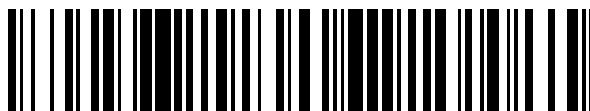


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 598**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2004 E 04785392 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 1687337**

54 Título: **Un método para el tratamiento de enfermedades malignas mediante la inhibición de la nucleolina**

30 Prioridad:

09.10.2003 US 683480

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

07.07.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF LOUISVILLE RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
Med Center Three, 201 E. Jefferson Street,
Ste 215
Louisville, KY 40202, US**

72 Inventor/es:

**BATES, PAULA J.;
MILLER, DONALD M.;
TRENT, JOHN O. y
XU, XIAOHUA**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 473 598 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

Un método para el tratamiento de enfermedades malignas mediante la inhibición de la nucleolina.

5 Estar bien preparado para la batalla engendra éxito; cuando el enemigo es el cáncer, la detección temprana resulta en una probabilidad mayor de que la intervención médica será exitosa. En las etapas iniciales, frecuentemente los tratamientos pueden estar dirigidos sólo a los tejidos afectados, disminuyendo los efectos secundarios. Si no se detecta tempranamente, las células cancerosas pueden hacer metástasis y extenderse por todo el cuerpo. El pronóstico en este caso es más grave, y los tratamientos médicos que se aplican frecuentemente de manera sistémica, matan no sólo las células cancerosas, sino un gran número de células sanas.

10 El Instituto Nacional del Cáncer estima que en el año 2002, 1.285 millones de estadounidenses se les diagnosticará cáncer, y más de 560,000 estadounidenses morirán de una enfermedad relacionada con el cáncer.

15 Una característica distintiva de una célula de cáncer es la proliferación incontrolada. La proliferación descontrolada de estas células puede manifestar las masas celulares (tumores) que interfieren con la función normal del órgano. Si la proliferación no se controla o contiene, las células de los tumores migran y colonizan otros tejidos del cuerpo, lo que eventualmente resulta en la muerte.

20 Factores externos, tales como el humo del tabaco, radiación y virus, pueden conducir a alteraciones en genes específicos que resultan en la proliferación celular no regulada. Los factores intrínsecos, incluyendo mutaciones heredables, niveles hormonales y metabolismo, contribuyen al riesgo de contraer cáncer.

25 Las células cancerosas presentan también aberraciones morfológicas y funcionales. La morfología celular puede ser menos organizada; por ejemplo, las células pierden el organelo asimétrico y organización estructural (polaridad celular) que permite la función apropiada de la célula. Los contactos célula-célula y célula-sustrato, cuyas especificidades son necesarias también para el funcionamiento normal, frecuentemente se modulan o pierden. Funcionalmente, las células pueden portar pocas, casi ninguna, funciones de tipo-silvestre, o pueden tener funciones normales exageradas, no reguladas, tales como la secreción de hormonas. Tales células regresan a etapas tempranas del desarrollo, apareciendo menos diferenciadas que las de tipo-silvestre (*es decir.*, padres normales).

30 También las células cancerosas frecuentemente expresan o focalizan erróneamente las proteínas a los compartimentos celulares inapropiados. Las proteínas pueden ser reguladas positiva o negativamente; incluso las proteínas que generalmente no se expresan por un tipo celular específico se pueden expresar por la contraparte transformada. La expresión errónea de la proteína puede tener una gran cantidad de efectos celulares corriente abajo, incluyendo cambios drásticos en la composición de la membrana, formación de organelos, o fisiología. La focalización errónea de proteínas (y otras moléculas, tales como lípidos, *etc.*) contribuyen además a la pérdida de la polaridad celular.

40 *Tratamientos para el cáncer*

Los métodos para tratar los cánceres incluyen cirugía (extracción física de los tejidos cancerosos), terapia de radiación (muerte de las células por la exposición a dosis letales para las células de radiactividad), quimioterapia (administración de toxinas químicas en las células), inmunoterapia (usando anticuerpos que se dirigen a las células cancerosas y las marcan para su destrucción por el sistema inmune innato) y terapias basadas en ácidos nucleicos (*por ejemplo*, expresión de material genético para inhibir el crecimiento del cáncer). Cada enfoque, sin embargo, tiene sus limitaciones.

50 La cirugía, quimioterapia y terapia de radiación sufren de limitaciones significativas similares, tales como la extirpación incompleta de las células cancerosas o la muerte accidental de células sanas. Las tácticas quirúrgicas son más eficaces cuando los cánceres están en etapas tempranas y en área localizada limitada en el cuerpo. Incluso en los pocos casos que se diagnostican tempranamente, frecuentemente la extirpación quirúrgica de las células cancerosas es incompleta, y la reaparición de lesiones metastásicas frecuentemente continúan. Cuando los agentes quimioterapéuticos se administran en dosis precisas, ellos son preferentemente tóxicos para las células cancerosas que proliferan rápidamente y no afectan a la mayoría de las células sanas. Las dosis de radiación de haz de luz externo localmente suministradas son más eficaces en las células que crecen rápidamente, matándolas mediante la introducción de daño de ADN no-específico. La terapia de radiación, como la cirugía, funciona mejor cuando la masa cancerosa focalizada está bien delimitada; el equilibrio de las células sanas *contra* células cancerosas se debe sopesar cuidadosamente. Tanto la quimioterapia como la terapia de radiación no son totalmente selectivas para las células cancerosas; inevitablemente, algunas células sanas caen víctima de los efectos tóxicos, causando profundos efectos secundarios en la víctima que sufre ya de cáncer.

Otros enfoques comunes, la inmunoterapia y terapia génica, pueden ser muy poderosos y superar la cirugía, quimioterapia y terapia de radiación. Estas técnicas dirigidas a factores específicos se asocian con la supervivencia del tumor, crecimiento celular o metástasis. Por ejemplo, los anticuerpos pueden dirigirse a proteínas asociadas a tumores específicos, tales como el anticuerpo monoclonal que se une a una proteína de superficie que específica a

las células B, CD20 (RITUXAN®; Genentech, Inc. y IDEC Inc.) que se usa para tratar tumores malignos de células B. Un ejemplo de una terapia génica eficaz es la inhibición antisentido de la expresión de *bcl-2* (GENASENSE®; Genta, Inc.). Aunque eficaz, el reto es identificar aquellos genes y proteínas clínicamente relevantes y desarrollar la terapéutica adecuada que los dirija a la destrucción de la célula cancerosa. Además, el proceso no sólo es laborioso en la identificación de estas moléculas, sino que en muchos casos, las moléculas identificadas serán específicas a sólo un tipo de cáncer o célula tumoral.

Mi Y y otros, Cancer Research, 43, 959-960 (Resumen 4752), 2002, WO 2000/61597, WO 2001/32832 y DE 10037861 todos describen polinucleótidos que pueden ser utilizados para reducir la nucleolina nuclear o citoplásmica y así puede ser útil en el tratamiento del cáncer. El resumen de Mi Y y otros indica además que un anticuerpo contra la nucleolina puede frenar el crecimiento de la célula cancerosa *in vitro* a una alta concentración, pero no proporcionó ninguna información sobre su efecto *in vivo* o sobre las células no cancerosas.

En la presente descripción se describen métodos para tratar tumores o cáncer en un sujeto mediante:

- (1) administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente anti-nucleolina y un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede comprender más aun otros agentes quimioterapéuticos o quimiotóxicos, tales como ciclofosfamida, etopósido, doxorubicina, metotrexato, vincristina, procabazina, prednisona, dexametasona, citrato de tamoxifeno, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, camptotecina, ácido zoledrónico, ibandronato y mitomicina. En conjunto, puede además aplicarse la terapia de radiación .
- (2) administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-nucleolina y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo es sustancialmente no-inmunogénico para el humano. Esta composición farmacéutica puede comprender además otros agentes quimioterapéuticos o quimiotóxicos. En conjunto, puede además aplicarse la terapia de radiación.
- (3) administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-nucleolina, un agente quimioterapéutico o quimiotóxico y un portador farmacéuticamente aceptable.
- (4) administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo contra nucleolina y un portador farmacéuticamente aceptable, y el tratamiento adicional del sujeto con terapia de radiación.
- (5) administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARN de interferencia dúplex para la nucleolina y un portador farmacéuticamente aceptable .
- (6) administración de una molécula antisentido de nucleolina que inhibe la nucleolina la producción de la proteína nucleolina.
- (7) administración de una molécula de ARN de interferencia-nucleolina que inhibe la expresión del gen de nucleolina.

En tales métodos descritos, un agente quimioterapéutico o quimiotóxico puede ser ciclofosfamida, etoposido, doxorubicina, metotrexato, vincristina, procabazina, prednisona, dexametasona, citrato de tamoxifeno, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, camptotecina, ácido zoledrónico, ibandronato y mitomicina.

También se describen en la presente descripción las composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y:

- (8) un oligonucleótido antisentido dirigido contra la nucleolina.
- (9) un ARN inhibitorio contra la nucleolina.
- (10) un anticuerpo contra nucleolina.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal sustancialmente no-inmunogénico, contra la nucleolina de la superficie celular y un portador farmacéuticamente aceptable, para usar en la eliminación de células cancerosas de un humano con cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1 muestra la tinción de la nucleolina nuclear en diversas líneas celulares. Se muestran micrografías de inmunofluorescencia (B, D, F, H) y en paralelo de contraste de fase (A, C, E, G). Las líneas celulares que se analizaron fueron: células de cáncer de próstata DU145 (A, B), células de cáncer de mama MDA-MB-231 (C, D), células de cáncer cervical HeLa (E, F) y células de la piel normal HS27 (G, H). Un anticuerpo anti-nucleolina se usó; las células se permeabilizaron antes de la tinción para permitir el acceso del anticuerpo a los compartimentos citoplasmáticos y nucleares.

Fig. 2 muestra la tinción de la nucleolina de membrana plasmática en las líneas celulares que se muestran en la figura 1. Se muestran micrografías de inmunofluorescencia (B, D, F, H) y en paralelo de contraste de fase (A, C, E, G). Las líneas celulares que se analizaron fueron: células de cáncer de próstata DU145 (A, B), células de cáncer de mama MDA-MB-231 (C, D), células de cáncer cervical HeLa (E, F) y células de la piel normal HS27 (G, H). Un anticuerpo anti-nucleolina se usó; las células no se permeabilizaron antes de la tinción lo que permite el acceso del anticuerpo sólo a la membrana plasmática.

Fig. 3 muestra las tasas comparativas de proliferación de las líneas celulares según se midió con el ensayo de MTT. cuadrado, DU145; diamantes, HeLa; círculos, HS27. Aunque MDA-MB-231 no se incluyó en este experimento, las tasas de proliferación para estas cuatro líneas celulares se determinó que fuera DU145 > MDA-MB-231 > HeLa > HS27. Tenga en cuenta que las líneas celulares con altos niveles de nucleolina de membrana plasmática se corresponden con las de más rápida proliferación (DU145 y HeLa; ver la Figura 2) .

Fig. 4 muestra la imagen de contraste de fase (B,D) y de inmunofluorescencia (A,C) de la pieza embebida en parafina extirpada de un paciente con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. La muestra se tiñó para la nucleolina de membrana plasmática y contrastó con yoduro de propidio para mostrar los núcleos celulares . Las imágenes (C) e imágenes (D) muestran las imágenes (A) y (B) superpuestas con marcas para mostrar mejor la tinción de la nucleolina. El área 1 abarcada por la línea blanca incluye la tinción intensa de la nucleolina, mientras que las áreas fuera de 1 muestran poca 3 o ninguna 2 señal.

Fig. 5 muestra la imagen de contraste de fase (B,D) y de inmunofluorescencia (A,C) de las líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas (NCI-H82) y células no-pequeñas (NCI-H1299) colocadas sobre una lámina de microscopio usando una citocentrífuga. Las muestras se tiñeron para la nucleolina de membrana plasmática y contrastaron con yoduro de propidio para mostrar los núcleos celulares. Las células con membranas plasmáticas excepcionalmente bien teñidas se indican con asteriscos (*).

Fig. 6 muestra las imágenes de contraste de fase (B, D, F) de inmunofluorescencia (A, C, E) de sangre periférica (A, B) o médula ósea (C, D y E, F) a partir de sujetos humanos. Las muestras se tiñeron para la nucleolina de membrana plasmática y contrastaron con yoduro de propidio para mostrar los núcleos celulares. Las células altamente teñidas para la nucleolina se marcan con un asterisco (*); éstas sólo se observaron en los pacientes que sufren de carcinomas (A,B y C,D), mientras que las células de un paciente sano no mostraron ninguna tinción de la nucleolina de membrana plasmática (E, F).

La invención se basa en el descubrimiento de una correlación entre la expresión de la nucleolina de membrana plasmática y la presencia y agresividad de las células neoplásicas. El descubrimiento inesperado que la nucleolina, principalmente restringida al interior del núcleo de la célula sana, cuando se encuentra en la superficie celular, se correlaciona con un fenotipo maligno o pre-maligno. Esta observación no sólo facilita el diagnóstico y pronóstico del cáncer, sino que también proporciona una estrategia de tratamiento novedosa y potente. Se describen en la presente los métodos para tratar el cáncer mediante la administración de un compuesto que específicamente se dirige a la nucleolina. Además se describen en la presente los métodos para tratar el cáncer mediante la administración de un compuesto dirigido a la nucleolina en conjunto con otras terapias contra el cáncer, *por ejemplo*, un fármaco anti-cáncer. Tal terapia de combinación logra resultados terapéuticos superiores y sinérgicos.

Las ventajas de usar la nucleolina localizada en la superficie para tratar tumores y cánceres incluyen:

- (1) Especificidad. La nucleolina de membrana plasmática generalmente no se observa en la membrana plasmática de la mayoría de las células (sanas) de tipo salvaje. Así, a diferencia de otros enfoques terapéuticos inespecíficos (*por ejemplo*, cirugía, radiación, quimioterapias), la nucleolina de membrana plasmática dirigida se puede usar para matar específicamente las células cancerosas.
- (2) Amplia aplicabilidad. A diferencia de las inmunoterapias y terapias génicas anteriores, la expresión de la nucleolina en la membrana plasmática ocurre en muchos tipos de células cancerosas. Muchos tipos de cánceres, por lo tanto, se pueden tratar mediante la explotación de la nucleolina de membrana plasmática; sin embargo, a diferencia de otros tratamientos menos específicos (*por ejemplo*, terapia de radiación), las células sanas no se dañan o mueren.
- (3) Tratamiento: temprano o tardío. Debido a que la nucleolina de membrana plasmática es indicativa no sólo de las células malignas, sino también de células *pre*-malignas, el tratamiento puede comenzar con la detección de la nucleolina superficial, incluso antes de que una masa tumoral pueda generalmente detectarse por otros medios.

Mientras que se investiga la actividad anti-proliferativa de los oligonucleótidos ricos en guanosina- no antisentido (GROs) en las células cancerosas, se encontró que tales GROs antiproliferativos se unen a la nucleolina para ejercer sus efectos (Bates y otros, 1999; Miller y otros, 2000). La nucleolina (Bandman y otros, 1999) es una proteína abundante, no-ribosomal del nucleolo, el sitio de la transcripción génica ribosomal y envasado del ARN pre-ribosomal. Esta fosfoproteína de 707 aminoácidos tiene una estructura de multi-dominio consistente de un N-terminal tipo-histona, un dominio central que contiene cuatro motivos de reconocimiento de ARN y un C-terminal rico en glicina/arginina y tiene un peso molecular aparente de 110 kD. Su estructura de múltiples dominios refleja las funciones notablemente diversas de esta proteína multifacética (Ginisty y otros 1999; Srivastava y Pollard, 1999; Tuteja y Tuteja, 1998). La nucleolina se ha involucrado en muchos aspectos fundamentales de la proliferación y supervivencia celular. La mejor comprendida es el papel de la nucleolina en la biogénesis del ribosoma. Otras funciones pueden incluir el transporte nucleocitoplasmático, citocinesis, nucleogénesis y apoptosis. La nucleolina es una de las proteínas de la región organizadora nuclear (NOR) cuyos niveles, según medido por tinción de plata, se evalúan por patólogos como un marcador de la proliferación celular y un indicador de malignidad (Derenzini, 2000).

