antígeno en una muestra. Un “sandwich” ELISA utiliza un anticuerpo principal para unir o “capturar” su antígeno (ej., una proteína) y un anticuerpo secundario etiquetado para ligar también al antígeno. La adición de un sustrato para la fracción de detección da lugar a una señal (ej., cambio de color, o radioactividad) que es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. En un sandwich ELISA de ejemplo, el anticuerpo principal es adsorbido a un soporte como un pocillo de una placa de microtitulación. Una muestra que contiene el antígeno se incuba con el anticuerpo principal adjunto y se permite
55

que el antígeno se une al anticuerpo. A continuación, también se permite que un anticuerpo secundario etiquetado con una molécula de detección (ej., enzima, radionucleido) también se ligue al antígeno. Ejemplos de etiquetas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano. Alternativamente, el anticuerpo secundario está sin etiqueta y un tercer anticuerpo (ej., un anticuerpo anti-IgG etiquetado) es también usado en el ensayo. El tercer anticuerpo etiquetado se une a la región constante de inmunoglobulina G (IgG). La adición de un sustrato para el enzima (ej., 2,2-azo-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OPD), y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina base (TMB)) resulta en un cambio de color en la solución de muestra que es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. El cambio de color puede detectarse usando un espectrofotómetro en una longitud de onda adecuada para detectar el cambio de color inducido por la etiqueta del enzima (ej., 624 nm usando TMB como sustrato).

[0073] Alternativamente, el anticuerpo secundario o tercer anticuerpo puede etiquetarse con una fracción radioactiva (ej., ^{125}I , ^{35}S , ^{32}P , ^{12}C). Un detector de radioactividad (ej., contador gamma) puede usarse para medir la radioactividad emitida por el anticuerpo secundario después de ligarse al antígeno. El nivel de radioactividad es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. En otra alternativa más, el nivel de GP88 en una muestra de fluido biológico puede determinarse usando un procedimiento de Western blot. En un procedimiento de Western blot ejemplar, la muestra de fluido biológico se carga en un gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) que se somete a una corriente eléctrica (ej., 20 mA) para separar las proteínas en la muestra de fluido biológico por peso molecular. Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y se incuban con un anticuerpo anti-GP88 etiquetado. Si el anticuerpo anti-GP88 está etiquetado con un enzima, la membrana de nitrocelulosa es expuesta al sustrato para el enzima que induce un cambio de color en la banda de proteína GP88 ubicada en la membrana de nitrocelulosa. La cantidad de GP88 en la muestra es proporcional al grado de cambio de color.

[0074] En una realización de la invención, se usa el anticuerpo monoclonal de GP88 6B3, producido por la línea celular de hibridoma (Número ATCC PTA-5262) como anticuerpo principal en un sandwich ELISA. Pueden usarse varios anticuerpos creados contra GP88 en un ELISA para detectar GP88 (ej., anticuerpos monoclonales de GP88 6B3, 6B2, 2A5, 4D1, 3F5, 5B4, 3F8 producidos a partir de las siguientes líneas celulares de hibridoma respectivamente Número ATCC PTA-5262, Número ATCC PTA-5261, Número ATCC PTA-5589, Número ATCC PTA-5593, Número ATCC PTA-5259, Número ATCC PTA-5260, Número ATCC PTA-5591). Los anticuerpos GP88 etiquetados con peroxidasa de rábano pueden usarse como anticuerpo secundario, y TMB puede ser usado como sustrato. Alternativamente, puede usarse un anticuerpo etiquetado capaz de ligarse a la región constante de una inmunoglobulina como anticuerpo secundario en un ELISA (ej., anticuerpo anti-IgG). Pueden usarse muestras que contienen cantidades conocidas de proteína GP88 (0.1, 2, 5, 10, 20 nanogramos) en un portador (ej., solución tampón) para generar una curva estándar basada en los resultados de un ELISA. La densidad óptica de la muestra puede trazarse respecto a la cantidad conocida de GP88 en la muestra para generar una curva estándar (ej., FIG. 16). La concentración de GP88 en una muestra desconocida puede determinarse midiendo la densidad óptica de una muestra desconocida y usando la curva estándar para calcular la concentración de GP88.

[0075] Un protocolo de ejemplo para un sandwich ELISA incluye los siguientes pasos:

[0076] (1) añadir una solución que contiene el anticuerpo principal al fondo del pocillo de una placa de microtitulación (ej., 50 microlitros de una solución de anticuerpo que contiene 20 mg/ml de anticuerpo).

[0077] (2) incubar la placa de microtitulación durante la noche a 4°C para permitir el ligado completo del anticuerpo al pocillo.

[0078] (3) lavar los pocillos con una solución tampón (ej., solución salina fosfotamponada (PBS))

[0079] (4) bloquear la unión de proteína no específica saturando los pocillos con un tampón de bloqueo (ej., Albumina de Suero Bovino (BSA) en PBS)

[0080] (5) lavar los pocillos con una solución tampón

[0081] (6) añadir una solución que contiene el antígeno e incubar la placa de microtitulación a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.

[0082] (7) lavar los pocillos con una solución tampón

[0083] (8) añadir el anticuerpo secundario etiquetado e incubar la placa de microtitulación durante al menos dos horas a temperatura ambiente

[0084] (9) lavar los pocillos con una solución tampón

[0085] (10) añadir el sustrato deseado diluido en una solución tampón, dejar suficiente tiempo para que ocurra una reacción

[0086] (11) leer la densidad óptica de la solución de sustrato resultante en un lector ELISA a la longitud de onda apropiada para el sustrato.

[0087] FIG. 16 muestra una curva ejemplar que puede ser usado para determinar la concentración de GP88 en un fluido biológico de suero sanguíneo. Muestras conteniendo cantidades conocidas de proteína GP88 recombinante fueron preparadas y medidas usando un ensayo ELISA. Las densidades ópticas de las muestras fueron representadas respecto a cantidades conocidas de proteína GP88. FIG. 16 muestra una relación lineal entre la OD (densidad óptica) de una muestra de fluido biológico (eje-y) y la concentración de GP88 (eje-x). La concentración de GP88 en una muestra de fluido biológico puede ser determinada usando anticuerpos anti-GP88 en una técnica de detección adecuada (ej., ELISA, RIA, Western blot) como descrita anteriormente. En una realización, se mide la densidad óptica de la muestra de fluido biológico y se determina la concentración de GP88 en la muestra de fluido biológico comparando la densidad óptica medida a una curva estándar (ej., FIG. 16). Por ejemplo, usando la curva de la FIG. 16, si la densidad óptica de una muestra de fluido biológico contactada con anticuerpo anti-GP88 y sometida a un inmunoensayo es 0,6, la concentración de GP88 en la muestra de fluido biológico sería 15 ng/ml.

[0088] Las concentraciones séricas de GP88 en humanos sanos varían entre unos 23 ng/ml y 44 ng/ml en humanos sanos. La medición del nivel de GP88 en plasma de voluntarios humanos sanos dio resultados similares. Pacientes humanos con cáncer de mama mostraron niveles elevados de GP88 en suero. Tres de cada veinte pacientes con cáncer de mama mostraron niveles elevados de GP88 (49, 51, y 56 ng/ml). Sin embargo, pacientes con enfermedad progresiva (ej., metastásicos) que no mostraron respuesta a la terapia habían aumentado de forma importante los niveles séricos de GP88 con el tiempo (de 27 a 233 ng/ml en 6 meses). Otro paciente con enfermedad avanzada que no era sensible a la terapia anti-tumorigénica tuvo una concentración sérica GP88 de 158 ng/ml el 21 de marzo de 2002 y 148 ng/ml el 23 de mayo de 2002. Los pacientes diagnosticados inicialmente con cáncer de mama no metastásico y pacientes en remisión tenían concentraciones séricas de GP88 dentro del rango normal. Por tanto, las concentraciones séricas elevadas de GP88 (ej., unos 40 a 50 ng/ml) son indicativas de tumorigenicidad. Niveles muy elevados de GP88 en suero (ej., unos 100 a 300 ng/ml) son indicativos de enfermedad progresiva y resistencia a la terapia anti-tumorigénica.

