(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 531 368**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/38 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2002 E 02741997 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 1399739**

(54) Título: **Métodos y kits para diagnosticar tumorigenicidad y determinar resistencia a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno**

(30) Prioridad:

15.06.2001 US 880842

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2015

(73) Titular/es:

A & G PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
9130 Red Branch Road, Suite U
Columbia, MD 21045, US

(72) Inventor/es:

SERRERO, GINETTE

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Métodos y kits para diagnosticar tumorigenicidad y determinar resistencia a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno

Esta solicitud es una continuación de la Solicitud U.S. No. 09/880.842, presentada el 15 de junio, 2001, que es una continuación en parte de la Solicitud U.S. No. 09/456.886, presentada el 8 de diciembre, 1999, que es una divisional de la Solicitud U.S. No. 08/991.862, presentada el 16 de diciembre, 1997, que es una continuación en parte de la Solicitud U.S. No. 08/863.079, presentada el 23 de mayo, 1997, ahora abandonada.

Antecedentes de la invención

La proliferación y diferenciación de células en organismos multicelulares están sometidas a un proceso altamente regulado. Una característica distintiva de las células cancerosas es la ausencia de control sobre este proceso; la proliferación y diferenciación están desrreguladas lo que resulta en un crecimiento incontrolado. Se han dirigido esfuerzos de investigación significativos hacia una mejor comprensión de esta diferencia entre células normales y tumorales. Un área del foco de la investigación es los factores de crecimiento y, más específicamente, la estimulación del crecimiento autocrino.

Los factores de crecimiento son polipéptidos que portan mensajes a las células respecto al crecimiento, diferenciación, migración y expresión génica. Típicamente, los factores de crecimiento son producidos en una célula y actúan en otra célula para estimular la proliferación. Sin embargo, determinadas células malignas, en cultivo, demuestran una dependencia mayor o absoluta en un mecanismo de crecimiento autocrino. Las células malignas que presentan este comportamiento autocrino sortean la regulación de la producción de los factores de crecimiento por otras células y, por lo tanto, tienen un crecimiento no regulado.

El estudio del control del crecimiento autocrino avanza en la comprensión de los mecanismos de crecimiento celular y da lugar a avances importantes en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Con este fin, se han estudiado varios factores de crecimiento, incluyendo los factores de crecimiento semejantes a la insulina ("IGF1" e "IGF2"), péptido liberador de gastrina ("GRP"), factores de crecimiento transformantes alfa y beta ("TGF-a" y "TGF-b"), y factor de crecimiento epidérmico ("EGF").

La presente invención está dirigida a un factor de crecimiento descubierto recientemente. Este factor de crecimiento se descubrió en primer lugar en el medio de cultivo de "células PC" altamente tumorigénicas, una variante independiente de insulina aislada de la línea celular adipogénica derivada de teratoma 1246. Este factor de crecimiento se refiere en la presente memoria como "GP88". GP88 se ha purificado y caracterizado estructuralmente. La secuenciación de aminoácidos de GP88 indica que GP88 tiene similitudes en la secuencia e aminoácidos con el precursor granulina/epitelina de ratón.

Las granulinas/epitelinas ("grn/epi") son polipéptidos de 6 kDa y pertenecen a una nueva familia de polipéptidos ricos en doble cisteína. La Patente U.S. No. 5.416.192 (Shoyab et al.) está dirigida a epitelinas de 6 kDa, particularmente epitelina 1 y epitelina 2. Según Shoyab, ambas epitelinas están codificadas por un precursor común de 63,5 kDa, que se procesa en formas más pequeñas tan pronto como se sintetiza, de manera que los únicos productos naturales encontrados en muestras biológicas son las formas de 6 kDa. Shoyab et al. enseña que el precursor de epitelina es biológicamente inactivo.

A diferencia de las enseñanzas de Shoyab et al,. el laboratorio del presente inventor ha demostrado que el precursor no siempre se procesa tan pronto como se sintetiza. Los estudios, realizador en parte por este inventor, han demostrado que el precursor (es decir, GP88) se secreta de hecho como una glicoproteína de 88 kDa con un resto carbohidrato unido en N de 20 kDa. El análisis de la secuencia N terminal de GP88 indica que GP88 empieza en el aminoácido 17 del precursor grn/epi, demostrando que los primeros 17 aminoácidos de la secuencia de proteína deducida a partir del ADNc precursor corresponden a un péptido señal compatible con el direccionamiento para la localización en la membrana o para secreción. A diferencia de las enseñanzas de Shoyab et al., GP88 es biológicamente activo y tiene actividad estimuladora del crecimiento, particularmente como un factor de crecimiento autocrino para las células productoras.

El cáncer de mama es una causa principal en todo el mundo de morbilidad y mortalidad entre las mujeres. Se sabe que el estrógeno es un estimulador primario para el crecimiento de las células de cáncer de mama humano positivas para el receptor de estrógeno (ER^+) *in vivo* e *in vitro*. Aunque el estrógeno se requiere inicialmente para el establecimiento y proliferación de los tumores de mama, el desarrollo de los tumores independientes de estrógeno durante el curso del cáncer de mama es indicativo de un mal pronóstico. Se ha postulado que el efecto mitogénico del estrógeno en las células de cáncer de mama, está mediado, al menos parcialmente, por factores de crecimiento autocrinos, incluyendo factores de crecimiento regulados por estrógeno. Así, la identificación y caracterización de genes que responden a estrógeno, particularmente genes que codifican factores de crecimiento, contribuye a la comprensión de los efectos del estrógeno en las células de cáncer de mama.

El citrato de tamoxifeno ("tamoxifeno") es un antiestrógeno no esteroideo prescrito comúnmente a pacientes que padecen cáncer de mama que ha demostrado propiedades antiestrógenas y antineoplásicas potentes. Véase la

Patente U.S. No. 4.536.516. El tamoxifeno es un antagonista del receptor de estrógeno que compite con el estrógeno para la unión a los receptores de estrógeno. Otros antiestrógenos incluyen, raloxifeno, inhibidores de aromatasa (por ejemplo, Arimidex® (anastrozol), Fenera®), y reguladores a la baja del receptor de estrógeno (por ejemplo, Faslodex®). Los efectos antiestrógenos del tamoxifeno pueden estas relacionados con su capacidad de competir con el estrógeno para los sitios de unión en tejidos diana. Otros antiestrógenos, tales como inhibidores de aromatasa, inhiben o reducen la cantidad de estrógeno disponible. Por ejemplo, los inhibidores de aromatasa evitan la conversión de andrógeno en estrógeno reduciendo de esta manera la cantidad de estrógeno disponible. Los reguladores a la baja del receptor de estrógeno inhiben o reducen el número de los receptores de estrógeno en la célula.

El tamoxifeno está disponible actualmente en comprimidos de 10 y 20 mg en AstraZeneca y Barr Laboratories con el nombre comercial Nolvadex® y está indicado para cáncer de mama metastásico, terapia adyuvante de cáncer de mama, carcinoma ductal in situ, y reducción de la incidencia del cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de cáncer de mama. Así, el tamoxifeno puede usarse para tratar y prevenir varios cánceres y particularmente cáncer de mama.

La administración de tamoxifeno, sin embargo, lleva consigo riesgos potencialmente graves para el paciente. Por ejemplo, la administración de tamoxifeno se ha asociado con un riesgo incrementado de cáncer de ovario. Además, algunos pacientes presentan resistencia a los efectos beneficiosos pretendidos del tamoxifeno. Por lo tanto, la administración de tamoxifeno a un paciente que es resistente a sus beneficios causa un daño innecesario al paciente incrementando el riesgo de cáncer de ovario y, la mismo tiempo, retrasando o causando que el paciente renuncie a tratamientos más efectivos.

De acuerdo con esto, la administración de tamoxifeno debe limitarse a aquellos pacientes que más probablemente se beneficiarían del tratamiento con tamoxifeno. Una determinación exacta de si un paciente será susceptible o resistente a los efectos antineoplásicos de la administración de tamoxifeno, antes de empezar dicho curso de tratamiento, sería una herramienta de diagnóstico valiosa.

La técnica enseña actualmente que la ausencia de receptor de estrógeno en un paciente corresponde con resistencia a tamoxifeno. Los pacientes con cáncer se ensayan rutinariamente para la presencia o ausencia del receptor de estrógeno en un intento de predecir si el paciente será resistente o responderá a terapia con tamoxifeno. Tomando como base el ensayo actual, a los pacientes con cáncer que son positivos en el ensayo para la presencia de receptores de estrógeno ("ER+" o "pacientes positivos para el receptor de estrógeno") se les prescribe típicamente tamoxifeno.

Sin embargo, un número significativo de pacientes ER+ son de hecho resistentes a tamoxifeno. Así, la prescripción rutinaria de tamoxifeno para pacientes ER+ puede ser perjudicial, e incrementa el riesgo del paciente de desarrollar cáncer de ovario u otras formas de cáncer.

Resumen de la invención

El inventor ha descubierto ahora inesperadamente que una glicoproteína (GP88), que se expresa de una forma firmemente regulada en células normales, está sobreexpresada y desrregulada en células altamente tumorigénicas derivadas de las células normales, que GP88 actúa como un estimulador de crecimiento requerido estrictamente para las células tumorigénicas y que la inhibición de la expresión o acción de GP88 en las células tumorigénicas resulta en una inhibición de las propiedades tumorigénicas de las células sobreproductoras. Además, el nivel de GP88 en una célula se correlaciona directamente con la tumorigenicidad de la célula.

