

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 916**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2004 E 04779605 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1660010**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para restaurar la sensibilidad al tratamiento con antagonistas de HER2**

30 Prioridad:

01.08.2003 US 491536 P
27.02.2004 US 547791 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2013

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:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 426 916 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

Composiciones y procedimientos para restaurar la sensibilidad al tratamiento con antagonistas de HER2

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes provisionales de los EE.UU. N° 60/491.536 presentada el 1 de agosto de 2003 y N° 60/547.791 presentada el 27 de febrero de 2004.

Referencias

En la presente memoria se hace referencia a varias publicaciones. Las citas completas de estas publicaciones se proporcionan a continuación.

Antecedentes de la invención

10 Aproximadamente del 25 al 30 % de los pacientes con cáncer de mama sobreexpresan la proto-oncoproteína y el receptor de superficie celular c-erbB2 (proteína receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 humana), también conocido como HER2/neu. La sobreexpresión del oncogén c-erbB2 se ha relacionado con un peor pronóstico y una disminución de la supervivencia para los pacientes. El proto-oncogén HER-2/neu está sobreexpresado en el 20-30 %
15 de los cánceres de mama metastásicos y se asocia con una disminución de la supervivencia y un aumento de la recurrencia de cáncer de mama. HER-2/neu también se sobreexpresa en otros tipos de cáncer incluyendo el cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer gástrico y cáncer de próstata. Actualmente, la forma más frecuente de tratamiento para estos pacientes es el uso del anticuerpo monoclonal humanizado trastuzumab, también conocido como Herceptin®.

20 Herceptin® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente con alta afinidad ($K_d = 5 \text{ nM}$) al dominio extracelular de c-erbB2 en un ensayo basado en células. Ver Science 1985; 230:1132-9 y Cancer Res 1993;53:4960-70. Herceptin® es un anticuerpo IgG1 kappa que se une al HER2 y contiene regiones estructurales humanas con regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo murino (4D5). *Id.* Sin embargo, sólo el 25 % de los pacientes tratados con Herceptin® o con cualquier otro anticuerpo anti-c-erbB2/HER2 son sensibles a esta terapia. Se han postulado varios modelos para explicar la resistencia al
25 tratamiento con anticuerpos anti-c-erbB2/HER2. Lo que se necesita son composiciones y procedimientos para la restauración de la sensibilidad al tratamiento con antagonistas de HER2/neu. Lu et al., 2000 (PNAS, 97 (9):3993-3998) demuestran que en las células de cáncer de mama ER-, la expresión de PCDGF es elevada y que la inhibición de la expresión de PCDGF por transfección del ADNc antisentido inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama humano *in vitro* e *in vivo*. Lu et al., 2001 (PNAS, 98(1):142-147) demuestran que el PCDGF media en el
30 efecto estimulante del crecimiento de E2 y que el PCDGF estimula la proliferación de las células de cáncer de mama humano MCF-7 y T47D mantenida en ausencia de E2.

Breve resumen de la invención

35 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que un factor de crecimiento autocrino, el factor de crecimiento derivado de células plasmáticas ("PCDGF"), confiere resistencia a los efectos antineoplásicos de los antagonistas de c-erbB2/HER2 ("HER2").

40 Las realizaciones preferidas de la presente invención se exponen en las reivindicaciones. Nosotros proporcionamos composiciones terapéuticas y usos para la restauración de la sensibilidad en las células tumorales resistentes a los efectos antineoplásicos de los antagonistas de HER2 mediante la administración de un antagonista del PCDGF en una cantidad eficaz para estimular o restablecer la sensibilidad a la inhibición del crecimiento de los antagonistas de HER2. Proporcionamos un uso para prevenir la recurrencia del crecimiento tumoral usando un antagonista del PCDGF. La invención proporciona composiciones terapéuticas y usos para inhibir el crecimiento de células tumorales que comprende la administración de un antagonista del PCDGF y un antagonista de HER2 en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de células tumorales.

45 También proporcionamos composiciones preferidas que comprenden un antagonista de HER2 y un antagonista del PCDGF. En otra realización, también proporcionamos una composición farmacéutica que comprende un antagonista de HER2, un antagonista del PCDGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y seroalbúmina humana).

50 También proporcionamos procedimientos para determinar si un paciente es resistente a los efectos antineoplásicos de los antagonistas de HER2, que comprende obtener una muestra biológica que contiene células de un paciente; detectar PCDGF en la muestra biológica y determinar la cantidad de PCDGF en dicha muestra en la que la cantidad de PCDGF es indicativa de resistencia a los efectos antineoplásicos de los antagonistas de HER2.

Breve descripción de los dibujos

Las Figura 1A y 1B muestran la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 1) y la secuencia deducida de aminoácidos (SEC ID N° 2), respectivamente, del PCDGF humano.

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático de la producción de un transfectante estable (D.c2) de las células MCF-7 que expresaban tanto erbB2 como PCDGF humano. Como control, también se prepararon células transfectadas con el vector pcDNA3 solo (EV.c1).

5 La Figura 3A y 3B muestra la región de 19 aminoácidos definida como E19V y la región de 14 aminoácidos definida como A14R, respectivamente, del PCDGF humano.

La Figura 4 resume los estudios patológicos de biopsias de cáncer de mama humano embebidas en parafina. La tinción del PCDGF y de erbB2 se controlaron mediante inmunohistoquímica. La sobreexpresión del PCDGF en las células que también sobreexpresan erbB2 convierte a las células en resistentes a los antagonistas de HER2. Los números de la primera columna (en vertical) y de la primera fila (en horizontal) indican la intensidad de la tinción de ErbB2 y PCDGF, respectivamente, en una escala de 0-3, siendo 3 el nivel de intensidad más alto. La columna 2 indica el número de casos examinados en cada grupo. Las filas 3-4 muestran la distribución de casos en cada nivel de tinción de ErbB2 y PCDGF. Por ejemplo, de los 6 casos que muestran un nivel de intensidad de 2 para la tinción de ErbB2, 2 casos tenían una intensidad de tinción de PCDGF de 0, 3 casos tenían una intensidad de tinción de PCDGF de 1, 1 caso tenía una intensidad de tinción de PCDGF de 2 y 0 tenían una intensidad de tinción de PCDGF de 3. Se sabe que el 25 % de los pacientes con tumores que sobreexpresan erbB2 serán sensibles a la terapia con antagonistas de HER2.

La Figura 5 muestra el resultado del análisis de inmunotransferencia (Western blot) que detecta la banda de PCDGF en los medios condicionados de células D.c2, las cuales sobreexpresan tanto erbB2 como PCDGF, utilizando anticuerpos anti-PCDGF. La banda de PCDGF fue detectada tanto por inmunoprecipitación (IP) como por inmunotransferencia (IM) de los medios condicionados. No se detectó ninguna banda en el control negativo (es decir, el clon erB2.c1 que expresa sólo erbB2).

La Figura 6 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia, que demuestra la fosforilación de erbB2 en células erbB2.c1 que han sido estimuladas con diferentes cantidades (carril 2: 200 ng/ml, carril 3: 75 ng/ml; carril 4: 0 ng de control) de PCDGF durante 7 minutos. La erbB2 fosforilada se detectó con anticuerpo anti-fosfo erbB2. Como control positivo (carril 1), las células se incubaron con 10 ng de heregulina.

La Figura 7 muestra los resultados del análisis de inmunotransferencia, que demuestra que PCDGF estimula la fosforilación de erbB2 en otras células de cáncer de mama, BT474 (mostradas aquí) y SKBR3 (véase la Fig. 13), que se sabe que sobreexpresan erbB2. PCDGF se añadió a 200 ng/ml y heregulina se añadió a 10 ng/ml.

La Figura 8 muestra la respuesta a la dosis de la estimulación de PCDGF de erbB2 en células BT474. PCDGF se añadió a las células a 300 ng/ml, 200 ng/ml, 75 ng/ml y 0 ng/ml (control) y se incubó durante 7 minutos y erbB2 fosforilada (P-erbB2) se detectó por inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti-fosfo erbB2. Como control positivo se usaron diez nanogramos de heregulina β 1.

La Figura 9 muestra las curvas de crecimiento a largo plazo de las células erbB2.c1 en respuesta a Herceptin[®], PCDGF y heregulina, solo o en combinación. Herceptin[®] inhibe la proliferación de las células que sobreexpresan erbB2. Heregulina y PCDGF hacen que las células pierdan su sensibilidad a los antagonistas de HER2/neu.

La Figura 10 muestra las curvas de crecimiento de las células que sobreexpresan PCDGF y erbB2 con o sin Herceptin y 0,5 % de CSS. Cuando PCDGF se sobreexpresa en las células que sobreexpresan erbB2 (por ejemplo, células D.c2), los antagonistas de HER2/neu ya no inhiben la proliferación de las células de cáncer de mama.

La Figura 11 muestra que la sobreexpresión de PCDGF en células que sobreexpresan erbB2 confiere resistencia a la actividad anti-proliferativa de los antagonistas de HER2/neu. Los antagonistas de HER2/neu ya no inhiben la proliferación de las células del cáncer de mama que sobreexpresan tanto erbB2 como PCDGF como se muestra por la incorporación de timidina como una medida de la proliferación celular.

La Figura 12 muestra los resultados de los ensayos en agar blando, que también demuestran que la sobreexpresión de PCDGF impide la inhibición del antagonista de HER2/neu de las células de cáncer de mama en un ensayo en agar blando (tumorigénesis) en células que sobreexpresan erbB2. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de PCDGF confiere resistencia a los antagonistas de HER2/neu en células que sobreexpresan erbB2. EV.c1 es una célula MCF-7 transfectada con un pcDNA3 solo. HR.c1 es una célula resistente a Herceptin[®].