[0089] En otra realización de la invención, se proporciona un método de diagnóstico de tumorigenicidad que comprende medir el nivel de proteína GP88 en una primera muestra de fluido biológico, medir el nivel de proteína GP88 en una segunda muestra de fluido biológico y diagnosticar tumorigenicidad determinando si el nivel medido de proteína GP88 en la segunda muestra de fluido biológico es mayor que el nivel de proteína GP88 en la muestra de fluido biológico inicial en una cantidad suficiente para indicar tumorigenicidad. Una muestra de fluido biológico inicial puede tomarse de un paciente del que se sospecha que tenga cáncer o una enfermedad relacionada con el crecimiento celular. El nivel de GP88 en la muestra de fluido biológico inicial puede ser medido y comparado al nivel de GP88 en una segunda muestra de fluido biológico tomada en un momento diferente. Las muestras de fluido biológico puede ser tomadas a intervalos regulares y la concentración medida de GP88 en muestras subsiguientes puede ser comparada al nivel de GP88 en la muestra inicial. Si los resultados indican un aumento en el nivel de GP88 en el fluido biológico con el tiempo, el medico puede iniciar o modificar el tratamiento del paciente con el fin de reducir o eliminar el crecimiento del tumor.

[0090] La invención también proporciona métodos para determinar si un paciente es sensible o responde a la terapia tumorigénica que comprenden medir la concentración de GP88 en una muestra de fluido biológico de un paciente que recibe terapia anti-tumorigénica, donde una concentración de GP88 de al menos unos 100 ng/ml indica que el paciente no responde a la terapia anti-tumorigénica. El término "terapia anti-tumorigénica" se refiere a cualquier medicamento, fármaco, terapia, o método de administración de un medicamento, fármaco, o terapia con el propósito de tratar el cáncer o una enfermedad relacionada con el crecimiento. Ejemplos de terapia anti-tumorigénica incluyen la terapia antiestrogenos, el uso de anticuerpos anti-tumorales (ej., anticuerpos anti-GP88), terapia antisentido (ej., ácidos nucleicos anti-GP88), quimioterapia, tratamiento de radiación, y terapia génica. La concentración sérica de GP88 de un paciente sometido a terapia anti-tumorigénica puede ser controlada analizando muestras de suero a intervalos regulares. (ej., diario, semanal, mensual). Un nivel en suero de GP88 de al menos unos 100 ng/ml puede indicar que el paciente no será sensible a o no responde a, la terapia anti-tumorigénica.

[0091] Ciertas terapias anti-tumorigénicas presentan efectos secundarios indeseables o riesgo adicional para el paciente. Por ejemplo, el tratamiento o prevención del cáncer de mama con antiestrógenos (ej., tamoxifeno, raloxifeno) está asociado con un mayor riesgo de cáncer de ovario. Niveles elevados de GP88 indican que un paciente no responderá al tratamiento con antiestrógenos. Si un paciente tiene niveles elevados de GP88 (ej., mayores que unos 100 ng/ml), el paciente probablemente no respondería a terapia antiestrógenos y el riesgo adicional que plantea la terapia antiestrógenos puede superar cualquier beneficio. La quimioterapia también está asociada con muchos efectos secundarios no deseados incluyendo, náuseas, debilidad, pérdida de cabello, pérdida de apetito, etc. Si no es probable que un paciente responda a un determinado tipo de quimioterapia, una terapia anti-tumorigénica con menores efectos secundarios puede ser más eficaz y no somete al paciente a un trauma adicional. La presente invención es útil para determinar si un paciente será sensible o responde a terapia antitumorigénica.

[0092] La invención también proporciona kits para diagnosticar la tumorigenicidad y determinar si un paciente es sensible o responde a la terapia anti-tumorigénica. Tales kits preferiblemente comprenden un recipiente y un compuesto o compuestos para detectar GP88 (ej., anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-GP88). El anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-GP88 puede ser etiquetado (ej., etiquetas enzimáticas, radioisotópicas, fluorescentes, y químicas) para su uso en un método de detección adecuado (ej., ELISA, radioinmunoensayo). En una realización, los kits contienen al menos un anticuerpo principal (ej., anticuerpo monoclonal anti-GP88 6B3), al menos un anticuerpo

secundario etiquetado (ej., anticuerpo policlonal GP88 anti-humano etiquetado con un enzima de detección como el HRP), y al menos un sustrato (ej., TMB). Alternativamente, los kits pueden contener anticuerpo secundario radioetiquetado en lugar de anticuerpo secundario etiquetado con un enzima. Los kits pueden también contener materiales desechables para llevar a cabo ensayos de detección (ej., placas de microtitulación, pipetas).

5 EJEMPLO 1

DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE GP88 EN UNA MUESTRA DE FLUIDO BIOLÓGICO

[0093] Se obtuvieron muestras de suero de 17 voluntarios humanos normales y sanos. Las concentraciones GP88 en muestras de suero humano se midieron por triplicado por el ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA). Se prepararon muestras de GP88 estándar a partir de GP88 recombinante diluido en una solución de glicerol al 30% y PBS-leche al 1% en concentraciones de 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 3, 10, y 20 ng/ml. Pocillos de 100 microlitro en una placa de microtitulación fueron recubiertos con 10 microgramos por mililitro de anticuerpo monoclonal GP88 anti-humano 6B3 (0,78 mg/ml de anticuerpo 6B3 en una solución salina tamponada con fosfato (PBS)) e incubados durante la noche a 4°C. Los pocillos fueron lavados con PBS seguido por la adición de PCDGF anti-humano policlonal (fracción IgG) a cada pocillo en una concentración de 3 microgramos/ml a 37°C durante 1.5 horas. Los pocillos fueron lavados en PBS antes de la adición del anticuerpo de detección (peroxidasa de rábano (HRP)-cabra-conejo-IgG) a cada pocillo. Se añadió TMB (sustrato) y se dejó incubar con las muestras durante 1 hora. La densidad óptica de las muestras fue determinada usando un lector espectrométrico ELISA fijado a una longitud de onda de 620 nanómetros. Al representar la densidad óptica de las muestras estándar de GP88 (eje-y) respecto a la cantidad de GP88 en cada muestra (eje-x) se generó una curva estándar (FIG. 16). La concentración de GP88 de las muestras desconocidas se determinó midiendo la densidad óptica y usando la curva estándar (FIG. 16) para determinar la concentración de GP88. La Tabla 1 proporciona la concentración GP88 en la muestra de suero para cada uno de los diecisiete voluntarios humanos sanos:

Tabla 1

Paciente #	GP88 Conc. (ng/ml)
1	36.415
2	31.534
3	42.342
4	27.109
5	37.85
6	23.793
7	32.837
8	42.208
9	32.089
10	42.792
11	36.213
12	31.902
13	26.383
14	32.823
15	28.028
16	34.1

[0094] La Tabla 2 muestra la concentración de GP88 de muestras de suero tomadas de un paciente con cáncer de mama avanzado progresivo quien no respondió a la terapia anti-tumorigénica. La concentración de GP88 en suero aumentó de 27 a 233 ng/ml en un periodo de seis meses.