- 5 También estuvieron presentes en la membrana plasmática de la célula en algunos tipos de células, como los linfocitos y las células de los conductos de recogida medulares interiores, nucleolina ha planteado la hipótesis de funcionar como un receptor (*por ejemplo*, (Callebaut y otros, 1998; Sorokina y Kleinman, 1999). Sin embargo, no se comprende bien el papel de la nucleolina de membrana plasmática. Adicionalmente, no está claro si la nucleolina de membrana plasmática es idéntica a la proteína de núcleo, o si representa una isoforma diferente o proteína tipo-nucleolina. Sin embargo, la expresión de la nucleolina de membrana plasmática es específica de células neoplásicas (tales como malignas o premalignas); así no es necesario conocer la función de la nucleolina de membrana plasmática para la intervención terapéutica eficaz.
- 10 **Definiciones**
- neoplasia, malignidad, tumor, células cancerosas*
- 15 Una neoplasia es un crecimiento anormal del tejido resultante de las células neoplásicas, células proliferan más rápido y descontrolado que las células normales. Por lo general, las neoplasias parcial o total estructuralmente desorganizadas, carecen de coordinación funcional con el tejido normal correspondiente. Las neoplasias generalmente forman una masa de tejido distinta que puede ser benigna (tumor) o maligna (cáncer).
- 20 Las células cancerosas invaden los tejidos circundantes, pueden hacer metástasis hasta sitios distantes, y probablemente se repiten después de intentar su eliminación, causando la muerte de un sujeto si no se trata adecuadamente. Adicionalmente a la desorganización estructural, generalmente las células cancerosas regresan a los estados más primitivos o indiferenciados (anaplásico), aunque morfológica y bioquímicamente, aún pueden exhibir muchas de las funciones de las células de tipo salvaje correspondientes. Los carcinomas son cánceres derivados del epitelio; sarcomas se derivan de los tejidos conectivos. En algunos casos, los cánceres pueden no estar asociados con un tumor, pero al igual que el tejido afectado, se desactiva *por ejemplo*, leucemias.
- 25 Los cánceres pueden ser más agresivos o menos agresivos. El fenotipo agresivo de una célula de cáncer se refiere a la tasa de proliferación y la capacidad para formar tumores y hacer metástasis en ratones desnudos. Los cánceres agresivos proliferan más rápidamente, forman los tumores y hacen metástasis más fácilmente que los tumores menos agresivos.
- 30 Los tumores y cánceres incluyen, cambios en el tejido disproliferativo sólido y tumores difusos. En el sentido de que los cánceres y tumores son crecimientos anormales que tienen una proliferación descontrolada de las células que no sirven para una función fisiológica normal, los términos "tumor" y "cáncer" se utilizan indistintamente. Los ejemplos de tumores y cánceres incluyen melanoma, linfoma, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, leucemia, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, hepatoma, y otras neoplasias. Para más ejemplos de tumores y cánceres, véase, por ejemplo (Stedman, 2000).
- 35 "Células de estroma" son células accesorias que se encuentran dentro del tumor. Tales células pueden ser, por ejemplo, fibroblastos, células reticulares y células endoteliales, y desempeñan un papel de apoyo en el crecimiento del tumor, pero son células sanas. Las células del estroma y los fibroblastos por lo tanto son constituyentes del microambiente en el que las células tumorales invaden durante la metástasis.
- 40 *Estado neoplásico*
- 45 El término "estado neoplásico" se refiere a tres condiciones: normal, premalignas y malignas. "Normal" Se refiere a un crecimiento o célula que es clínicamente normal (sano) . "Pre-maligno" se refiere a un crecimiento o célula que está en la ruta hacia la malignidad, pero en el momento del examen no se puede clasificar como maligno por los métodos convencionales. "Maligno" se refiere a una célula o un crecimiento que, al menos, tiene una de las siguientes propiedades: crecimiento destructivo, localmente invasivo y metástasis.
- 50 *GROs y otros oligonucleótidos de unión al polipéptido*
- 55 Los oligonucleótidos que están disponibles se unen específicamente a polipéptidos, tales como las nucleolinas. Ejemplos de éstos son GROs, que son oligonucleótidos ricos en guanosina. Las características de GROs incluyen:
- 60 (1) presenta al menos 1 motivo GGT
 (2) preferentemente presenta de 4-100 nucleótidos, aunque GROs que tienen mucho más nucleótidos son posibles
 (3) presenta modificaciones químicas para mejorar la estabilidad.
- 65 GROs especialmente útiles forman estructuras en cuarteto-G, como se indica en un perfil de desnaturalización/renaturalización térmica reversible a 295 nm (Bates y otros, 1999). GROs preferidos compiten además con un oligonucleótido telómero por la unión a una proteína celular objetivo en un ensayo de cambio de movilidad electroforética (Bates y otros, 1999).

Otros oligonucleótidos pueden tener una alta especificidad de unión para la nucleolina .

agente anti-nucleolina

5 Un "agente anti-nucleolina" se une a la nucleolina. Los ejemplos incluyen anticuerpos anti-nucleolina y ciertos oligonucleótidos.

Definiciones basadas en ácido-nucleico

10 Un "gen estructural" o "gen" se refiere a una secuencia de ADN que se transcribe en ARN mensajero (ARNm) que se puede traducir en un polipéptido (un polipéptido consiste en por lo menos dos residuos de aminoácidos).

15 Un promotor es una secuencia de ADN que especifica el sitio de iniciación de la transcripción de ARN, la dirección de la transcripción, y la tasa de transcripción. Por esta razón, los promotores se localizan generalmente 5' del sitio de inicio (designado como +1) para la secuencia de ADN que codifica el ARN transcrito resultante. Los promotores pueden ser regulados o no regulados. Cuando un promotor es no-regulado, opera de forma constitutiva en un nivel particular de actividad basal. Cuando el promotor es regulado, la eficiencia del promotor se puede modular en respuesta a un agente. La transcripción del ARN se aumenta con respecto al nivel basal de transcripción bajo circunstancias en las que un agente regula positivamente la actividad del promotor; por el contrario, la transcripción del ARN se disminuye con respecto al nivel basal de transcripción bajo circunstancias en las que un agente regula negativamente la actividad del promotor. Los agentes que regulan positivamente la actividad del promotor se denominan activadores; mientras que los agentes que regulan negativamente la actividad promotora se denominan represores.

25 Un potenciador es un elemento de transcripción del ADN que puede aumentar la eficiencia de la actividad promotora. Como los promotores, los potenciadores se enlazan físicamente al gen afectado. Los potenciadores pueden ser también regulados o no regulados. Sin embargo, a diferencia de los promotores, los potenciadores no pueden especificar el sitio de inicio de la transcripción de ARN o la dirección de transcripción. Los potenciadores pueden estimular la expresión génica independiente de la orientación y localización del potenciador con respecto al sitio de inicio de la transcripción del ARN. Debido a que los potenciadores no especifican el inicio el sitio de la transcripción del ARN, los potenciadores pueden ejercer sus efectos encima de grandes distancias (diversos kilobases) con respecto a un gen particular.

35 La secuencia reguladora de ADN es típicamente un motivo corto de ADN que responde negativamente o positivamente a la actividad de un agente. La secuencia reguladora puede ser unidireccional o bidireccional. La secuencia reguladora puede ser parte de la organización modular ya sea de un promotor o un potenciador. En el contexto de un promotor, la secuencia reguladora modula ya sea la eficiencia del promotor y/o afecta a la selección de los sitios de iniciación de la transcripción del ARN. En el contexto de un potenciador, la secuencia reguladora modula la eficiencia de un potenciador.

40 Un "vector de clonación" es una molécula de ADN tal como un plásmido, cósmido, o bacteriófago que tiene la capacidad de replicarse en una célula. Los vectores de clonación contienen típicamente los sitios de restricción de reconocimiento de la endonucleasa que permiten la introducción de cambios y adiciones de fragmentos de ADN. Los vectores de clonación típicamente incluyen también los promotores que permiten la expresión eficaz y marcadores seleccionables que confieren resistencia a los compuestos tales como ampicilina o tetraciclina.

45 Un "vector de expresión" es un polinucleótido que comprende una secuencia codificante (tal como un gen) que se elabora para que se exprese por la célula huésped. Los vectores de expresión contienen típicamente promotores, potenciadores y elementos reguladores específicos de tejido que están operativamente enlazados con el gen expresado o fragmento de ADN.

50 El término "isoforma" se refiere a los polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos o modificaciones post-traduccionales (tales como glicosilación o eventos de procesamiento proteolíticos). Las isoformas se usan también para referirse a los polipéptidos que se derivan de un gen común que resultan del empalme alternativo.

Definiciones asociadas a la terapia

60 "Agente citotóxico" se refiere a una sustancia que inhibe o previene al menos una función de la célula, o causa la destrucción de una célula. Los isótopos radioactivos (*por ejemplo*, ²¹¹At, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P e isótopos radioactivos de Lu), y agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña, o toxinas de bacterias, hongos, plantas o animales son ejemplos de tales agentes.

65 "La terapia de radiación" y "radioterapia" se refiere a la utilización de dosis de radiación de haz externo administradas localmente para efectuar la muerte de una célula tumoral o cáncer.

- 5 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico que puede ser utilizado con eficacia para tratar una célula de cáncer. Los ejemplos de fármacos y agentes de oncología de uso general incluyen vinorelbina (Navelbine®), mitomicina, camptotecina, ciclofosfamida (Cytosin®), metotrexato, citrato de tamoxifeno, 5-fluorouracil, irinotecan, doxorubicina, flutamida, paclitaxel (Taxol®), docetaxel, vinblastina, mesilato de imatinib (Gleevec®), antraciclina, letrozol, trióxido de arsénico (Trisenox®), anastrozol, pamoato de triptorelin, ozogamicina, clorhidrato de irinotecan (Camptosar®), BCG, live (Pacis®), implante de acetato leuprolida (Viadur), bexaroteno (Targretin®), exemestano (Aromasin®), clorhidrato de topotecan (Hycamtin®), gemcitabina HCL (Gemzar®), clorhidrato de daunorubicina (Daunorubicin HCL®), gemcitabina HCL (Gemzar®), citrato de toremifeno (Fareston), carboplatino (Paraplatin®), cisplatino (Platinol® y Platinol-AQ®) oxaliplatino y cualquier otro fármaco para oncología que contiene platino.
- 10 "Medicamento", "composición terapéutica" y "composición farmacéutica" se usan indistintamente para indicar un compuesto, materia, mezcla o preparación que ejerce un efecto terapéutico en un sujeto.
- 15 "Anticuerpos terapéuticos aprobados" incluyen rituximab (Rituxan®), gemtuzumab (Mylotarg®), alemtuzumab (Campath®) y trastuzumab (Herceptin®).
- "Anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y se refiere a los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, fragmentos de anticuerpos y derivados.
- 20 Un "anticuerpo artificial" es un agente de unión que tiene dominios de unión al polipéptido conectados a las estructuras de los polipéptidos (Irving y otros, 2001; Koide, 2002).
- Un "fármaco de anticuerpo conjugado" se refiere a un agente terapéutico que incluye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugado con una porción que es un agente citotóxico.
- 25 Una "proteína de fusión al anticuerpo" se refiere a una molécula recombinante que comprende uno o más componentes del anticuerpo y un agente terapéutico tal como una citocina, enzima o un agente citotóxico.
- 30 El término "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo entero, intacto, tal como un anticuerpo monoclonal, monoclonal o policlonal recombinante que ni se fusiona ni se conjuga a una enzima, agente citotóxico o agente quimioterapéutico.
- 35 Un "anticuerpo contra nucleolina" o "anticuerpo anti-nucleolina" es un anticuerpo, fármaco de anticuerpo conjugado, proteína de fusión de anticuerpo, anticuerpo desnudo o anticuerpo artificial que se une a los polipéptidos de la nucleolina.
- 40 "Oligonucleótidos anti-sentido," "oligo," "ácido oligo nucleico," "anti-sentido," o "polinucleótido anti-sentido" son fármacos específicos de secuencia capaces de modificar o silenciar selectivamente la expresión de genes, causando un efecto terapéutico deseado.
- 45 El término "ARN de interferencia," "iARN," "ARN de interferencia corta" o "ARN de interferencia bicatenario" se refiere ya sea a las moléculas de ácidos ribonucleicos libres o las generados *in vivo* por medio de sistemas de expresión de genes. Tales moléculas de ARN de interferencia son capaces de alterar la expresión de un gen objetivo.
- 50 "Tratar un tumor" o "tratar un cáncer" significa inhibir significativamente el crecimiento y/o metástasis del tumor/cáncer. La inhibición del crecimiento se puede indicar por el volumen de tumor reducido o eventos de metástasis reducidas. El crecimiento del tumor se puede determinar, *por ejemplo*, mediante el examen del volumen tumoral a través de los procedimientos de rutina (tal como la obtención de mediciones bidimensionales con un calibrador de línea). La metástasis se puede determinar mediante la inspección de células tumorales en sitios secundarios o el análisis del potencial metastásico de las biopsias de células tumorales *in vitro* usando técnicas bien conocidas.
- 55 Un "agente anti-nucleolina" incluye cualquier molécula, compuesto *etc.*, que interactúa con la nucleolina. Tales agentes incluyen los anticuerpos anti-nucleolina y derivados de los mismos, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, iARN, *etc.*
- 60 Los ejemplos a continuación describen diversas maneras de practicar la invención. Muchas maneras diferentes de practicar la invención son posibles también.
- 65 En todos los casos, el principio subyacente es enfocar las células de la invención terapéutica mediante la diferenciación específica entre nucleolina de membrana plasmática y nucleolina nuclear. La nucleolina de membrana plasmática, según descubierta por los solicitantes, se correlaciona con células que están en el estado neoplásico. Usando esta expresión diferencial de la membrana plasmática, las células tumorales y cancerosas pueden dirigirse hacia el tratamiento.

Detección de la nucleolina de membrana plasmática

5 Diversas técnicas permiten a un usuario diferenciar entre la nucleolina nuclear y de membrana plasmática. Son útiles también las técnicas de detección, en donde los reactivos que detectan la nucleolina tienen acceso exclusivo a las porciones extracelulares de la célula (y por consiguiente a la nucleolina de membrana plasmática celular), o las técnicas bioquímicas, en donde, ya sea la membrana plasmática superficial o proteínas superficiales se separan de otros componentes y compartimentos celulares. Una práctica de la invención puede desear que se determine la posible eficacia de una terapia dirigida a nucleolina examinando primero las células para la expresión de la nucleolina de membrana plasmática.

10 En un caso, la nucleolina se detecta directamente en la superficie celular. Una célula se aísla de un sujeto y la nucleolina de membrana plasmática se detecta usando un agente que se une a la nucleolina. Las células se pueden aislar mediante cualquier técnica conocida. Una célula aislada puede comprender una muestra de tejido más grande que contiene células no son neoplásicas. Los procedimientos de detección usan anticuerpos anti-nucleolina que unen los epítomos de la nucleolina extracelular; estos anticuerpos se pueden marcar directamente o detectar indirectamente cuando se unen. Otros agentes útiles para la detección de la nucleolina de membrana plasmática incluyen GROs que se unen específicamente a la nucleolina. Los procedimientos útiles, tales como clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o inmunofluorescencia, emplean marcadores fluorescentes, mientras que otras técnicas citológicas, tales como histoquímica, inmunohistoquímica y otras técnicas microscópicas (microscopía electrónica (EM), inmuno-EM) usan otros marcadores diversos, ya sea colorimétricos o radiactivos. Los diversos reactivos pueden ser ensamblados en kits.

25 En otro caso, las células se aíslan de un sujeto y se extraen. Las membranas y/o proteínas plasmáticas se aíslan después (tales como a través de extracción diferencial, o ruptura celular física diferencial, centrifugación diferencial de células extraídas con detergentes, etc.), y después la nucleolina detectada en las membranas aisladas usando un agente que se une a la nucleolina. Generalmente, las técnicas útiles para detectar la nucleolina incluyen aquellas en donde el extracto se coloca sobre un sustrato, y el sustrato se prueba con un reactivo de detección de nucleolina. Ejemplos de tales técnicas incluyen la membrana de transferencia puntual y transferencia de tipo Western de polipéptidos, biochips, matrices de proteínas etc. Otros formatos de detección incluyen los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) en sus múltiples manifestaciones (Ausubel y otros, 1987). En modalidades en donde las moléculas superficiales de la membrana plasmática se separan físicamente de la mayoría de los otros componentes y compartimentos celulares, los agentes de unión a la nucleolina no necesitan reconocer específicamente ninguna porción extracelular de la nucleolina. Los diversos reactivos pueden ser ensamblados en kits.

35 También se describen métodos de detección de cáncer de pulmón, tales como carcinomas de células pequeñas de pulmón. La expresión de la nucleolina de membrana plasmática es útil para la detección y pronóstico.

40 Se describe además un método para la identificación de un sujeto para el cual una cierta terapia, tal como la quimioterapia dirigida a la nucleolina, se indica para el tratamiento o la mejoría de una afección asociada con un abundante aumento de la nucleolina en la superficie celular. Tal afección incluye el cáncer, neoplasia y una lesión precancerosa. Tal método puede incluir las etapas de contactar un agente que une específicamente a la nucleolina con una célula en o del sujeto y determinar la cantidad de unión de la nucleolina de membrana plasmática.

45 En otro caso, individuo que se presentó, en el pasado, con cáncer se presenta ante un profesional de la salud para un examen. Una muestra que tiene una célula, tal como una muestra de biopsia, se toma del cuerpo del individuo, con lo cual la muestra se contacta con un anticuerpo anti-nucleolina, incuba, y el anticuerpo unido se detecta después. La cantidad de anticuerpo unido se puede comparar con la cantidad unida por las células sanas aisladas de la misma persona. Un régimen de tratamiento se puede idear después, basado en la cantidad de nucleolina de la superficie celular por célula tomada de cuerpo del individuo y una correlación conocida entre la nucleolina de la superficie celular y la sensibilidad del cáncer a una terapia determinada, tal como quimioterapia orientada a la nucleolina.

Tratamiento de las células del tumor/cáncer orientada a la nucleolina

55 En la presente se proporcionan descritos los métodos para tratar las células en un estado neoplásico incluyendo células cancerosas y tumorales; estos métodos explotan la nucleolina de membrana plasmática que actúa como un faro para un agente terapéutico. Por ejemplo, la administración de anticuerpos anti-nucleolina, que se pueden conjugar con una toxina u otros medios para estimular la muerte celular o incurrir en necrosis, resulta en la eliminación de las células que expresan la nucleolina de membrana plasmática

60 Práctica de la invención

La siguiente, no pretende limitar la invención, se presenta para auxiliar al médico en la realización de la invención, aunque otros métodos, técnicas, células, reactivos y enfoques se pueden usar para lograr la invención.

Células

Las células o muestras de tejidos se recogen de un sujeto. El sujeto es un vertebrado, con mayor preferencia un mamífero, tal como un mono, perro, gato, conejo, vaca, cerdo, cabra, oveja, caballo, rata, ratón, conejillo de indias, etc.; y con la máxima preferencia un humano. Cualquier técnica para recolectar las células deseadas se puede emplear, incluyendo biopsia, cirugía, raspado (interior de la mejilla, piel, etc.) y la extracción de sangre. Toda herramienta apropiada puede usarse para llevar a cabo tales tareas. No es necesario aislar la población de prueba (es decir., las células que se están probando para el estado neoplásico) de las células y tejidos de (material contaminante) que no están siendo probados, excepto en algunos casos usando métodos bioquímicos que incluyen extracción. En este último caso, la población de prueba no necesita estar completamente aislada de los materiales contaminantes, sino que debe predominar o estar fácilmente distinguible (*por ejemplo*, morfológicamente (marcadores estructuralmente específicos) o bioquímicamente).