El inventor ha descubierto además inesperadamente que el nivel de la expresión de GP88 indica si un paciente será resistente a los efectos farmacológicos de los compuestos antiestrogénicos tales como tamoxifeno. El estado del receptor de estrógeno de las células tumorales en pacientes con cáncer de mama no proporciona información suficiente para determinar si el tamoxifeno es un curso de tratamiento apropiado o preferible en los pacientes con cáncer de mama. La presente invención proporciona una herramienta más exacta para determinar si un sujeto es resistente a tamoxifeno y, por lo tanto, representa un avance valioso en el tratamiento del cáncer.

Las realizaciones preferidas de la invención proporcionan métodos para diagnosticar tumorigenicidad de cáncer de mama que comprenden obtener una muestra biológica que contiene células de un paciente, detectar GP88 en las células de la muestra, determinar el número de células positivas o teñidas para GP88 en la muestra, y determinar la proporción de las células positivas o teñidas para GP88 respecto al número total de células en dicha muestra biológica. La proporción es indicativa de tumorigenicidad de cáncer de mama.

La presente descripción también proporciona métodos para determinar si un sujeto es resistente a los efectos anti-neoplásicos de los antiestrógenos. Según una realización particularmente preferida, GP88 se detecta en una muestra biológica que contiene células de un paciente y se determina la cantidad de GP88 en la muestra. La cantidad de GP88 en la muestra biológica es indicativa de resistencia a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno. En otra realización preferida, se determina el número de células positivas o teñidas para GP88 en una muestra biológica, y se determina la proporción de las células positivas o teñidas para GP88 respecto al número

total de células en la muestra biológica. La proporción es indicativa de resistencia a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno.

La descripción también proporciona kits para diagnosticar tumorigenicidad y determinar si un paciente es resistente a los efectos antineoplásicos de los antiestrógenos. Dichos kits comprenden preferiblemente un contenedor y un compuesto o compuestos para detectar GP88 (por ejemplo, anticuerpos anti-GP88, y sondas nucleotídicas anti-GP88).

La descripción proporciona métodos para tratar o prevenir el cáncer. Según una realización preferida, se determina la cantidad de GP88 en una muestra biológica obtenida de un paciente y se administra terapia antiestrógeno al paciente si la cantidad de GP88 en la muestra es menor de aproximadamente 5%. Alternativamente, la terapia antiestrógeno se administra a un paciente positivo para el receptor de estrógeno si la cantidad de GP88 en las muestras biológicas es menor de aproximadamente 10%. En otra realización preferida, se determina el porcentaje de células positivas para GP88 en una muestra biológica obtenida de un paciente y se administra la terapia antiestrógeno al paciente en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el cáncer si el porcentaje de células positivas o teñidas para GP88 en la muestra biológica es menor de aproximadamente 5%. Alternativamente, la terapia antiestrógeno se administra a un paciente positivo para el receptor de estrógeno si el porcentaje de células positivas o teñidas para GP88 en la muestra biológica es menor de aproximadamente 10%.

La presente descripción proporciona composiciones para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades tales como, pero no limitadas a, cáncer en el que las células presentan una expresión alterada de GP88 o respuesta alterada a GP88. El uso del término "expresión alterada" en la presente memoria significa expresión incrementada o sobreexpresión de GP88 por un factor de al menos dos veces, y a veces por un factor de 10 o más, tomando como base el nivel de ARNm o proteína comparado con las células normales correspondientes o células periféricas circundantes. El término "expresión alterada" también significa la expresión que se vuelve desrregulada o constitutiva sin estar necesariamente elevada. El uso de los términos "respuesta" incrementada o alterada de GP88 significa una afección en la que el incremento de cualesquiera funciones biológicas (por ejemplo, crecimiento, diferenciación, infectividad viral) conferidas por GP88 resulta en la misma afección o equivalente que la expresión alterada de GP88.

"Neoplasia" se refiere a crecimiento celular anormal o celular tumoral que persiste en la ausencia del estímulo de crecimiento original. El término "efecto anti-neoplásico" se refiere a la propiedad de revertir o inhibir la neoplasia. El término "cáncer" se refiere a cualquier enfermedad causada por el crecimiento celular anormal e incluye, pero no está limitado a, cáncer de mama, de ovario, de riñón, de hueso, pancreático, testicular, de hígado, de cerebro, y de piel. El término "tumorigenicidad" se refiere al grado en el que una célula o tejido presenta las características de neoplasia.

Tal y como se usa en la presente memoria, "ER" se refiere a receptor de estrógeno, a no ser que se afirme otra cosa. "PR" se refiere a receptor de progesterona, a no ser que se afirme otra cosa.

"Células positivas para GP88" o "células teñidas con GP88" se refiere a aquellas células en las que se detecta GP88. Tal y como se usa en la presente memoria, "células negativas para GP88" se refiere a aquellas células en las que no se detecta GP88. Si una célula es positiva o negativa para GP88 puede depender, en parte, de la sensibilidad del método de detección (es decir, inmunotinción, hibridación in situ, formación de imágenes). "Número total de células" se refiere al número total de células analizadas en una muestra biológica y puede incluir todas o algunas de las células presentes en una parte particular de una muestra biológica.

El término "muestra biológica" se refiere a material derivado del cuerpo de un animal vertebrado, incluyendo, pero no limitado a, sangre, suero, plasma, orina, aspirado de pezón, fluido cerebroespinal, hígado, riñón, mama, hueso, médula ósea, testículos u ovarios y cerebro, colon, y pulmón.

Tal y como se usa en la presente memoria, un sujeto que es "resistente a" terapia antiestrógeno es un paciente que no responde a o tiene una respuesta reducida o limitada a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno.

El término "terapia antiestrógeno" se refiere a la administración de compuestos que previenen la formación de o interfieren con la función del estrógeno o análogos del estrógeno. Los ejemplos de compuestos usados para la terapia antiestrógeno se refieren en la presente memoria como "antiestrógenos" e incluyen, pero no están limitados a, tamoxifeno, raloxifeno, inhibidores de aromatasa (por ejemplo, Arimidex®, Femera®), y reguladores a la baja del receptor de estrógeno (por ejemplo, Faslodex®).

El uso del término "GP88" en la presente memoria significa precursor epitelina/granulina en extractos celulares y fluidos extracelulares, y se pretende que incluya no sólo a GP88 según las secuencias de aminoácidos incluidas en las figuras 8 y 9, que tienen origen de ratón y humano, sino también GP88 de otras especies. Además, el término también incluye derivados funcionales de éste que tienen componentes adicionales tales como un resto carbohidrato incluyendo una glicoproteína u otras estructuras modificadas. Los términos "GP88" y "PCDGF" se usan indistintamente en la presente memoria. También se pretende con el término GP88 cualquier fragmento polipeptídico que tiene al menos 10 aminoácidos presentes en las secuencias mencionadas anteriormente. Las secuencias de esta longitud son útiles como antígenos y para preparar conjugados inmunogénicos con vehículos para la

producción de anticuerpos específicos para varios epítopos de la proteína completa. Dichos polipéptidos son útiles en el cribado de dichos anticuerpos y en los métodos dirigidos a la detección de GP88 en fluidos biológicos. Es muy conocido en la técnica que los péptidos son útiles en la generación de anticuerpos frente a proteínas mayores. En una realización de esta invención, se muestra que los péptidos de 12-19 aminoácidos de longitud se han usado con éxito para desarrollar anticuerpos que reconocen el GP88 de longitud completa.

El polipéptido de esta invención puede existir unido covalentemente o no covalentemente a otra molécula. Por ejemplo, puede fusionarse con uno o más polipéptidos adicionales mediante uno o más enlaces peptídicos tales como glutatión transferasa, poli-histidina, proteína fluorescente verde, etiqueta myc, u otros compuestos etiquetados (por ejemplo, biotina).

El polipéptido es suficientemente grande para comprender un determinante o epítopo antigenéticamente distinto que puede usarse como un inmunógeno para reproducir o ensayar anticuerpos frente a GP88 o un derivado funcional de éste.

Una realización incluye el polipéptido sustancialmente sin otros péptidos de mamíferos. GP88 de la presente invención puede purificarse bioquímicamente o inmunoquímicamente de células, tejidos o un fluido biológico. Alternativamente, el polipéptido puede producirse por medios recombinantes en un sistema de expresión procariota o eucariota y células huésped.

Un "fragmento" de GP88 se refiere a cualquier subconjunto de la molécula que es un péptido más corto. Esto corresponde por ejemplo pero no está limitado a regiones tales como K19T y S14R para GP88 de ratón, y E19V y A14R (equivalente a K19T y S14R murino, respectivamente) para GP88 humano.

Una "variante" de GP88 se refiere a una molécula sustancialmente similar bien al péptido completo o a un fragmento de éste. Los péptidos variantes pueden prepararse por síntesis química directa del péptido variante usando métodos conocidos en la técnica.