Tabla 2

Fecha	GP88 Conc.(ng/ml)
1/8/2001	27
10/10/2001	128.26
21/3/2002	233

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para medir la concentración de GP88/PCDGF en una muestra de fluido biológico que comprende contactar dicha muestra con un anticuerpo anti-GP88/PCDGF o un fragmento de anticuerpo del mismo y medir la concentración de GP88/PCDGF en el que PCDGF es capaz de ser detectada en una concentración tan baja como 0,1 nanogramos de GP88/PCDGF por mililitro, en el que el anticuerpo anti-GP88/PCDGF es producido de una línea celular de hibridoma seleccionada del grupo que consta de ATCC Número de Acceso PTA-5262 (6B3), ATCC Número de Acceso PTA-5261 (6B2), ATCC Número PTA-5589 (2A5), ATCC Número PTA-5593 (4D1), ATCC Número PTA-5259 (3F5), ATCC Número PTA-5260 (5B4), y ATCC Número PTA-5591 (3F8).
- 10 2. Un método para diagnosticar actividad tumorigénica en células que comprende: medir el nivel de la proteína GP88/PCDGF en una primera muestra de fluido biológico tomada de un paciente; medir el nivel de la proteína GP88/PCDGF en una segunda muestra de fluido biológico tomada de un paciente; y diagnosticar actividad tumorigénica en células determinando si el nivel medido de la proteína GP88/PCDGF en dicha segunda muestra es mayor que el nivel en dicha primera muestra en una cantidad suficiente para indicar actividad tumorigénica en células, en el que medir el nivel de GP88/PCDGF se realiza usando el método de la reivindicación 1.
- 15 3. Un método para diagnosticar actividad tumorigénica en células que comprende medir el nivel de GP88/PCDGF en una muestra de fluido biológico usando un anticuerpo anti-GP88/PCDGF, y determinar si el nivel de GP88/PCDGF en dicha muestra es suficiente para indicar actividad tumorigénica en células, en el que medir el nivel de GP88/PCDGF se lleva a cabo usando el método de la reivindicación 1.
- 20 4. Un método para determinar si un paciente responde o es sensible a terapia anti-tumorigénica, que comprende medir la concentración de GP88/PCDGF en una muestra de fluido biológico de un paciente y determinar si la concentración de GP88/PCDGF en dicha muestra es suficiente para indicar que dicho paciente no responde o no es sensible a terapia anti-tumorigénica, en el que medir el nivel de GP88/PCDGF se lleva a cabo usando el método de la reivindicación 1.
- 25 5. Un anticuerpo anti-GP88/PCDGF producido a partir de una línea celular de hibridoma seleccionada del grupo consistente de Número de Acceso ATCC PTA-5262 (6B3), Número de Acceso ATCC PTA-5261 (6B2), Número ATCC PTA-5589 (2A5), Número ATCC PTA-5593 (4D1), Número ATCC PTA-5259 (3F5), Número ATCC PTA-5260 (5B4), y Número ATCC PTA-5591 (3F8), en el que dicho anticuerpo anti-GP88/PCDGF es capaz de detectar GP88 en una concentración tan baja como 0,1 nanogramos por mililitro.
- 30 6. Un método según la reivindicación 1, donde dicha muestra es una muestra de suero.
- 35 7. Un kit para diagnosticar actividad tumorigénica en células mediante la medición de la concentración de PCDGF según el método de la reivindicación 1, que comprende un recipiente, y un anticuerpo de PCDGF anti-humano como se describe en la reivindicación 5 o un fragmento ligante de antígeno del mismo.
8. Un kit para determinar si un paciente está respondiendo o es sensible a terapia anti-tumorigénica mediante la medición de la concentración de PCDGF según el método de la reivindicación 1, que comprende un recipiente y anticuerpo de PCDGF anti-humano como se describe en la reivindicación 5 o un fragmento ligante de antígeno del mismo.