Para aquellos métodos que analizan carcinomas de pulmón, la recolección de esputo es una muestra atractiva y fácil de obtener. El término "esputo" como se usa en la presente descripción se refiere a la materia expectorada compuesta de saliva y secreciones de las vías respiratorias. El esputo es un material altamente complejo que tiene una estructura pronunciada tipo-gel.

Para la recolección de esputo, Byrne, y otros, (Byrne, 1986) sugieren que el paciente recolecte el material, acumulado por varias toses profundas, en un contenedor con tapa. Alternativamente, el esputo se puede recolectar usando un broncoscopio (Kim y otros, 1982). Dispositivos o agentes específicos pueden usarse para facilitar la recolección del esputo (Babkes y otros, 2001; King y Speert, 2002; Rubin y Newhouse, 1999). Otros métodos de recolección de esputo también están disponibles.

Cultivo de células

En algunos casos, el cultivo de las células recogidas es deseable para aumentar sus números tal que se facilita la detección de la nucleolina de membrana plasmática. Medios y condiciones adecuadas para la generación de cultivos primarios adecuados son bien conocidos. La selección de los medios y condiciones de cultivo varía dependiendo del tipo de célula y se puede determinar empíricamente. Por ejemplo, células de músculo esquelético, hueso, neuronas, piel, hígado y madre embrionarias se cultivan en medios que difieren en sus contenidos específicos. Además, los medios para cada tipo de célula puede diferir significativamente de un laboratorio a otro y de institución a institución. Para mantener las células en división, el suero, tal como suero fetal de ternero (FCS) (conocido además como suero fetal bovino (FBS)), se añade al medio en cantidades relativamente grandes, 5%-30 % en volumen, en dependencia del tipo de célula o tejido. Otros sueros incluyen suero de ternero recién nacido (NCS), suero de ternera bovina (BCS), suero bovino adulto (ABS), suero de caballo (HS), sueros de humano, pollo, cabra, porcino, conejo y oveja. Los sustitutos del suero se pueden usar también, tal como suero de proceso controlado tipo-sustitución (CPSR; 1 o 3) o fluido embrionario bovino. Los factores de crecimiento específicos purificados o cócteles de múltiples factores de crecimiento se pueden agregar también o, a veces, sustituirlos por suero. Los factores u hormonas específicas que promueven la supervivencia o proliferación celular se pueden usar también.

Los ejemplos de medios de cultivo adecuados incluyen medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio Eagle esencial mínimo (MEM), medio Eagle Basal (BME), medio de Click, medio Leibovitz L-15, medio 5A de McCoy, medio esencial mínimo de Glasgow (GMEM), medio NCTC 109, medio E de Williams, RPMI-1640, y medio 199. Un medio desarrollado específicamente para un tipo de célula/línea o función celular en particular, *por ejemplo*. Se conocen también el medio de crecimiento de riñón bovino Madin-Darby, medio de mantenimiento de riñón bovino Madin-Darby, diversos medios de hibridomas, medio basal endotelial, medio basal para fibroblastos, medio basal para queratocitos, y medio basal para melanocitos. Si se desea, se puede usar una proteína libre o reducida y/o medio libre de suero y/o químicamente definido, medio libre de componente animal se puede usar, *por ejemplo*, CHO, medio de terapia génica o medio libre de suero QBSF (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO), mezcla nutriente DMEM F-12 Ham, MCDB (105, 110, 131, 151, 153, 201 y 302), NCTC 135, Ultra DOMA PF o HL-1 (ambas de Biowhittaker; Walkersville, MD).

El medio puede estar suplementado con una variedad de factores de crecimiento, citocinas, suero, etc., dependiendo de las células a cultivarse. Ejemplos de factores de crecimiento adecuados incluyen: factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF α y TGF β), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento tipo-insulina (IGF), insulina, eritropoyetina (EPO), y factor estimulante de colonias (CSF). Ejemplos de aditivos hormonales adecuados están estrógeno, progesterona, testosterona o glucocorticoides tal como dexametasona. Ejemplos de aditivos de medio de citocinas están interferones, interleucinas o factor- α de necrosis tumoral (TNF α). Las soluciones salinas, se pueden añadir también a los medios, incluyendo la solución de Alsever, solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (DPBS), solución salina equilibrada de Earle, solución salina equilibrada de Gey (GBSS), solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), Salina A de Puck, y solución salina de Tyrode. Si es necesario, los aditivos y componentes de cultivo en diferentes condiciones de cultivo se pueden optimizar, ya que estos pueden alterar la respuesta celular, curso de la actividad u otras características que afectan la bioactividad. Adicionalmente, la superficie en las que se

cultivan las células puede recubrirse con una variedad de sustratos que contribuyen a la supervivencia, el crecimiento y/o diferenciación de las células. Estos sustratos incluyen pero sin limitarse a, laminina, matriz-EHS, colágenos, poli-L-lisina, poli-D-lisina, poliornitina y fibronectina. Cuando se desean cultivos tridimensionales, los geles de matriz extracelular se pueden usar, tales como colágeno, matriz-EHS, o gelatina (colágeno desnaturalizado). Las células se pueden cultivar en la parte superior de tales matrices, o pueden moldear dentro de los mismos geles.

Si se desea, los medios pueden completarse además con reactivos que limitan la acidosis de los cultivos, tales como adición de tampón al medio (tal como ácido N,N-bis(2-hidroxietilo)-2-aminoetanosulfónico (BES), bis(2-hidroxietilo)amino-tris(hidroximetilo)metano (BIS-Tris), ácido N-(20hidroxietil)piperazina-N'3-propanesulfónico (EPPS o HEPPS), glicilicina, ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)propano, sulfónico (MOPS), piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etano-sulfónico) (PIPES), bicarbonato sódico, ácido 3-(N-tris(hidroximetilo)-metilo-amino)-2-hidroxi-propanosulfónico) TAPSO, ácido (N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico (TES), N-tris(hidroximetilo)metilo-glicina (Tricina), tris(hidroximetilo)-aminometano (Tris), etc.). Cambios frecuentes de medio y cambios en la concentración del CO₂ suministrado (con frecuencia aproximadamente 5%) pueden usarse también para controlar la acidosis.

Típicamente los gases para el cultivo son el dióxido de carbono de aproximadamente 5% y el resto nitrógeno, pero opcionalmente pueden contener diferentes cantidades de óxido nítrico (comenzando tan bajo como 3 ppm), monóxido de carbono y otros gases, tanto inertes como biológicamente activos. Las concentraciones de dióxido de carbono típicamente se encuentran en el intervalo de alrededor de 5%, pero puede variar entre 2-10%. Tanto el óxido nítrico como el monóxido de carbono, si necesario, se administran típicamente en cantidades muy pequeñas (es decir. en el intervalo de ppm), determinadas empíricamente o a partir de la literatura. La temperatura a la que las células crecerán de manera óptima se puede determinar empíricamente, aunque la temperatura del cultivo generalmente será entre el intervalo fisiológico normal del animal cuyas células se aislaron.

Detección de nucleolina: métodos basados en anticuerpos

Anticuerpos

La nucleolina puede detectarse a nivel de proteínas en las células, secciones de tejido, células cultivadas y extractos de los mismos. Los métodos inmunoquímicos para detectar la expresión de proteínas se conocen bien e incluyen, pero sin limitarse a, transferencia de tipo Western, purificación por inmovinoafinidad, inmunoprecipitación, ensayo inmunoenzimático (ELISA), transferencia puntual o por ranuras, radioinmunoensayo (RIA), detección inmunohistoquímica, tinción inmunocitoquímica y citometría de flujo. Los procedimientos e instrucciones comunes usando anticuerpos se abordaron bien (*por ejemplo*, (Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999). Los anticuerpos seleccionados que son útiles para detectar la nucleolina de membrana plasmática se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Anticuerpos anti-nucleolina

Anticuerpo	Fuente	Fuente del antígeno	NOTAS
anticuerpo (mAb) monoclonal de ratón p7-1A4	Banco de Estudios de Desarrollo de Hibridoma (Universidad de Iowa; Ames, IA)	oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	IgG ₁
mAb de ratón sc-8031	Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, California)	Humano	IgG ₁
policlonal Ab (pAb) de cabra sc-9893	Santa Cruz Biotech	Humano	IgG
pAb de cabra sc-9892	Santa Cruz Biotech	Humano	IgG
mAb de ratón clon 4E2	MBL International (Watertown, MA)	Humano	IgG ₁
mAb de ratón clon 3G4B2	Upstate Biotechnology (Lago Plácido, NY)	perro (células MDCK)	IgG _{1k}

Si se desean anticuerpos anti-nucleolina de membrana plasmática adicionales, se pueden producir usando métodos bien conocidos (Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999). Por ejemplo, los anticuerpos policlonales (pAbs) se pueden originar en el huésped mamífero por una o más inyecciones de un inmunógeno, tal como un dominio extracelular de la nucleolina expresada en la superficie, y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el inmunógeno (y adyuvante) se inyecta en el mamífero con una inyección vía subcutánea o intraperitoneal. El inmunógeno puede incluir componentes tales como polipéptidos (aislados, no aislados, de producidos por vía recombinante), células o fracciones celulares. Ejemplos de adyuvantes incluyen completo de Freund, monofosforil lípido A sintético-dicorinomicolato de trehalosa, hidróxido de aluminio (alumbre), proteínas de choque térmico HSP 70 o HSP96 (WO01/917871A1), emulsión de escualeno que contienen monofosforil lípido A (LaPosta y Eldrige, 2001), macroglobulina α₂ y sustancias superficiales activas, incluyendo emulsiones de aceite, polioles pleurónicos, polianiones y dinitrofenol Para mejorar la respuesta inmune, un inmunógeno se puede conjugara un polipéptido que es inmunogénico en el huésped, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica, tiroglobulina bovina, toxina colérica, enterotoxina lábil, o inhibidor de tripsina de soja. Alternativamente, pAbs se pueden fabricar en pollos, produciendo moléculas de IgY (Schade y otros, 1996).

5 Los anticuerpos monoclonales (mAbs) también se pueden fabricar mediante la inmunización del huésped o los linfocitos del huésped, cosecha de los linfocitos que secretan (o potencialmente secretan) mAb, fusión de los linfocitos con células inmortalizadas (*por ejemplo*, células de mieloma), y selección de las células secretan el mAb deseado (Goding, 1996; Kohler y Milstein, 1975). Otras técnicas se pueden usar, tal como la técnica del hibridoma de EBV (Cole y otros, 1985; Coligan, 1996). Las técnicas para la generación de anticuerpos quiméricos mediante el empalme de genes que codifican los dominios variables de los anticuerpos no-humanos con genes de los dominios constantes de la inmunoglobulina humana resultan en "anticuerpos quiméricos" que son sustancialmente humanos a nivel de aminoácidos (Neuberger, Williams y otros 1984; Morrison, Johnson y otros 1984). Si se desea, los mAb se pueden purificar del medio de cultivo o fluido ascítico mediante procedimientos convencionales, tales como proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, precipitación con sulfato de amonio o cromatografía de afinidad (Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999). Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse mediante la inmunización de ratones transgénicos que contienen una tercera copia del loci-trans de IgG humana y el loci endógeno silenciado de Ig de ratón (Surani y otros, 1996) o usando ratones transgénicos-humanos (Jakobovits y otros, 1998; Lonberg y Kay, 1998). La producción de anticuerpos monoclonales humanizados y fragmentos de los mismos se puede generar también a través de las tecnologías de presentación de fago (Winter, Griffiths y otros 1994).

20 Un ejemplo de la producción de un anticuerpo monoclonal murino para la nucleolina humana de acuerdo con las técnicas descritas (Kohler y Milstein, 1975) es como sigue. Ratones BALB/c hembras (20-25 g) se inyectan por vía intraperitoneal con 100 µg de antígeno que contiene el polipéptido de la nucleolina humana, o porción del mismo. Alternativamente, el antígeno incluye las células murinas que se transformaron para expresar la nucleolina humana. Después de 2 semanas, se inyecta una segunda inyección que tiene 50 µg de antígeno. Para probar la producción de anticuerpos anti-nucleolina, los sueros a partir de los ratones se usan en el tamizaje inmunohistológico. Los ratones que muestran altos niveles en suero sanguíneo del anticuerpo anti-nucleolina reciben la tercera inyección (20 µg) de antígeno. Cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican, sus células del bazo se aíslan y fusionan con una línea de mieloma, *por ejemplo*, P3X63Ag8.653 (Colección Americana de Cultivo de Tejido; Manassas, VA). Las células del hibridoma resultante se cultiva, sub-clona y selecciona para la expresión de anticuerpos que tienen altas afinidades por la nucleolina.

30 Los anticuerpos policlonales humanizados o de tipo-humano no inmunogénicos que se unen a la nucleolina se pueden producir también. Estos anticuerpos policlonales se pueden fabricar, por ejemplo, usando métodos de presentación en fagos (Sharon, 1995), o por la inmunización de animales transgénicos o genéticamente modificados capaces de producir anticuerpos policlonales humanos (Singh y Dias, 2002).

35 Anticuerpos adecuados para terapia

40 Los anticuerpos más ideales para su uso como agentes terapéuticos son aquellos que son no-inmunogénicos cuando se administran a los sujetos. Tales anticuerpos tienen la ventaja de ejercer efectos secundarios mínimos, teniendo larga vida media biológica y de suero, con amplia bio-distribución, teniendo alta especificidad de objetivo y una alta actividad en el acoplamiento de la fase efectora del sistema inmunitario. Estos anticuerpos, cuando se destinan a los seres humanos, se conocen comúnmente como anticuerpos "humanizados," "humano," "quimérico," o "primatizados"; estos se componen sustancialmente (>70%) de las secuencias de aminoácidos humanos.

45 Detección

Un enfoque usando anticuerpos para detectar la presencia de un antígeno incluirá uno o más, sino todas, de las siguientes etapas:

- 50 (1) Preparación de la entidad que se prueba para la nucleolina de membrana plasmática lavando con agua o tampón
- (2) Bloqueo de los sitios de unión no-específicos del anticuerpo
- (3) Aplicación del anticuerpo (*por ejemplo*, anti-nucleolina)
- 55 (4) Detección del anticuerpo unido, ya sea a través de un anticuerpo secundario de marcaje detectable que reconoce el anticuerpo primario o un marcador detectable enlazado directamente a, o asociado con, el anticuerpo unido (anti-nucleolina).

60 Los sustratos se pueden lavar con cualquier solución que no interfiera con la estructura del epítipo. Los tampones comunes incluyen solución salina y tampones biológicos, tales como bicina, tricina, y Tris.

Sitios de unión no-específicos se bloquean aplicando una solución de proteína, tal como albúmina sérica bovina (BSA; desnaturalizada o nativa), proteínas de la leche, o en los casos en donde el reactivo de detección es un anticuerpo secundario, suero normal o inmunoglobulinas de un animal huésped no-inmunizado cuya especie es del mismo origen que el anticuerpo de detección. Por ejemplo, un procedimiento usando un anticuerpo secundario fabricado en cabras puede emplear el suero normal de cabra (NGS).

El sustrato se hace reaccionar con el anticuerpo de interés. El anticuerpo puede aplicarse en cualquier forma, tal como fragmentos F_{ab} y derivados de los mismos, anticuerpo purificado (por afinidad, precipitación, etc.), sobrenadante de cultivos de hibridoma, ascitis, suero o anticuerpos recombinantes expresados en células recombinantes. El anticuerpo se puede diluir en tampón o medios, frecuentemente con una proteína portadora tal como la solución usada para bloquear los sitios de unión no-específica; la concentración de anticuerpo útil se determina generalmente de forma empírica. Generalmente, sueros policlonales, anticuerpos y ascitis purificadas se pueden diluir 1:50 a 1:200,000, más frecuentemente, 1:200 a 1:500. Los sobrenadantes de hibridoma pueden diluirse 1:0 a 1:10, o se pueden concentrar por diálisis o precipitación con sulfato de amonio (o cualquier otro método que retiene los anticuerpos de interés pero al menos elimina parcialmente el componente líquido y preferentemente otras moléculas pequeñas, tales como sales) y diluir si es necesario. La incubación con los anticuerpos se puede llevar a cabo por tan poco como 20 minutos a 37° C, de 2 a 6 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 22° C), u 8 o más horas a 4° C.

Para detectar un complejo antígeno-anticuerpo, se puede usar el marcador. El marcador se puede acoplar al anticuerpo de unión, o en un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo, y se incuba con la muestra tras la incubación del anticuerpo primario y a través del lavado. Los marcadores adecuados incluyen porciones fluorescentes, tales como isotiocianato de fluoresceína; diclorotriazina de fluoresceína y análogos fluorados de fluoresceína; ácido carboxílico de naftofluoresceína y su éster succinimidilo; carboxirodamina 6G; derivados del piridiloxazol; Cy2, 3 y 5; ficoeritrina; especies fluorescentes de ésteres de succinimidilo, ácidos carboxílicos, isotiocianatos, cloruros de sulfonilo, y cloruros de dansilo, incluyendo ésteres de succinimidilo del ácido propiónico, y ésteres de succinimidilo del ácido pentoico; ésteres de succinimidilo de carboxitetrametilrodamina; éster de succinimidilo de rodamina roja X; cloruro de sulfonilo de Rojo Texas; éster succinimidilo de Rojo Texas-X; éster de tetrafluorofenol sódico de Rojo Texas-X; Rojo- X; colorantes Rojo Texas; tetrametilrodamina; lisamina rodamina B; tetrametilrodamina; isotiocianato de tetrametilrodamina; naftofluoresceínas; derivados de la cumarina; pirenos; derivados del piridiloxazol; colorantes dapoxyl; colorantes de cascada azul y amarillo; isotiocianatos benzofurano; tetrafluorofenoles sódicos; 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno. Los marcadores adecuados incluyen además porciones enzimáticas, tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante; porciones radiactivas, incluyendo marcadores- ^{35}S y ^{135}I ; sistemas de detección basados en biotina-avidina (o estreptavidina) (frecuentemente acoplado con sistemas de señal enzimática u oro); y partículas de oro. En el caso de los sistemas de detección basados en enzimáticos, la enzima se hace reaccionar con un sustrato apropiado, tal como 3, 3'-diaminobencidina (DAB) para peroxidasa de rábano picante; preferentemente, los productos de reacción son insolubles. Las muestras marcadas con oro, si no se preparan para análisis ultraestructurales, se pueden hacer reaccionar químicamente para mejorar la señal del oro; este enfoque es especialmente deseable para microscopía de luz. La elección del marcador depende de la aplicación, la resolución deseada y los métodos de observación deseados. Para los marcadores fluorescentes, el fluoróforo se excita con la longitud de onda adecuada y la muestra se observa usando un microscopio, el microscopio confocal, o dispositivo FACS. En el caso del marcado radiactivo, las muestras se ponen en contacto con la película de autorradiografía, y la película se revela; alternativamente, la autorradiografía también puede realizarse con enfoques ultraestructurales. Alternativamente, la radioactividad se puede cuantificar usando un contador de centelleo.