Alternativamente, las variantes de la secuencia de aminoácidos del péptido pueden prepararse modificando el ADN que codifica la proteína o péptido sintetizado. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones, o sustituciones de residuos en la secuencia de aminoácidos de GP88. También puede hacerse cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea la actividad deseada. La mutación que se hará en el ADN que codifica el péptido variante no debe alterar el marco de lectura y preferiblemente no creará regiones complementarias que pudieran producir estructuras secundarias de ARNm. A nivel genético, estas variantes se preparan por mutagénesis dirigida a sitio (8) de nucleótidos en el ADN que codifica la molécula peptídica produciendo de esta manera ADN que codifica la variante, y expresando posteriormente el ADN en cultivo celular recombinante. La variante presenta típicamente la misma actividad biológica cualitativa que el péptido no variante.

Un "análogo" de la proteína GP88 se refiere a una molécula no natural sustancialmente similar bien a la molécula completa o a un fragmento de ésta.

Los anticuerpos (neutralizantes y otros) se usan preferiblemente como un tratamiento para cáncer u otras enfermedades en células que presentan una expresión incrementada de GP88. Por el término "neutralizante" debe entenderse que el anticuerpo tiene la capacidad de inhibir o bloquear la actividad biológica normal de GP88, incluyendo, pero no limitado a, a capacidad de GP88 de estimular la proliferación celular, incrementar la supervivencia celular, bloquear la apoptosis, o inducir el crecimiento tumoral en animales experimentales y en seres humanos. Una cantidad efectiva de anticuerpo anti-GP88 se administra a un animal, incluyendo seres humanos, por varias rutas. En una realización alternativa, el anticuerpo anti-GP88 se usa como un diagnóstico para detectar células que presentan una expresión alterada (incrementada) de GP88 como ocurre en enfermedades tales como pero no limitado a cánceres, y para identificar células enfermas cuyo crecimiento depende de GP88 y que responderán a terapia antagonizante de GP88. En otra realización más, el anticuerpo anti-GP88 se usa para administrar compuestos tales como factores citotóxicos u oligonucleótidos antisentido a células que expresan o responden a GP88.

Debe entenderse que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o entorno específico estará dentro de las capacidades de un experto en la técnica a la vista de las enseñanzas contenidas en la presente memoria. Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta especificación, ilustran realizaciones de la invención y, conjuntamente con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. Los ejemplos de los productos de la presente invención y procesos para su uso aparecen en los ejemplos siguientes.

Descripción breve de los dibujos

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

La FIG. 1B compara el nivel de expresión del ARNm de GP88 en las líneas celulares 1246, 1246-3A y PC.. El ARNm para RPL32 se usó como un control interno para cantidades iguales de carga de ARN.

La FIG. 1C compara la expresión del ARNm de GP88 en células 1246 (panel izquierdo) y en células PC (panel derecho) en medio sin suero y que contiene suero. Los resultados muestran que la expresión de GP88 en células 1246 se inhibe por la adición de suero fetal bovino mientras dicha inhibición no se observa en las células altamente tumorigénicas PC.

La FIG. 2 ilustra el efecto del tratamiento de células altamente tumorigénicas PC con concentraciones crecientes de anticuerpo neutralizante anti-GP88.

La FIG. 3 muestra ratones C3H a los que se inyectó subcutáneamente 10^6 células PC transfectadas con GP88 antisentido (parte inferior) y células PC control transfectadas con vector vacío (parte superior).

La FIG. 4 muestra los niveles de expresión de GP88 *in vivo* en tejidos tumorales de ratones C3H y en los tejidos normales circundantes.

La FIG. 5 muestra los niveles de expresión del ARNm de GP88 en líneas celulares de carcinoma mamario humano positivas para el receptor de estrógeno y negativas para el receptor de estrógeno.

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

La FG. 7 muestra las propiedades del crecimiento y capacidad tumorigénica de células PC transfectadas con un vector de expresión controlado por un promotor de citomegalovirus que contiene GP88 en orientación antisentido y células PC transfectadas con un vector vacío.

La FIG. 8 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de GP88 de ratón. Las regiones peptídicas usadas como antígenos para producir los anticuerpos anti-GP88 K19T y S14R están subrayadas. La región clonada en la orientación antisentido en el vector de expresión de mamíferos pCMV4 está indicada entre paréntesis.

La FIG. 9A muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de GP88 humano. Entre paréntesis se indica la región clonada en la orientación antisentido en el sistema de expresión de mamíferos pcDNA3; y

La FIG. 9B muestra la secuencia de aminoácidos deducida de GP88 humano. La región E19V usada como antígeno para desarrollar anticuerpo neutralizante anti-GP88 humano está subrayada. También indica la región A14R equivalente a la región S14R de ratón.

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

La FIG. 11 muestra una representación esquemática de pCMV4 y un clon de ADNc de GP88 indicando los sitios de restricción usados para clonar el ADNc antisentido de GP88 en el vector de expresión.

La FIG. 12 muestra el entrecruzamiento de ^{125}I-rGP88 a los receptores de GP88 de la superficie celular en células CCL-64. La reacción de entrecruzamiento se realizó con suberato de disuccinimidilo (DSS). Los productos de la reacción se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 7%.

La FIG. 13 muestra el entrecruzamiento de ^{125}I-rGP88 a los receptores de GP88 de la superficie celular en fibroblastos 3T3, células PC y células epiteliales mamarias C57MG. Los resultados muestran que estas diferentes líneas celulares presentan receptores de GP88 en la superficie celular con un peso molecular similar a los de las células CCL64 (Figura 12).

La FIG. 14 muestra los niveles de expresión de GP88 en células epiteliales mamarias humanas no tumorigénicas MCF 10A y malignas (MCF7, MDA-MB-468).

La FIG. 15 muestra que la expresión de GP88 se inhibe por la transfección de ADNc antisentido de GP88 en células de carcinoma de mama humano, negativas para el receptor de estrógeno, MDA-MB-468.

La FIG. 16 muestra el efecto de PCDGF en la proliferación de células MCF-7. La Fig. 16(A) ilustra que PCDGF estimula la síntesis de ADN de células MCF-7 en ausencia de 17β-estradiol (E2). La Fig. 16(B) ilustra que el anticuerpo anti-PCDGF inhibe específicamente el efecto mitogénico de E2. Los resultados se expresan como medias ± SD de determinaciones en triplicado.

La FIG. 17 muestra el efecto de la inhibición de la expresión de PCDGF en el efecto mitogénico de E2. La Fig.17(A) ilustra la inhibición de la expresión de PCDGF por la transfección de ADNc antisentido de PCDGF en células MCF-7. La Fig. 17(B) ilustra que la inhibición de le expresión de PCDGF en células MCF-7 inhibe la actividad mitogénica de E2.

La FIG. 18 muestra que la sobreexpresión de PCDGF en células MCF-7 resulta en células que son capaces de proliferar en ausencia de E2 y que son resistentes a tamoxifeno. La Fig. 18(A) muestra la expresión de PCDGF en células O4 y células MCF-7C control. La Fig. 18(B) muestra la proliferación de células O4 y MCF-7 control en medio PFMEM desprovisto de estrógeno. La Fig. 18(C) muestra una comparación de la respuesta de células MCF-7 y O4 a tamoxifeno. Los resultados se expresan como medias ± SD.

La FIG. 19 muestra la determinación de la ruta de señalización de PCDGF en células MCF-7. La Fig. 19(A) ilustra el efecto del inhibidor de la quinasa MAP en el efecto mitogénico de PCDGF. La Fig. 19(B) ilustra la activación de la quinasa MAP por PCDGF.

La FIG. 20 muestra el efecto de PCDGF en la expresión de ciclinaD1 y c-myc en células MCF-7. La Fig. 20(A) muestra la estimulación de la expresión de la ciclina D1 por PCDGF. La Fig. 20(B) muestra el efecto de E2 y PCDGF en la expresión de c-myc.

La FIG. 21 muestra la intensidad de la tinción de GP88 con anticuerpo anti-GP88 en biopsias de cáncer de mama incluidas en parafina por inmunohistoquímica (IHC).

La FIG. 22 muestra la correlación entre el estado del receptor de estrógeno y la intensidad de la tinción de GP88 en tumores de Carcinoma Ductal Invasivo (IDC).

La FIG. 23 muestra la correlación entre la capacidad de respuesta a tamoxifeno de tumores IDC ER+ y la intensidad de la tinción de GP88. Al incrementarse la intensidad de la tinción de GP88, los tumores positivos para el receptor de estrógeno se vuelven resistentes a la terapia antiestrógeno.

Descripción detallada de la invención

Ahora se hará referencia con detalle a las realizaciones presentemente preferidas de la invención, que, junto con los ejemplos siguientes, sirven para explicar los principios de la invención.

Actividad biológica de GP88

La invención se refiere a GP88 y composiciones antitumorales y antivirales útiles para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades ligadas a la expresión alterada (incrementada) de GP88. Alternativamente, esta invención se usa para tratar y diagnosticar enfermedades ligadas a una capacidad de respuesta incrementada a GP88. Usando un sistema de modelo murino que consiste en tres líneas celulares, el inventor ha mostrado que las células que sobreexpresan GP88 forman tumores. La línea celular parental, 1246, es una línea celular adipogénica de ratón C3H que prolifera y se diferencia en adipocitos en un medio definido bajo la regulación astringente por insulina. Las células 1246 no pueden formar tumores en un animal singénico (ratón C3H) incluso cuando se inyectan a una densidad celular alta. Se aisló una línea celular independiente de insulina, 1246-3A, de células 1246 mantenidas en un medio sin insulina. Las células 1246-3A han perdido la capacidad de diferenciarse y formar tumores cuando se inyectan 10^6 subcutáneamente en ratones singénicos. Se desarrolló una línea celular altamente tumorigénica, PC, a partir de las células 1246-3A por una técnica lanzadera *in vitro-in vivo*. Las células PC formaron tumores cuando se inyectaron 10^4 células en ratones singénicos.