La Figura 13 muestra la resistencia a los antagonistas de HER2/neu en células SKBR3 que sobreexpresan PCDGF. Las células SKBR3 son células de cáncer de mama que sobreexpresan de forma natural HER2. Las células SKBR3 fueron transfectadas con un vector vacío (EV) pcDNA3 o con el vector de expresión de PCDGF pcDNA3 (P.c6). En este último caso, la sobreexpresión de PCDGF confiere a las células resistencia a los antagonistas de HER2/neu.

Descripción detallada de la invención

Factor de crecimiento derivado de CP ("PCDGF") y HER2

El PCDGF es un factor de crecimiento autocrino de 88 kDa, que tiene la secuencia de nucleótidos y la secuencia

deducida de aminoácidos SEC ID N^o 1 y 2, respectivamente, caracterizado en nuestro laboratorio y que se ha demostrado que se sobreexpresa e induce la tumorigénesis en una amplia variedad de células tumorales humanas y animales (por ejemplo, neuroblastoma, glioblastoma, astrocitoma, sarcomas y cánceres de la próstata, sangre, líquido cefalorraquídeo, hígado, riñón, mama, cabeza y cuello, faringe, tiroides, páncreas, estómago, colon, colorrectal, útero, cuello uterino, hueso, médula ósea, testículos, tejido neuronal cerebral, ovario, piel y pulmón). Ver, por ejemplo, patente US-6.309.826.

El PCDGF también confiere resistencia a los efectos antineoplásicos de los antagonistas de HER2 (por ejemplo, Herceptin[®], inhibidores de la quinasa HER2; véase más adelante) en células tumorales. Como se describe en la patente US-6.309.826, la sobreexpresión de PCDGF conduce a un crecimiento celular incontrolado y al aumento de la tumorigénesis. El grado de sobreexpresión de PCDGF se correlaciona directamente con el grado de tumorigenicidad celular. Las células que sobreexpresan PCDGF no requieren señales externas para mantener un crecimiento celular incontrolado. La pérdida de crecimiento celular regulado, tales como una pérdida en la capacidad de respuesta a la insulina y/o estrógeno, conduce a un aumento de la malignidad y a un exceso de crecimiento celular no regulado. Por lo tanto, el desarrollo de procedimientos y composiciones que interfieren con la actividad tumorigénica de PCDGF es de gran interés para el tratamiento del cáncer.

Proporcionamos, un procedimiento para estimular o restablecer la sensibilidad a la inhibición del crecimiento en un paciente con un tumor que es resistente a la inhibición del crecimiento por un antagonista de HER2, mediante la administración de un antagonista del PCDGF a la paciente en una cantidad eficaz para estimular o restablecer la sensibilidad a la inhibición del crecimiento a un antagonista de HER2. En otra realización específica, se proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento de células tumorales mediante la administración de un antagonista del PCDGF y un antagonista de HER2 a una paciente en cantidades eficaces para inhibir el crecimiento de células tumorales. En otra realización más, proporcionamos un procedimiento de prevención de la recurrencia del tumor mediante la administración de una cantidad profilácticamente eficaz de un antagonista del PCDGF. El término "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un antagonista del PCDGF o antagonista de HER2 capaz de prevenir o retrasar la recurrencia del crecimiento del tumor.

El término "antagonista de HER2" se refiere a cualquier molécula (por ejemplo, proteína, anticuerpo, péptido, molécula pequeña, ácido nucleico, antisentido o ARNs) que es capaz de unirse, interferir con, o inhibir la actividad de HER2 o cualquiera de sus análogos o derivados de HER2 que retienen las propiedades neoplásicas de HER2 (por ejemplo, pero sin limitarse a Herceptin[®] y los inhibidores de la cinasa HER2).

En una realización, un antagonista de HER2 incluye una molécula que puede dirigirse o unirse selectivamente a HER2 y, por ejemplo, proporcionar una toxina u otro compuesto o molécula para destruir una célula o inhibir el crecimiento celular. Por ejemplo, un anticuerpo anti-HER2 puede ser acoplado a una toxina o un agente quimioterapéutico que se administra a una célula tumoral después de que el anticuerpo se una a HER2. Los antagonistas de HER2 también incluyen moléculas (por ejemplo, péptidos, moléculas pequeñas, moléculas antisentido y siRNA) que modulan la actividad biológica de las moléculas que regulan la actividad de HER2. Un antagonista de HER2 puede ser un anticuerpo que recluta una respuesta inmune, por ejemplo, a través de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos).

La terapia con antagonistas de HER2 es útil para el tratamiento de pacientes con tumores que sobreexpresan HER2, incluyendo pero sin limitarse al cáncer de mama metastásico, incluyendo pacientes cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2 y que han recibido uno o más regímenes de quimioterapia para su enfermedad metastásica. Herceptin[®], en particular, está también aprobado para la terapia de combinación con paclitaxel para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2 y que no han recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica. Sin embargo, sólo el 25 %-50 % de los pacientes tratados con Herceptin[®] o cualquier otro anticuerpo anti-HER2 son sensibles a este tipo de tratamiento. Los presentes inventores han descubierto que PCDGF confiere resistencia a los efectos antineoplásicos de los antagonistas de HER2. Los estudios de inmunohistoquímica de biopsias de cáncer de mama humano embebidas en parafina mostraron que PCDGF esta altamente sobreexpresado en el 40 % de los carcinomas ductales invasivos c-erbB2 positivo (3) (Véase. Figura 4).

Antagonista del PCDGF

El término "antagonista del PCDGF" se refiere a cualquier molécula (por ejemplo, proteína, anticuerpo, péptido, molécula pequeña, ácido nucleico, antisentido o ARNs) que es capaz de unirse selectivamente, interferir con, o inhibir la actividad biológica de PCDGF incluyendo, pero no limitado a, su capacidad para conferir resistencia frente a los antagonistas de HER2 a las células expuestas a PCDGF, o cualquiera de sus análogos o derivados de PCDGF que retienen las propiedades de PCDGF. En una realización, un antagonista del PCDGF incluye anticuerpos anti-receptor del PCDGF o antagonistas de molécula pequeña que pueden dirigirse o unirse selectivamente al receptor de PCDGF y, por ejemplo, proporcionar una toxina u otro compuesto o molécula de destruir a una célula o inhibir el crecimiento celular.

Anticuerpos

Los antagonistas de PCDGF, tales como anticuerpos anti-PCDGF, interfieren con la actividad biológica del PCDGF (por ejemplo, la actividad tumorigénica) uniéndose directamente al PCDGF y evitando que el PCDGF transmita señales de crecimiento celular a una célula diana (por ejemplo, células de cáncer de mama). Un anticuerpo anti-PCDGF puede unirse al sitio activo de PCDGF o sus formas procesadas (por ejemplo, el sitio de unión del receptor de PCDGF) y evitar la unión del PCDGF a su receptor. Alternativamente, los anticuerpos anti-PCDGF pueden unirse a un sitio del PCDGF distinto del sitio activo, alterar la conformación del sitio activo y, por lo tanto, hacer que el PCDGF sea incapaz de unirse a su receptor. Los anticuerpos anti-PCDGF incluyen anticuerpos neutralizantes de PCDGF. Los anticuerpos "neutralizantes" tienen la capacidad de inhibir o bloquear la actividad biológica normal de PCDGF, incluyendo la capacidad del PCDGF para estimular la proliferación celular, aumentar la supervivencia celular, la apoptosis en bloque, o inducir el crecimiento del tumor en los animales y en los seres humanos.

En una realización, un anticuerpo anti-PCDGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une inmuno-específicamente a las regiones de 19 aminoácidos definidas como E19V (SEC ID N° 3) del PCDGF humano. En otra realización, un anticuerpo anti-PCDGF o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une a las regiones de 14 aminoácidos definidas como A14R (SEC ID N° 4) del PCDGF humano. Los anticuerpos anti-PCDGF adecuados para la restauración de la sensibilidad a la terapia con antagonistas de HER2 y la terapia citotóxica, y en otras composiciones y procedimientos preferidos de la invención (por ejemplo, la inhibición del crecimiento de células tumorales, etc.) se han depositado en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA desde 20110-2209 y pueden producirse a partir de líneas celulares de hibridoma, incluyendo, pero no limitado a, la línea celular de hibridoma 6B3 (Número de Acceso ATCC PTA-5262), la línea celular de hibridoma 6B2 (Número de Acceso ATCC PTA-5261), la línea celular de hibridoma 6C12 (ATCC número de acceso PTA-5597), la línea celular de hibridoma 5B4 (Número de Acceso ATCC PTA-5260), la línea celular de hibridoma 5G6 (Número de Acceso ATCC PTA-5595), la línea celular de hibridoma 4D1 (Número de Acceso ATCC PTA-5593), la línea celular de hibridoma 3F8 (Número de Acceso ATCC PTA-5591), la línea celular de hibridoma 3F5 (Número de Acceso ATCC PTA-5259), la línea celular de hibridoma 3F4 (Número de Acceso ATCC PTA-5590), 3G2 (Número de acceso ATCC PTA-5592) y la línea celular de hibridoma 2A5 (Número de Acceso ATCC PTA-5589).

Los antagonistas del PCDGF también incluyen anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un receptor del PCDGF y bloquean la unión del PCDGF al receptor. Dichos anticuerpos anti-receptor del PCDGF incluyen anticuerpos producidos a partir de líneas celulares de hibridoma, incluyendo, pero no limitado a, la línea celular de hibridoma 6G8 (Número de acceso ATCC PTA-5263) y la línea celular de hibridoma 5A8 (Número de acceso ATCC PTA-5594).