También se describen métodos para la detección de un tumor en un individuo *in vivo*. Al individuo se le administra una composición farmacéuticamente aceptable que tiene un agente que se une a la nucleolina de la superficie celular. El agente incorpora también el marcador detectable, tal como un radiomarcador, cuya distribución en el cuerpo del sujeto se mapea después. El agente puede comprender un aptámero, un oligonucleótido, un péptido, una molécula pequeña, o una macromolécula, tal como un anticuerpo.

En un ejemplo del método, una composición que se une específicamente a la nucleolina de la superficie celular del tumor está radiomarcada. La naturaleza del radiomarcador se determina por el dispositivo que se usa para registrar la presencia y distribución del agente en el cuerpo del paciente. Por ejemplo, si se usa la radio-imagen estándar con cámara de rayos gamma, cualquier uno de varios radioisótopos se usa, tales como tecnecio-99 o indio-111. Alternativamente, si se usa la tomografía por emisión de positrones (PET), entonces el radiomarcador es un halógeno radioactivo, tal como flúor-18. El paciente se inyecta por vía intravenosa con el agente de radiomarcado, y las imágenes del paciente, para visualizar la localización del agente, se realizan durante un periodo de las siguientes 12 horas, a las, por ejemplo, 1, 4, y 12 horas después de la inyección. Las técnicas de monitoreo incluyen la exploración del cuerpo entero, SPECT (que permite visualizar las secciones transversales del cuerpo), y cualquier técnica permite el monitoreo de emisión.

Enfoques citológicos:

Inmunofluorescencia/inmunohistoquímica

La expresión de proteínas por las células o tejido se puede determinar por inmunolocalización de un antígeno. Generalmente, las células o tejido se conservan por fijación, se exponen a un anticuerpo que reconoce el epítipo de interés, tal como una nucleolina, y se visualiza el anticuerpo unido.

Cualquier célula, línea celular, tejido, o aun un organismo completo es adecuado para la fijación. Las células se

pueden cultivar *in vitro* como cultivos primarios, líneas celulares, o se cosechan a partir de tejido y separan mecánicamente o enzimáticamente. El tejido puede ser de cualquier órgano, planta o animal, y se puede cosechar después o antes de la fijación. La fijación, si se desea, puede ser por cualquier método conocido; los requisitos son que la proteína que se detecta no se deje irreconocible por el agente de unión, más frecuentemente un anticuerpo.

5 Fijadores adecuados incluyen paraformaldehído-lisina-peryodato, formalina, paraformaldehído, metanol, ácido acético-metanol, glutaraldehído, acetona, fijador de Karnovsky, *etc.* La selección del fijador depende de variables tales como la proteína de interés, las propiedades de un reactivo de detección particular (tal como un anticuerpo), el método de detección (fluorescencia, enzimático) y el método de observación (microscopía de epifluorescencia, microscopía confocal, microscopía de luz, microscopía electrónica *etc.*). La muestra se lava primero por lo general,

10 más frecuentemente con un tampón biológico, antes de la fijación. Los agentes de fijación se preparan en solución o en tampones biológicos; muchos fijadores se preparan inmediatamente antes de aplicar a la muestra. Los tampones biológicos adecuados incluyen solución salina (*por ejemplo*, solución salina regulada con fosfato), ácido N-(carbamoilmetil)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido N-2-acetoamido-2-iminodiacético (ADA), bicina, bis-tris, ácido 3-ciclohexilamino-2-hidroxi-1-propanosulfónico (CAPSO), etanolaminas, glicina, ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico (MES), ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico (MOPS), ácido 3-N-morfolino-2-hidroxi-propanosulfónico (MOPSO), piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), tricina, trietanolamina, *etc.* Un tampón adecuado se selecciona de acuerdo con la muestra que se analiza, pH adecuado, y los requisitos del método de detección. Un tampón útil es la solución salina regulada con fosfato (PBS).

20 Después de la fijación, la muestra se puede almacenar en el fijador, preferentemente fresca, o temporalmente o indefinidamente, a una temperatura entre aproximadamente 4 °C a aproximadamente 22 °C.

Después de la fijación de 5 minutos a 1 semana, dependiendo del tamaño de la muestra, espesor de la muestra, y viscosidad del fijador, la muestra se lava en el tampón. Si la muestra es gruesa o se desean secciones, la muestra se puede embeber en una matriz adecuada. Para el crioseccionamiento, la sacarosa se infunde, y embebe en una

25 matriz, tal como OCT Tissue Tek (Andwin Scientific; Canoga Park, California) o gelatina. Las muestras se pueden embeber además en cera de parafina, o resinas adecuadas para microscopía electrónica, tal como basadas en epóxido (Araldite, Polybed 812, Durcupan ACM, Quetol, Spurr's o mezclas de estos; Polysciences, Warrington, Pensilvania), acrilatos (Resinas de Londres (LR blanc, LR oro), Lowicryls; UNICRY ; Polysciences), metilacrilatos (JB-4, OsteoBed; Polysciences), melamina (Nanoplast; Polysciences) y otros medios tal como DGD, Immuno-Bed (Polysciences) y después se polimerizan. Las resinas que son especialmente adecuadas incluyen hidrofílica (tal como Lowicryls, resinas de Londres, Durcupan soluble en agua, *etc.*), ya que son menos propensas a desnaturalizar la proteína de interés durante la polimerización y no repelerán las soluciones de anticuerpos. Cuando se embeben en cera o resina, las muestras se deshidratan pasando a través de ellos una serie de concentraciones de etanol o metanol; en algunos casos, otros disolventes se pueden usar, tal como, óxido de polipropileno. La inclusión puede

30 ocurrir después que la muestra se ha hecho reaccionar con los agentes de detección, o las muestras se pueden primero embeber, seccionar (a través de micrótopo, cirótomo o ultramicrótopo) y después las secciones reaccionan con los reactivos de detección. En algunos casos, los materiales de inclusión se pueden eliminar parcialmente o totalmente antes de la detección para facilitar el acceso de los antígenos.

40 En algunos casos, el (los) epítipo (s) de nucleolina al que el anticuerpo se une se puede (n) volver no disponible debido a la fijación. Los métodos de recuperación del antígeno se pueden usar para hacer disponible el antígeno para la unión del anticuerpo. Muchos recursos están disponibles (revisado en, por ejemplo, (McNicol y Richmond, 1998; Robinson y Vandre, 2001; Shi y *otros*, 2001)). Los métodos comunes incluyen usar el calor suministrado de autoclaves, microondas, agua o tampones calientes, ollas a presión, u otras fuentes de calor. Frecuentemente las

45 fuentes de calor se usan en secuencia; las muestras deben estar frecuentemente en solución (*por ejemplo*, tratamientos de microondas). El detergente puede desenmascarar además los antígenos, tales como dodecil sulfato sódico (SDS, 0.25 % al 1 %) u otro tipo de detergentes de desnaturalización. Los métodos químicos incluyen álcalis fuertes (tales como NaOH), inmersión prolongada en agua, urea, ácido fórmico y refijación en sulfato de zinc-formalina. En otros casos, el tratamiento con enzima proteolítica modificará el antígeno tal que esté disponible para el anticuerpo. Cualquier número de proteasas se pueden usar, tal como tripsina. Estos métodos se pueden combinar para lograr resultados óptimos. La selección del método de recuperación del antígeno dependerá de la muestra, su inclusión (si la hay), y el anticuerpo anti-nucleolina.

55 Especialmente en los casos de detección basado en el producto enzimático o inmunofluorescente, la señal de fondo debido al fijador residual, entrecruzamiento de proteínas, precipitación de proteínas o enzimas endógenas se pueden apagar, usando *por ejemplo*, cloruro de amonio o borohidruro de sodio o una sustancia, para desactivar o agotar las enzimas endógenas que desorientan, tal como el peróxido de hidrógeno, que actúa sobre las peroxidasa. Para detectar las proteínas intracelulares en las muestras que no se deben seccionar, las muestras se pueden permeabilizar. Agentes de permeabilización incluyen detergentes, tales como t-octilfenoxipoli-etoxietanoles, polioxietilensorbitan, y otros agentes, tales como lisinas, proteasas, *etc.*

60

Los sitios de unión no específicos se bloquean por la aplicación de una solución de proteína, tal como albúmina de suero bovino (BSA; desnaturalizada o nativa), proteínas de la leche, o preferentemente en los casos en donde el reactivo que detecta es un anticuerpo, suero normal o IgG de un animal huésped no-inmunizado cuya especie es del mismo origen del anticuerpo de detección.

65

Citometría de flujo /Fluorescencia-Activada Separación de Células (FACS)

5 Los métodos para realizar la citometría de flujo son bien conocidos (Orfao y Ruiz-Arguelles, 1996). Debido a que la nucleolina de membrana plasmática está siendo investigada, la permeabilización celular que permite el acceso a los compartimentos citoplasmáticos es indeseable. Después de cosechar, las células se preparan como una suspensión celular única; las células se incuban después con un anticuerpo anti-nucleolina por lo general después de bloquear los sitios de unión no específicos. Preferentemente, el anticuerpo anti-nucleolina se marca con un marcador fluorescente. Si el anticuerpo no se marca con un marcador fluorescente, se usa un segundo anticuerpo que es inmunorreactivo con el primer anticuerpo y contiene un marcador fluorescente. Después de lavar suficiente para garantizar que se eliminen anticuerpos en exceso o no unidos, las células están listas para la citometría de flujo.

Enfoques bioquímicos:

15 En estos enfoques, es deseable primero aislar las proteínas de la membrana plasmática de otros compartimentos celulares. Esto se puede hacer en cualquier número de maneras, tales como una simple extracción celular, extracción diferencial o ruptura mecánica seguido por la separación de compartimentos celulares en gradientes (tal como sacarosa o povidextrano) por centrifugación, extracción seguido por inmunoselección de compartimentos celulares adecuados con anticuerpos específicos de membrana plasmática etc. Un ejemplo de un enfoque de este tipo se describe en (Naito y otros, 1988; Yao y otros, 1996b)). Los reactivos de extracción son bien conocidos. Por ejemplo, solventes tales como metanol pueden ser útiles ocasionalmente. Más probablemente, los detergentes, tales como t-octilfenoxipoli-etoxietanol (además conocidos como polietilenglicol tert-octilfenil éter) son particularmente útiles para las extracciones simples. Son útiles además los glucopiranosidos, maltopiranosidos, maltósidos, ésteres de polioxietileno, otros éteres de polioxietileno, sales de los ácidos alginico, caprílico, cólico 1-decanosulfónico, deoxicólico, dioctilo sulfosuccinato, 1-dodecanosulfónico, gliocólico, gicodeoxicólico, 1-heptanosulfónico, 1-hexanosulfónico, N-lauroilsacrosina, sulfato de laurilo (por ejemplo, SDS), 1-nanosulfónico, 1-octanosulfónico, 1-pentanosulfónico, taurocólico y taudoxicólico; sulfato de sodio 7-etil-2-metilo-4-undecilo, y sulfato de sodio 2-etilhexilo. Otros detergentes útiles incluyen (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano,-sulfonato, (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano,-sulfonato, N-decilo-, N-dodecilo-, N-hexadecil-, N-octadecilo-, N-tetradecilo-N,N-dimetilo-3-amonio-1-propanosulfonatos y fosfatidilcolina. Menos útiles, pero pueden ser útiles en algunos casos, son bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, bromuro de bencildimetildodecilamonio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, cetilpiridinio, bromuro de decametonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio, cloruro de metilbencetonio, cloruro de metiltiroctilamonio, y N,N',N'-polioxietileno(10)-N-sebo-1,3-diaminopropano. Los diferentes reactivos de extracción se pueden usar solos o en combinación; ellos se pueden preparar en soluciones acuosas simples o tampones adecuados.

El polietilenglicol éter ter-octilfenil es particularmente útil para la extracción diferencial aprovechando el punto de enturbiamiento bajo para separar las proteínas de membrana de las proteínas solubles en dos fases diferentes.

40 Los tampones de extracción pueden contener inhibidores de proteasa, tal como aprotinina, benzamidina, antipaína, pepstatina y yodoacetamida.

45 Los extractos se analizan después para la expresión de nucleolina. Para aquellas técnicas que separan la membrana plasmática de la superficie de otros componentes celulares (especialmente el núcleo), los agentes que detectan nucleolina no necesitan ser específicos para los epítomos de nucleolina de membrana plasmática extracelular.

Ensayo Inmunoabsorbente (ELISA) (Ausubel y otros, 1987)

50 Se conocen diversos tipos de ensayos de inmunoabsorción ligados enzimas (ELISA) para detectar la expresión de proteína, y estos son aplicables a la detección de nucleolina. Sin embargo, otros ensayos tipo ELISA incluyen radioinmunoensayos y otros ensayos de unión de anticuerpo no ligado a enzimas y procedimientos. En estos ensayos, las proteínas de superficie celular son los principales componentes en la preparación celular.

55 La técnica ELISA sándwich de doble anticuerpo es especialmente útil. El protocolo básico para un ELISA sándwich de doble anticuerpo es como sigue: Una placa se recubre con anticuerpos anti-nucleolina (anticuerpos de captura). La placa se lava después con un agente bloqueador, tal como BSA, para bloquear la unión no específica de proteínas (anticuerpos o antígenos) a la placa de prueba. La muestra de prueba se incuba después sobre la placa recubierta con los anticuerpos de captura. La placa después, se lava, incuba con anticuerpos antinucleolina, se lava de nuevo, e incuba con un conjugado marcado con el anticuerpo específico y se detecta adecuadamente la señal.

65 En otros ELISAs, las proteínas o péptidos se inmovilizan sobre una superficie seleccionada, la superficie que exhibe puede tener afinidad para las proteínas, tales como los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno especialmente tratada. Después de lavar para eliminar el material adsorbido incompletamente, uno podría después generalmente desear unir o recubrir con una proteína no específica que se sabe que es antigénicamente neutra con los anticuerpos anti-nucleolina, tales como BSA o caseína, en la parte inferior del pocillo. Esta etapa permite

bloquear los sitios de adsorción no específicos sobre la superficie de inmovilización y reduce así, el fondo causado por la unión no específica de anticuerpos sobre la superficie. Cuando se crearon los anticuerpos en un animal conjugando un polipéptido a una proteína (*por ejemplo*, BSA), una proteína diferente se usa por lo general como un agente bloqueador, debido a la posibilidad de la presencia de anticuerpos para la proteína bloqueadora en la composición de anticuerpo.

Después de unir la nucleolina al pocillo, recubrir con un material no-reactivo para reducir el fondo, y lavar para eliminar el material no unido, la superficie de inmovilización se pone en contacto con una composición de anticuerpo anti-nucleolina de manera propicia para la formación del complejo inmune (antígeno/anticuerpo). Tales condiciones incluyen diluir la composición de anticuerpo con diluyentes tales como BSA, y globulina bovina (BGG) y PBS/monolaurato de polioxietilensorbitán. Estos agentes añadidos además ayudan en la reducción de la señal de fondo no específica. La composición de anticuerpos en capas se deja después incubarse durante *por ejemplo*, de 2 a 4 horas en 25 °C a 37 °C. A continuación de la incubación, la superficie en contacto con la composición de anticuerpo se lava para eliminar el material no inmunocomplejado. Un procedimiento de lavado incluye lavar con PBS/monolaurato de polioxietilensorbitán o solución tampón de borato.

Después de la formación de inmunocomplejos específicos entre la muestra de prueba y el anticuerpo y el posterior lavado, se detecta la formación de inmunocomplejo usando un segundo anticuerpo que tiene especificidad para el anticuerpo anti-nucleolina. Para la detección, el anticuerpo secundario se asocia con la etiqueta detectable, tal como una enzima o una molécula fluorescente. Un número de inmunoensayos se discuten en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,736,348, 5,192,660, y 4,474,892.

Transferencia de Western. (Ausubel y otros. 1987)

Los métodos de transferencia de Western son bien conocidos. Generalmente, una muestra de proteína se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) a condiciones tales como para producir una separación adecuada de proteínas dentro de la muestra. Las proteínas se transfieren después a una membrana (*por ejemplo*, nitrocelulosa, nilón, etc.) de tal manera como para mantener las posiciones relativas de las proteínas mutuamente.

Las proteínas visiblemente marcadas de peso molecular conocido se pueden incluir dentro de un carril del gel. Estas proteínas sirven como un control para asegurar la transferencia adecuada de las proteínas a la membrana, así como marcadores de peso molecular para determinar el peso molecular relativo de otras proteínas en la mancha. Como alternativa, las proteínas marcadoras sin etiqueta (o en algunos casos raros, las proteínas sin marcador) se detectan después de la transferencia con otros tintes de proteínas Azul Brillante (G o R; Sigma; St. Louis, Missouri). Después de la transferencia de proteína, la membrana se sumerge en una solución bloqueadora para evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario.