GP88 está sobreexpresado en líneas celulares tumorigénicas independientes de insulina respecto a la línea celular dependiente de insulina no tumorigénica parental. Además, el grado de sobreexpresión de GP88 se correlaciona positivamente con el grado de tumorigenicidad de estas células, demostrando por primera vez que GP88 es importante en la tumorigénesis (FIG. 1). Con referencia a la Figura 1, como GP88 es sintetizado por las células pero también se secreta en el medio de cultivo, el nivel de GP88 se determinó en lisados celulares y en medio de cultivo (CM). Todas las células se cultivaron en medio nutritivo DME/F12 suplementado con 2% suero fetal bovino. Cuando las células alcanzaron la confluencia, el medio de cultivo (CM) se recogió y los lisados celulares se prepararon por incubación en tampón que contenía detergente seguido de una centrifugación a 10.000 x g. El lisado celular y el medio condicionado se normalizaron por el número de células. Las muestras del lisado cellar y medio condicionado se analizaron por análisis de transferencia Western usando un anticuerpo anti-GP88, como se explica más adelante.

El desarrollo de un anticuerpo neutralizante confirmó el papel clave de GP88 en la tumorigénesis. Cuando se añadió un anticuerpo anti-GP88 dirigido a la región K19T de GP88 de ratón al medio de cultivo, el crecimiento de las células PC altamente tumorigénicas se inhibió de una forma dependiente de la dosis (FIG. 2). Con referencia a la Figura 2, las células PC se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2 x 10^4 células/pocillo en medio DME/F12 suplementado con fibronectina humana (2 µg/ml) y transferrina humana (10 µg/ml). Se añadieron concentraciones crecientes de fracción IgG anti-GP88 a los pocillos después de que las células se hubieran adherido. Las células control se trataron con concentraciones equivalentes de IgG no inmune. Dos días después, se añadieron 0,25 mCi

de ^{3}H-timidina por pocillo durante 6 hrs. Las células se recogieron para contar la ^{3}H-timidina incorporada en ADN como una medida de la proliferación celular.

Además, cuando la expresión de GP88 se inhibió específicamente por ADNc antisentido de GP88 en células PC, la producción de GP88 se redujo y estas células PC no pudieron formar ya tumores en el ratón singénico C3H. Además, estas células PC volvieron a adquirir la capacidad de respuesta a la insulina. Con referencia a la Figura 3 y las Tablas 1 y 2, se inyectaron a ratones hembra C3H subcutáneamente 10^6 células PC transfectadas con GP88 antisentido (como se explica más adelante) o 10^6 células PC transfectadas con vector vacío. Los ratones se monitorizaron diariamente para la aparición de tumores. Se hicieron fotografías 45 días después de la inyección de las células. Los resultados muestran que los ratones a los que inyectaron células PC con GP88 antisentido no desarrollan tumores, a diferencia de los ratones a los que se inyectaron células PC transfectadas con vector vacío usados como control.

Tabla 1. Comparación de las propiedades tumorigénicas de células transfectadas con GP88 antisentido, células transfectadas control y células PC

CÉLULAS INYECTADAS	DÍA PROMEDIO DE DETECCIÓN DEL TUMOR	NÚMERO DE RATONES CON TUMORES	PESO TUMORAL PROMEDIO (g)
PC	15 ± 3,0	5/5	9,0 ± 3,2
P14	15 ± 3,7	5/5	7,8 ± 2,7
ASGP88	---	0/5	---

PC: Células control no transfectadas

P-14: Células PC control transfectadas con vector vacío

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

Los tumores se escindieron y pesaron a los 45 días. --- indica sin formación de tumor.

Tabla 2. Comparación de las propiedades de células 1246, PC y células antisentido para GP88

Células 1246	Células PC	Células antisentido para GP88
Capacidad de respuesta a insulina para crecimiento y diferenciación	independiente de insulina para crecimiento diferenciación deficiente	Recuperación de la capacidad de respuesta a insulina para crecimiento (¿diferenciación?)
	Producción autocrina de factor relacionado con la insulina	
Expresión alta del receptor de insulina en la superficie celular alta	expresión muy baja del receptor de insulina en la superficie celular	expresión elevada del receptor de insulina en la superficie celular
Expresión baja de GP88	expresión de GP88 constitutivamente alta	expresión de GP88 inhibida por antisentido
Expresión de GP88 inhibida por suero	Sin inhibición por el suero	
Expresión de GP88 regulada por insulina	Expresión de GP88 constitutiva	Recuperación de la regulación por insulina para la expresión de GP88 endógeno
No tumorigénica	altamente tumorigénica	no tumorigénica

La comparación de la expresión de GP88 indica que los niveles de GP88 *in vivo* en tumores es dramáticamente mayor que en tejidos normales (FIG. 4). Se inyectaron a ratones C3H 10^6 células PC. Los ratones que portaban tumores se sometieron a eutanasia. Se recogieron los tumores, almohadillas grasas y tejido conectivo. Se prepararon lisados celulares por incubación en tampón que contenía detergente como se ha descrito anteriormente para la FIG. 1. Se determinó la concentración de proteínas de los extractos de tejido, y se analizaron cantidades equivalentes de proteínas para cada muestra por SDS-PAGE seguido de análisis por transferencia Western usando

anticuerpo anti-GP88 para medir el contenido de GP88 en los extractos de tejido. Los resultados mostraron que el nivel de GP88 en los extractos tumorales es al menos 10 veces mayor que en los tejidos conectivo y graso circundantes.

En células normales (células 1246, fibroblastos), la expresión de GP88 está regulada, en particular por insulina, e inhibida por suero fetal bovino. En las células tumorigénicas, una pérdida de regulación del crecimiento normal da lugar a la expresión incrementada de GP88 y la adquisición de dependencia de GP88 para el crecimiento. Por lo tanto, la inhibición de la expresión y/o acción de GP88 es una estrategia efectiva para la supresión de la tumorigénesis. La detección de una expresión elevada de GP88 en biopsias proporciona análisis de diagnóstico de los tumores que pueden responder a la terapia de inhibición de GP88.

GP88 también es un factor inductor de tumores en los cánceres humanos, Como se observa en la línea celular 1246-3A, se ha documentado bien (13, 14) una pérdida de la capacidad de respuesta a insulina (o a IGF-I) y un incremento concurrente de la malignidad en varios cánceres humanos incluyendo pero no limitado a cánceres de mama. Específicamente, el carcinoma de mama está acompañado de la adquisición de un bucle autocrino insulina/IGF-I, que también es el punto de partida del desarrollo de las propiedades tumorigénicas en el sistema de modelo de ratón discutido anteriormente. Además, la expresión de GP88 está elevada en los carcinomas de mama humanos. Más específicamente, con referencia a la FIG. 5, GP88 humano estaba altamente expresado en células altamente malignas independientes de insulina/IGF-I positivas para el receptor de estrógeno y también en negativas para el receptor de estrógeno. También, GP88 es un factor de crecimiento potente para las células epiteliales mamarias (FIG. 6). Los datos de la FIG. 5 se obtuvieron cultivando células MCF7, MDA-MB-453 y MDA-MB-468 en medio DME/F12 suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS). Se extrajo el ARN de cada línea celular por el método RNAzol y se preparó ARN poli-A+. La expresión del ARNm de GP88 se examinó por análisis de transferencia Northern con 3 µg de ARN poli-A+ para cada línea celular usando una sonda de ADNc de GP88 marcada con ^{32}P.

Para el análisis por transferencia Northern de la expresión del ARNm de GP88 en células o tejidos de roedores (ratón y ratas), usamos una sonda de ADNc de GP88 de ratón de 311 pb de longitud empezando en el nucleótido 551 a 862 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos 160 a 270). El ARN puede extraerse por una variedad de métodos (Sambrook, Molecular Biology manual: 35) muy conocidos para los expertos en la técnica. El método elegido fue extraer ARN usando disoluciones de RNAzol (Cinnabiotech) o Trizol (Gibco-BRL) que consisten en una única etapa de extracción con isotiocianato de guanidio y fenol-cloroformo.

Para el análisis por transferencia Northern de la expresión del ARNm de GP88 en líneas celulares humanas, se desarrolló una sonda de ADNc de GP88 humano de 672 pb correspondiente a los nucleótidos 1002 a 1674 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos 334-558) de GP88 humano. Véase el ejemplo 8 para una descripción detallada y específica del método de análisis por transferencia Northern usado en las realizaciones preferidas.

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

También se ha establecido una correlación entre la producción autocrina de IGF-I y una malignidad incrementada para glioblastomas, teratocarcinomas y carcinomas de mama. En estos cánceres, la expresión de GP88 también está elevada en tumores humanos cuando se compara con fibrobolastos humanos no tumorigénicos y otras líneas celulares humanas. GP88 estimula el crecimiento de células de carcinoma mamario.