El término anticuerpo usado en la presente memoria se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une inmuno-específicamente al PCDGF, el receptor de PCDGF o HER2. En otras palabras, un anticuerpo inmuno-específico es específico de su antígeno diana (por ejemplo, no se une de forma no específica a ni se asocia con otros antígenos). Preferiblemente, tales anticuerpos no reaccionan de forma cruzada con otros antígenos. Estos anticuerpos específicos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales humanos y no humanos, anticuerpos monoclonales (Acm) humanos y no humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-IdAb), anticuerpos neutralizantes, anticuerpos no neutralizantes y anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno o de los huevos de gallina y se pueden obtener por cualquier procedimiento adecuado conocido para un experto normal en la técnica. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o clon de fago, y no el procedimiento por el cual se ha producido. Los anticuerpos monoclonales ("Acm") se pueden obtener por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante y de visualización de fagos, o una combinación de los mismos, que están dentro del conocimiento de un experto en la técnica.

Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase inmunológica incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos incluyen fragmentos Fab y F(ab')₂, los cuales carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión a tejido no específico que un anticuerpo intacto. Tales fragmentos se producen generalmente por escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (para generar fragmentos Fab) y pepsina (para generar fragmentos F(ab')₂). Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos también pueden ser producidos por cualquier procedimiento conocido en la técnica de la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o preferiblemente, por técnicas de expresión recombinantes.

Una vez que una molécula de anticuerpo como se describe en este documento ha sido producida por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, a continuación se puede purificar por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la purificación de la Proteína A o la Proteína G y la cromatografía de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos utilizados en la presente

invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos conocidos en la técnica para facilitar la purificación, conferir actividades biológicas adicionales y así sucesivamente.

Composiciones farmacéuticas y kits

5 También proporcionamos composiciones farmacéuticas que contienen uno o más antagonistas de HER2 y uno o más antagonistas de PCDGF. Los pacientes que reciben tanto antagonistas de HER2 como de PCDGF se beneficiarán de los efectos antineoplásicos de cada antagonista en el sentido de que el antagonista del PCDGF puede estimular o restaurar la sensibilidad antagonista de HER2 de los pacientes resistentes a la terapia de anti-HER. En una realización específica, el antagonista de HER2 es Herceptin®. En otra realización específica, el antagonista del PCDGF es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Las composiciones farmacéuticas tienen utilidad en la inhibición del crecimiento de células tumorales, así como en la prevención de la recurrencia del tumor en un sujeto y se pueden administrar a tal sujeto.

15 Se conocen varios sistemas de administración y se pueden usar para administrar la composición farmacéutica útil en la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem., 262:4429-4432). Los procedimientos de introducción incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, y oral. Los compuestos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. 20 En una realización preferida, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas útiles en la invención en los tejidos afectados por cualquier vía adecuada. La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente de aerosolización.

25 En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas útiles en la invención localmente en el área en necesidad de tratamiento, lo que puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas silásticas o fibras. En una realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de los tejidos enfermos.

30 En otra realización, la composición farmacéutica puede administrarse en una vesícula, en particular, un liposoma (ver, por ejemplo, Langer, 1990 Science 249: 1527-1533; Treat et al., en Liposomas en la terapia de enfermedades infecciosas y el cáncer, López Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, Pp 317-327; Véase en general *ibid.*).

35 En otra realización más, la composición farmacéutica se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, 1987 CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201; Buchwald et al., 1980 Surgery 88:507 y Saudek et al., 1989 N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, pueden utilizarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Biodisponibilidad de fármacos controlados, diseño de la forma farmacéutica y eficacia, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger y Peppas, 1983 J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, véase también Levy et al., 1985 Science 228:190; During et al., 1989 Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105). En otra realización más, un sistema de liberación controlada se puede colocar en la proximidad de la diana de la composición, es decir, el tejido de la mama, por lo que requiere sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-45 1533).

Las composiciones farmacéuticas útiles en la presente invención pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o incluido en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones 60

de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran ya sea por separado o mezclados juntos en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o sobre que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, esta se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de grado farmacéutico o solución salina. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los componentes se pueden mezclar antes de la administración.

Las composiciones farmacéuticas útiles en la invención se pueden formular como formas neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres, tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2 etilamino etanol, histidina, procaína, etc

La cantidad de la composición farmacéutica útil en la invención que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse por técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos in vitro para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe ser decidida de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, intervalos de dosificación adecuados para administración intravenosa son generalmente de aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de administración adecuados para administración intranasal son generalmente aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistema de ensayo in vitro o de modelos animales. Los supositorios generalmente contienen principio activo en el intervalo de 0,5 % a 10 % en peso; las formulaciones orales contienen preferiblemente de 10 % a 95 % de componente activo.

También proporcionamos un paquete o kit que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas útiles en la invención. Opcionalmente asociado con tal recipiente (s) puede encontrarse una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, nota que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración humana. En una realización preferida, el kit contiene un antagonista de HER2 o su sal farmacéuticamente aceptable y un antagonista del PCDGF o su sal farmacéuticamente aceptable, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el antagonista de HER2 es Herceptin[®]. En otra realización específica, el antagonista del PCDGF es un anticuerpo, molécula de ácido nucleico, molécula pequeña, o polipéptidos. En una realización preferida, el kit farmacéutico que contiene uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas útiles en la invención en una forma de dosificación unitaria. El kit farmacéutico puede comprender además adyuvantes, antivirales, antibióticos, analgésicos, anti-inflamatorios, u otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

Usos terapéuticos

Proporcionamos procedimientos para estimular o restablecer la sensibilidad a la inhibición del crecimiento de células tumorales resistentes a los efectos antineoplásicos de los antagonistas de HER2 mediante la administración de un antagonista del PCDGF a un paciente humano en una cantidad eficaz para estimular o restablecer la sensibilidad a la inhibición del crecimiento del paciente a los antagonistas de HER2. La presente invención proporciona usos para inhibir el crecimiento de células tumorales mediante la administración de un antagonista del PCDGF y un antagonista de HER2 a un paciente en cantidades eficaces para inhibir el crecimiento de células tumorales, tal como se establece en las reivindicaciones. En otra realización, la invención proporciona usos de prevención de la recurrencia del crecimiento tumoral mediante la administración de un antagonista del PCDGF y un antagonista de HER2 a un paciente en cantidades eficaces para prevenir o retrasar la recurrencia del crecimiento del tumor, tal como se establece en las reivindicaciones. Los antagonistas del PCDGF pueden prevenir la formación de tumores y el crecimiento de cualquier tipo de tumor o cáncer, incluyendo, pero no limitado a, neuroblastoma, glioblastoma, astrocitoma, sarcomas y cánceres de la próstata, sangre, hígado, riñón, mama, cabeza y cuello, faringe, tiroides, páncreas, estómago, colon, colorrectal, útero, cuello del útero, hueso, médula ósea, testículos, cerebro, tejido neural, ovario, piel y pulmón en la producción del antagonista de HER2 y/o antagonista del PCDGF en el interior de la célula transfectada.

Para las administraciones *in vivo*, los antagonistas del PCDGF y los antagonistas de HER2 se pueden proporcionar a un sujeto por varias vías de administración y formas de administración (véase supra en "Composiciones farmacéuticas y kits"). Un sujeto, preferentemente un sujeto humano, que sufre un trastorno neoplásico, incluyendo pero no limitado a, cáncer de mama, u otro trastorno patológico asociado con el aumento de la expresión de HER2 y/o del PCDGF, se trata consecutivamente o simultáneamente con una antagonista de HER2 y un antagonista del PCDGF. En una realización, el antagonista de HER2 y el antagonista del PCDGF se co-administran. En una realización específica, el antagonista de HER2 y el antagonista del PCDGF se administran simultáneamente. En otra realización específica, el antagonista de HER2 y el antagonista del PCDGF se administran secuencialmente, preferentemente se comprueba la concentración de PCDGF y, si está elevada, se administra primero el antagonista del PCDGF.

El tratamiento con un antagonista del PCDGF puede preceder, seguir, o ser llevado a cabo simultáneamente con el tratamiento con un antagonista de HER2. El tratamiento con un antagonista del PCDGF puede preceder o seguir el tratamiento con un antagonista de HER2 a intervalos que van de minutos a semanas. En otra realización, un antagonista del PCDGF y un antagonista de HER2 se administran en una forma tal que se garantice que no transcurra un período prolongado entre el momento de la administración de cada agente. Por ejemplo, cada antagonista se puede administrar a un paciente en cuestión de segundos, minutos u horas respecto del otro antagonista.

En una realización preferida, el tratamiento con un antagonista del PCDGF disminuye la fosforilación de c-erbB2 por lo menos el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o más, preferiblemente en al menos el 50 %. En otra realización preferida adicional, el tratamiento con un antagonista del PCDGF aumenta la sensibilidad del antagonista de HER2 de las células por lo menos dos veces, más preferiblemente en al menos tres veces.

También proporcionamos que un antagonista de HER2 en combinación con un antagonista del PCDGF y/o quimioterapia (por ejemplo, paclitaxel, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfano, nitrosourea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, inhibidores de la aromatasas (por ejemplo, Arimidex[®] o anastrozol, Femera[®], letrozol), reguladores a la baja de estrógenos (por ejemplo, Faslodex[®]), agentes de unión al receptor de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier variante o análogo o derivado de lo anterior, se puede utilizar para tratar el cáncer de mama metastásico o cánceres de varios tejidos (por ejemplo, neuroblastoma, glioblastoma, astrocitoma, sarcomas y cánceres de la próstata, sangre, hígado, riñón, mama, cabeza y cuello, faringe, tiroides, páncreas, estómago, colon, colorrectal, útero, cuello del útero, hueso, médula ósea, testículos, cerebro, tejido neural, ovario, piel y pulmón). La terapia de combinación se puede administrar de forma independiente de la evaluación de diagnóstico.