El anticuerpo primario, *por ejemplo*, anti-nucleolina se puede marcar y la presencia y peso molecular del antígeno se puede determinar por la detección de la etiqueta en un lugar específico en la membrana Sin embargo, el anticuerpo primario puede no estar marcado, y la mancha se hace reaccionar además con un segundo anticuerpo marcado. Este anticuerpo secundario es inmunoreactivo con el anticuerpo primario; por ejemplo, el anticuerpo secundario puede ser uno para inmunoglobulinas de conejo y marcado con fosfatasa alcalina. Un aparato para y métodos para realizar transferencias Western se describen en la Patente de Estados Unidos con núm. 5,567,595.

Immunoprecipitación (Ausubel y otros, 1987; Harlow y Lane, 1999)

La expresión de proteína se puede determinar y cuantificar por el aislamiento de antígenos usando inmunoprecipitación. Los métodos de inmunoprecipitaciones se describen en la Patente de Estados Unidos con núm. 5,629,197. La inmunoprecipitación implica la separación del componente antigénico objetivo a partir de una mezcla compleja y se usa para discriminar o aislar las cantidades mínimas de proteína. Para el aislamiento de proteínas de la superficie celular, se usan frecuentemente sales no iónicas.

Por ejemplo, una inmunoprecipitación a partir de células completas se puede realizar como sigue. Las células se extraen con uno o más detergentes (ver anteriormente), tales como, por ejemplo, 1 % t-octilfenoxipoliétoxietanol/0.1 % SDS/150 mM de NaCl en 20 mM de tampón Tris, pH 8.6. Después de la extracción, la cual se pueden ayudar por agitación, el debris insoluble se elimina usando una centrifuga. El anticuerpo anti-nucleolina se añade a los extractos, y después las muestras se incuban 30 minutos hasta toda la noche a 4 °C. Proteína A de *Staphylococcus aureus* o producida de forma recombinante o proteína G de *Staphylococcus* Grupo C conjugada con perlas de sefarosa o tris-acrilo se añaden después. En aquellos casos cuando el anticuerpo anti-nucleolina no se une bien a Proteína A, se añaden simultáneamente los Abs IgG que reconocen anticuerpos de los animales en el que se hizo el anticuerpo anti-nucleolina. Las muestras se incuban después con agitación suave por alrededor de 2 horas a 4 °C. Las perlas o células bacterianas, ahora unidas a los complejos anticuerpo-antígeno, se lavan exhaustivamente, por lo general, ya sea con la primera solución de extracción o un tampón alto en sal, después, un tampón con menos sal o agua para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente y moléculas de detergente residual Después de eliminar el tampón residual, las perlas se incuban con un tampón, tal como tampón de muestra de electroforesis, y

después se someten a 95 °C durante 3-5 minutos para eluir proteínas unidas a partir de las perlas. Las muestras están listas entonces para el análisis y detección de nucleolina.

Otros métodos:

5

Procedimientos de Inmunoselección (distinto de FACS) (Ausubel y otros, 1987)

10

Las células que expresan nucleolina en membrana plasmática se pueden fácilmente aislar por "inmunoadsorción" en placas de plástico recubiertas con anticuerpos anti-anticuerpo (Wysocki y Sato, 1978). La inmunoadsorción tiene muchas ventajas sobre otros procedimientos de inmunoselección: Es rápido, eficiente (10^7 células pueden ser fácilmente adsorbidas en dos placas de plástico de 60 mm en 30 minutos), y barato.

15

Generalmente, una suspensión de células única se marca con un anticuerpo anti-nucleolina, y después se incuba en un sustrato recubierto con un anticuerpo secundario (con los sitios de unión no específicos bloqueados). Después de 1 a 3 horas de incubación a temperatura ambiente, las células no adherentes se eliminan por lavado. En esta modalidad, las células unidas indican que la nucleolina se expresa en la membrana plasmática, indicando una célula neoplásica.

20

Detección de nucleolina: métodos basados en oligonucleótidos

25

GROs y otros oligonucleótidos que reconocen y unen nucleolina (Bates y otros, 1999; Miller y otros, 2000; Xu y otros, 2001) se pueden usar de la misma manera que los anticuerpos son. Los ejemplos de ensayos adecuados son dados más abajo. En algunos casos, incorporar los nucleótidos GRO en grandes secuencias de ácido nucleico puede ser ventajoso; por ejemplo, para facilitar la unión de un ácido nucleico GRO a un sustrato sin desnaturalizar el sitio de unión a nucleolina.

30

GROs útiles que unen nucleolina (y además tienen la propiedad biológica de inhibir el crecimiento de células de cáncer) se han descrito (Bates y otros, 1999; Miller y otros, 2000; Xu y otros, 2001). Ellos incluyen los que se muestran en la Tabla 2. GROs de control son útiles para detectar los niveles de señal de fondo.

Tabla 2 GRO no-antisentido que se une a controles nucleolina y no de unión^{1,2,3}

GRO	Secuencia	Sec. con núm. de ident.:
GRO29A ¹	tttggtggtg gtggttggtg tgggtggtg	1
GRO29-2	tttggtggtg gtggttttgg tgggtggtg	2
GRO29-3	tttggtggtg gtggtggtg tgggtggtg	3
GRO29-5	tttggtggtg gtggtttggg tgggtggtg	4
GRO29-13	tgggtggtgt ggt	5
GRO14C	ggtggttggtg gtgg	6
GRO15A	gttgtttggg gtggt	7
GRO15B ²	ttgggggggg tgggt	8
GRO25A	ggttgggggtg ggtgggggtg gtggg	9
GRO26B ¹	ggtggtggtg gttgtggtg tgggtg	10
GRO28A	tttggtggtg gtggttggtg tgggtggtg	11
GRO28B	tttggtggtg gtggtgtggt ggtggtg	12
GRO29-6	ggtggtggtg gttgtggtg tgggtgttt	13
GRO32A	ggtggttggtg gtggttggtg tgggtgtggt gg	14
GRO32B	tttggtggtg gtggttggtg tgggtgtggt tt	15
GRO56A	ggtggtggtg gttgtggtg tgggtgtgt ggtggtggtg gttgtggtg tgggtg	16
CRO	tttcctctc ctcctctcc tcctctcc	18
GRO A	ttagggtag ggttagggtt aggg	19
GRO B	ggtggtggtg g	20
GRO C	ggtggttggtg gtgg	21
GRO D	ggtggttggtg gttgg	22
GRO E	gggttttggg	23
GRO F	ggttttgggt tgggtttgg	24
GRO G ¹	ggttgggtg gttgg	25
GRO H ¹	ggggtttgg gg	26
GRO I ¹	gggttttggg	27
GRO J ¹	ggggtttgg ggttttgggg ttttgggg	28
GRO K ¹	ttgggggtg ggttgggggt gggg	29
GRO L ¹	gggtggtggtg gtgggt	30

GRO M ¹	ggtttgggtt ttggtttgg ttttgg	31
GRO N ²	tttcctctc ctccttctcc tcctcctcc	32
GRO O ²	cctcctcctc cttctcctcc tcctcc	33
GRO P ²	tggggt	34
GRO Q ²	gcatgct	35
GRO R ²	gcggtttgcg g	36
GRO S ²	tagg	37
GRO T ²	ggggttgggg tgtggggtg ggg	38
¹ Indica una buen GRO de unión a nucleolina de membrana plasmática. ² Indica un control de nucleolina (no unión de nucleolina de membrana plasmática).		
³ Secuencia GRO sin ¹ o ² designaciones tiene alguna actividad anti-proliferativa.		

Enfoques citológicos:

Localización celular /marcaje (relativo a localización inmune/ensayos de marcaje)

5 Los procedimientos descritos anteriormente para los ensayos de localización basados en lo inmune (tal como la inmunofluorescencia o FACS) son aplicables además a aquellos ensayos en donde el reactivo de detección es una GRO de unión a nucleolina. Las modificaciones incluyen aquellas para evitar la unión no específica, usando ADN desnaturalizado, tal como de esperma de salmón en lugar de una proteína tal como BSA . Para la detección, las etiquetas similares descritas anteriormente son además útiles siempre que el GRO se pueda derivatizar con la etiqueta en alguna forma. Para este propósito, los sistemas de marcaje de ácido nucleico-biotina-avidina son especialmente convenientes, como son los de digoxigenina (Ausubel y otros, 1987). La síntesis de nucleótidos biotinilados ha sido descrita (Langer y otros, 1981). La biotina, una vitamina soluble en agua, se puede covalentemente unir a la posición C5 del anillo de pirimidina a través de un brazo enlazador alilamina; la biotina une de forma no covalente avidina o estreptavidina, que se puede marcar fácilmente. Como alternativa, se añade biotina a oligonucleótidos durante la síntesis por el acoplamiento al 5'-hidroxilo del nucleótido terminal. La digoxigenina-11-dUTP se puede incorporar en el ADN ya sea por protocolos de síntesis con cebados de oligonucleótido con traslación de mella o aleatorio. La digoxigenina se detecta usando anticuerpos marcados anti-digoxigenina. Los sistemas de digoxigenina convenientes están comercialmente disponibles (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, Indiana). Un ejemplo de un procedimiento usando oligonucleótidos para detectar y localizar proteínas ha sido descrito por (Davis y otros, 1998).

Enfoques basados en bioquímica:

25 Los GROs se pueden usar además de manera similar como los anticuerpos para detectar nucleolina en enfoques bioquímicos, como se describió anteriormente. Por ejemplo, experimentos de transferencia tipo " Southwestern " se pueden realizar con GROs (Bates y otros, 1999; Miller y otros, 2000). Después de que las células se han extraído adecuadamente (por ejemplo, diferencialmente para separar las proteínas de la membrana plasmática de las proteínas intracelulares), las proteínas se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida y transfieren a un sustrato, tal como una membrana de difluoruro polivinilideno. Las proteínas se desnaturalizan y renaturalizan por lavado durante 30 minutos a 4 °C con 6 M de guanidina-HCl, seguido por 3 lavados en 3 M, 1.5 M y 0.75 M de guanidina HCl en 25 mM de HEPES (pH 7.9)/ 4 mM de KCl/3 mM de MgCl₂). Después de bloquear los sitios de unión no específica con 5 % de leche en polvo sin grasa en tampón HEPES, el GRO marcado se hibrida durante 2 horas a 4 °C en tampón de unión HEPES suplementado con 0.25% de NDM, 0.05 % de NP-40, 400 ng/ml de ADN de esperma de salmón y 100 ng/ml de una secuencia de oligonucleótido mixta no relacionada, tal como tcgagaaaaa ctcctctc ctcctctc ctcca; sec. con núm. de ident. :17. Después de lavar con tampón de unión HEPES, se detecta adecuadamente la señal.

Otros métodos:

Matrices

Matrices de reactivos de unión a nucleolina inmovilizados en chips

45 Un chip es una matriz de regiones que contiene moléculas inmovilizadas, separadas por regiones que no contienen moléculas o moléculas inmovilizadas en una densidad mucho menor. Por ejemplo, un chip de proteína se puede preparar aplicando anticuerpos de unión a nucleolina; un chip de tipo "aptámero" se puede preparar aplicando GROs de unión a nucleolina. Las regiones restantes se dejan sin cubrir o se cubren con moléculas inertes. Las matrices se pueden enjuagar para eliminar todo menos los polipéptidos o ácidos nucleicos inmovilizados específicamente. Adicionalmente, los chips se pueden preparar además que contiene múltiples anticuerpos de unión a nucleolina (Tabla 1), ácidos nucleicos (tales como GROs; Tabla 2), o ambos, y pueden contener anticuerpos de control y/o ácidos nucleicos que son no reactivo con nucleolina. Una matriz de ese tipo tendría en cuenta la prueba de confirmación simultánea, duplicación y controles internos.

- 5 Las proteínas, tales como anticuerpos antinucleolina, se pueden inmovilizar en soportes sólidos por reacciones químicas simples, que incluyen la condensación de aminas con ácidos carboxílicos y la formación de disulfuros. Esta inmovilización covalente de proteínas en sustratos inertes puede evitar las señales de fondo debido a la adsorción no específica. Los sustratos derivatizados con otras moléculas, tales como biotina, son útiles además cuando la proteína que se inmoviliza se derivatiza con avidina o estreptavidina, o *vice-versa*. En algunos casos raros, especialmente cuando las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-nucleolina están disponibles, los polipéptidos de fusión que comprenden anticuerpo anti-nucleolina pueden ser ventajosos para la inmovilización en un sustrato.
- 10 La superficie puede ser cualquier material al que el agente de unión a nucleolina se puede inmovilizar. Por ejemplo, la superficie puede ser metal, vidrio, cerámica, polímero, madera o tejido biológico. La superficie puede incluir un sustrato de un material dado y una capa o capas de otro material sobre una porción o toda la superficie del sustrato. Las superficies pueden ser cualquiera de las superficies comunes usadas para la cromatografía de afinidad, tales como aquellas usadas para la inmovilización de glutatión para la purificación de polipéptidos de fusión GST. Las superficies para la cromatografía de afinidad incluyen, por ejemplo, sefarosa, agarosa, poliacrilamida, poliestireno y dextrano. La superficie no necesita ser un sólido, pero puede ser un coloide, una arcilla mineral exfoliada, una monocapa lipídica, una bicapa lipídica, un gel o un material poroso.
- 15 El método de inmovilización deseable controla la posición del agente de unión a la nucleolina en la superficie; por ejemplo, facilitando las porciones que unen al antígeno de los anticuerpos no unidos al sustrato, mientras que las porciones de no unión al antígeno se enraízan al sustrato. Controlando la posición de los ligandos reactivos individuales, se pueden producir patrones o matrices de los ligandos. Las porciones de la superficie que no se ocupan por el reactivo de unión a nucleolina no permiten la adsorción no específica de los polinucleótidos o polipéptidos.
- 20 En este caso, la muestra del sujeto, por ejemplo, la sangre, se pasa por encima de un chip que contiene moléculas de unión a nucleolina. Un dispositivo biosensor, tal como máquina que detecta cambios en la resonancia de plasmón de superficie, se usa después para detectar la nucleolina unida. Los chips BIAcore (Uppsala, Suecia) sirven como ejemplos de chips útiles y máquinas de detección.
- 25 *Ensayos de pronósticos*
- 30 Los métodos de diagnóstico, además, se pueden usar para identificar sujetos que tienen, o en riesgo de desarrollar, una neoplasia en una etapa temprana de desarrollo de la enfermedad, ya que la expresión en la superficie de nucleolina se puede ser detectar más temprano que en los métodos convencionales. Los ensayos de pronóstico se pueden usar para identificar un sujeto que tiene o en riesgo de desarrollar una neoplasia, tal como el sujeto que tiene una historia familiar de neoplasias dañinas, especialmente cánceres. Un método para identificar un individuo de ese tipo incluiría una muestra de prueba obtenida de un sujeto y la prueba para la localización de nucleolina en la superficie celular.
- 35 En otro caso, la detección de nucleolina de membrana plasmática y después evaluar ya sea cuantitativamente o cualitativamente la cantidad de nucleolina (generalmente indirectamente a través de la señal generada a partir de moléculas de nucleolina unidas) pueden indicar la tasa de proliferación celular, ya que los niveles de nucleolina de membrana plasmática se correlacionan con las velocidades de proliferación celular.
- 40 *Kits*
- 45 Kits, envases, paquetes, o dispensadores que contienen sondas de nucleolina y reactivos de detección, junto con las instrucciones para la administración, se pueden ensamblar. Cuando se suministra como un kit, los diferentes componentes se pueden envasar en envases separados y se mezcla inmediatamente antes del uso. Tal envasado de los componentes por separado puede permitir el almacenamiento a largo plazo sin perder las funciones de los componentes activos.
- 50 Los kits pueden incluir además los reactivos en envases separados que facilitan la ejecución de una prueba específica, tal como las pruebas de diagnóstico. Por ejemplo, los GROs que no unen nucleolina se pueden suministrar para controles negativos internos, o nucleolina y un reactivo de unión a nucleolina para los controles positivos internos. Los componentes de un kit son un agente anti-nucleolina usado para sondear nucleolina, una muestra control, y, opcionalmente, una composición para detectar nucleolina. Ejemplos de agentes anti-nucleolina incluyen un anticuerpo anti-nucleolina (*por ejemplo*, como se muestra en la Tabla 1) o fragmento de este; si se marca, entonces es innecesario un reactivo de detección de unión a nucleolina. Un oligonucleótido de unión a nucleolina (*por ejemplo*, como se muestra en la Tabla 2), el cual se puede derivatizar tal que puede unirse un segundo reactivo marcado (tal como biotina). Sin embargo, si se proporciona un ácido nucleico GRO marcado, entonces es innecesario un segundo reactivo marcado. Ejemplos de reactivos de detección incluyen: anticuerpos secundarios marcados, por ejemplo, un pAb anti-ratón hecho en burro y después etiquetado con un fluoróforo tal como rodamina, o un reactivo marcado para detectar oligonucleótidos como GROs; por ejemplo, avidina o estreptavidina enlazado a peroxidasa de rábano picante cuando la sonda se biotinila. Los componentes de control
- 55
- 60
- 65

pueden incluir: suero normal del animal en el que se hizo el anticuerpo secundario; una solución que contiene el polipéptido de nucleolina u oligonucleótido de unión a nucleolina; un ensayo de transferencia de puntos de proteína de nucleolina para ensayar la reactividad del reactivo de unión a nucleolina; o células fijadas o conservadas que expresan nucleolina en la membrana plasmática. Otros componentes pueden incluir tampones, fijadores, soluciones bloqueadoras, portaobjetos de microscopio y/o cubre objeto u otros sustratos adecuados para el análisis, tales como placas de microtitulación; detergente o soluciones detergentes u otros reactivos de extracción de células; reactivos misceláneos, inhibidores de proteasa, diversos envases y herramientas y equipos misceláneos para facilitar los ensayos.