Anticuerpos anti-GP88

La invención proporciona composiciones para tratar y diagnosticar enfermedades ligadas a la expresión incrementada de GP88. Esto también se aplicará al tratamiento y diagnóstico de enfermedades ligadas a una capacidad de respuesta incrementada a GP88. Las composiciones de esta invención incluyen anticuerpos anti-GP88 que neutralizan la actividad biológica de GP88.

La presente invención también está dirigida a un anticuerpo específico para un epítopo de GP88 y al uso de dicho anticuerpo para detectar la presencia o medir la cantidad o concentraciones de la molécula GP88, un derivado funcional de ésta o un homólogo de diferentes especies animales en una célula, un extracto celular o tisular, medio de cultivo o fluido biológico. Además, el anticuerpo puede usarse para dirigir moléculas citotóxicas a un sitio específico.

Para uso como antígeno para desarrollar anticuerpos, se obtiene la proteína GP88 producida naturalmente o expresada en forma recombinante o derivado funcional de ésta, que tiene preferiblemente al menos 9 aminoácidos, y se usa para inmunizar un animal para la producción de anticuerpo policlonal o monoclonal. Se dice que un anticuerpo es capaz de unirse a una molécula si es capaz de reaccionar con la molécula para unir de esta manera la molécula al anticuerpo. La reacción específica pretende indicar que el antígeno reaccionará de una manera

altamente selectiva con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden inducirse por otros antígenos.

El término anticuerpo en la presente memoria incluye pero no está limitado a anticuerpos policlonales humanos y no humanos, anticuerpos monoclonales humanos y no humanos (mAb), anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-IdAb) y anticuerpos humanizados. Los anticuerpos policlonales son poblaciones hetereogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas bien del suero de animales inmunizados con un antígeno o de huevos de pollo. Los anticuerpos monoclonales ("mAb") son poblaciones sustancialmente homogéneas de anticuerpos frente a antígenos específicos. Los mAb pueden obtenerse por métodos conocidos para los expertos en la técnica (por ejemplo, Patente U.S. No. 4.376.110). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de éstas. El hibridoma que produce anticuerpos humanos y no humanos frente a GP88 puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. Para la producción de una gran cantidad de mAb, el método *in vivo* es el actualmente preferido para la producción. Brevemente, se inyectan células de los hibridomas individuales intraperitonealmente en ratones Balb/c estimulados con pristano o ratones desnudos para producir fluido de ascites que contiene altas concentraciones de los mAb deseados. Los mAb pueden purificarse de dichos fluidos de ascites o de sobrenadantes de cultivo usando métodos estándar de cromatografía muy conocidos para los expertos en la técnica.

Un Ab monoclonal humano frente a GP88 humano puede prepararse inmunizando ratones transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humanos. El hibridoma producido usando linfocitos de estos animales transgénicos producirá inmunoglobulina humana en lugar de inmunoglobulina de ratón.

Como la mayor parte de los anticuerpos monoclonales derivan de fuentes murinas y otras fuentes no humanas, su eficacia clínica puede ser limitada debido a la inmunogenicidad de los mAb de roedor administrados a seres humanos, reclutamiento pobre de función efectora y aclaramiento rápido del suero. Para evitar estos problemas, las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos murinos pueden conferirse a anticuerpos humanos mediante un proceso denominado humanización. Un anticuerpo humanizado contiene las secuencias de aminoácidos para las 6 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del mAb murino parental que están injertadas en un marco de anticuerpo humano. Se ha demostrado que el bajo contenido en secuencias no humanas en los anticuerpos humanizados (aproximadamente el 5%) es efectivo para reducir la inmunogenicidad y prolongar la vida media en suero en los seres humanos. Los métodos tales como los que usan una estrategia de exposición en fagos monovalente y biblioteca combinatoria para la humanización de anticuerpos monoclonales se aplican actualmente ampliamente para la humanización de una variedad de anticuerpos y son conocidos para los expertos en la técnica. Estos anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos desarrollados con animales transgénicos como se ha descrito anteriormente son muy útiles desde un punto de vista terapéutico para varias enfermedades incluyendo pero no limitado a cáncer.

Los sobrenadantes de hibridoma y sueros se criban para la presencia de anticuerpo específico para GP88 por cualquiera de varios inmunoensayos incluyendo transferencias sobre mancha e inmunoensayos estándar (EIA o ELISA) que son muy conocidos en la técnica. Una vez que se ha identificado que un sobrenadante tiene un anticuerpo de interés, puede cribarse adicionalmente por transferencia Western para identificar el tamaño del antígeno al que se une el anticuerpo. Un experto en la técnica sabrá cómo preparar y cribar dichos hibridomas sin experimentación innecesaria con el fin de obtener un policlonal o mAb deseado.

Los anticuerpos quiméricos tienen diferentes partes derivadas de diferentes especies animales. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico podría tener una región variable de un mAb murino y una región constante de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción también son conocidos para los expertos en la técnica.

Un anti-idiotípico ("anti-IdAb") es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un anti-IdAb puede prepararse inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) que la fuente del mAb con el mAb frente al que un anti-IdAb se está preparando. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo anticuerpo frente a estos determinantes idiotípicos (el anti-IdAb). El anti-IdAb también puede usarse como un inmunógeno para producir una respuesta inmune en otro animal más, produciendo un denominado anti-anti-IdAb. El anti-anti-IdAb puede ser epitópicamente idéntico al mAb original que indujo el anti-IdAb. Así, mediante el uso de anticuerpos frente a los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos con una especificidad idéntica.

De acuerdo con esto, los mAb generados frente a GP88 pueden usarse para inducir anti-IdAb humanos y no humanos en animales adecuados. Las células del bazo de dichos ratones inmunizados se usan para producir hibridomas que secretan anti-Id mAb humanos o no humanos. Además, los anti-Id mAb pueden acoplarse a un vehículo tal como Hemocianina de Lapa (KLH) o albúmina de suero bovino (BSA) y usarse para inmunizar ratones adicionales. Los sueros de estos ratones contendrán anti-anti-IdAb humanos o no humanos que tienen las propiedades de unión del mAb original específico para un epítopo de polipéptido GP88. Los anti-Id mAb tienen así sus propios epítopos idiotípicos o idiotipos similares estructuralmente al epítopo que se está evaluando.

El término anticuerpo también se pretende que incluya tanto moléculas intactas así como fragmentos de éstas tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')2, que son capaces de unirse al antígeno. Los fragmentos Fab y F(ab')2 carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica de tejido que un anticuerpo intacto. Dichos fragmentos se producen típicamente por escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (para generar fragmentos Fab) y pepsina (para generar fragmentos F8ab')2). Se apreciará que Fab y F(ab')2 y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención pueden usarse para la detección o cuantificación de GP88, y para el tratamiento de estados patológicos relacionados con la expresión de GP88, según los métodos descritos en la presente memoria para moléculas de anticuerpo intactas.

Según la presente invención, los anticuerpos que neutralizan la actividad de GP88 *in vitro* pueden usarse para neutralizar la actividad de GP88 *in vivo* para tratar enfermedades asociadas con la expresión incrementada de GP88 o la capacidad de respuesta incrementada a GP88, tales como pero no limitado a cáncer e infección viral. Un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, que padece una enfermedad asociada con la expresión incrementada de GP88 se trata con un anticuerpo frente a GP88. Dicho tratamiento puede llevarse a cabo conjuntamente con otra terapia anti-cancerosa o anti-viral. Un régimen típico comprende la administración de una cantidad efectiva del anticuerpo específico para GP88 administrada durante un periodo de una a varias semanas e incluyendo entre aproximadamente uno a seis meses. El anticuerpo de la presente invención puede administrarse por cualquier medio que consiga su propósito pretendido. Por ejemplo, la administración puede ser por varias rutas incluyendo pero no limitado a subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal y oral. La administración parenteral puede ser por inyección en bolo o por perfusión gradual en el tiempo. Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas, que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas tales como comprimidos y cápsulas también pueden prepararse según métodos rutinarios. Se entiende que la dosificación dependerá de la edad, sexo y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si existe, frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. No se pretende que los intervalos de dosis efectivas proporcionados más adelante limiten la invención y representan meramente intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosificación más preferida se personalizará para el sujeto individual como entiende y puede determinar un experto en la técnica. La dosis total requerida para cada tratamiento puede administrarse por múltiples dosis o en una única dosis. Las cantidades efectivas son de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal y preferiblemente de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 mg/kg. El anticuerpo puede administrarse solo o conjuntamente con otros terapéuticos dirigidos a la misma enfermedad.

Según la presente invención y respecto al anticuerpo neutralizante, los anticuerpos neutralizantes de GP88 pueden usarse en todos los casos terapéuticos en los que es necesario inhibir la actividad biológica de GP88, aunque puede no ocurrir necesariamente un cambio en la expresión de GP88, incluyendo casos en los que existe una sobreexpresión de receptores de la superficie celular para GP88 y esto, a su vez, resulta en una actividad biológica incrementada, o en los que existe una alteración en las rutas de señalización o receptores de GP88 que da lugar al hecho de que las rutas de señalización están siempre "activadas". Los anticuerpos neutralizantes frente a factor de crecimiento y frente a receptores de factor de crecimiento se han usado con éxito para inhibir el crecimiento de células cuya proliferación depende de ese factor de crecimiento. Éste ha sido el caso para el receptor de IGF-I en células de carcinoma de mama humano y bombesina para cáncer de pulmón. El anticuerpo frente a GP88 también puede usarse para administrar compuestos tales como, pero no limitado a, reactivos citotóxicos tales como toxinas, oncotoxinas, mitotoxinas e inmunotoxinas, u oligonucleótidos antisentido, con el fin de dirigirlos específicamente a células que expresan o responden a GP88 (30).