En una modalidad preferida de la invención, un paciente de cáncer de mama (por ejemplo, que tiene cáncer de mama metastásico y sobreexpresión de HER2) se le administra tratamiento con antagonista de HER2, por ejemplo, Herceptin. Aunque, la paciente presente un cierto grado de inhibición del crecimiento tumoral, su progreso desciende, ya que se vuelve resistente a la terapia con antagonistas de HER2. Se lleva a cabo una biopsia o se recoge una muestra suero y revela que el paciente tiene niveles elevados de PCDGF. En otra realización, los niveles de PCDGF del paciente se determinan antes de comenzar la terapia con antagonistas de HER2. El paciente se trata entonces con un antagonista del PCDGF solo, o se co-administra el antagonista del PCDGF con el antagonista de HER2, para estimular o restablecer la sensibilidad a la terapia con antagonistas de HER2. Después del tratamiento con antagonista del PCDGF, el paciente de nuevo responde a la terapia con antagonistas de HER2. El nivel de PCDGF del paciente se supervisa periódicamente, por ejemplo, semanal o mensualmente durante la terapia de HER2 y, si es necesario, se administra de nuevo un antagonista del PCDGF para estimular o restablecer la sensibilidad de HER2. Alternativamente, el paciente puede continuar recibiendo la co-administración del antagonista del PCDGF y el antagonista de HER2.

Los intervalos de dosis eficaces proporcionadas a continuación no pretenden limitar la invención y representan intervalos de dosis meramente ilustrativos. Sin embargo, la dosificación más preferida se adaptará al sujeto individual como se entiende y la puede determinar un experto ordinario en la técnica dadas las enseñanzas descritas en esta memoria. La dosis total requerida para cada tratamiento puede administrarse mediante dosis múltiples o en una sola dosis. En una realización, las cantidades eficaces de cada uno de un anticuerpo anti-HER2 y un anticuerpo anti-PCDGF son de aproximadamente 0,01 ng a aproximadamente 500 µg/ml y preferiblemente desde aproximadamente 10 ng a aproximadamente 100 µg/ml. En otra realización, las cantidades eficaces de anticuerpo son generalmente de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal y preferiblemente de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 mg/kg.

En otra realización más, un antagonista de HER2 y un antagonista del PCDGF pueden administrarse por separado, juntos, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. En otra realización, la cantidad de cada antagonista administrada estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, siempre que los antagonistas de HER2 y PCDGF se administren al paciente en cantidades terapéuticamente eficaces (es decir, cantidades que eliminan y/o reducen la carga tumoral del paciente o restauran la sensibilidad a los efectos antineoplásicos de cualquier antagonista de HER2) o cantidades profilácticamente

eficaces (es decir, cantidades que impiden o retrasan la recurrencia del crecimiento del tumor).

Un régimen de tratamiento preferido comprende la co-administración de una cantidad eficaz de un antagonista de HER2 y un antagonista del PCDGF durante un período de una o varias semanas y que incluye entre aproximadamente una semana y seis meses. En otra realización, se puede proporcionar un antagonista de HER2
5 puede ser proporcionado en una dosis inicial de 4 mg/kg seguido de 2 mg/kg por vía intravenosa (iv) semanalmente; o la dosis de 8 mg/kg dosis inicial, seguido de 4 mg/kg iv semanal. El tratamiento con un antagonista del PCDGF puede ser proporcionado, por ejemplo, en una dosis inicial de 4 mg/kg seguido de 2 mg/kg por vía intravenosa (iv) semanalmente, o una dosis inicial de 8 mg/kg seguido de 4 mg/kg iv semanalmente. Ejemplos adicionales de regímenes para el tratamiento del cáncer que se pueden utilizar para el tratamiento con un antagonista de HER2, un
10 antagonista del PCDGF y/o agentes quimioterapéuticos se divulgan en los siguientes artículos: Hamid, O., J. Am. Pharm Assoc, 2004 Ene-Feb; 44(1):52-8; Kubo et al., Anticancer Res. 2003 Nov-Dic; 23(6a):4443-9; Slamon et al., N Engl J Med. 2001; 344:783-792.; Baselga et al, Cancer Res 1998;58:2825-2831; y Jones, et al., Ann Oncol. Dic; 14 (12) :1697-704.

Los protocolos y composiciones de la invención se ensayan preferiblemente *in vitro* y después *in vivo*, para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en los seres humanos.

Por ejemplo, los ensayos *in vitro* que se pueden utilizar para determinar si está indicada la administración de un protocolo terapéutico específico, incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que una muestra de tejido del paciente se hace crecer en cultivo y se expone a o se administra de otro modo un protocolo y se observa el efecto de tal protocolo sobre la muestra de tejido. Los anticuerpos anti-PCDGF y los anticuerpos anti-receptor del PCDGF
20 (colectivamente "anticuerpos anti-antagonista del PCDGF") se pueden proporcionar a las células tanto *in vitro* como *in vivo*. Para las administraciones *in vitro*, se pueden añadir anticuerpos anti-antagonistas del PCDGF al medio de cultivo celular a concentraciones que van generalmente desde 0,01 ng hasta aproximadamente 100 mg/ml de medio de cultivo celular y preferiblemente desde aproximadamente 10 ng hasta aproximadamente 50 mg/ml. El anticuerpo se puede administrar solo o en combinación con otros agentes terapéuticos dirigidos a la misma enfermedad.

Las células también pueden ser transfectadas con ADN o ARN que codifica anticuerpos anti-antagonista del PCDGF o fragmentos de unión al antígeno de los mismos o vectores que contienen tales secuencias de ADN o ARN. Las células transfectadas pueden ser inducidas para producir anticuerpos anti-antagonista del PCDGF o fragmentos de anticuerpos por medio de cualquier técnica adecuada (por ejemplo, promotor inducible, y múltiples copias de plásmido).

En una realización, la reducción del crecimiento de las células del tumor o el aumento de la supervivencia de las células puestas en contacto indica que el agente terapéutico es eficaz para tratar la afección en el paciente. Alternativamente, los agentes y procedimientos terapéuticos pueden ser seleccionados utilizando líneas celulares establecidas, tales como las células MCF-7 (células de cáncer de mama humano resistentes a tamoxifeno) y células
30 04 (células MCF-7 resistentes a tamoxifeno con sobreexpresión de PCDGF). Los compuestos para uso en la terapia se pueden ensayar en sistemas de modelos animales adecuados antes de ensayarlos en humanos, incluyendo pero no limitado a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc. Los principales modelos son ampliamente conocidos en la técnica.

Ejemplos

PCDGF confiere resistencia a los efectos antineoplásicos de la terapia con antagonistas de HER2

Métodos y Materiales

Preparación de transfectantes estables

Para investigar el papel del PCDGF en la resistencia a los antagonistas de HER2 de células que sobreexpresan c-erbB2, células de cáncer de mama MCF-7 fueron transfectadas establemente con el vector de expresión pcDNA3/erbB2 (véase la Fig. 2) mediante el procedimiento del fosfato de calcio. Se seleccionó un color que
45 sobreexpresaba c-erbB2 (erbB2.c1) que fue utilizado para la transfección estable posterior con el vector de expresión pSecTag/PCDGF. De los clones que sobreexpresan tanto c-erbB2 como PCDGF, se seleccionó el clon D.c2 y se examinó con más detalle en comparación con las células individuales que sobreexpresan erbB2 (véase las figuras 5, 6 y 7). Se establecieron clones en presencia de zeocina y/o G418.

Ensayo de proliferación celular

Las células se sembraron en DMEF/F12 que contenía FBS 5 % a 8×10^4 células/pocillo. Después de 24 horas de incubación, las células se lavaron y se añadió PFMEM fresco junto con diversos tratamientos. Las células se contaron usando un hemocitómetro durante cada uno de los tres días siguientes al periodo de incubación inicial de 24 horas (véanse las Fig. 11 y 12). Como se muestra en las Figs. 11 y 12, la sobreexpresión de PCDGF confiere resistencia al antagonista de HER2/neu en células que sobreexpresan HER2/neu.

Ensayos de incorporación de timidina

Las células se sembraron a 8×10^4 células/pocillo en DMEM/F12 que contenía suero bovino fetal (FBS) 5 % en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 48 horas. Las células se desecharon a continuación y se añadió PEMEM fresco (con o sin suero tratado con carbón vegetal 1 %) junto con los diversos tratamientos. Cuarenta y ocho horas más tarde, se añadieron 1 μ Ci de 3 H-timidina a cada pocillo y las células se incubaron durante 24 horas. Los lisados celulares se prepararon y se midieron las concentraciones de 3 H-timidina en un contador de centelleo líquido (ver Fig. 11). Como se muestra en la Fig. 11, la sobreexpresión de PCDGF confiere resistencia al antagonista de HER2/neu en las células que sobreexpresan el HER2/neu.

Activación de erbB2

Se sembraron doscientas mil (2×10^5) células en DMEM/F12 que contenía FBS 5 % y se incubaron durante 48 horas. Las células se lavaron y se añadió PFMEM fresco (MEM libre de rojo fenol) y se incubaron adicionalmente durante 24 horas. Se añadieron a continuación varios compuestos a las células durante un máximo de 15 minutos: los lisados celulares se prepararon utilizando tampón RIPA. Los lisados se separaron en un SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó y se incubó con anticuerpo anti-fosfo-erbB2 seguido por un anticuerpo secundario marcado. Se detectaron bandas positivas con tinción de quimioluminiscencia (ECL) (véanse las Figs. 6, 7 y 8). Se utilizó heregulina como control positivo. Estos resultados muestran que el PCDGF estimula la fosforilación de ErbB2 en las células que sobreexpresan erbB2 e indican que PCDGF y erbB2 comparten una vía de transducción de señal común.