10 (a) *Envases o recipientes*

Los reactivos incluidos en los kits se pueden suministrar en envases de cualquier tipo, tales que la vida de los diferentes componentes se conservan y no se adsorben o alteran por los materiales del envase. Por ejemplo, ampollas de vidrio selladas pueden contener reactivos de unión a nucleolina liofilizados (tales como anticuerpos anti-nucleolina u oligonucleótidos de unión a nucleolina) o tampones que se han envasado bajo un gas no reactivo neutro, tal como nitrógeno. Las ampollas puede consistir en cualquier material adecuado, tal como vidrio, polímeros orgánicos (*es decir*, policarbonato, poliestireno, *etc.*), cerámica, metal o cualquier otro material que se emplea típicamente para contener los reactivos. Otros ejemplos de envases adecuados incluyen botellas simples que se pueden fabricar a partir de sustancias similares como ampollas y desarrollos que pueden tener interiores forrados de aluminio, tales como aluminio o aleación. Otros envases incluyen tubos de prueba, viales, frascos, botellas, jeringas, o similares. Los envases pueden tener un puerto de acceso estéril, tal como una botella que tiene un tapón que puede ser perforado por una aguja de inyección hipodérmica. Otros envases pueden tener dos compartimentos que se separan por una membrana fácilmente removible que tras la eliminación permite mezclar los componentes. Las membranas removibles pueden ser de vidrio, plástico, caucho, *etc.*

25 (b) *Materiales de instrucción*

Los kits se pueden suministrar además con los materiales de instrucción. Las instrucciones se pueden imprimir en papel u otro sustrato y/o se pueden suministrar como un medio electrónico legible, tal como un disquete, CD-ROM, DVD-ROM, DVD, cinta de vídeo, cintas de audio, *etc.* Las instrucciones detalladas pueden no estar asociados físicamente con el kit; en su lugar, un usuario se puede dirigir a un sitio web de Internet especificado por el fabricante o distribuidor del kit, o suministrar como correo electrónico.

Métodos de tratamiento

35 Métodos terapéuticos

Se describen además los métodos para modular la expresión de nucleolina o actividad para propósitos terapéuticos. El método modulador de la invención implica contactar una célula con un agente que modula una o más de las actividades de la actividad de la nucleolina asociada con la célula. Un agente que modula la actividad de nucleolina puede ser un ácido nucleico o una proteína, un ligando similar a la nucleolina de origen natural, un péptido, un peptidomimético de nucleolina, u otra molécula pequeña. Métodos moduladores se pueden realizar *in vivo* (*por ejemplo*, administrando el agente a un sujeto). En la presente están descritos los métodos para tratar un individuo aquejado de una enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión o actividad aberrante de una nucleolina.

45 Anticuerpos anti-nucleolina como agentes terapéuticos

Cualquier anticuerpo, como se describió anteriormente en "*Detecting nucleolin: antibody-based methods: Antibodies*," que se une e interfiere con la nucleolina se puede usar para tratar tumores y cánceres. En algunos casos, se prefieren los anticuerpos monoclonales que unen epítopos individuales, específicos y definidos. En otros casos, sin embargo, se prefieren anticuerpos policlonales capaces de interactuar con más de un epítipo en la nucleolina. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos y fragmentos o derivados de estos. Por ejemplo, al ensayar células vivas, usando fragmentos F_{ab} se eliminará la reticulación, evitando así las células a partir de la endocitosis de anticuerpos unidos.

55 Transempalme de ARN mediado por empalmosoma (SMaRT) (Mitchell, 1997)

En otro caso, un subconjunto de células que expresan miembros selectos de nucleolina se dirige a través del transempalme de ARN mediado por empalmosoma. Este método es un medio para expresar un gen heterólogo en un subconjunto de células seleccionadas por la orientación de la reacción trans-empalme entre la molécula terapéutica precursora (PMT) y moléculas pre-ARNm que son únicamente expresadas en las células objetivo específicas (Puttaraju, DiPasquale y *otros*. 2001). El gen heterólogo puede ser cualquiera de valor terapéutico para la célula o una toxina que elimina a las células específicas.

65 Compuestos antisentido

Los métodos descritos para tratar un tumor en un sujeto incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz

de una molécula de ácido nucleico anti-sentido o ribozimas que se pueden usar para modular, particularmente inhibir, la expresión de nucleolina.

5 Las moléculas de ácido nucleico anti-sentido son herramientas específicas de secuencia capaces de modificar o silenciar selectivamente la expresión génica. Los oligos anti-sentido funcionan uniendo secuencias complementarias de un ARN similar de genes específicos por el apareamiento de bases de Watson-Crick para formar moléculas híbridas ARN-oligo (Knorre y Vlassov 1990). La formación de híbridos ARN-oligo interfiere con la función del ARN, estabilidad y en consecuencia la expresión de proteínas. Diversos mecanismos se han atribuido a la inhibición de la traducción de proteínas por las moléculas de ácido nucleico anti-sentido que incluyen: interferencia por efectos estéricos físicos y la iniciación de la degradación mediada por RNasa H del híbrido de cadena doble sonda oligo antisentido:ARNm (Dagle and Weeks 2000). Las moléculas de oligonucleótido anti-sentido así son útiles terapéuticamente y como herramienta para validar objetivos farmacéuticos

15 Un caso preferido de un ADN anti-sentido de nucleolina tiene al menos 10 nucleótidos, preferentemente entre 15 a 25 nucleótidos, o una longitud que une cadenas complementarias y se formulan y administran más fácilmente a los órganos objetivo y células. Los nucleótidos anti-sentido sintéticos contienen preferentemente análogos fosfoéster, tales como fosforotioato o tioésteres en lugar de enlaces fosfodiéster enteramente naturales como aquellos enlaces de origen natural que son lábiles a nucleasas (Shaw, Kent y otros. 1991). La clase de oligonucleótidos con fosforotioato tienen las ventajas adicionales de alta solubilidad, facilidad de síntesis, mantenimiento de patrones de unión de hidrógeno de nucleótidos Watson-Crick y la capacidad de activar la degradación mediada por Ribonucleasa H de ARNm celular (Stein, Tonkinson y otros. 1991; Crooke 1993; Srinivasan e Iversen 1995; Bock, Griffin y otros. 1992).

25 Las ribozimas son moléculas de ARN "catalítico" enzimática que se auto-escinden y auto-empalman (Cech 1986; Altman 1990; Symons 1992). Al combinar los dominios catalíticos de las ribozimas de origen natural con los oligonucleótidos específicos de una molécula de ARN objetivo, se pueden hacer moléculas de ARN catalítico artificial que escinden objetivos de ARN específico. Una ribozima contiene al menos dos dominios funcionales: (1) una secuencia especializada para la unión específica de ARN; y, (2) una secuencia catalítica responsable para la escisión del ARN (Cech y otros, 1992).

30 ARN de interferencia

35 Los tumores y cánceres se pueden tratar por la interferencia con la expresión de genes reguladores claves administrando composiciones de ARN de interferencia. Varias modalidades de esta tecnología ahora se han descrito, tales como dúplex de ARN de interferencia sintéticos, dúplex de ARN de horquilla corta sintética y sistemas de expresión génica que permiten la producción *in vivo* y suministro de molécula de ARN de interferencia (Sharp y Zamore 2000; Bernstein, Caudy y otros. 2001; Ketting, Fischer y otros. 2001; Sharp 2001; McManus, Petersen y otros. 2002; McManus y Sharp 2002; Paddison, Caudy y otros. 2002; Paddison, Caudy y otros. 2002) (Beach y otros, 2001; Fire y otros, 2003; Tuschl y otros, 2002; Tuschl y otros, 2001).

40 Terapias de combinación

45 Al practicar los métodos descritos anteriormente, los inhibidores específicos (por ejemplo, anticuerpos, antisentido, ribozimas, PMTs o ARN de interferencia dirigidos contra la nucleolina) se pueden usar solo o, preferentemente, en combinación con otro, o con otros agentes anti-tumorales tal como radiación, quimioterapia y fármacos citotóxicos. Tal terapia de combinación logra resultados terapéuticos superiores y sinérgicos

Administración

50 *Composiciones farmacéuticas*

55 Un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los solventes, medio de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónico y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica (Remington 2000). Los ejemplos preferidos de tales portadores o diluyentes incluyen agua, solución salina, soluciones de Ringer y solución de dextrosa. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Consideraciones generales

60 Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía pretendida de administración, incluyendo la administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, por inhalación, transdérmica, transmucosa, y rectal. Las soluciones o suspensiones que se usan para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir un diluyente estéril, tal como, agua para inyección, solución salina, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables

o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Formulaciones Inyectables

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL® (BASF; Parsippany, NJ) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida para ser administrada usando una jeringa. Tales composiciones deben ser estables durante la fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la contaminación de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, poliol (tal como, glicerina, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y otras mezclas adecuadas compatibles. Diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, y timerosal, pueden contener contaminación de microorganismos. Los agentes isotónicos tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, y cloruro sódico pueden incluirse en la composición. Las composiciones que pueden retrasar la absorción incluyen agentes tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Las soluciones inyectables estériles puede prepararse incorporando los agentes anti-nucleolina, y otros componentes terapéuticos, en la cantidad requerida en un solvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes según se requiera, seguido por esterilización. Los métodos de preparación de sólidos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles incluyen secado al vacío y liofilización para obtener un sólido.

Composiciones orales

25 Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales se pueden preparar además usando un portador fluido para su uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica por vía oral. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tales como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tales como almidón o lactosa, un agente desintegrante tales como ácido alginico, PRIMOGEL®, o almidón de maíz; un lubricante tales como estearato de magnesio o STEROTES®; un agente de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tales como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tales como yerbabuena, salicilato de metilo, o sabor de naranja.

Composiciones para inhalación

40 Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran como una atomización de aerosol a partir de un nebulizador o un envase presurizado que contiene un propelente adecuado, *por ejemplo*, un gas tal como dióxido de carbono.

Portadores

45 En un caso, los compuestos activos se preparan con portadores que protegen el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo pero sin limitarse a, sistemas de suministro microencapsulados e implantes. Se pueden usar polímeros biodegradables o biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Tales materiales pueden obtenerse comercialmente de ALZA Corporation (Mountain View, CA) y NOVA Pharmaceuticals, Inc. (Lake Elsinore, CA), o prepararse por un experto en la técnica.

Formulaciones transmucosas o transdérmicas

55 Se describe la administración transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se seleccionan agentes penetrantes que pueden penetrar la (s) barrera (s) objetivo(s). Los penetrantes transmucosos incluyen, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. Los atomizadores nasales o supositorios se pueden usar para la administración transmucosa. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas. Los supositorios (*por ejemplo*, además se pueden preparar con bases tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

Dosificación unitaria

65 Las formulaciones orales o composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria se pueden crear para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria se refiere a unidades distintas físicamente como dosis individuales del sujeto que se trata, que contiene una cantidad terapéuticamente

eficaz del compuesto activo en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención se dictan por, y dependen directamente de, las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea, y las limitaciones inherentes de la composición del compuesto activo.

5

Dosificación

La composición farmacéutica puede además comprender otros compuestos terapéuticamente activos como se señaló en la presente descripción que se aplican por lo general en el tratamiento de cánceres y tumores.

10

En el tratamiento o prevención de afecciones que requieren la modulación de nucleolina, un nivel de dosificación adecuado del agente terapéutico generalmente será aproximadamente 0.01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente por día que puede administrarse en dosis única o múltiples. Preferentemente, el nivel de dosificación será aproximadamente 0.1 a aproximadamente 250 mg/kg por día; con mayor preferencia aproximadamente 0.5 a aproximadamente 100 mg/kg por día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser aproximadamente 0.01 a 250 mg/kg por día, aproximadamente 0.05 a 100 mg/kg por día, o aproximadamente 0.1 a 50 mg/kg por día. Dentro de este intervalo la dosificación puede ser 0.05 a 0.5, 0.5 a 5 o 5 a 50 mg/kg por día. Para la administración oral, las composiciones se proporcionan preferentemente en forma de tabletas que contienen 1.0 a 1000 miligramos del ingrediente activo, particularmente 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 750.0, 800.0, 900.0, y 1000.0 miligramos del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis al paciente que se trata. Los compuestos pueden administrarse en un régimen de 1 a 4 veces al día, preferentemente una o dos veces al día.

15

20

25

Sin embargo, el nivel de la dosis y la frecuencia de la dosificación específica para cualquier paciente particular puede variar y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular, y el huésped sometido a terapia.

30

Determinación del efecto biológico del terapéutico

Ensayos *in vitro* o *in vivo* adecuados se pueden realizar para determinar el efecto de un terapéutico específico y si su administración se indica para el tratamiento del tejido afectado.

35

En varios casos específicos, ensayos *in vitro* se pueden realizar con células representativas del tipo (s) implicada (s) en el trastorno del paciente, para determinar si una terapia dada ejerce el efecto deseado sobre el (los) tipo(s) de célula (s). Modalidades para el uso en terapia se pueden ensayar en sistemas de modelos animales adecuados que incluyen, pero sin limitarse a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, perros y similares, antes de probar en sujetos humanos. Del mismo modo, para la prueba *in vivo* cualquiera de los sistemas de modelo animal conocido en la técnica se puede usar antes de la administración a sujetos humanos.

40

Los ejemplos a continuación se pretenden para ilustrar la presente invención sin limitación.

EJEMPLOS

45

Ejemplo 1 Marcate inmunofluorescente de nucleolina de membrana plasmática en las células

Este ejemplo ilustra un procedimiento que tiñe la nucleolina nuclear, o sólo la nucleolina de membrana plasmática.

50

Las células de las líneas celulares DU145 (cáncer de próstata humano), MDA-MB-231 (cáncer de mama humano) HeLa (cáncer cervical humano) y HS27 (fibroblastos de piel normal) (todas disponibles de la ATCC, Manassas, Virginia) se liberaron de los sustratos de cultivo con tripsina, se resuspendieron en células individuales y sembraron sobre portaobjetos de microscopio. Los portaobjetos sembrados con las células se incubaron a 37 °C hasta que estuvieron bien unidas, según se analizó por inspección visual usando un microscopio. Después de enjuagar las células unidas una vez con PBS durante dos minutos, se fijaron en 4% de formaldehído/PBS durante al menos 15 minutos a 22 °C. Para la tinción de nucleolina nuclear, las células se permeabilizaron con 1 % de Triton X-100 antes de contactar con el anticuerpo. Después de lavar dos veces con PBS, 5 minutos/lavado, los sitios de unión no específicos se bloquearon durante 15-60 minutos con 1 % de NGS/PBS a 22 °C, y después se incubaron con anticuerpos de ratón anti-nucleolina diluidos en 1 % de NGS/PBS o PBS/Tween (0.05 % -0.1 %) durante 1 hora hasta toda la noche a 4 °C. Las muestras se lavaron cuatro veces, 5 minutos cada una con PBS y, después, se incubaron con anti-pAb de ratón en cabra marcado con anticuerpos secundarios marcados con FITC diluido en PBS durante 1 hora a 22 °C. Después de lavar de nuevo cuatro veces con PBS durante 5 minutos cada una, las muestras se montaron en medio de montaje Mowiol (preparado como sigue: 9 ml/glicerol y 3.36g de Mowiol 40-88 se agitaron durante 1 h a 22 °C. Entonces, 9 ml de agua se añadió después, y la agitación continuó durante 2 h a 22 °C. Después se añadió Tris (0.2 M, pH 8.5; 18 ml), y la solución se incubó durante 6 horas a 50 °C hasta que los sólidos se disolvieron casi completamente. Después de la centrifugación a 5,000 x g, la fase líquida se usó para el

65

montaje), se observó bajo un microscopio, y fotografió.

Las Figuras 1 y 2 muestran la tinción de nucleolina de membrana nuclear (Figura 1) y plasmática (Figura 2) en las distintas líneas celulares. Se muestran micrografías de inmunofluorescencia (Figuras 1 y 2, paneles B, D, F, H) y de contraste de fase en paralelo (Figuras 1 y 2; paneles A, C, E, G); las células DU145 se muestran en A y B; las células MDA-MB-231 se muestran en C y D; las células HeLa se muestran en E y F; y las células HS27 se muestran en G y H. Todas las líneas celulares muestran tinción clara de nucleolina nuclear (Figuras 1A, 1C, 1D y 1G). Tenga en cuenta que cuando las células no se permeabilizan, restringiendo así el acceso del anticuerpo a la superficie de la membrana plasmática, la línea celular de piel normal, HS27, es completamente negativa para la tinción de la membrana plasmática (Figura 2H) mientras que las células de cáncer muestran tinción fuerte (Figuras 2B, 2D, 2F y 2H). La tinción de nucleolina de membrana plasmática es, así un método superior para el diagnóstico y pronóstico en comparación con la nucleolina nuclear o NORs con tinción de plata.

Ejemplo 2 Correlación del grado de expresión de nucleolina en membrana plasmática y agresividad del cáncer

Este experimento demuestra las líneas celulares con altos niveles de nucleolina de membrana plasmática corresponden a aquellos que tienen más rápida proliferación.

Dos líneas celulares de cáncer, DU145 y HeLa, y una línea celular normal, HS2, se ensayaron y compararon para determinar la tasa de proliferación. El tiempo de duplicación celular se calcula determinando la densidad celular a intervalos regulares usando el ensayo MTT (basado en la capacidad de las células vivas de reducir 3-(van de Loosdrecht y otros, 1994)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) en formazan; (van de Loosdrecht y otros, 1994)), y confirma por el recuento de las células usando exclusión con azul tripán.

La Figura 3 muestra las tasas de proliferación comparativas de DU145 (cuadrados), HeLa (diamantes) y HS27 (círculos) como se midió por el ensayo MTT. Hasta 3 días de cultivo, las tasas de crecimiento son similares, pero después de 3 días, HeLa y DU145 aumentan a una tasa más rápida que las células HS27 normales. Aunque MDA-MB-231 no se incluyó en este experimento, la tasa de proliferación se ha determinado que es DU145 > MDA-MB-231 > HeLa > HS27. Tenga en cuenta que las líneas celulares con altos niveles de nucleolina en membrana plasmática (véase Figura 2) corresponden a aquellas que tienen más rápida la proliferación (DU145 y HeLa).

Ejemplo 3 Marcaje inmunofluorescente de nucleolina en secciones de tejidos embebidos en parafina

Este ejemplo proporciona una técnica adecuada para detectar y localizar nucleolina en una muestra fijada que se ha embebido.