PRODUCCIÓN DE GP88 POR CÉLULAS TUMORIGÉNICAS Y NO TUMORIGÉNICAS

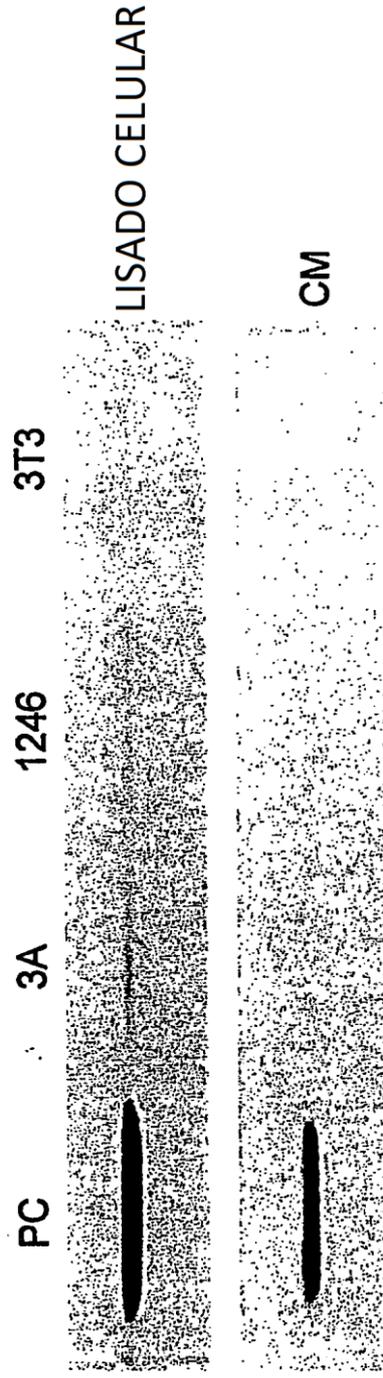


FIG.1A

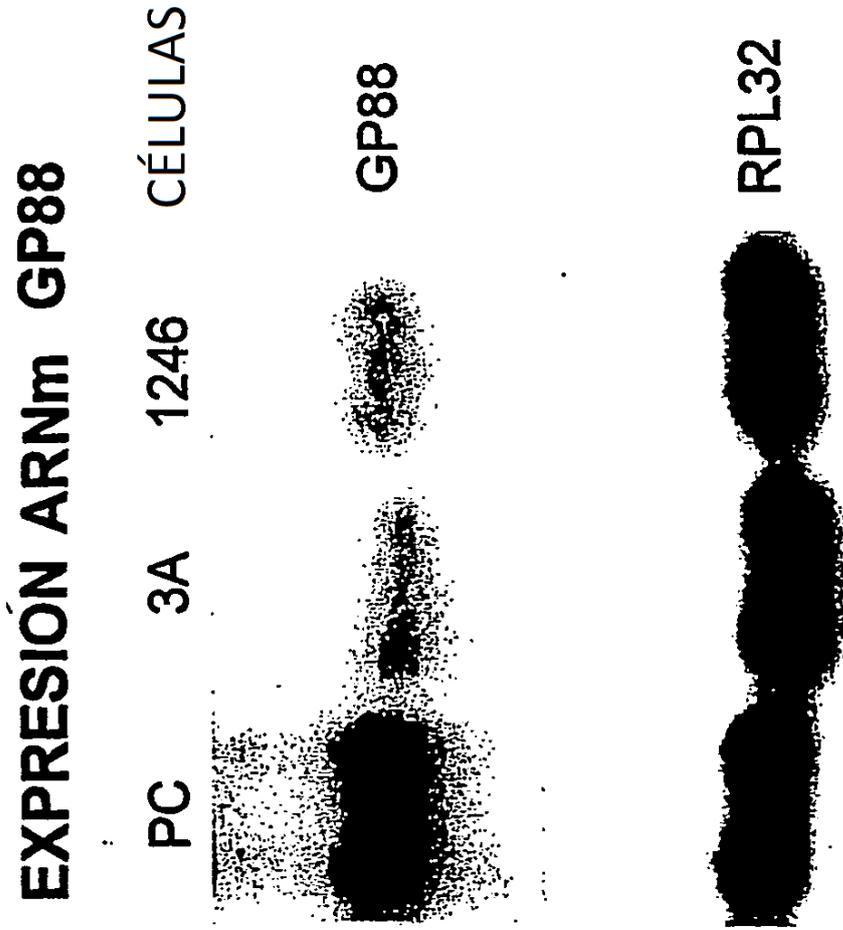


FIG.1B

EXPRESIÓN ARNm GP88 EN VARIAS CONDICIONES DE CULTIVO

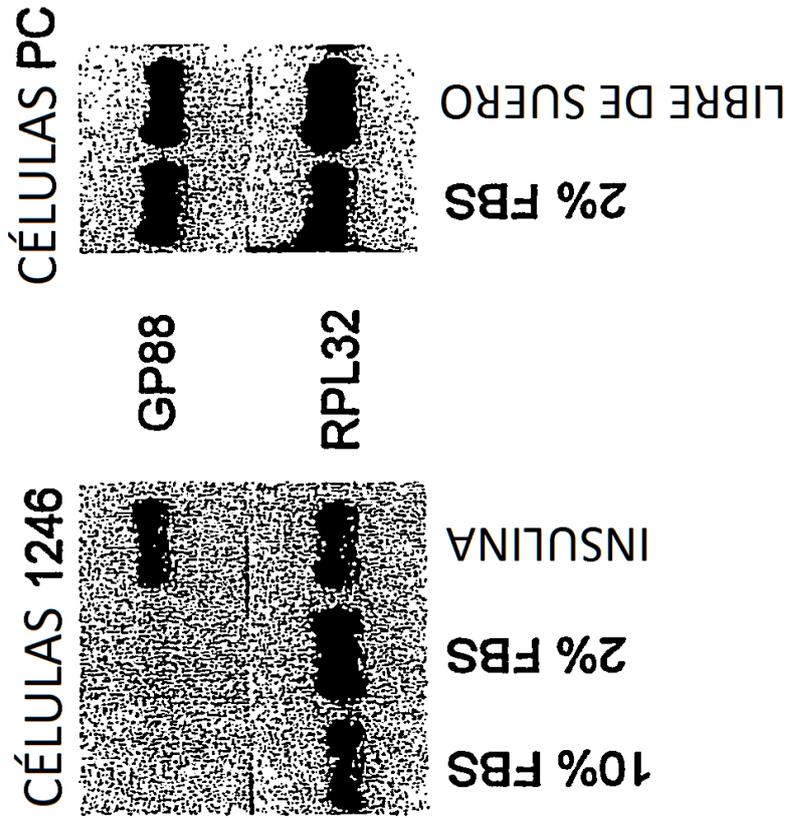


FIG.1C

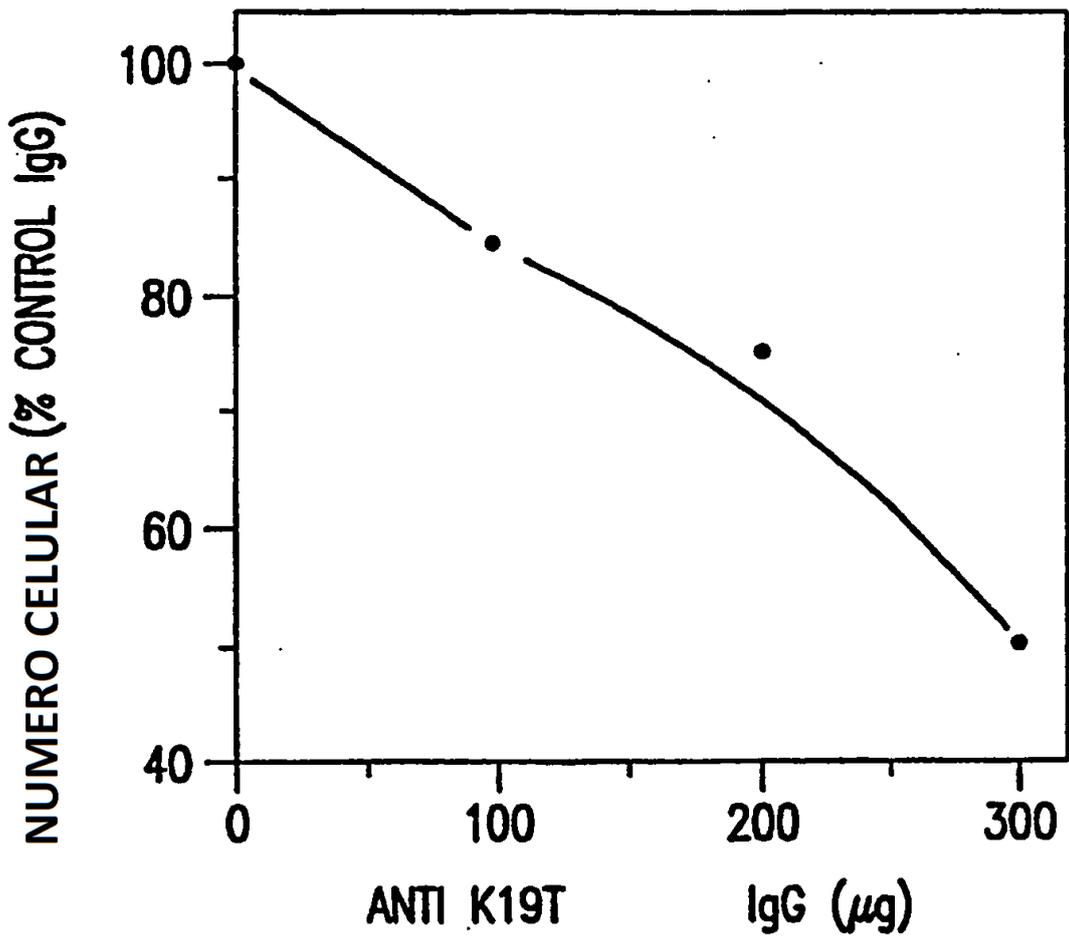
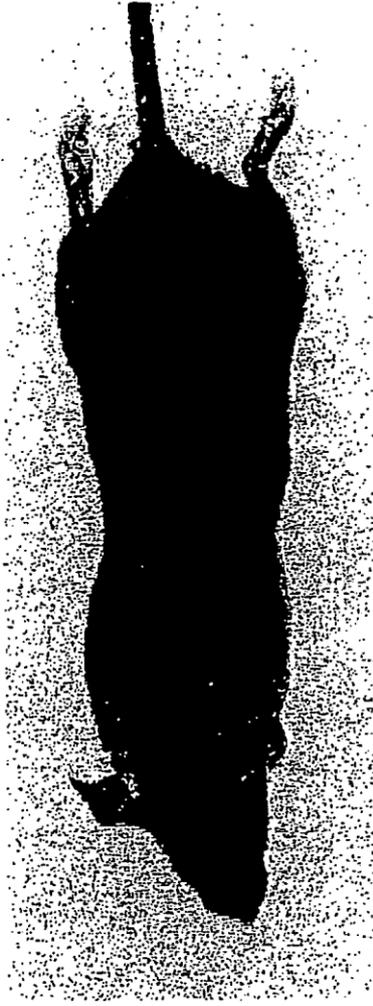


FIG.2

**AUSENCIA DE FORMACIÓN DE TUMOR EN RATONES C3H POR INHIBICIÓN DE LA
EXPRESIÓN GP88**



CÉLULAS PC TRANSFECTADAS GP88 ANTISENTIDO



CONTROL DE CÉLULAS PC TRANSFECTADAS

FIG.3

EXPRESIÓN DE LA PROTEINA GP88 EN EL TUMOR Y LOS TEJIDOS CIRCUNDANTES



FIG.4

EXPRESIÓN DE ARNm GP88 EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO
DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE ESTRÓGENO