RT-PCR de PCDGF

La expresión de PCDGF en transfectantes estables erbB2 se midió mediante PCR con transcripción inversa (RT)-PCR. Brevemente, se sembraron 2×10^5 células en placas de 35 mm en el medio apropiado. Cuarenta y ocho horas más tarde, se extrajo el ARN total utilizando Trizol[®] (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Se usó Superscript[®] 11 (Invitrogen) para la transcripción inversa. La PCR se llevó a cabo durante 25 ciclos de [94 °C, 1 min; 62 °C, 45 seg; 72 °C, 2 min] seguido por una elongación final a 72 °C durante 7 minutos. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Análisis de inmunotransferencia (Western blot)

En una realización, se sembraron cien mil (1×10^5 células/ml) en el medio apropiado. Cuarenta y ocho horas más tarde, las células se lavaron y se añadió PFMEM fresco. Veinticuatro horas más tarde, se añadió PFMEM fresco junto con los tratamientos indicados. Los lisados celulares se recogieron utilizando tampón de lisis celular (Tris 50 mM, pH 7,4; EDTA 4 mM, KCl 25 mM, Na_3VO_4 1 mM; NaF 10 mM, Triton 100 1 %; 10 μ g/ml de leupeptina, 10 μ g/ml de pepstatina y 2 μ g/ml de aprotinina). Se cargaron cuarenta μ g de lisados de proteína total en geles PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Para las inmunoprecipitaciones, se añadieron 2 μ g de anti-PCDGF a lisados celulares y se incubaron durante la noche a 4 °C. Se añadieron 40 μ l de proteína A Sefarosa y se incubó a 4 °C durante 4 horas. Las perlas de Sefarosa se lavaron con PBS frío y se añadió tampón de muestra de proteína. Las membranas se bloquearon con PBS-T (+5 % de leche) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS-T tres veces (5 minutos cada uno) las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces (15 minutos cada vez). Las proteínas se detectaron con quimioluminiscencia potenciada (EC).

Ensayo en agar blando

Se colocaron en capas diez mil (1×10^4) células en agarosa 0,33 % en la parte superior de agarosa 6 % en DMEM/F12 (suero al 5 % en general; se usó suero al 10 % para las células SKBR3). Las colonias se cultivaron durante 21 días y luego se tiñeron con cristal violeta al 0,005 %. Las colonias se contaron usando un microscopio. Como se muestra en la Fig. 12, la sobreexpresión de PCDGF confiere resistencia a los antagonistas de HER2/neu en células que sobreexpresan erbB2.

Resultados

Como se muestra en las figuras adjuntas, los clones de doble sobreexpresión (D.c2) (es decir, los clones que sobreexpresan tanto PCDGF como erbB2) eran resistentes al antagonista de HER2 con respecto a su capacidad para proliferar *in vitro* (Figs. 10 y 12), mientras que las células erbB2.c1 eran sensibles al tratamiento con Herceptin[®] (Fig. 9). Estas células erbB2.c1 sensibles a Herceptin[®] también tuvieron una ventaja de crecimiento cuando se trataban con PCDGF. Por otra parte PCDGF estimula la fosforilación de c-erbB2 en estas células (Figs. 6 y 7). También hemos demostrado que las células D.c2 con expresión doble eran más resistentes que las células erbB2.c1 al antiestrógeno ICI 182.780 (datos no mostrados). Nuestros hallazgos demuestran que PCDGF confiere resistencia a Herceptin[®] en tumores que sobreexpresan c-erbB2. Por lo tanto, el bloqueo de la acción del PCDGF sería beneficioso para los pacientes sometidos a tratamiento con antagonistas de HER2.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-Her2 o fragmento de unión al antígeno del mismo y un inhibidor de quinasa Her2 en cantidades eficaces para inhibir el crecimiento de células tumorales, en la fabricación de un medicamento para la inhibición del crecimiento de células tumorales, en el que dicha célula tumoral expresa HER2.
- 10 2. Uso de un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-Her2 o fragmento de unión al antígeno del mismo y un inhibidor de quinasa Her2 en cantidades eficaces para prevenir o retrasar la recurrencia del tumor en un paciente con un tumor, en la fabricación de un medicamento para prevenir o retrasar la recurrencia del tumor en un paciente con un tumor, en el que las células de dicho tumor expresan HER2.
- 15 3. Un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-Her2 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un inhibidor de quinasa Her2 en cantidades eficaces para inhibir el crecimiento de células tumorales, para su uso en la inhibición del crecimiento de células tumorales, en el que dicha célula tumoral expresa HER2.
- 20 4. Un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-Her2 o fragmento de unión a antígeno del mismo y un inhibidor de quinasa Her2 en cantidades eficaces para prevenir o retrasar la recurrencia del tumor en un paciente con un tumor, para su uso en la prevención el o retraso de la recurrencia del tumor en un paciente con un tumor, en el que las células de dicho tumor expresan HER2.
- 25 5. El uso de la reivindicación 1 o 2 o un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 de la reivindicación 3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 3 o un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 de la reivindicación 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-PCDGF y el antagonista de HER2 son para co-administración.
- 30 6. El uso de la reivindicación 1 o 2 o un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 de la reivindicación 3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 3 o un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 de la reivindicación 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-PCDGF y el antagonista de HER2 son para administración simultánea.
- 35 7. El uso de la reivindicación 1 o 2 o un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 de la reivindicación 3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 3 o un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 de la reivindicación 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-PCDGF y el antagonista de HER2 son para administración secuencial.
- 40 8. El uso de la reivindicación 1 o 2 o un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 de la reivindicación 3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 3 o un anticuerpo anti-PCDGF neutralizante y un antagonista de HER2 de la reivindicación 4 para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-PCDGF se produce a partir de una línea celular de hibridoma seleccionada entre el grupo que consiste en 6B3 como la depositada en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-5262), 6B2 como la depositada con (ATCC con el número de acceso PTA-5261), 6C12 como la depositada con (ATCC con el número de acceso PTA-5597), 5B4 como la depositada con (ATCC con el número de acceso PTA-5260), 5G6 como la depositada con (ATCC con el número de acceso PTA-5595), 4D1 como la depositada con (ATCC con el número de acceso PTA-5593), 3F8 como la depositada con (ATCC con el número de acceso PTA-5591), 3F5 (ATCC número de acceso PTA-5259), 3F4 como la depositada con (ATCC con el número de acceso PTA-5590), 3G2 como la depositada con (ATCC con el número de acceso PTA-5592) y 2A5 como la depositada con (ATCC con el número de acceso PTA-5589) y 4F10 (ATCC número de acceso PTA-8763) o es un fragmento de unión a antígeno de las mismas.

45

Secuencia de nucleótidos del precursor de granulina/epitelina humano (GP88 humano).
 Granulina humana Genbank M751G1

```
[cgcaggcaga ccatgtggac cttggtgagc tgggtggcct taacagcagg gctggtggct
ggaacgcggt gcccagatgg tcagttctgc cctgtggcct gctgcctgga ccccggagga
gccagctaca gctgctgccg tccccttctg gacaaatggc ccacaacact gagcaggcat
ctgggtggcc cctgccaggf tgatgcccac tgctctgccg gccactcctg catctttacc
gtctcagggg cttccagttg ctgccccttc ccagaggccg tggcatgcgg ggatggccat
cactgctgcc cacggggcct cactgcagt gcagacggga gatcctgctt ccaaagatca
ggaacaact ccgfggggtgc catccagtgc cctgatagtc agttcgaatg cccggacttc
tccacgtgct gtgttatggt cgatggctcc tgggggtgct gcccctatgcc ccaggcttcc
tgctgtgaag acaggggtgca ctgctgtccg cacgggtgcct tctgcgacct ggttcacacc
cgctgcatca caccacacgg caccacccc ctggcaaaga agtcacctgc ccagaggact
aacagggcag tggccttgtc cagctcggtc atgtgtccgg acgcacggtc ccggtgccct
gatggttcta cctgctgtga gctgcccagt gggagatag gctgctgccc aatgcccaac
gccacctgct gctccgatca cctgcaactgc tgcccccaag aactgtgtg tgacctgatc
cagagtaagt gcctctccaa ggagaacgct accacggacc tcctcactaa gctgcctgcg
cacacagtgg gcgatgtgaa atgtgacatg gaggtgagct gccagatgg ctatacctgc
tgccgtctac agtcggggggc ctggggctgc tgcccttta cccaggctgt gtgctgtgag
gaccacatac actgctgtcc cgcgggggtt acgtgtgaca cgcagaaggg tacctgtgaa
caggggcccc accaggtgcc ctggatggag aaggccccag ctcacctcag cctgccagac
ccacaagcct tgaagagaga tgtcccctgt gataatgtca gcagctgtcc ctctccgat
acctgctgcc aactcacgtc tggggagtgg ggctgctgtc caatcccaga ggctgtctgc
tgctcggacc accagcactg ctgccccag cgatacacgt gtgtagctga ggggcagtgt
cagcaggaa gcgagatcgt ggctggactg gagaagatgc ctgcccgcgg cggttcctta
tcccaccca gagacatcgg ctgtgaccag cacaccagct gcccggtggg cggaacctgc
tgcccagacc aggggtgggag ctgggcctgc tgccagttgc cccatgctgt gtgctgcgag
gategccagc actgctgccc ggctggctac acctgcaacg tgaaggctcg atcctgcgag
aaggaagtgg tctctgccc aacctgccacc ttcttgccc gtagccctca cgtgggtgtg
aaggacgtgg agtgtgggga aggacacttc tgccatgata accagacctg ctgccgagac
aacggacagg gctgggcctg ctgtccctac gccagggcg tctgttgtgc tgatcggcgc
cactgctgtc ctgctggctt ccgctgcgca cgcaggggta ccaagtgttt gcgcagggag
gccccgcgct gggacgcccc tttgagggac ccagccttga gacagctgct gtgagggaca
gtactgaaga ctctgcagcc ctccgggaccc cactcggagg gtgccctctg ctcaggcctc
gtactgaaga ctctgcagcc ctccgggaccc cactcggagg gtgccctctg ctcaggcctc
cctagcacct cccctaacc aaattctccc tggaccccat tctgagctcc ccataccat
gggaggtggg gcctcaatct aaggcccttc cctgtcagaa gggggttgag gaaaagccc
attacaagct gccatcccct ccccgtttca gtggaccctg tggccagggt ctttcccta
tccacagggg tgtttgtgtg ttgggtgtgc tttcaataaa gtttgtcact ttctt*
```