Una región que permite al antígeno desarrollar un anticuerpo neutralizante frente a GP88 es la región de 19 aminoácidos definida como K19T en el GP88 de ratón, y E19V en el GP88 humano que no está localizada en las repeticiones epitelina/granulina de 6 kDa sino entre estas repeticiones, específicamente entre granulina A (epitelina 1) y granulina C (5) en lo que se considera una región variante (véase la Figura 10). Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, se cree que la región importante para la actividad biológica de GP88 se encuentra fuera de las repeticiones de epitelina.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos útiles en la presente invención también pueden usarse para detectar cuantitativamente o cualitativamente la presencia de células que expresan la proteína GP88. Esto puede conseguirse por técnicas de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo marcado con fluorescencia (véase más adelante) con detección por microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, o fluorométrica. La reacción de los anticuerpos y polipéptidos de la presente invención puede detectarse por métodos de inmunoensayo muy conocidos en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse histológicamente como en microscopía óptica, microscopía de inumunofluorescencia o inmunoelectrón, para la detección *in situ* de la proteína GP88 en muestras de tejido o biopsias. La detección *in situ* puede conseguirse retirando una muestra histológica de un paciente y aplicando el anticuerpo apropiadamente marcado de la presente invención. El anticuerpo (o fragmento) se proporciona preferiblemente aplicando o superponiendo el anticuerpo marcado (o fragmento) en la muestra biológica. Mediante el uso de dicho procedimiento, es posible determinar no sólo la presencia de la proteína GP88 sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente invención, los expertos en la técnica

percibirán fácilmente que puede modificarse cualquier variedad amplia de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) con el fin de lograr dicha detección *in situ*.

Los ensayos para GP88 comprenden típicamente incubar una muestra biológica tal como un fluido biológico, un extracto tisular, células recién recogidas o cultivadas o su medio de cultivo en presencia de un anticuerpo marcado de forma detectable capaz de identificar la proteína GP88 y detectar el anticuerpo por cualquiera de varias técnicas muy conocidas en la técnica.

La muestra biológica puede tratarse con un soporte o vehículo de fase sólida tal como nitrocelulosa u otro soporte sólido capaz de inmovilizar células o partículas celulares o proteínas solubles. El soporte puede lavarse seguido de tratamiento con el anticuerpo anti-GP88 marcado de forma detectable. Esto está seguido del lavado del soporte para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcaje unido en dicho soporte puede detectarse por medios convencionales. Por soporte en fase sólida se pretende cualquier soporte capaz de unir antígeno o anticuerpos tales como pero no limitado a vidrio, poliestireno polipropileno, nilón, celulosa modificada, o poliacrilamida.

La actividad de unión de un lote dado de anticuerpo frente a la proteína GP88 puede determinarse según métodos muy conocidos. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

La detección de la proteína GP88 o derivado funcional de ésta y de un anticuerpo específico para la proteína puede conseguirse por una variedad de inmunoensayos muy conocidos en la técnica tales como inmunoensayos ligados a enzima (ELISA) o radioinmunoensayos (RIA). Dichos ensayos son muy conocidos en la técnica y un experto en la técnica sabrá fácilmente cómo llevar a cabo dichos ensayos usando los anticuerpos anti-GP88 y la proteína GP88 de la presente invención.

Dichos inmunoensayos son útiles para detectar y cuantificar la proteína GP88 en suero u otro fluido biológico así como en tejidos, células, extractos celulares, o biopsias. En una realización preferida, la concentración de GP88 se mide en una muestra de tejido como un medio para diagnosticar cáncer u otra enfermedad asociada con una expresión incrementada de GP88.

La presencia de determinados tipos de cánceres y el grado de malignidad se dicen que son "proporcionales" a un incremento en el nivel de la proteína GP88. El término "proporcional" tal y como se usa en la presente memoria no se pretende que esté limitado a una relación lineal o constante entre el nivel de proteína y las propiedades malignas del cáncer. El término "proporcional" tal y como se usa en la presente memoria, se pretende que indique que un nivel incrementado de la proteína GP88 está relacionado con la aparición, recurrencia o presentación de propiedades malignas de un cáncer u otra enfermedad asociada con la expresión incrementada de GP88 a intervalos de concentración de la proteína que pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

Otra realización de la invención se refiere a evaluar la eficacia de un fármaco o agente anti-canceroso o anti-viral midiendo la capacidad del fármaco o agente de inhibir la expresión o producción de GP88. Los anticuerpos de la presente invención son útiles en un método para evaluar fármacos anti-cancerosos o anti-virales ya que pueden emplearse para determinar la cantidad de la proteína GP88 en uno de los inmunoensayos mencionados anteriormente. Alternativamente, la cantidad de la proteína GP88 producida se mide por bioensayo (ensayo de proliferación celular) como se describe en la presente memoria. El bioensayo e inmunoensayo pueden usarse en combinación para una evaluación más precisa.

Una realización adicional está dirigida a un ensayo para diagnosticar cánceres u otras enfermedades asociadas con un incremento en la expresión de GP88 tomando como base la medición en un tejido o fluido biológico de la cantidad de secuencias de ARNm presentes que codifican GP88 o un derivado funcional de éste, preferiblemente usando un ensayo de hibridación ARN-ADN. La presencia de determinados cánceres y el grado de malignidad es proporcional a la cantidad de dicho ARNm presente. Para dichos ensayos, la fuente de ARNm serán biopsias y tejidos circundantes. La técnica preferida para medir la cantidad de ARNm es un ensayo de hibridación usando ADN con secuencias de bases complementarias.

Otra realización relacionada está dirigida a un ensayo para diagnosticar cánceres u otras enfermedades asociadas con un incremento en la capacidad de respuesta a GP88 tomando como base la medición en una biopsia de tejido de si el tratamiento con anticuerpo neutralizante anti-GP88 inhibirá su crecimiento u otra actividad biológica.

Otra realización relacionada es un método para medir la eficacia de un fármaco o agente anti-canceroso o anti-viral que comprende las etapas de medir el efecto del agente en la inhibición de la expresión del ARNm para GP88. De manera similar, dicho método puede usarse para identificar o evaluar la eficacia de agentes antagonizantes de GP88 midiendo la capacidad de dicho agente para inhibir la producción del ARNm de GP88.

Los ensayos de detección de ácidos nucleicos, especialmente ensayos de hibridación, pueden basarse en cualquier característica de la molécula de ácido nucleico tal como su tamaño, secuencia, o susceptibilidad a digestión por endonucleasas de restricción. La sensibilidad de dichos ensayos puede incrementarse alterando la manera en la que se reporta o señala la detección al observador. Se ha desarrollado extensamente una amplia variedad de marcajes y

se han usado por los expertos en la técnica, incluyendo marcajes enzimáticos, radioisotópicos, fluorescentes, químicos y bases modificadas.

Un método para superar la limitación de sensibilidad de un ácido nucleico para la detección es amplificar selectivamente el ácido nucleico antes de llevar a cabo el ensayo. Este método se ha referido como la "reacción en cadena de la polimerasa" o PCR. (Pat. U.S. Nos. 4.683.202 y 4.582.788). La reacción de PCR proporciona un método para incrementar selectivamente la concentración de una secuencia de ácido nucleico particular incluso cuando esa secuencia no se ha purificado previamente y sólo está presente en una única copia en una muestra particular.

Componentes antisentido de GP88

Esta invención también proporciona componentes antisentido de GP88. Se ha mostrado que la expresión constitutiva de ARN antisentido en células inhibe la expresión de más de 20 genes y la lista continúa creciendo. Los posibles mecanismos para los efectos antisentido son el bloqueo de la traducción o la prevención del corte y empalme, ambos de los cuales se han observado *in vitro*. La interferencia con el corte y empalme permite el uso de secuencias intrónicas que deberían estar menos conservadas y, por lo tanto, resulta en una mayor especificidad, inhibiendo la expresión de un producto génico de una especie pero no su homólogo en otra especie.

El término componente antisentido corresponde a una secuencia de ARN así como a una secuencia de ADN que la codifica, que es suficientemente complementaria a una molécula de ARNm particular, para la que es específico el ARN antisentido, para causar hibridación molecular entre el ARN antisentido y el ARNm de manera que se inhibe la traducción del ARNm. Dicha hibridación puede ocurrir en condiciones *in vivo*. La acción del ARN antisentido resulta en la inhibición específica de la expresión génica en las células.