FIG.5

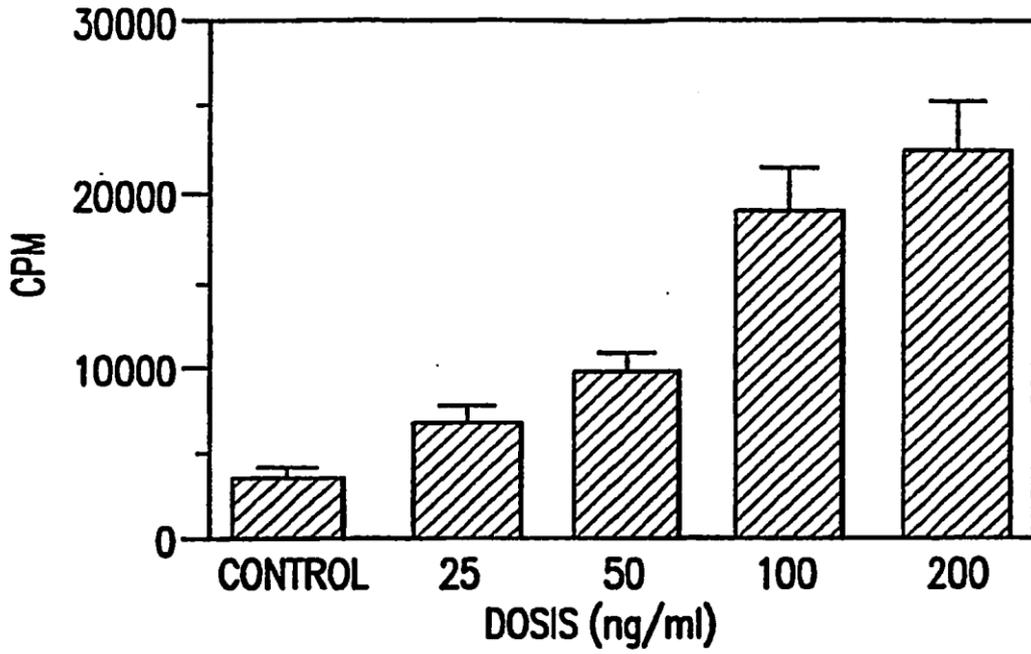


FIG. 6A

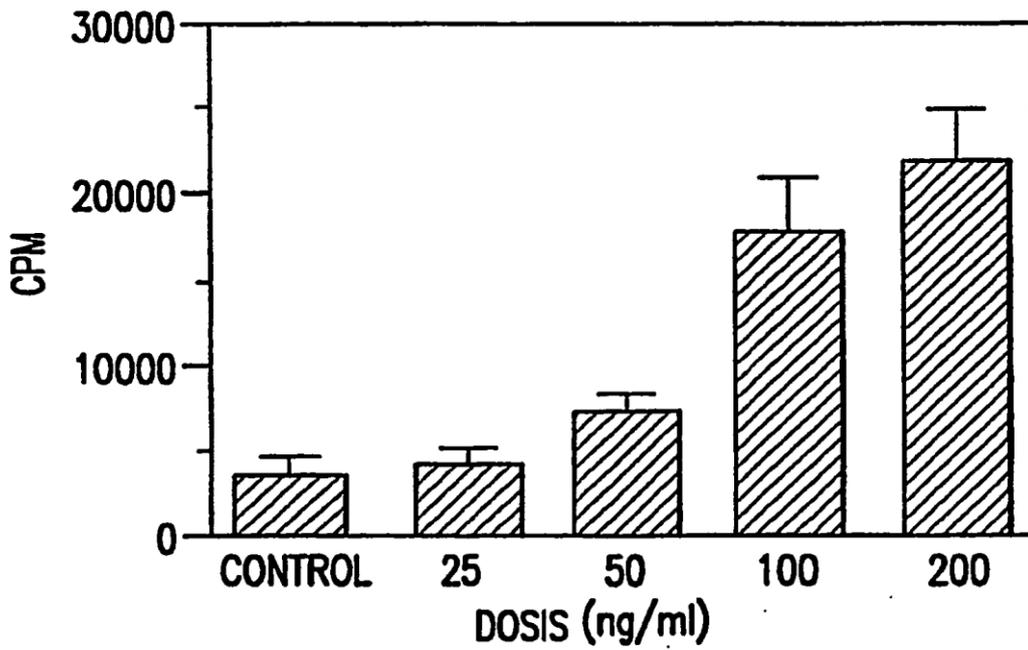


FIG. 6B

**EXPRESIÓN DE GP88 EN CÉLULAS PC TRANSFECTADAS
ANTISENTIDO Y DE CONTROL**

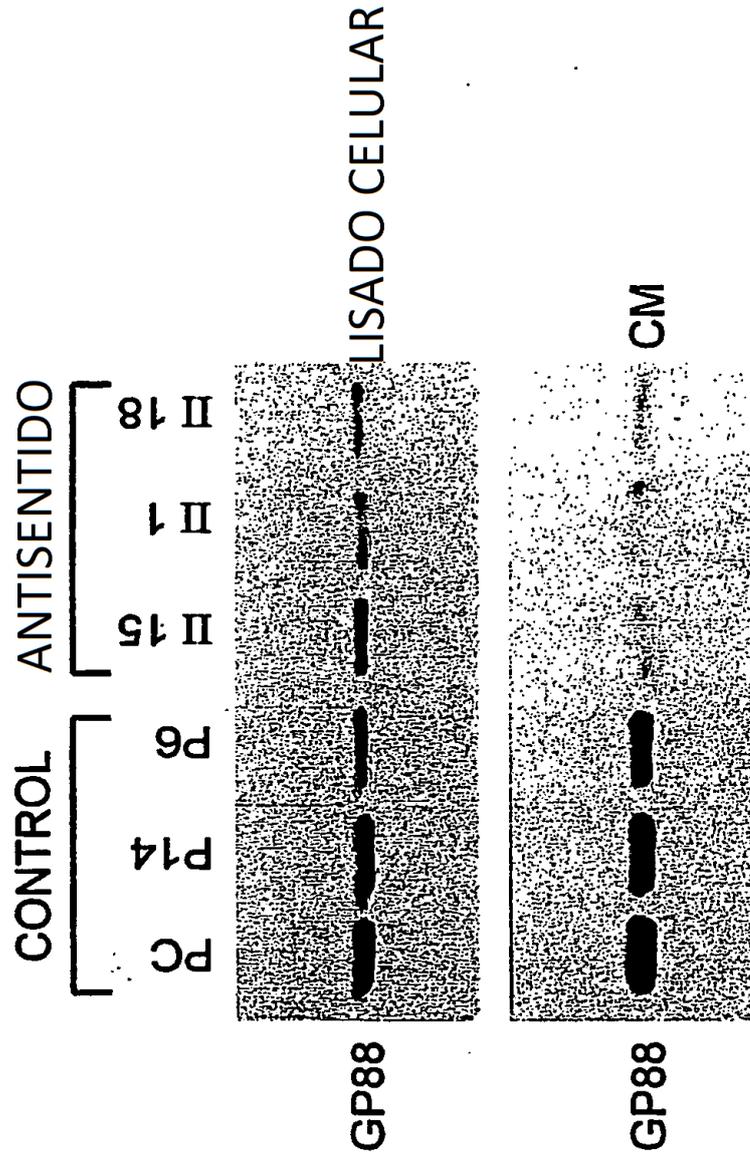


FIG.7

ES 2 395 125 T3

ADNc GP88 de Ratón

CGG	GGA	CCC	CGA	CGC	AGA	CAG	ACC	ATG	TGG	GTC	CTG	ATG	AGC	TGG	CTG		46
								M	W	V	L	M	S	W	L		8
GCC	TTC	GCG	GCA	GGG	CTG	GTA	GCC	GGA	ACA	CAG	TGT	CCA	GAT	GGG	CAG		94
A	F	A	A	G	L	V	A	G	T	Q	C	P	D	G	Q		24
TTC	TGC	CCT	GTT	GCC	TGC	TGC	CTT	GAC	CAG	GGA	GGA	GCC	AAC	TAC	AGC		142
F	C	P	V	A	C	C	L	D	Q	G	G	A	N	Y	S		40
TGC	TGT	AAC	CCT	CTT	CTG	GAC	ACA	TGG	CCT	AGA	ATA	ACG	AGC	CAT	CAT		190
C	C	N	P	L	L	D	T	W	P	R	I	T	S	H	H		56
CTA	GAT	GGC	TCC	TGC	CAG	ACC	CAT	GGC	CAC	TGT	CCT	GCT	GGC	TAT	TCT		238
L	D	G	S	C	Q	T	H	G	H	C	P	A	G	Y	S		72
TGT	CTT	CTC	ACT	GTG	TCT	GGG	ACT	TCC	AGC	TGC	TGC	CCG	TTC	TCT	AAG		286
C	L	L	T	V	S	G	T	S	S	C	C	P	F	S	K		88
GGT	GTG	TCT	TGT	GGT	GAT	GGC	TAC	CAC	TGC	TGC	CCC	CAG	GGC	TTC	CAC		334
G	V	S	C	G	D	G	Y	H	C	C	P	Q	G	F	H		104
TGT	AGT	GCA	GAT	GGG	AAA	TCC	TGC	TTC	CAG	ATG	TCA	GAT	AAC	CCC	TTG		382
C	S	A	D	G	K	S	C	F	Q	M	S	D	N	P	L		120
GGT	GCT	GTC	CAG	TGT	CCT	GGG	AGC	CAG	TTT	GAA	TGT	CCT	GAC	TCT	GCC		430
G	A	V	Q	C	P	G	S	Q	F	E	C	P	D	S	A		136
ACC	TGC	TGC	ATT	ATG	GTT	GAT	GGT	TCG	TGG	GGA	TGT	TGT	CCC	ATG	CCC		478
T	C	C	I	M	V	D	G	S	W	G	C	C	P	M	P		152
CAG	GCC	TCT	TGC	TGT	GAA	GAC	AGA	GTG	CAT	TGC	TGT	CCC	CAT	GGG	GCC		526
Q	A	S	C	C	E	D	R	V	H	C	C	P	H	G	A		168
TCC	TGT	GAC	CTG	GTT	CAC	ACA	CGA	TGC	GTT	TCA	CCC	ACG	GGC	ACC	CAC		574
S	C	D	L	V	H	T	R	C	V	S	P	T	G	T	H		184
ACC	CTA	CTA	AAG	AAG	TTC	CCT	GCA	CAA	AAG	ACC	AAC	AGG	GCA	GTG	TCT		622
T	L	L	K	K	F	P	A	Q	K	T	N	R	A	V	S		200
TTG	CCT	TTT	TCT	GTC	GTG	TGC	CCT	GAT	GCT	AAG	ACC	CAG	TGT	CCC	GAT		670
L	P	F	S	V	V	C	P	D	A	K	T	Q	C	P	D		216