Secuencia de nucleótidos del PCDGF humano

FIG. 1 A

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

MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGFQCPVACCLDPGGASYSCCRP
LLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRG
FHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCED
RVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDG
STCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKLSKENATDILLTYLPA
HTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGT
CEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIP
EAVCCSDHQHCCPQRYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRGSLSHPRDIGCDQHTSC
PVGGTCCPSQGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAPATFL
ARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYAQGVCCADRRHCCPAGFRCA
RRGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL*

Secuencia de aminoácidos deducida del PCDGF humano

FIG. 1 B

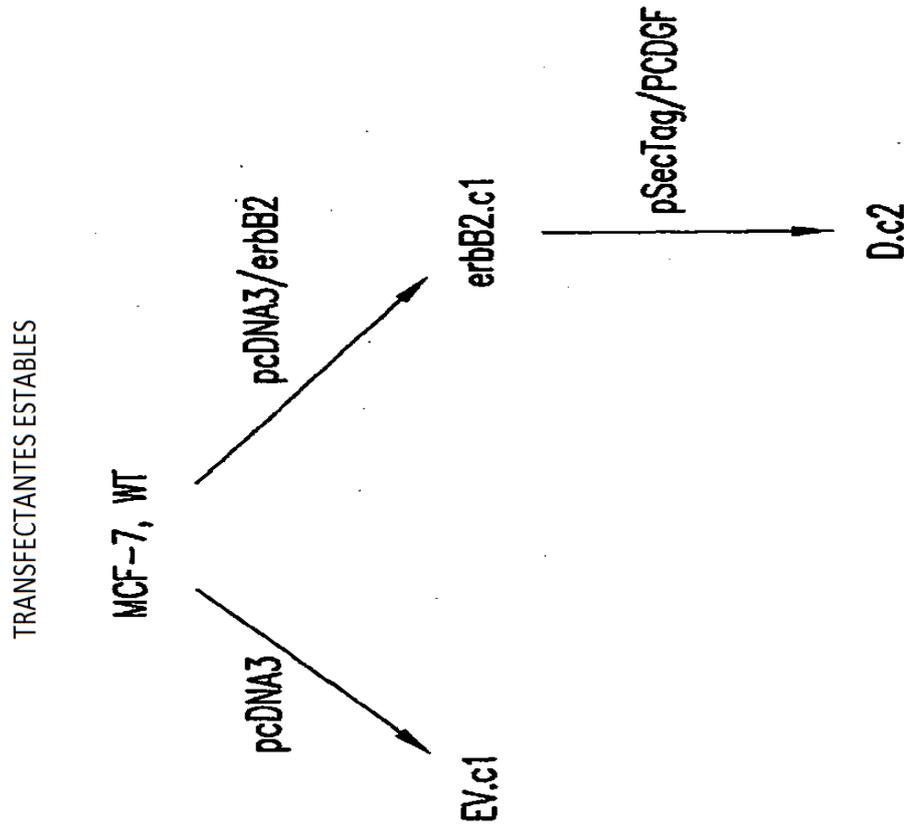


FIG.2

EKAPAHLSLPDPOALKRDV

FIG.3A

RRGTKCLRREAPR

FIG.3B

EXPRESIÓN DE PCDGF Y erb2
EN BIOPSIAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO:

ErbB2	Nº DE CASOS	TINCIÓN DEL PCDGF			
		0	1	2	3
0	n=9	1	1	4	3
2	n=6	2	3	1	0
3	n=7	0	4	2	1

FIG.4

NIVELES DE PCDGF EN MEDIOS CONDICIONADOS DE

D.c2 vs. erbB2.c1

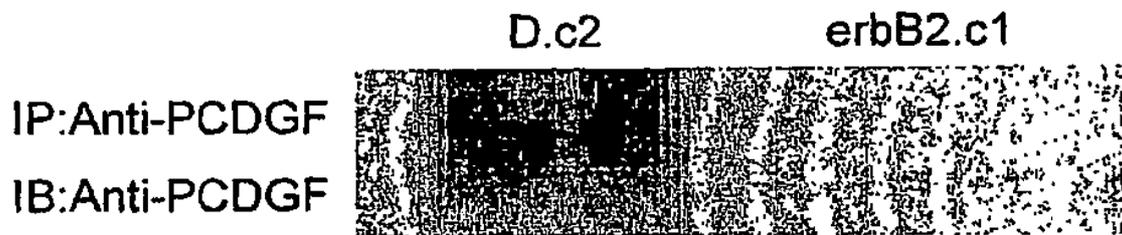


FIG.5

Respuesta a la dosis de PCDGF y heregulina
en células erbB2.c1
Activación de erbB2