Según la presente invención, la transfección de células tumorigénicas con ADN antisentido para el ADNc de GP88 inhibe la expresión endógena de GP88 e inhibe la tumorigenicidad de las células transfectadas con ADNc antisentido. Este ADN antisentido debe tener una complementariedad suficiente, aproximadamente 18-30 nucleótidos de longitud, con el gen GP88 de manera que el ARN antisentido pueda hibridar con el gen GP88 (o ARNm) e inhibir la expresión del gen GP88 independientemente de si la acción es a nivel del corte y empalme, transcripción, o traducción. El grado de inhibición lo puede deducir fácilmente un experto en la técnica sin experimentación innecesaria dadas las enseñanzas de la presente memoria y preferiblemente es suficiente para inhibir el crecimiento de células cuya proliferación depende de la expresión de GP88. Un experto en la técnica reconocerá que la estrategia de ARN antisentido es sólo uno de varios mecanismos conocidos que pueden emplearse para bloquear la expresión génica específica.

Los componentes antisentido de la presente invención pueden ser capaces de hibridar con cualquiera de varias partes del ADNc de GP88 diana, incluyendo la secuencia codificadora, regiones no traducidas 3' ó 5', u otras secuencias intrónicas, o con ARNm de GP88. Como es fácilmente deducible por un experto en la técnica, la cantidad mínima de homología requerida por la presente invención es la suficiente para resultar en la hibridación al ADN o ARNm de GP88 y en la inhibición de la transcripción del ADN, o traducción o función del ARNm, preferiblemente sin afectar la función de otras moléculas de ARNm y la expresión de otros genes no relacionados.

El ARN antisentido se administra a una célula por transformación o transfección mediante un vector, incluyendo vectores retrovirales y plásmidos, en el que se ha puesto el ADN que codifica el ARN antisentido con las secuencias reguladoras apropiadas incluyendo un promotor para resultar en la expresión del ARN antisentido en una célula huésped. Se ha llevado a cabo la transfección estable de varios vectores de expresión antisentido que contienen fragmentos de ADNc de GP88 en la orientación antisentido. También pueden administrarse componentes antisentido a células usando un vector retroviral. La administración también puede conseguirse por liposomas.

Para el propósito de la tecnología antisentido para la terapia *in vivo*, el método actualmente preferido es usar oligonucleótidos antisentido, en lugar de llevar a cabo la transfección estable de un fragmento de ADNc antisentido construido en un vector de expresión. Se prefieren los oligonucleótidos antisentido que tienen un tamaño de 15-30 bases de longitud y con secuencias que pueden hibridar con cualquiera de varias partes del ADNc de GP88 diana, incluyendo la secuencia codificadora, regiones no traducidas 3' ó 5', u otras secuencias intrónicas, o con el ARNm de GP88. Las secuencias para los oligonucleótidos antisentido para GP88 se seleccionan preferiblemente como las que tienen los efectos antisentido más potentes. Los factores que gobiernan un sitio diana para la secuencia del oligonucleótido antisentido están relacionados con la longitud del oligonucleótido, afinidad de unión, y accesibilidad de la secuencia diana. Las secuencias pueden cribarse *in vitro* para potencia de su actividad antisentido midiendo la inhibición de la traducción de la proteína GP88 y el fenotipo relacionado con GP88, por ejemplo, inhibición de la proliferación celular en células en cultivo. En general, se sabe que la mayor parte de las regiones del ARN (regiones no traducidas 5' y 3', AUG de inicio, codificadoras, uniones de corte y empalme e intrones) pueden tomarse como diana usando oligonucleótidos antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido para GP88 preferidos son aquellos oligonucleótidos que son estables, tienen una alta resistencia a nucleasas (enzimas que podrían degradar potencialmente los oligonucleótidos), poseen una

farmacocinética adecuada para permitir el movimiento a tejido enfermo a dosis no tóxicas, y tienen la capacidad de cruzar a través de membranas.

Pueden usarse oligonucleótidos antisentido fósforotioato. Las modificaciones de la unión fosfodiéster así como del heterociclo o el azúcar pueden proporcionar un incremento de la eficiencia. Con respecto a la modificación de la unión fosfodiéster, puede usarse fósforotioato. Se ha descrito que una unión fósforoamidato N3'-P5' estabiliza los oligonucleótidos frente a nucleasas e incrementa la unión a ARN. La unión de ácido nucleico peptídico (PNA) es un reemplazo completo del núcleo de ribosa y fosfodiéster y es estable frente a nucleasas, incrementa la afinidad de unión a ARN, y no permite la escisión por ARNasa H. Su estructura básica también es susceptible de modificaciones que pueden permitir su optimización como un componente antisentido. Con respecto a las modificaciones del heterociclo, se ha demostrado que determinadas modificaciones del heterociclo aumentan los efectos antisentido sin interferir con la actividad ARNasa H. Un ejemplo de dicha modificación es modificación C-5 tiazol. Finalmente, la modificación del azúcar también puede considerarse. Las modificaciones 2'-O-propil y 2'-metoxietoxi ribosa estabilizan los oligonucleótidos frente a nucleasas en cultivo celular e *in vivo*. Los experimentos de cultivo celular y tumores *in vivo* usando estos tipos de oligonucleótidos dirigidos a c-raf-1 resultaron en una potencia aumentada.

La ruta de administración será la que proporcione el mejor efecto antisentido según se mide según los criterios descritos anteriormente. Los ensayos de cultivo celular *in vitro* y los ensayos de crecimiento tumoral *in vivo* usando oligonucleótidos antisentido han mostrado que la administración mediada por liposomas catiónicos, por vectores retrovirales y la administración directa son eficaces. Otro modo posible de administración es el direccionamiento usando anticuerpo frente a marcadores de la superficie celular para las células tumorales. El anticuerpo frente a GP88 o su receptor puede servir para este propósito.

GP88 recombinante

La presente invención también está dirigida a sistemas de expresión de ADN para expresar un polipéptido GP88 recombinante o un derivado funcional de éste sustancialmente sin otras secuencias de ADN de mamíferos. Dicho ADN puede ser bicatenario o monocatenario. La secuencia de ADN debe tener preferiblemente aproximadamente 20 o más nucleótidos para permitir la hibridación con otro polinucleótido. Con el fin de conseguir una mayor especificidad de hibridación, caracterizada por la ausencia de hibridación a secuencias distintas de las que codifican la proteína GP88 o un homólogo o derivado funcional de ésta, se prefiere una longitud de al menos 50 nucleótidos.

La presente invención también está dirigida a las moléculas de ADN anteriores, vehículos o vectores expresables así como huéspedes transfectados o transformados con los vehículos y capaces de expresar el polipéptido. Dichos huéspedes pueden ser procariotas, preferiblemente bacterias, o eucariotas, preferiblemente células de levadura o de mamíferos. Un sistema de vector preferido incluye baculovirus expresado en células de insecto. El ADN puede incorporarse en organismos huésped por transformación, transducción, transfección, infección o procesos relacionados conocidos en la técnica. Además de las secuencias de ADN y ARNm que codifican el polipéptido GP88, la invención también proporciona métodos para la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Además, las secuencias genéticas y oligonucleótidos permiten la identificación y clonación de polipéptidos adicionales que tienen homología de secuencia con el polipéptido GP88 descrito aquí.

Un vector de expresión es un vector que (debido a la presencia de secuencias de control apropiadas de la transcripción y/o traducción) es capaz de expresar una molécula de ADN (o ADNc) que se ha clonado en el vector y produce de esta manera un polipéptido o proteína. La expresión de la secuencia clonada ocurre cuando el vector de expresión se introduce en una célula huésped apropiada. Si se emplea un vector de expresión procariota, la célula huésped apropiada sería cualquier célula procariota capaz de expresar la secuencia clonada. De manera similar, si se emplea un sistema de expresión eucariota, la célula huésped apropiada sería cualquier célula eucariota capaz de expresar la secuencia clonada. El vector de baculovirus, por ejemplo, puede usarse para clonar ADNc de GP88 y posteriormente expresar el ADNc en células de insecto.

Una secuencia de ADN que codifica el polipéptido GP88 o sus derivados funcionales puede recombinarse con ADN de vector según técnicas convencionales incluyendo extremos romos o extremos escalonados para ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno en extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable, y ligación con enzimas ligasas apropiadas. Las técnicas para dichas manipulaciones se discuten en (35).

Una molécula de ácido nucleico es capaz de expresar un polipéptido si contiene secuencias de nucleótidos que contienen información de regulación de la transcripción y traducción y dichas secuencias están unidas de manera operativa a secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido. Una unión operativa es una unión en la que las secuencias de ADN reguladoras y la secuencia de ADN que se quiere expresar están conectadas de una manera tal que se permite la expresión génica. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar de un organismo a otro pero en general incluirán una región promotora, que en procariotas contiene tanto el promotor (que dirige el inicio de la transcripción a ARN) así como las secuencias de ADN que cuando se transcriben en ARN señalarán el inicio de la síntesis de proteínas. Dichas regiones incluirán normalmente aquellas secuencias no codificadoras en 5' implicadas en el inicio de la transcripción, traducción tal como la caja TATA, secuencia casquete ("capping"), secuencia CAAT y semejantes.

Si se desea, la región no codificadora en 3' de la secuencia génica que codifica la proteína puede obtenerse por métodos descritos (cribado de biblioteca de ADNc apropiada o amplificación por PCR). Esta región puede retenerse para la presencia de secuencias reguladoras de la terminación de la transcripción tales como terminación y poliadenilación. Así, reteniendo la región 3' que es naturalmente contigua a la secuencia de ADN que codifica la proteína, pueden proporcionarse las señales de terminación de la transcripción. Cuando no se proporcionan señales de terminación de la transcripción o satisfactoriamente funcionales en las células huésped de expresión, entonces puede sustituirse una región 3' de otro gen.