FIG.8A

ES 2 395 125 T3

ADNc GP88 de Ratón (continuado)

GAT TCT ACC TGC TGT GAG CTA CCC ACT GGG AAG TAT GGC TGC TGT CCA	718
D S T C C E L P T G K Y G C C P	232
ATG CCC AAT GCC ATC TGC TGT TCC GAC CAC CTG CAC TGC TGC CCC CAG	766
M P N A I C C S D H L H C C P Q	248
GAC ACT GTA TGT GAC CTG ATC CAG AGT AAG TGC CTA TCC AAG AAC TAC	814
D T V C D L I Q S K C L S K N Y	264
ACC ACG GAT CTC CTG ACC AAG CTG CCT GGA TAC CCA GTG AAG GAG GTG	862
T T D L L T K L P G Y P V K E V	280
AAG TGC GAC ATG GAG GTG AGC TGC CCT GAA GGA TAT ACC TGC TGC CGC	910
K C D M E V S C P E G Y T C C R	296
CTC AAC ACT GGG GCC TGG GGC TGC TGT CCA TTT GCC AAG GCC GTG TGT	958
L N T G A W G C C P F A K A V C	312
TGT GAG GAT CAC ATT CAT TGC TGC CCG GCA GGG TTT CAG TGT CAC ACA	1006
C E D H I H C C P A G F Q C H T	328
GAG AAA GGA ACC TGC GAA ATG GGT ATC CTC CAA GTA CCC TGG ATG AAG	1054
E K G T C E X G I L Q V P W M <u>K</u>	344
AAG GTC ATA GCC CCC CTC CGC CTG CCA GAC CCA CAG ATC TTG AAG AGT	1102
<u>K V I A P L R L P D P Q I L K S</u>	360
GAT ACA CCT TGT GAT GAC TTC ACT AGG TGT CCT ACA AAC AAT ACC TGC	1150
<u>D T</u> P C D D F T R C P T N N T C	376
TGC AAA CTC AAT TCT GGG GAC TGG GGC TGC TGT CCC ATC CCA GAG GCT	1198
C K L N S G D W G C C P I P E A	392
GTC TGC TGC TCA GAC AAC CAG CAT TGC TGC CCT CAG GGC TTC ACA TGT	1246
V C C S D N Q H C C P Q G F T C	408
CTG GCT CAG GGG TAC TGT CAG AAG GGA GAC ACA ATG GTG GCT GGC CTG	1294
L A Q G Y C Q K G D T M V A G L	424
GAG AAG ATA CCT GCC CGC CAG ACA ACC CCG CTC CAA ATT GGA GAT ATC	1342
E K I P A R Q T T P L Q I G D I	440

FIG.8B

ES 2 395 125 T3

ADNc GP88 de Ratón (continuado)

GGT TGT GAC CAG CAT ACC AGC TGC CCA GTA GGG CAA ACC TGC TGC CCA	1390
G C D Q H T S C P V G Q T C C P	456
AGC CTC AAG GGA AGT TGG GCC TGC TGC CAG CTG CCC CAT GCT GTG TGC	1438
S L K G S W A C C Q L P H A V C	472
TGT GAG GAC CGG CAG CAC TGT TGC CCG GCC GGG TAC ACC TGC AAC GTG	1486
C E D R Q H C C P A G Y T C N V	488
AAG GCG AGG ACC TGT GAG AAG GAT GTC GAT TTT ATC CAG CCT CCC GTG	1534
K A R T C E K D V D F I Q P P V	504
CTC CTG ACC CTC GGC CCT AAG GTT GGG AAT GTG GAG TGT GGA GAA GGG	1582
L L T L G P K V G N V E C G E G	520
CAT TTC TGC CAT GAT AAC CAG ACC TGT TGT AAA GAC AGT GCA GGA GTC	1630
H F C H D N Q T C C K D S A G V	536
TGG GCC TGC TGT CCC TAC CTA AAG GGT GTC TGC TGT AGA GAT GGA CGT	1678
W A C C P Y L K G V C C R D G R	552
CAC TGT TGC CCC GGT GGC TTC CAC TGT TCA GCC AGG GGA ACC AAG TGT	1726
H C C P G G F H C <u>S A R G T K C</u>	568
TTG CGA AAG AAG ATT CCT CGC TGG GAC ATG TTT TTG AGG GAT CCG GTC	1774
<u>L R K K I P R</u> W D M F L R D P V	584
CCA ACA CCG CTA CTG TAA GGA AGG GCT ACA GAC TTA AGG AAC TCC ACA	1822
P R P L L *	589
GTC CTG GGA ACC CTG TTC CGA GGG TAC CCA CTA CTC AGG CCT CCC TAG	1870
CGC CTC CTC CCC TAA CGT CTC CCC GGC CTA CTC ATC CTG AGT CAC CCT	1918
ATC ACC ATG GGA GGT GGA GCC TCA AAC TAA AAC CTT CTT TTA TGG AAA	1966
GAA GGC TGT GGC CAA AAG CCC CGT ATC AAA CTG CCA TTT CTT CCG GTT	2014
TCT GTG GAC CTT GTG GCC AGG TGC TCT TCC CGA GCC ACA GGT GTT CTG	2062
TGA GCT TGC TTG TGT GTG TGT GCG CGT GTG CGT GTG TTG CTC <u>QAA TAA</u>	2110
<u>AGT</u> TTG TAC GCT TTC TGA AAA AAA AAA	2137

FIG.8C

Secuencia de nucleótidos del precursor granulina/epitelina humano
(GP88 humano) Genbank de Granulina Humana M751615

```

[GCAGGCAGA ccatgtggac cttggtgagc tgggtggcct taacagcagg gctggtggct
ggaacgcggt gccagatgg tcagtctgc cctgtggcct gctgocctga cccggaggga
gccagctaca gctgctgcg tccctctcg gacaatggc ccacaacact ggtcaggcat
ctgggtggcc cctgccaggf tgatgccac tgcctgcoq gccactccty catctttacc
gtctcaggga ettocagttg ctgcccttc ccaggggcoq tggcatgcoy ggtatggccat
cactgctgcc caoggggett coactgcagt gcagacggga gatcctgctt ccaagatca
ggttaacaact ccggtgggtgc catccagtg cctgatagtc agttogaatg cccggacttc
tccacgtgct gtgttatggt cgatggctcc tgggggtgct gccccatgcc ccaagcttcc
tctgtgtaag acaggggtga ctgctgtccg cacgggtgoc tctgogacct ggttcacacc
cgtgcatca caccacggg caccaccoc ctggcaaga agctccctgc ccagaggact
aacagggcag tggcctgtc cagctggtc atgtgtccq acgcaogtc ccggtgocct
gatggtteta cctgctgtga gctgccagf gggaaqtatg gctgctgccc aatgcccac
gccactgct gctccatca cctgcactgc tggcccnaq acctgtgtg tgaactgatc
cagagtaagt gctctccaa ggagaecgt accacggacc tctcactaa gctgectgcg
cacacagtg gogatgtga atgtgacatg gaggtgact gccagatgg ctatactgc
tgcctctac agtccggggc ctggggctgc tgcctttta cccaggtgt gtgctgtgag
gaccacatc actgctgtcc cgtgggttt acgtgtgaca cgcagaaggg tactgtgaa
caggggccc accaggtgoc ctggtggag aaggcccag ctcaactcag cctgccagac
ccacaagct tgaagagaga tgtccctgt gataatgtca gcagctgtcc ctctccgat
acctgctgcc aactcaegt tggggagtgg gctgctgtc caatccaga ggtgtgtgc
tctcggacc accagcacty ctgcccocag cgatacacgt gtgtagctga ggggcagtgt
cagcgaggaa gogagatgt ggtggacty gagaagatgc ctgcccgcog cggttcccta
tccaccccga gagacatgg ctgtgaccag cacaccagct gcccggtgg cggaacctgc
tgcccagcc aggtggggg ctggcctgc tgcagttgc ccatgctgt gtgtgogag
gatcggcagc actgctgcc ggctggctac acctgcaog tgaaggctog atctgogag
aaggagtggt tctctgcca gctgcccacc tctctggoc gtagccctca cgtgggtgtg
aaggacgtgg agtgtgggga aggaacttc tgcattgata accagactg ctgcccagac
aaccgacag gctggaccty ctgtccctac gccagggog tctgttgtgc tgatcgggc
cactgctgtc ctgctggctt ccgctgogca cgcagggta ccaagtgtt ggcagggag
gcccogcgt gggagcocc tttgaggac ccagcctga gacagctgt gtgaggaca
gtactgaaga ctctgcagcc ctggggccc cactcggagg gtgccctctg ctcaggctc
gtactgaaga ctctgcagcc ctggggccc cactcggagg gtgccctctg ctcaggctc
cctgcaect cccctaac aaattctcc tggacccat tetgagctcc ccattccat
gggggtggg gctcaactc aaggccttc cctgtcagaa ggggggtgag gcaaaagccc
attacaagct gccatcccc cccgtttca gtggacctg tggccagtg cttttcccta
tccacaggg tgtttgtgt tgggtgtgc tttcaataa gtttgtact ttctt*