Las secciones de células fijadas y embebidas en cera de parafina y ancladas en portaobjetos de microscopio se lavaron con tres cambios de xileno (2 minutos cada uno) para eliminar la parafina, hidrataron en alcoholes graduados (serie 100 %, 95 % y 70 %, 2 minutos cada uno), y se colocaron en PBS durante 5 minutos. La recuperación del antígeno usó el enfoque de recuperación del antígeno a baja temperatura; (Shi y otros, 1997; Shi y otros, 2001): Después de la digestión con 0.1 % de tripsina-EDTA (v/v) (Invitrogen Corp., Carlsbad, California) diluida en PBS durante 15 minutos a 37 °C/5 % de CO₂, las muestras se lavaron con agua desionizada y se incubaron en 10 mM de tampón de citrato (pH 6) durante 2 horas a 80 °C. Después de enfriar, los portaobjetos se enjuagaron con agua desionizada y después con PBS.

Los sitios de unión no específicos se bloquearon por incubación en 3% de BSA en PBS durante 30 minutos a 22 °C. Las muestras se incubaron después con 4 µg/ml de mAb anti-nucleolina de ratón (Santa Cruz) diluido en PBS/1 % de NGS en 4 °C durante toda la noche. Las muestras se llevaron a 22 °C, lavaron cuatro veces con PBS durante 5 minutos, y después reaccionaron con 50 µg/ml anti-IgG de ratón en cabra conjugado con Alexa488 (Molecular Probes, Eugene, OR) y 2 µg/ml de yoduro de propidio diluido en PBS/1 % de NGS durante 1 hora a 22 °C. Después de lavar cuatro veces con PBS durante 5 minutos, las muestras se montaron en medio de montaje Mowiol y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia.

La Figura 4 muestra los resultados de un experimento de ese tipo. Se preparó una muestra clínica de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y se sondeó para la nucleolina de membrana plasmática. La señal de nucleolina de membrana plasmática se relegó a células neoplásicas, malignas. La Figura 4A muestra la señal de inmunofluorescencia obtenida a partir del sondeo de nucleolina; los núcleos se contratiñeron con un colorante intercalante de ADN. La Figura 4B muestra una micrografía de contraste de fase en paralelo. Las Figuras 4C y 4D son duplicados de las Figuras 4A y 4B, excepto las marcas que, se han añadido para indicar mejores áreas de tinción. En la región 1, la señal es fuerte sobre las células (señal débil en relación con la tinción nuclear en la Figura 4A); estas células están en los tejidos poco organizada y están menos densamente empaquetadas, lo que sugiere que son malignas. En la región 2, células normales (como delineadas por células bien empaquetadas y tejido organizado), células que no muestran señal de nucleolina de membrana plasmática.

Ejemplo 4 Expresión de nucleolina de membrana plasmática en células de carcinoma de pulmón.

Este ejemplo demuestra que las células de carcinoma de pulmón se pueden identificar fácilmente por tinción de nucleolina de membrana plasmática.

5 NCI-H1299 (carcinoma de pulmón de células no pequeñas aisladas de ganglios linfáticos de *H. sapiens*; (Giaccone y otros, 1992; Lin y Chang, 1996)) y células NCI-H82 (carcinoma de pulmón de células pequeñas, *H. sapiens*, (Carney y otros, 1985; Little y otros, 1983; Takahashi y otros, 1989)) se liberaron a partir de los sustratos de cultivo con tripsina, se resuspendieron en células individuales y sembraron en portaobjetos de microscopio. Las células se incubaron a 37 °C hasta que estuvieron bien unidas como se analizó por inspección visual usando un microscopio.
 10 Después de lavar las células una vez con PBS durante 2 minutos, se fijaron en 4% de formaldehído/PBS durante al menos 15 minutos a 22 °C. Después de lavar dos veces con PBS, 5 minutos/lavado, los sitios de unión no específicos se bloquearon durante 15-60 minutos con 1 % de NGS/PBS a 22 °C, y se incubaron después con anticuerpos de ratón anti-nucleolina durante 1 hora hasta toda la noche a 4 °C. Las muestras se lavaron cuatro veces, 5 minutos cada una con PBS y se incubaron después con pAb anti-ratón en cabra marcado con anticuerpos secundarios marcados con FITC diluidos en PBS con yoduro de propidio (para teñir núcleos) durante 1 hora a 22 °C.
 15 Después de lavar de nuevo cuatro veces con PBS durante 5 minutos cada una, las muestras se montaron en medio de montaje Mowiol, se observaron bajo un microscopio y se fotografiaron.

20 La Figura 5 muestra células completas sondaadas para nucleolina de membrana plasmática de dos líneas celulares de cáncer de pulmón, NCI- H82 (Figura 5A; una imagen de contraste de fase en paralelo se muestra en 5B) y NCI-H1299 (Figura 5C; una imagen de contraste de fase en paralelo se muestra en 5D). En ambas líneas celulares, la tinción de nucleolina de membrana plasmática es fuerte; los ejemplos de células bien teñidas se indican por asterisco (*) en las Figuras 5A y 5C.

25 *Ejemplo 5 Tinción de nucleolina de membrana plasmática de muestras clínicas.*

Para probar la factibilidad de usar este nuevo método para ensayar la nucleolina de membrana plasmática para diagnosticar tumor, se recogieron células pre-malignas y malignas, muestras clínicas de sujetos sanos y aquellos que sufren de un cáncer. Las muestras de sangre periférica, médula ósea y muestras de biopsia de tumor se obtuvieron y tiñeron para la nucleolina de membrana plasmática como se describió en el Ejemplo 4. La Figura 6 muestra contraste de fase (B, D, F) e imágenes inmunofluorescentes (A, C, E) de sangre periférica (A, B) o médula ósea (C, D y E, F). Las células muy teñidas de nucleolina de membrana plasmática se marcan con un asterisco (*); éstas sólo se observaron en aquellos pacientes que sufren de carcinomas (A , B y C, D), mientras que las células de un paciente sano no mostraron ninguna tinción de la membrana plasmática (E , F).
 30
 35

Ejemplo 6 Inhibición del crecimiento tumoral

La colonia de ratones SCID se desarrolló usando ratones SCID originales (C.B-17/IcrACSCID) obtenidos de Taconic (Germantown, Nueva York). Los animales se alojaron en jaulas de microisolator (Compañía de Instalación de Enjaulamiento Allentown, Allentown, Nueva Jersey) y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos. Los ratones comieron bolitas de NIH31 irradiado (Tekland Premier, Madison, Wisconsin) y bebieron agua en autoclave. Los ratones se examinaron mensualmente por serología mediante ELISA para micoplasma, virus de la hepatitis del ratón, oxiuros, y virus de Sendai. Dieron negativo.
 40

45 Los ratones hembra de 6-8 semanas de edad se les extrajo sangre (200 µl) por punción retro-orbital para detectar la presencia de inmunoglobulina de ratón (Ig) usando ELISA . Sólo los ratones con niveles de IgG < 20 µg/ml se usaron para los experimentos. Los ratones se pesaron una vez por semana. Las inyecciones de células tumorales se dieron SC en el flanco inferior derecho del ratón en un volumen total de 200 µl. Las inyecciones de fármacos se administraron por inyección intraperitoneal (IP) (200 µl) cuando se establecieron los tumores (Día 6). Como los tumores se desarrollaron, los tumores SC se midieron para la estimación del volumen del tumor (mm³) de acuerdo con la fórmula (a² x b/2) donde a es el diámetro más pequeño y b es el diámetro más grande. Los ratones se sacrificaron por CO₂ y los tumores se cosecharon. Los tumores cosechados se cortaron en secciones de 3 mm, fijaron en 10 % de formalina neutra tamponada durante 24 horas, se colocaron después en 70 % de etanol, y se embebieron en bloques de parafina.
 50
 55

La línea celular de mama MDA-MB-231 se cultivó en medio HyQ RPMI-1640 (1X) (HyClone, Logan, Utah) con 2.05 mM de L-glutamina suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Sigma, St. Louis, Missouri) y se mantuvo en 5 % de CO₂ - 95 % de atmósfera de aire humidificado a 37 °C. Un frasco de células sub-confluente se cosechó usando 0.25 % de tripsina-EDTA (HyClone , Logan, Utah) y se contaron usando la técnica de ensayo de azul tripán. Los otros frascos de células subconfluentes se rasparon. Las células (95-100 % de viabilidad) se resuspendieron respectivamente a una concentración de 8 x 10⁶ células /200 µl de solución salina estéril.
 60

65 Taxol 10 mg/kg se preparó y administró IP en el volumen de 200 µl cada dos días para un total de 5 inyecciones en menos de una hora a partir del equipo de preparación. Los anticuerpos monoclonales y policlonales, IgG de ratón y poli IgG de conejo se prepararon e inyectaron dentro de una hora IP en el volumen de 200 µl para la dosis de carga

inicial de 10 mg/kg. La cantidad restante de anticuerpos se prepararon a una dosis de mantenimiento de 3 mg/kg en 200 µl, lo que se dividió en alícuotas y se congeló en 6 tubos separados por anticuerpo para inyecciones semanales para un total de 6 semanas. Cada dosis de mantenimiento semanal se descongeló e inyectó dentro de una hora El control PBS1x se administró IP semanal en 200 µl para un total de 7 inyecciones. Los resultados del experimento demuestran significativamente mayor regresión del tumor con la combinación de cualquier composición de anticuerpo y Taxol.

Ejemplos 7 (Profético) Correlación del grado de expresión de nucleolina de membrana plasmática y agresividad del cáncer

Treinta y tres líneas celulares de carcinoma de pulmón se analizan, la mayoría disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, Virginia) El tiempo de duplicación celular se calcula determinando la densidad celular a intervalos regulares usando el ensayo MTT y se confirma contando las células usando . exclusión de azul tripán. En cada experimento las células HeLa (Gey y otros, 1952) se incluyen como un control interno. Cada valor se determina a partir de al menos dos experimentos independientes con muestras por triplicado. Para determinar los niveles de nucleolina nuclear y de membrana plasmática, se implementan dos métodos de aplicación. En primer lugar, los extractos nuclear y de membrana plasmática se preparan a partir de cada línea celular usando métodos que se han descrito (Ausubel y otros, 1987; Bates y otros, 1999; Yao y otros, 1996a). En resumen, las células se recogen y resuspenden en un tampón hipotónico, después se dejan hinchar sobre hielo durante varios minutos. Las células se lisan usando un homogeneizador Dounce, y los núcleos se recogen por centrifugación. Los núcleos se resuspenden en un tampón con alto contenido de sal para extraer las proteínas nucleares; la sal se elimina después por diálisis. Las proteínas de membrana plasmática se pueden aislar de la fracción S-100 y se separan de las proteínas citosólicas y otros organelos por centrifugación a través de un gradiente de sacarosa. Extractos PM y nuclear de diferentes células se analizan por análisis de transferencia Western (Ausubel y otros, 1987) usando un anticuerpo anti- nucleolina (Santa Cruz) seguido por visualización quimioluminiscente. Los niveles de nucleolina se cuantifican después por densitometría de la señal resultante registrada en la película de rayos X y normalizada con la intensidad de los controles del extracto de HeLa. El segundo enfoque para determinar los niveles de nucleolina implica el sondeo para nucleolina de la inmunofluorescencia de las líneas celulares. Las células se sondean para la expresión de nucleolina en la superficie en paralelo con células DU145 (Mickey y otros, 1977; Stone y otros, 1978) como control positivo, células HS27 como un control negativo y células HeLa como referencia (véase Figura 2). Las células se fotografian y clasifican para el grado de señal, lo que se puede además cuantificar (usando sistemas que usan software e imágenes para cuantificar píxeles; en este caso, se usan imágenes de vídeo) o cualitativamente evaluar. Los datos se someten después a análisis estadístico para demostrar las correlaciones con el grado de proliferación celular (tasas superiores de proliferación celular indican células cancerosas más agresivas) con la intensidad de la señal de nucleolina a través la muestra completa y dentro de los subconjuntos.

Ejemplo 8 (Profético) Detección del cáncer de pulmón

En este ejemplo, las biopsias de pacientes, muestras de esputo y tejido pulmonar extirpado se sondean para nucleolina de membrana plasmática, y estos resultados se comparan con otros marcadores de diagnóstico y pronóstico del cáncer de pulmón, utilizando muestras clínicas de archivo y de rutina para este estudio.

Métodos

Las muestras que incluyen biopsias bronquiales, muestras de esputo, y tejido pulmonar extirpado se obtienen de sujetos humanos, tanto sanos como aquellos que sufren de cáncer de pulmón, y cada muestra se codifica tal que en el momento de sondeo y observación de la nucleolina, el origen de la muestra es desconocido.

El sondeo de estas muestras se implementa después usando técnicas de inmunohistoquímica. Por ejemplo, la nucleolina de membrana plasmática se sondea con uno o más Abs anti-nucleolina seleccionados de la Tabla 1, una señal se genera a partir de un Ab secundario marcado con fluoróforo, y las muestras se observan y fotografian. Los controles adecuados incluyen sondear con sólo el anticuerpo secundario, no sondear con anticuerpos, sondear con sólo suero pre-inmune, y sondear con un anticuerpo conocido por no reaccionar con los tipos de células que se analizan. Para facilitar la visualización y determinación de la localización, las células se pueden contrateñir con Hoechst 33258 o yoduro de propidio (para visualizar los núcleos) y/o con faloidina o falicidina etiquetadas con fluorescencia (para visualizar el citoesqueleto de actina). Las muestras se observan, anotan (señal de superficie indicando la expresión de nucleolina de membrana plasmática) y documentan.

Referencias

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, y K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Nueva York.
 Babkes, M., A. Ranford, y K. Yaeger. 2001. Sputum trap manifold with nested caps/ patente de Estados Unidos 6,325,785.
 Bandman, O., H. Yue, N. Corley, y P. Shah. 1999. Human nucleolin-like protein/ patente de Estados Unidos núm.

- 5,932,475.
- Bates, P.J., J.B. Kahlon, S.D. Thomas, J.O. Trent, y D.M. Miller. 1999. Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *J Biol Chem.* 274:26369-77.
- 5 Beach, D., E. Bernstein, A. Caudy, S. Hammond, y G. Hannon. 2001. Methods and compositions for RNA interference/ WO 01/68836.
- Byrne, C.J. 1986. Laboratory tests : implications for nursing care. Addison-Wesley Pub. Co. Health Sciences Division, Menlo Park, Calif. xxi, 756 págs.
- Callebaut, C., J. Blanco, N. Benkirane, B. Krust, E. Jacotot, G. Guichard, N. Seddiki, J. Svab, E. Dam, S. Muller, J.P. Briand, y A.G. Hovanessian. 1998. Identification of V3 loop-binding proteins as potential receptors implicated in the binding of HIV particles to CD4(+) cells. *J Biol Chem.* 273:21988-97.
- 10 Carney, D.N., A.F. Gazdar, G. Bepler, J.G. Guccion, P.J. Marangos, T.W. Moody, M.H. Zweig, y J.D. Minna. 1985. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res.* 45:2913-23.
- Cech, T., A. Zaug, y M. Been. 1992. RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endoribo-nucleases and methods/ US 5,093,246.
- 15 Cole, S.P., E.H. Vreeken, y J.C. Roder. 1985. Antibody production by human X human hybridomas in serum-free medium. *J Immunol Methods.* 78:271-8.
- Coligan, J.E. 1996. Current protocols in immunology. Wiley, [Nueva York]. 3 v. (hojas sueltas) págs.
- Davis, K.A., Y. Lin, B. Abrams, y S.D. Jayasena. 1998. Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* 26:3915-24. Derenzini, M. 2000. The AgNORs. *Micron.* 31:117-20.
- 20 Fire, A., S. Kostas, M. Montgomery, L. Timmons, S. Xu, H. Tabara, S. Driver, y C. Mello. 2003. Genetic inhibition by double-stranded RNA/ US 6,506,559.
- Gey, G., W. Coffman, y M. Kubicek. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12:264.
- 25 Giaccone, G., J. Battey, A.F. Gazdar, H. Oie, M. Draoui, y T.W. Moody. 1992. Neuromedin B is present in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 52:2732s-2736s.
- Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, y P. Bouvet. 1999. Structure and functions of nucleolin. *JCell Sci.* 112:761-72.
- Goding, J.W. 1996. Monoclonal antibodies: Principles and Practice. Academic Press, San Diego. 492 págs.
- 30 Harlow, E., y D. Lane. 1988. Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 págs.
- Harlow, E., y D. Lane. 1999. Using antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory PRes, Cold Spring Harbor, NuevaYork.
- 35 Irving, R.A., G. Coia, A. Roberts, S.D. Nuttall, y P.J. Hudson. 2001. Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *J Immunol Methods.* 248:31-45.
- Jakovovits, A., R. Kucherlapati, S. Klapholz, M. Mendez, y L. Green. 1998. Transgenic mammals having human Ig loci including plural V/ WO 98/24893.
- Kim, C.S., B.B. Berkley, W.M. Abraham, y A. Wanner. 1982. A micro double capillary method for rheologic measurements of lower airway secretions. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 18:915-27.
- 40 King, M., y D. Speert. 2002. Use of destran and other polysaccharides to improve mucus clearance/ patente de Estados Unidos 6,339,075.
- Kohler, G., y C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:495-7.
- Koide, S. 2002. Nucleic acids encoding artificial antibody polypeptides/ US 6,462,189.
- 45 Langer, P.R., A.A. Waldrop, y D.C. Ward. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:6633-7.
- LaPosta, V., y J. Eldrige. 2001. Adjuvant and vaccine compositions conatining monophosphoryl lipid A/ US 6,306,404.
- 50 Lin, D.L., y C. Chang. 1996. p53 is a mediator for radiation-repressed human TR2 orphan receptor expression in MCF-7 cells, a new pathway from tumor suppressor to member of the steroid receptor superfamily. *J Biol Chem.* 271:14649-52.
- Little, C.D., M.M. Nau, D.N. Carney, A.F. Gazdar, y J.D. Minna. 1983. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature.* 306:194-6.
- 55 Lonberg, N., y R. Kay. 1998. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies/ US 5,770,429.
- McNicol, A.M., y J.A. Richmond. 1998. Optimizing immunohistochemistry: antigen retrieval and signal amplification. *Histopathology.* 32:97-103.
- Mickey, D.D., K.R. Stone, H. Wunderli, G.H. Mickey, R.T. Vollmer, y D.F. Paulson. 1977. Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res.* 37:4049-58.
- 60 Miller, D., P. Bates, y J. Trent, 2000. Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides and method of using same to bind to nucleolin/ WO 00/61597.
- Mitchell, L. 1997. Therapeutic molecules generated by trans-splicing/ WO 09/722250.
- Naito, M., H. Hamada, y T. Tsuruo. 1988. ATP/Mg²⁺-dependent binding of vincristine to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells. *J Biol Chem.* 263:11887-91.
- 65 Orfao, A., y A. Ruiz-Arguelles. 1996. General concepts about cell sorting techniques. *Clin Biochem.* 29:5-9.
- Robinson, J.M., y D.D. Vandre. 2001. Antigen retrieval in cells and tissues: enhancement with sodium dodecyl