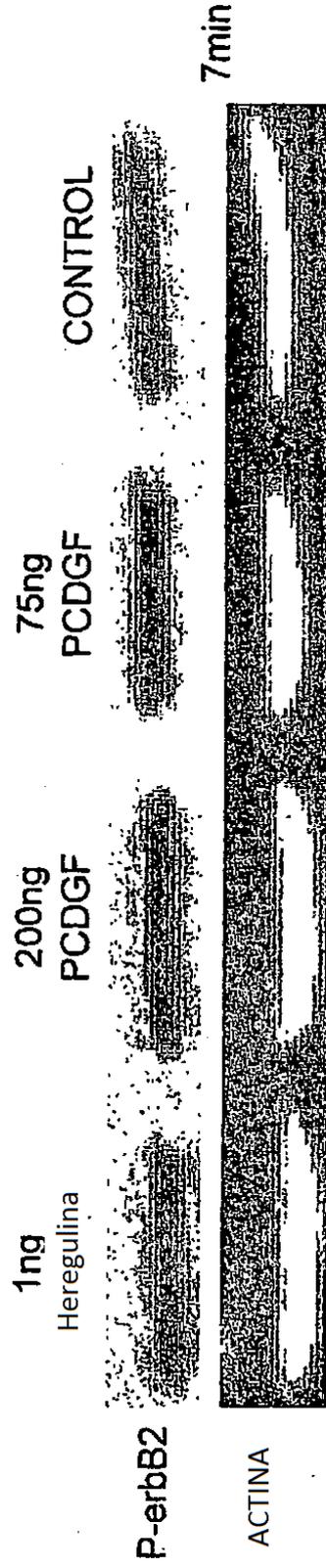


FIG.6

ACTIVACIÓN DE PCDGF DE erbB2 IN BT-474

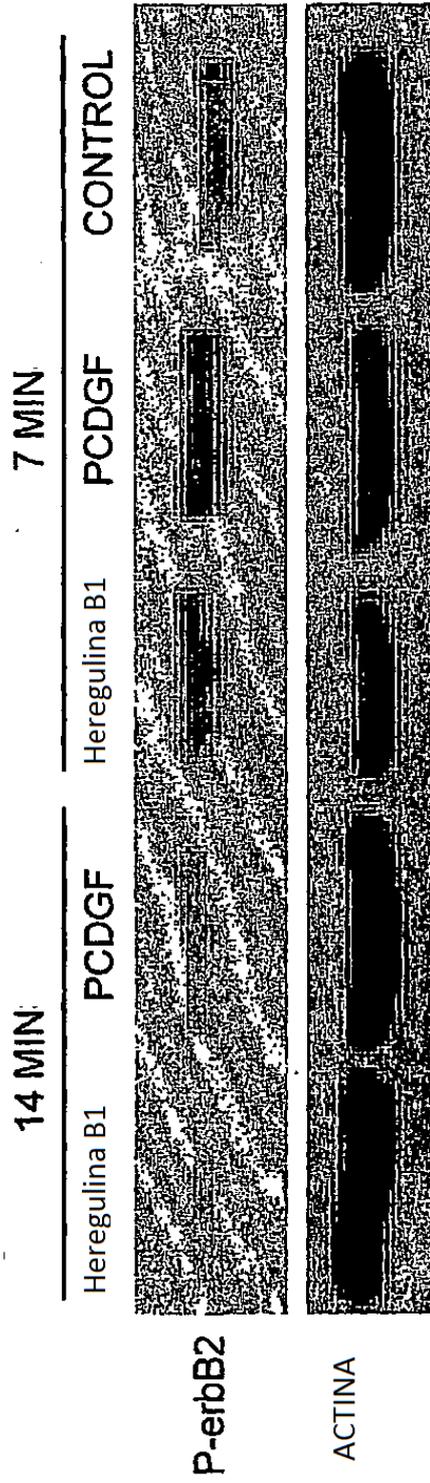


FIG.7

ACTIVACIÓN DE PCDGF DE erbB2 en RESPUESTA A LA DOSIS DE BT-474

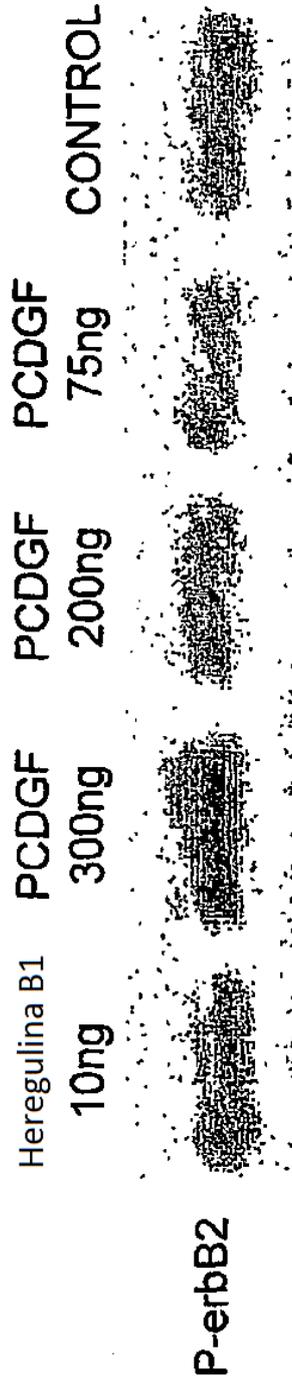


FIG.8

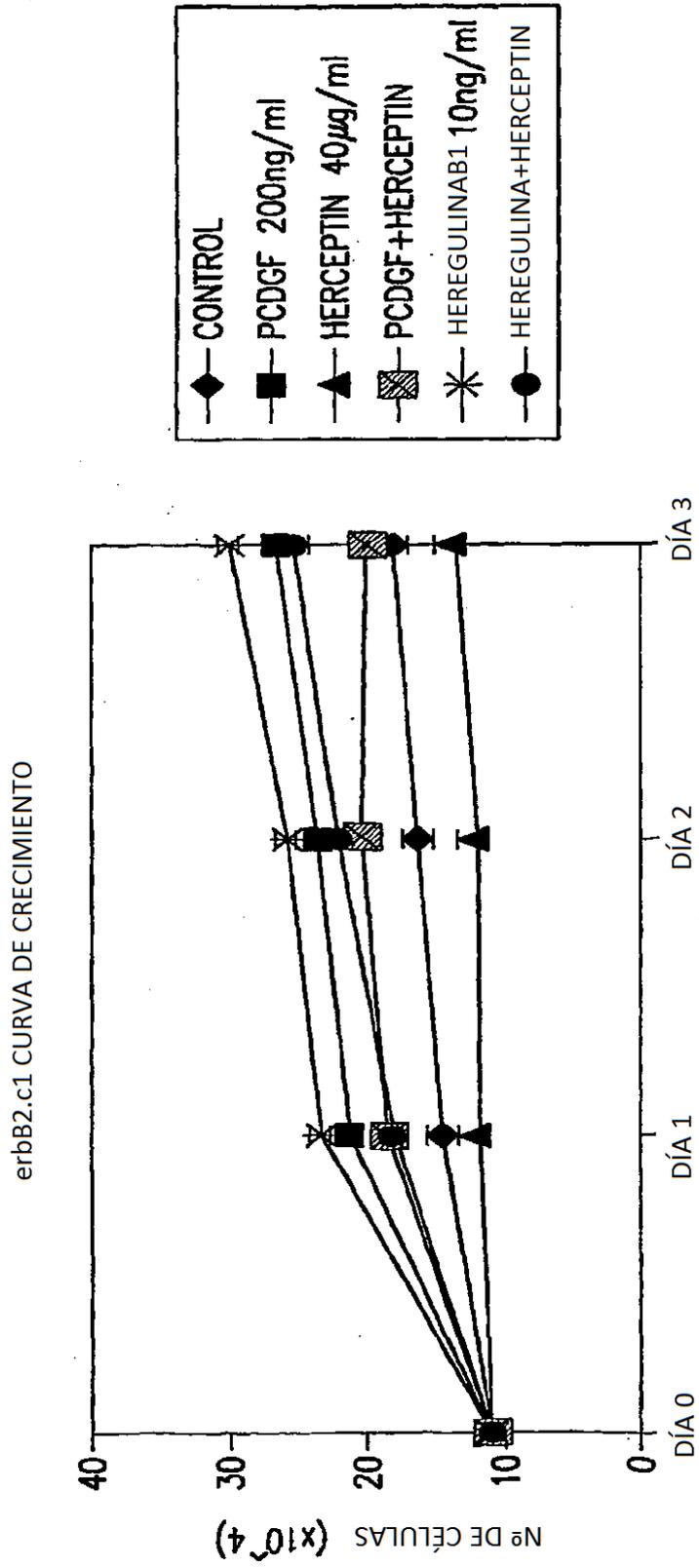


FIG.9

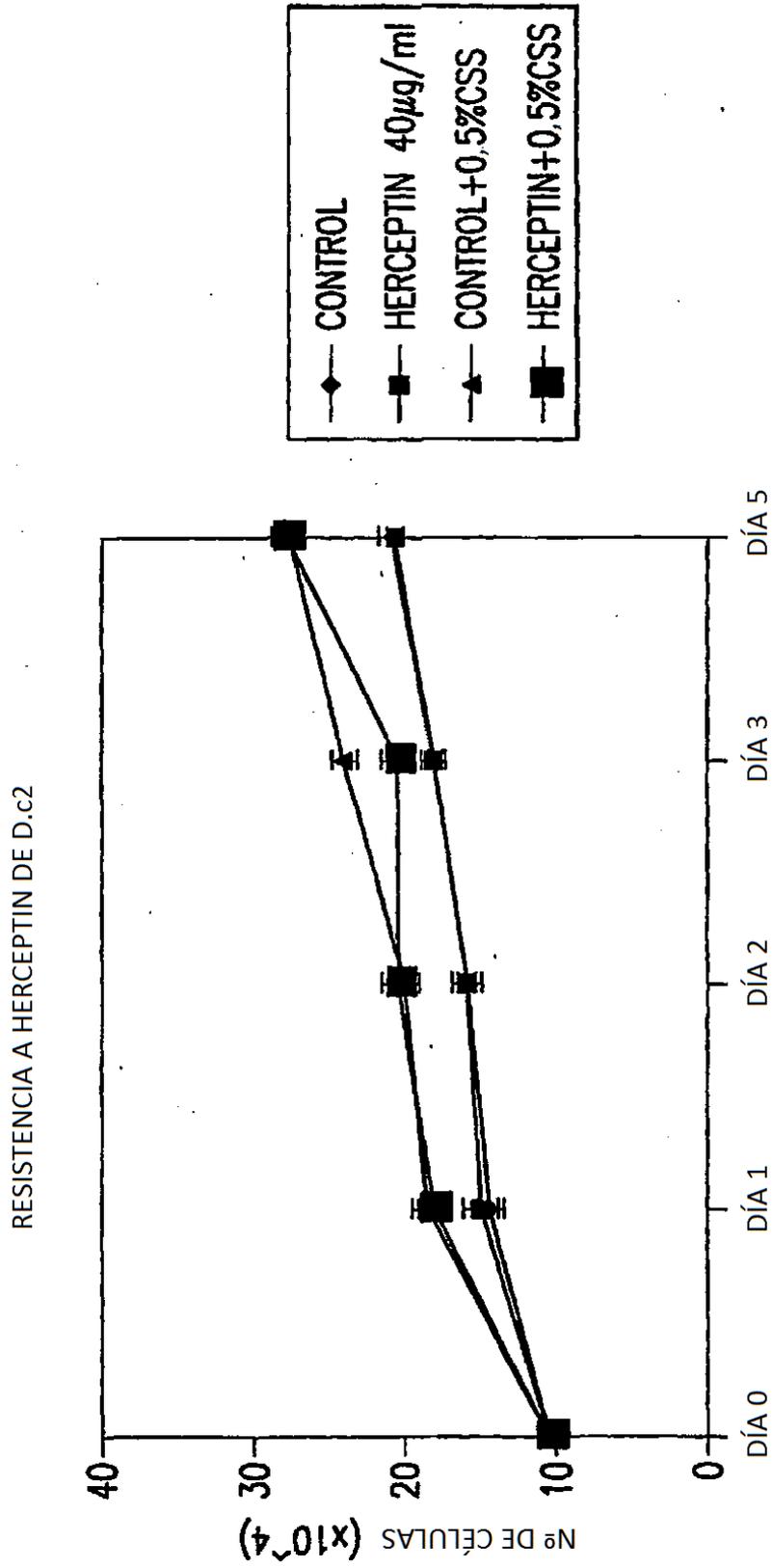