```

FIG.9A

Secuencia de aminoácido del precursor granulina/epitelina humano (GP88 humano)

MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCRP
LLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHCCPRG
FHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCED
RVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDG
STCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKLSKENATDILLTYLPA
HTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGT
CEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIP
EAVCCSDHQHCCPQRYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRGSLSHPRDIGCDQHTSC
PVGGTCCPSQGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFL
ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYAQGVCCADRRHCCPAGFRCA
RRGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL*

FIG.9B

Secuencia de la Proteina GP88 de ratón

MWLMKLAFAAGLVAG 17

TQCPOGQF-CPVA--CCLDQG-6AMYSOCHPILLOTNPRITSHL 57

DGSC-QTHGCPAGY-SCLLTVS6TS-SCCPFSKGVSDGGYHCCPQGFHCADGKSCFQMSQAPL 120

GANQCPSQFECPOGATCCIMWD-6-SMGCCPMPQASCCEDRHCCPHASCOLVHTRCVSPYTGHTLLKVPKQKTHMANSIPFS 204

VVCPRAKTDCPRDSTCOEELP-TGK-YGDCPPHMAJGCSHLHCCPQDTYCVLTDKSKYTTDILLTKLPGYPK 278

EVKC-DNEVSPGEGITCCALN-TGA-MEGCOPFAKANGCEDHHCCEPAGFQCHTEKIGICEVIGELQVPMKXKJLAPRBLPDRQILKS 360

DTPCDDFETR-CPTHNTCKLN-56D-MEGCOPJPEANGCSOMHCCPQFETCLAQGY-CUKGDTMAGLEKIPARQTTPLQIG 438

DTGCDVET-SCPVGTCCPSLK-6-SMAGCQUPHANGCEDRHCCPAGYTCMVKARTCEKQVDFQFPVLLTLGPKVG 513

MVEGEGHF-CHDNTCKKDSA-6V-MACCPYLKGVCCRDENHCCPSEFHC-SABGTCKLAKKLRDNDHFLADYVPRPLL 589

g
f
2,B
1,A
C
D
e

Secuencia de consenso

C.....C.....CC.....6....CC.....CC.D...HCCP.....C.....C

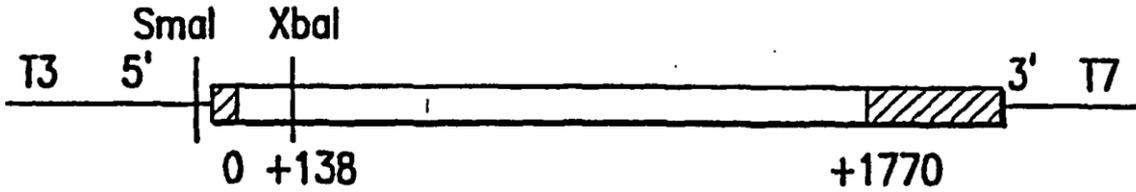
1,2, epitelina de ratón 1,2

A, B, C, D, e, f, g: granulina A, B, C, D, E, F, G; N-términos de granulina A, B, C, D se han secuenciado

La secuencia de precursor de epitelina de ratón es de Ploeman et al. (1992).