- sulfate. *Histochem Cell Biol.* 116:119-30.
- Rubin, B., y M. Newhouse. 1999. Use of surface active agents to promote mucus clearance/ patente de Estados Unidos 5,925,334.
- 5 Sharon, J. 1995. Polyclonal antibody libraries/ WO 95/20401.
- Shi, S.R., R.J. Cote, y C.R. Taylor. 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem.* 45:327-43.
- Shi, S.R., R.J. Cote, y C.R. Taylor. 2001. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem.* 49:931-7.
- 10 Singh, S., y P. Dias. 2002. Transgenic avian species for making human and chimeric antibodies/ US 2002/0028488.
- Sorokina, E.A., y J.G. Kleinman. 1999. Cloning and preliminary characterization of a calcium-binding protein closely related to nucleolin on the apical surface of inner medullary collecting duct cells. *J Biol Chem.* 274:27491-6.
- Srivastava, M., y H.B. Pollard. 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *Faseb J.* 13:1911-22.
- 15 Stedman, T.L. 2000. *Stedman's medical dictionary.* Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia. xxxvi, [127], 2098 p. págs.
- Stone, K.R., D.D. Mickey, H. Wunderli, G.H. Mickey, y D.F. Paulson. 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer.* 21:274-81.
- Surani, A., M. Neuberger, y M. Bruggemann. 1996. Production of antibodies from transgenic animals/ US 5,545,807.
- 20 Takahashi, T., M.M. Nau, I. Chiba, M.J. Birrer, R.K. Rosenberg, M. Vinocour, M. Levitt, H. Pass, A.F. Gazdar, y J.D. Minna. 1989. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science.* 246:491-4.
- Tuschl, T., S. Elbashir, y W. Lendeckel. 2002. RNA interference mediating small RNA molecules/ WO 02/44,321.
- Tuschl, T., P. Sharp, P. Zamore, y D. Bartel. 2001. RNA sequence-specific mediators of RNA interference/ WO 011075,164.
- 25 Tuteja, R., y N. Tuteja. 1998. Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 33:407-36.
- van de Loosdrecht, A.A., R.H. Beelen, G.J. Ossenkuppele, M.G. Broekhoven, y M.M. Langenhuijsen. 1994. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods.* 174:311-20.
- 30 Wysocki, L.J., y V.L. Sato. 1978. "Panning" for lymphocytes: a method for cell selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:2844-8.
- Xu, X., F. Hamhouyia, S.D. Thomas, T.J. Burke, A.C. Girvan, W.G. McGregor, J.O. Trent, D.M. Miller, y P.J. Bates. 2001. Inhibition of DNA Replication and Induction of S Phase Cell Cycle Arrest by G-rich Oligonucleotides. *J Biol Chem.* 276:43221-30.
- 35 Yao, G.Q., S. Corrias, y Y.C. Cheng. 1996a. Identification of two oligodeoxyribonucleotide binding proteins on plasma membranes of human cell lines. *Biochem Pharmacol.* 51:431-6.
- Yao, G.Q., S. Corrias, y Y.C. Cheng. 1996b. Identification of two oligodeoxyribonucleotide binding proteins on plasma membranes of human cell lines. *Biochem Pharmacol.* 51:431-6.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bates, Paula J Miller, Donald M Trent, John O Xu, Xiaohua

5 <120> UN NUEVO METODO PARA EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE ENFERMEDADES MALIGNAS

<130> 11114/03

<160> 38

10 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> ADN.

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético.

20 <400> 1

tttggtggtg ggggtgtgg tgggtggtg 29

<210> 2

25 <210> 2

<211> 29

<212> ADN.

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido sintético.

<400> 2

tttggtggtg ggggtttgg tgggtggtg 29

35 <210> 3

<211> 29

<212> ADN.

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> oligonucleótido sintético.

<400> 3

45 tttggtggtg ggggtggtg tgggtggtg 29

<210> 4

<211> 29

<212> ADN.

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético.

55 <400> 4

tttggtggtg ggggtttggg tgggtggtg 29

<210> 5

<211> 13

60 <212> ADN.

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético.

- <400> 5
13 tggtggtggt ggt
- 5 <210> 6
<211> 14
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> oligonucleótido sintético.
- <400> 6
14 ggtggttggtg gtgg
- 15 <210> 7
<211> 15
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> oligonucleótido sintético.
- <400> 7
15 gttgtttggg gtggt
- 25 <210> 8
<211> 15
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> oligonucleótido sintético.
- <400> 8
15 ttgggggggg ttggt
- 35 <210> 9
<211> 25
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> oligonucleótido sintético.
- <400> 9
25 ggttgggggtg ggtggggtg gtggg
- 45 <210> 10
<211> 26
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> oligonucleótido sintético.
- <400> 10
ggtggtggtg gttggtggtg tgggtg 26
- 60 <210> 11
<211> 28
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>

<223> oligonucleótido sintético.
 <400> 11
 5 tttggtggtg gtggttggtg tgggtggtg 28
 <210> 12
 <211> 28
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 <400> 12
 15 tttggtggtg gtggttggtg ggtggtggtg 28
 <210> 13
 <211> 29
 <212> ADN.
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 25 <400> 13
 ggtggtggtg gttgtggtg tgggtggtt 29
 <210> 14
 <211> 32
 30 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 35 <400> 14
 ggtggttggtg gtggttggtg tgggtggtg 32 gg
 <210> 15
 <211> 32
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 45 <400> 15
 tttggtggtg gtggttggtg tgggtggtg 32 tt
 <210> 16
 <211> 56
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 <400> 16
 60 ggtggtggtg gttgtggtg tgggtggtg 56 ggtggtggtg gttgtggtg tgggtg
 <210> 17
 <211> 35
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> oligonucleótido sintético.

5 <400> 17
 tcgagaaaa ctctcctctc ctccttct 35 ctcca

<210> 18
 <211> 29
 <212> ADN.
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético.

15 <400> 18
 tttcctcctc ctccttctcc tcctcctcc 29

<210> 19
 <211> 24
 20 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético.

25 <400> 19
 24 ttagggtag ggtaggggtt aggg

<210> 20
 <211> 11
 30 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> oligonucleótido sintético.

<400> 20
 11 ggtgggtg g

40 <210> 21
 <211> 14
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.

<400> 21
 14 ggtggtgtg gtgg

50 <210> 22
 <211> 15
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.

<400> 22
 60 15 ggtggtgtg gttgg

<210> 23
 <211> 10
 <212> ADN.
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético.

5 <400> 23
 10 gggttttggg

<210> 24
 <211> 20
 10 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético.

15 <400> 24
 20 ggttttggtt ttggtttgg

20 <210> 25
 <211> 15
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.

<400> 25
 15 ggttggtgtg gttgg

30 <210> 26
 <211> 12
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.

<400> 26
 12 ggggttttgg gg

40 <210> 27
 <211> 10
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.

50 <400> 27
 10 gggttttggg

<210> 28
 <211> 28
 <212> ADN.
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético.

60 <400> 28
 ggggttttgg ggttttgggg ttttgggg 28

<210> 29
 <211> 24
 65 <212> ADN.

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 5
 <400> 29
 24 ttggggttg ggtggggtt gggg
 <210> 30
 <211> 16
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 15
 <400> 30
 16 ggggggttg gtgggt
 <210> 31
 <211> 26
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 25
 <400> 31
 ggttttgggt ttggtttgg ttttgg 26
 <210> 32
 <211> 29
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 35
 <400> 32
 ttcctcctc ctcctctcc tcctcctcc 29
 <210> 33
 <211> 26
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 45
 <400> 33
 cctcctcctc cttctcctcc tcctcc 26
 <210> 34
 <211> 6
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.
 55
 <400> 34
 6 tggggt
 <210> 35
 <211> 7

<212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido sintético.

 <400> 35
 7 gcatgct

 10 <210> 36
 <211> 11
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.

 <400> 36
 11 gcggttgcg g
 20 <210> 37
 <211> 4
 <212> ADN.
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.

 <400> 37
 30 4 tagg

 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN.
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético.

 40 <400> 38
 23 ggggttgggg tgtggggtg ggg

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal prácticamente no inmunogénico contra la nucleolina de superficie celular y un portador farmacéuticamente aceptable de este, para usar en un método para el tratamiento de cáncer en humanos mediante la muerte de las células de cáncer.
2. Una composición para el uso como se reivindica en la reivindicación 1 en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 10 3. Una composición para el uso como se reivindica en la reivindicación 1 en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
4. Una composición para el uso como se reivindica en la reivindicación 1 en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o es un fragmento de anticuerpo.
- 15 5. Una composición para el uso como se reivindica en la reivindicación 1 en donde el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico.
- 20 6. Una composición para el uso como se reivindica en la reivindicación 5 en donde el agente citotóxico es un isótopo radiactivo, un agente terapéutico quimioterapéutico o una toxina.
7. Una composición para el uso como se reivindica en la reivindicación 5 en donde el agente citotóxico es una toxina la cual es una toxina de bacterias, hongos, plantas o animales.
- 25 8. Una composición para el uso como se reivindica en la reivindicación 1 para usar por inyección la cual es estéril.
9. Una composición para el uso como se reivindica en la reivindicación 1 para usar en un humano que se trata además con terapia de radiación.
- 30 10. Una composición para el uso como se reivindica en la reivindicación 1 para usar en un humano que se trata además con un agente quimiotóxico o quimioterapéutico.
- 35 11. Una composición para el uso como se reivindica en la reivindicación 10 en donde el agente quimiotóxico o quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste de ciclofosfamida, etoposido, doxorubicina, metotrexato, vincristina, procarbazona, prednisona, dexametasona, citrato de tamoxifeno, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, camptotecina, ácido zoledrónico, ibandronato y mitomicina, vinorelbina, irinotecan, flutamida, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, imatinib mesilato, antraciclina, letrozol, trióxido de arsénico, anastrozol, pamoato de triptorelin, ozogamicina, clorhidrato de irinotecan, BCG vivo, implante de acetato de leuprolide, bexaroteno, exemestano, clorhidrato de topotecan, clorhidrato de gemcitabina, clorhidrato daunorubicina y citrato toremifeno.
- 40 12. Una composición para usar como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde el cáncer es melanoma, linfoma, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, leucemia, cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer esofágico, cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer cervical, hepatoma.
- 45 13. Un anticuerpo monoclonal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar como se define en la reivindicación 1.
- 50 14. Un anticuerpo monoclonal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.

Figura 1

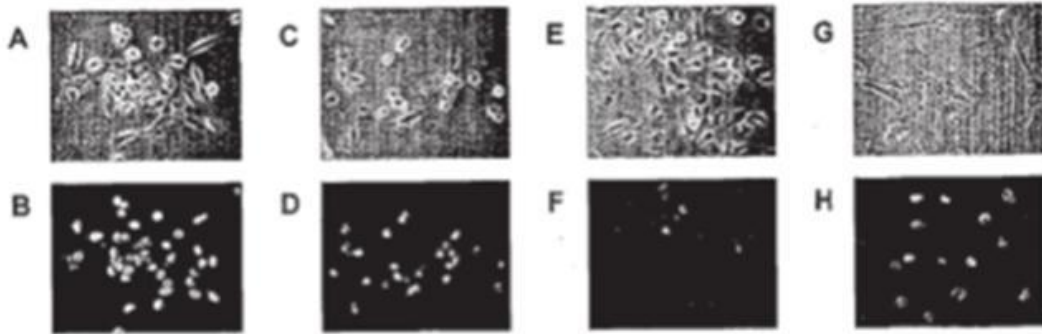


Figura 2

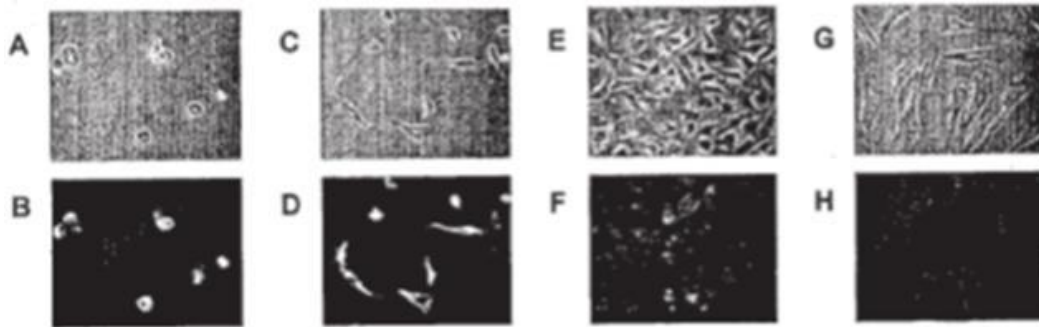


Figura 3

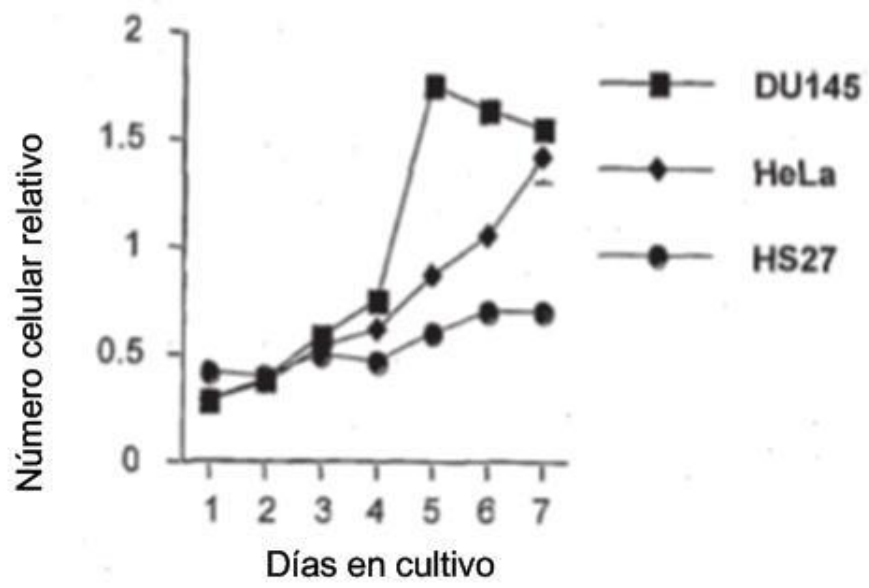


Figura 4

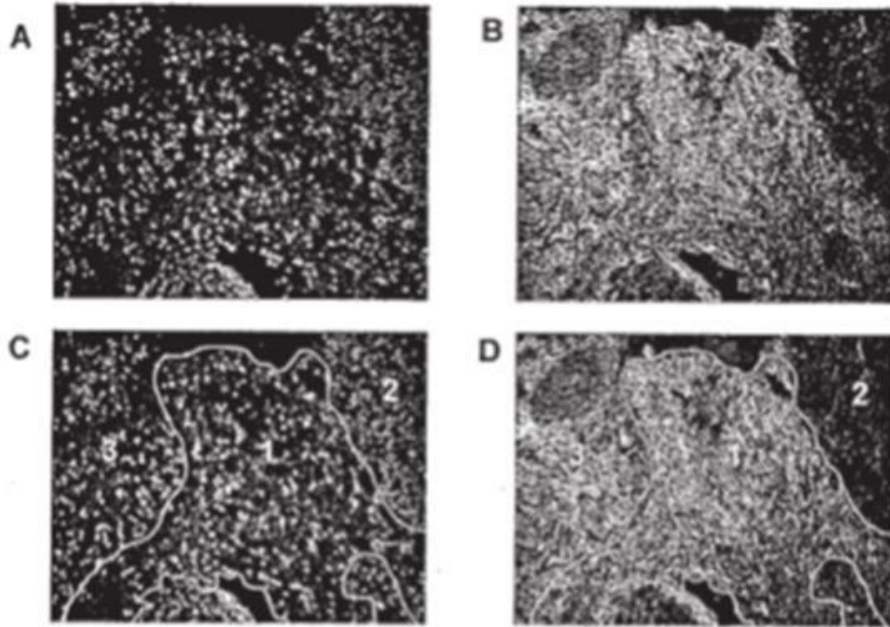


Figura 5

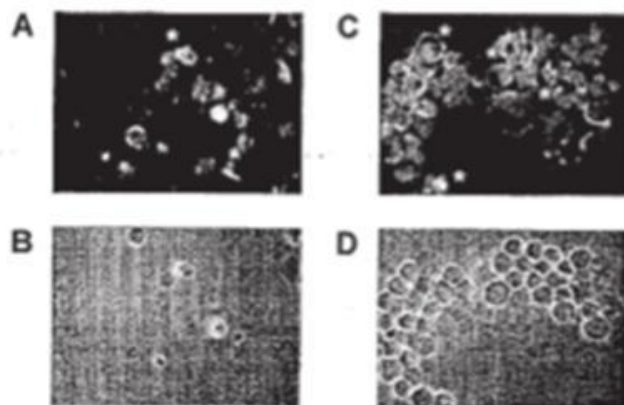


Figura 6