FIG.10

INCORPORACIÓN DE TIMIDINA: D.c2
RESPUESTA A HERCEPTIN

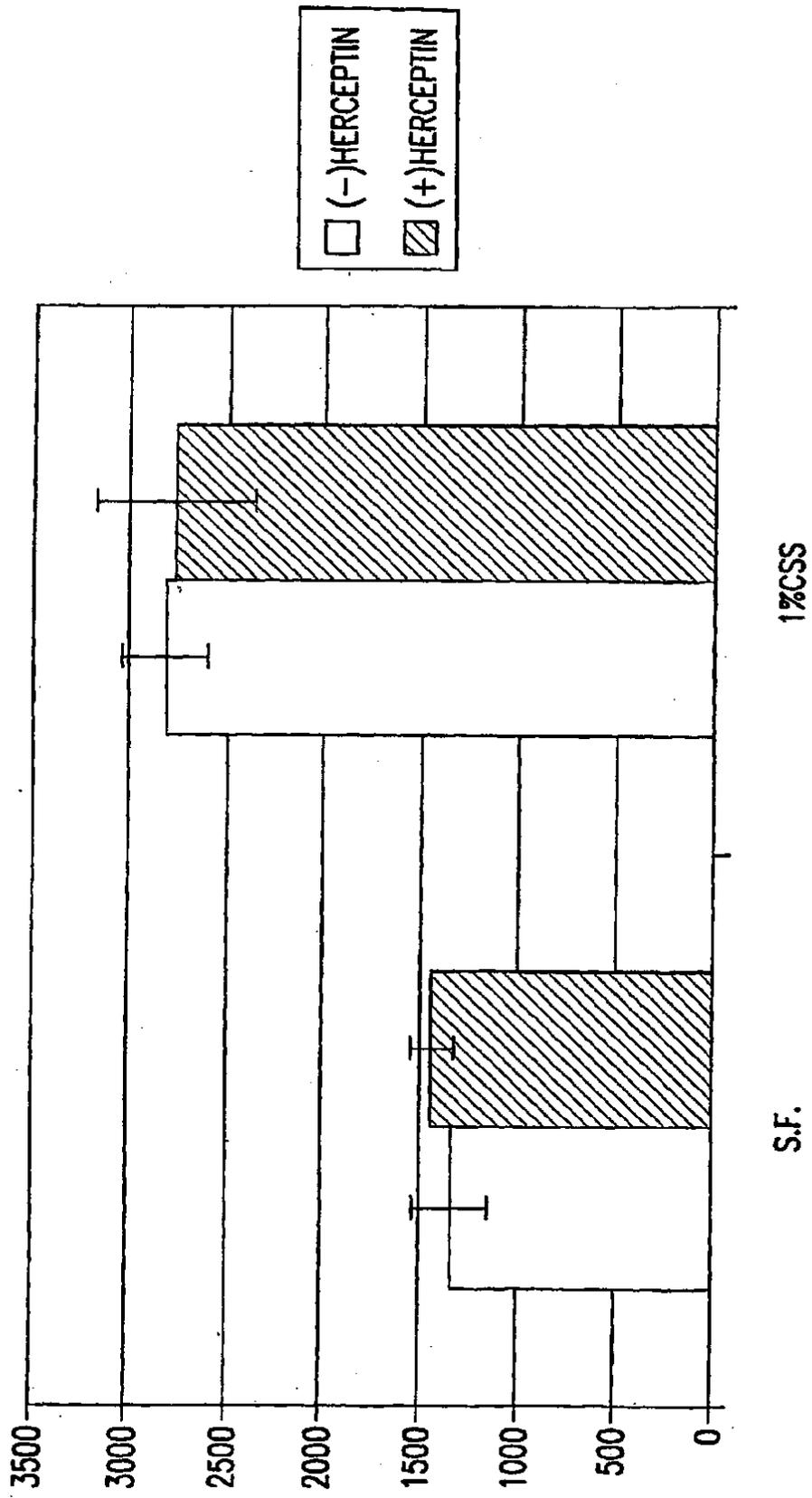


FIG.11

ENSAYO EN AGAR BLANDO:
RESPUESTA A HERCEPTIN

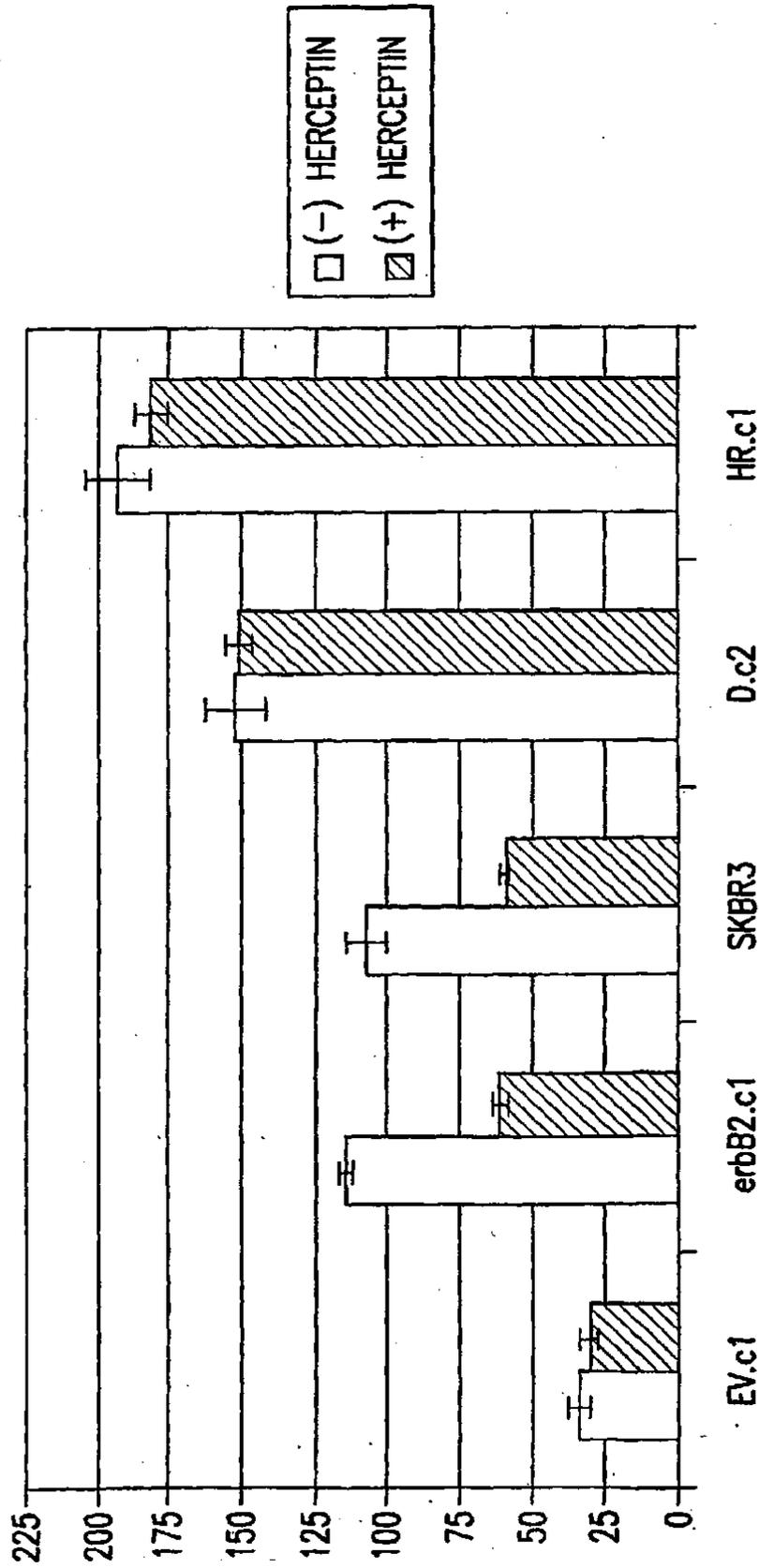


FIG.12

RESISTENCIA A HERCEPTIN EN CÉLULAS SKB3-3
QUE SOBREEXPRESAN PCDGF

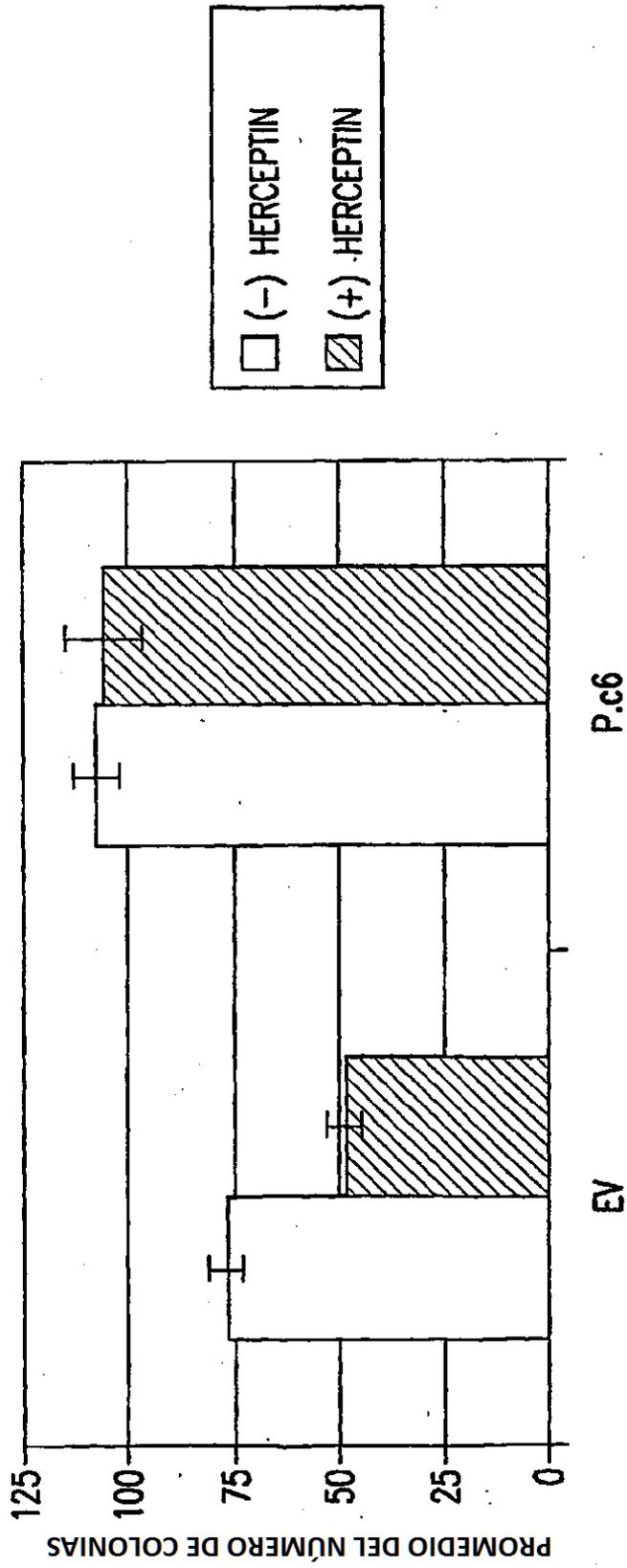


FIG.13