FIG.10

CLON ADNc GP88 en SK



ESTRUCTURA DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pCMV₄

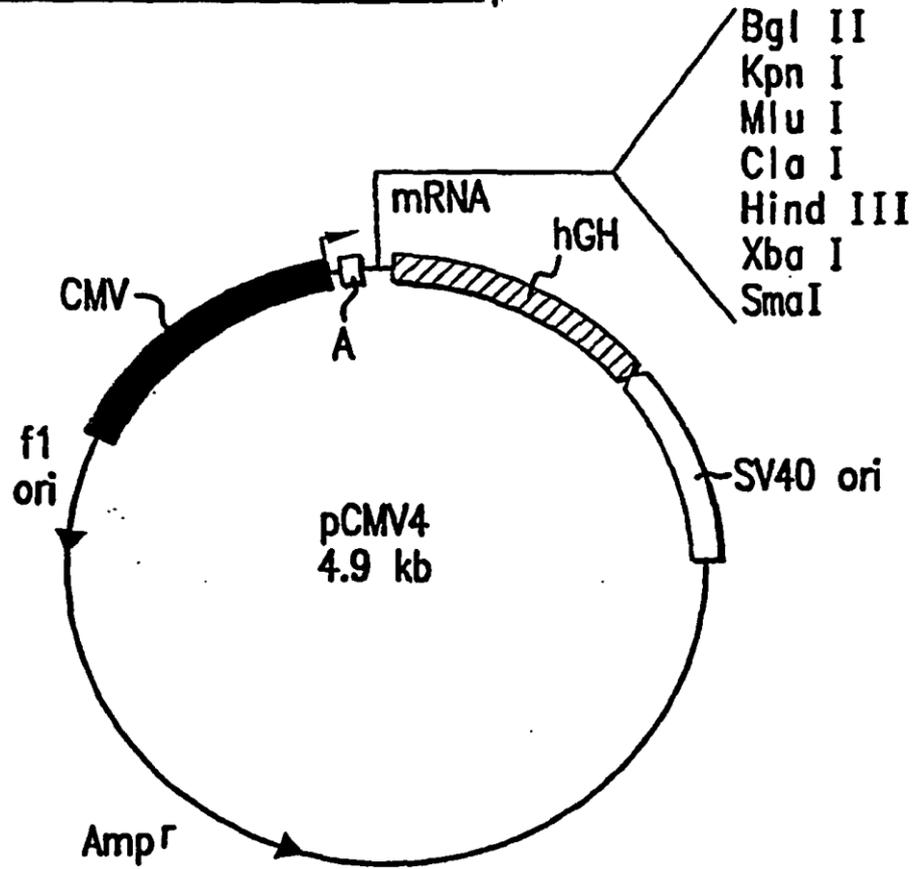


FIG.11

RETICULACIÓN DE ¹²⁵I-rGP88 A LAS CÉLULAS CCL64

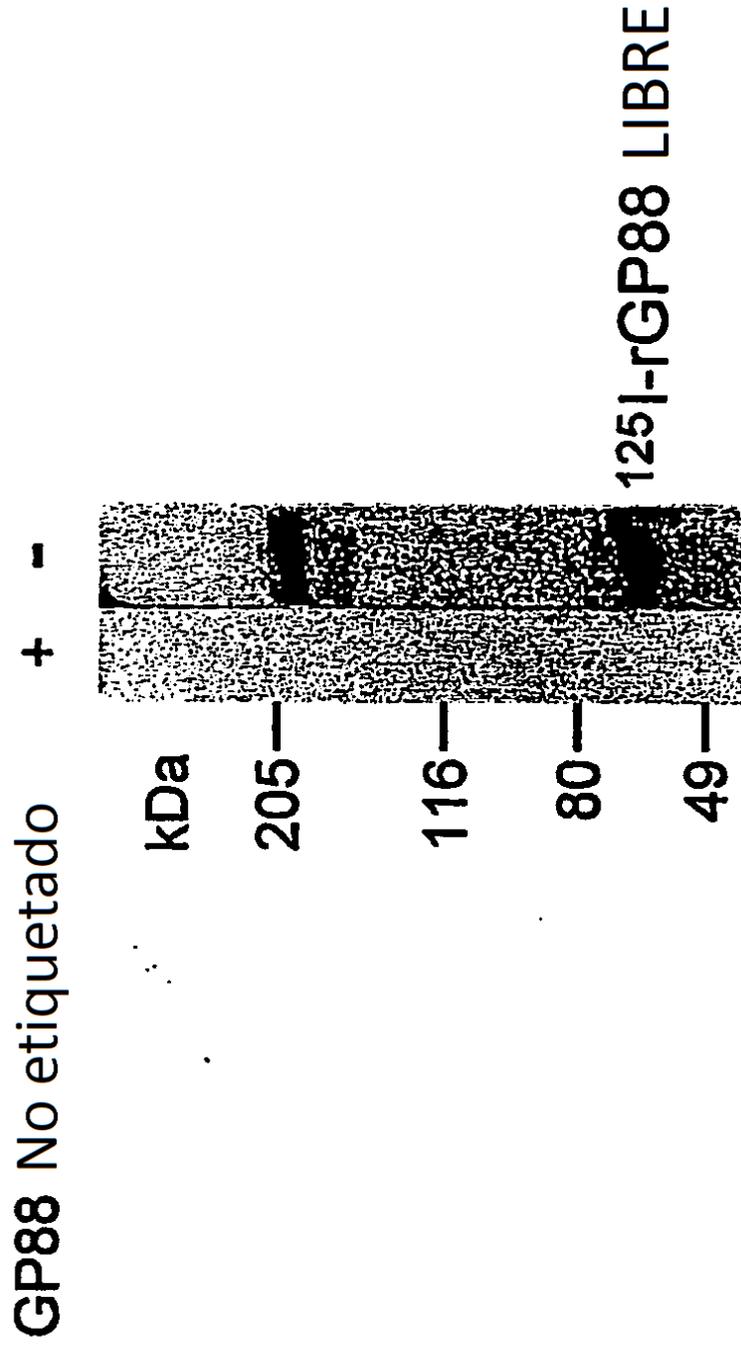


FIG.12

**EXPRESIÓN GP88 EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS
HUMANAS NO TUMORIGÉNICAS (MCF 10A)
Y MALIGNAS (MCF 7, MDA-468)**

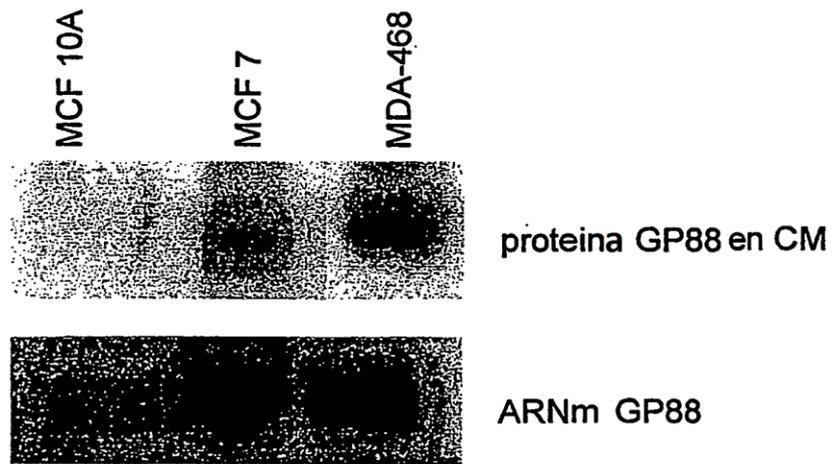


FIG.14

**EXPRESIÓN GP88 ES INHIBIDA POR LA TRANSFECCIÓN
DEL ADNc GP88 ANTISENTIDO DEL CARCINOMA
DE MAMA HUMANO MDA-468**

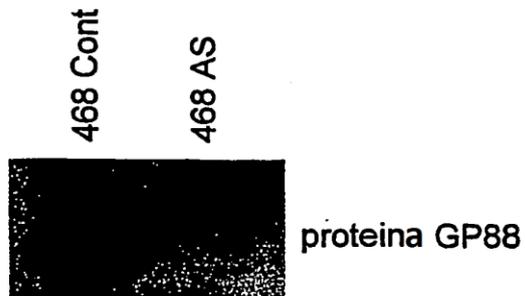


FIG.15

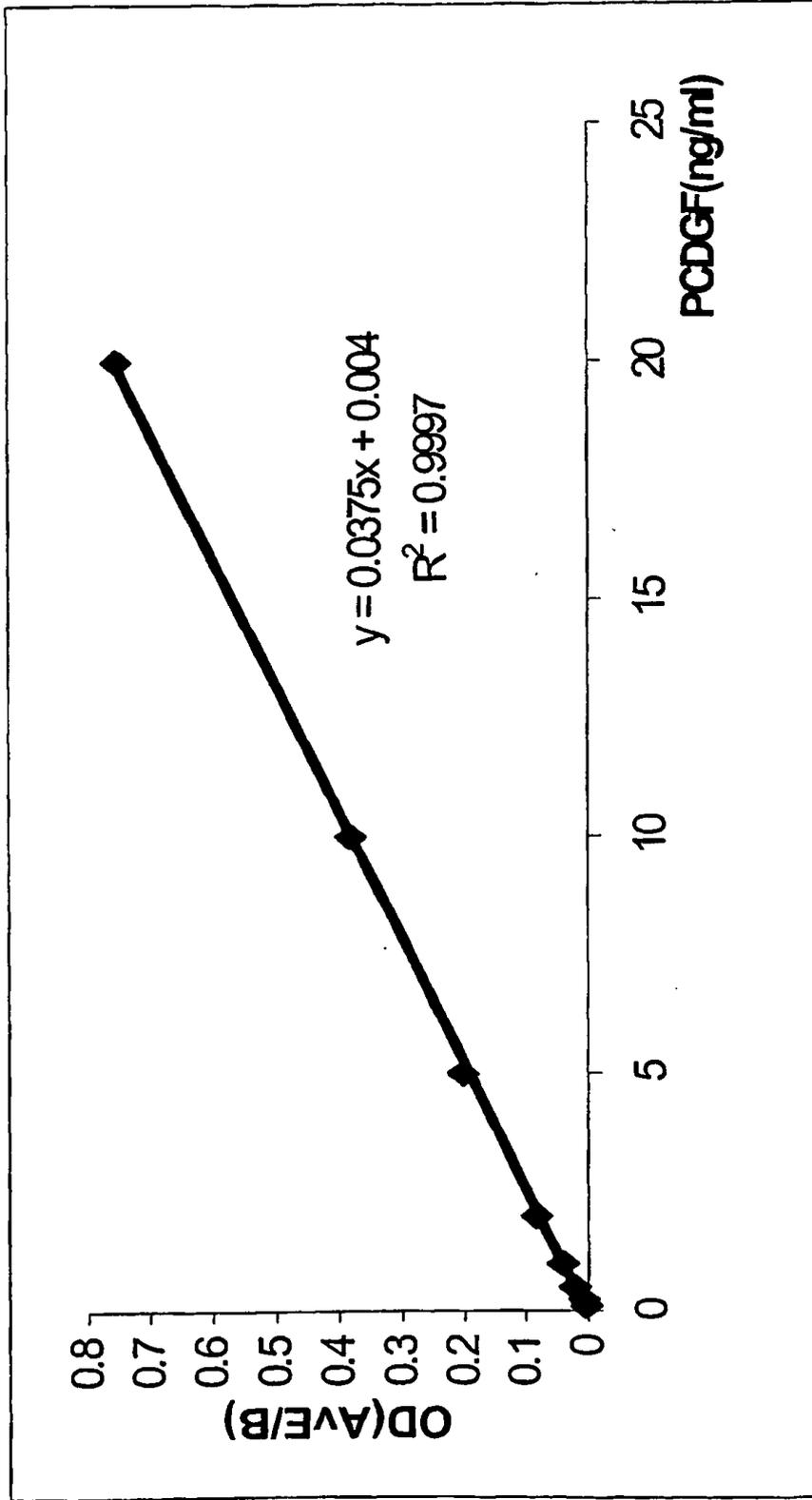


Figura 16