Dos secuencias de ADN tales como una secuencia de región promotora y una secuencia codificadora de GP88 se dice que están unidas de manera operativa si la naturaleza de la unión entre las secuencias no resulta en la introducción de una mutación de desplazamiento de marco o interfiere con la capacidad de la secuencia promotora de dirigir la transcripción de la secuencia del gen del polipéptido.

Las secuencias promotoras pueden ser procariotas, eucariotas o virales. Los promotores adecuados son inducibles, reprimibles o constitutivos. Los ejemplos de promotores procariotas adecuados están revisados por.

Los promotores eucariotas incluyen pero no están limitados al promotor para el gen de metalotioneína I de ratón, el promotor TK del Virus del Herpes, el promotor del gen gal4, el promotor temprano de SV40, el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), y el promotor de citomegalovirus (CMV). Se prefieren los promotores fuertes. Los ejemplos de dichos promotores son aquellos que reconocen las polimerasas T3, SP6 y T7, el promotor PL del bacteriófago lambda, el promotor recA, el promotor del gen de metalotioneína I de ratón, el promotor de SV40 y el promotor de CMV.

Métodos de diagnóstico

La invención también proporciona métodos de diagnóstico de GP88 para determinar la tumorigenicidad y también métodos de diagnóstico para determinar si un paciente es resistente a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno. Como se ha descrito anteriormente, los niveles elevados de GP88 son indicativos de tumorigenicidad incrementada. Además, los inventores han descubierto inesperadamente que los niveles incrementados de GP88 son indicativos de resistencia a los efectos antineoplásicos de antiestrógenos.

La terapia antiestrógeno interfiere o inhibe la función o síntesis de estrógeno. Por ejemplo, tamoxifeno interfiere con la unión de estrógeno a su receptor. Los inhibidores de aromatasa, tales como anastrozol, interfieren con enzimas que catalizan la conversión de andrógenos en estrógenos disminuyendo de esta manera los niveles de estrógeno.

Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría, creemos que los niveles elevados de GP88 contribuyen a la conversión de una célula de un crecimiento dependiente de estrógeno a independiente de estrógeno. Las células independientes de estrógeno son insensibles a la presencia o ausencia de estrógeno y, por lo tanto, no se ven afectadas por la terapia antiestrógeno. Previamente, la presencia del receptor de estrógeno se usó como un marcador de pronóstico muy necesario para resistencia a la terapia antiestrógeno. Sin embargo, al incrementarse los niveles de GP88 y conseguir la célula un crecimiento independiente de estrógeno, la presencia o ausencia del receptor de estrógeno no será ya suficiente para indicar si el paciente responderá a la terapia antiestrógeno. El nivel de GP88, y concomitantemente y teóricamente, la independencia de estrógeno, en lugar de la presencia del receptor de estrógeno, sirve como un marcador de pronóstico aumentado y más exacto, más temprano y fiable, para si un paciente será resistente o responderá a la terapia antiestrógeno. Como se ha explicado anteriormente, este nuevo marcador de pronóstico es particularmente valioso dada la propensión muy conocida de los antiestrógenos tales como tamoxifeno de causar cáncer de ovario en pacientes, particularmente aquellos que son, hasta la presente invención, resistentes desconocidos a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno.

Las realizaciones preferidas de la invención están dirigidas a métodos para determinar si un paciente es resistente a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno. La proteína GP88 o el polinucleótido que codifica GP88 se detecta en muestra(s) biológica(s) de un paciente, y se determina el número de células positivas para GP88 en la muestra y la proporción de células positivas para GP88 comparado con el número total de células. La proporción de células positivas para GP88 frente al número total de células es indicativa de si el paciente es resistente a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno. Alternativamente, puede determinarse la cantidad de GP88 en una muestra biológica detectando GP88 en una muestra biológica y extrapolando la cantidad de GP88 de una curva estándar generada a partir de la detección de cantidades conocidas de la proteína o ácidos nucleico GP88 ("técnica de la curva estándar"). La técnica de la curva estándar es un método preferido para medir la cantidad de GP88 en una muestra biológica no susceptible fácilmente para detectar GP88 en un número discreto de células. Por ejemplo, la cantidad GP88 en un fluido biológico (por ejemplo, suero o fluido cerebroespinal) puede determinarse usando la técnica de la curva estándar. La cantidad de GP88 en una muestra biológica es indicativa de si el paciente es resistente a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno.

Las muestras biológicas preferidas incluyen, pero no están limitadas a, sangre, fluido cerebroespinal, suero, plasma, orina, aspirado de pezón, hígado, riñón, mama, hueso, frotis de médula ósea, testículos, cerebro, ovario, piel, o pulmón. La muestra biológica puede tener cualquier tamaño, forma o tipo de tejido e incluye cualquier número de células y/o tipos celulares. La muestra biológica puede comprender células no tumorigénicas y células

tumorigénicas. Las células no tumorigénicas pueden incluir, sin limitación, células estromales o epiteliales de tejido normal, tejido periférico, carcinoma lobular benigno, hiperplasia epitelial y cualquier otra lesión benigna. La muestra biológica puede comprender fluido biológico que contiene células o tejido.

Como se ha descrito anteriormente, la proteína GP88 puede detectarse por cualquier método adecuado, incluyendo inmunotinción (por ejemplo, tinción inmunohistoquímica), transferencia western, cromatografía, micromatriz, separador celular usando un anticuerpo anti-GP88. Preferiblemente, el anticuerpo anti-GP88 está marcado (por ejemplo, marcaje fluorescente, biotina, marcajes enzimáticos, radioisotópicos, fluorescentes, y químicos) para uso en un sistema de detección adecuado. La detección de la proteína GP88 o derivados funcionales de ésta también puede conseguirse por una variedad de técnicas de formación de imágenes de diagnóstico. El término "formación de imágenes de diagnóstico" se refiere a cualquier técnica para diagnosticar una enfermedad empleando una molécula marcada para la detección de una proteína o ácido nucleico marcador en un sistema de formación de imágenes (por ejemplo, formación de imágenes por resonancia magnética, ultrasonidos, etc.). La formación de imágenes con anticuerpo usando anticuerpos monoclonales radiomarcados está disponible para el diagnóstico de una variedad de cánceres (por ejemplo, cáncer de colon, próstata, pulmón, y ovario). Los ejemplos de los sistemas de formación de imágenes para diagnóstico incluyen sistemas de formación de imágenes con anticuerpos monoclonales tales como el sistema de formación de imágenes con anticuerpos monoclonales OncoScint® que se usa actualmente para escanear o formar imágenes del cuerpo para el diagnóstico del cáncer. Los anticuerpos monoclonales pueden emplearse en tecnologías de escaneo convencionales tales como MRI o ultrasonidos para detectar específicamente GP88 y determinar la cantidad de GP88 o el número de células positivas para GP88 en una muestra biológica.

El ácido nucleico de GP88 puede detectarse con un ácido nucleico de GP88 antisentido por cualquier ensayo de detección adecuado (por ejemplo, hibridación in situ, hibridación fluorescente in situ, Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa, Transferencia Northern, Transferencia Southern, Transferencia Southwestern, ensayo de protección de ARNasa, micromatriz) con anti-ácido nucleico GP88 (por ejemplo, sonda de ADNc de GP88). Preferiblemente, el anti-ácido nucleico GP88 se marca usando, por ejemplo, un marcaje enzimático, radioisotópico, fluorescente, o químico.

Las células positivas para GP88 pueden contarse por cualquier método adecuado conocido para los expertos en la técnica (por ejemplo, examen microscópico, MRI, ultrasonidos, análisis FACS, detección luminex, micromatriz de anticuerpo, escáner digital, y sistemas de separador celular). Por ejemplo, el número de células positivas para GP88 en una muestra biológica puede determinarse construyendo un índice de GP88 de una manera similar al índice Ki-67. Ki-67 es un marcador de ADN polimerasa indicativo de la tasa de proliferación de tejidos. Se determina el número de células positivas para Ki-67, y se expresa como el porcentaje de células con tinción positiva para Ki-67 por 1.000 células contadas. Preferiblemente, se cuentan las células con tinción positiva para GP88 y se expresan como el porcentaje de células con tinción positiva para GP88 por 1.000 células contadas. Sin embargo, puede contarse cualquier número de células. Por ejemplo, puede preferirse contar más de 1.000 células con el fin de obtener una muestra más representativa de células de un paciente. Puede preferirse contar menos de 1.000 células si la muestra parece ser representativa de varios tipos celulares y está disponible una cantidad limitada de muestra para el análisis.

Para los métodos para determinar si un paciente es resistente a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno, la presencia e intensidad de la tinción de GP88 en una muestra biológica se gradúa preferiblemente como sigue: menos de aproximadamente 5% de células positivas para GP88 se considera negativo; aproximadamente 10-25% de células positivas para GP88 se considera débilmente positivo (1+); aproximadamente 25-50% de células positivas para GP88 (2+) se considera moderadamente positivo; y más de aproximadamente 50% de células positivas para GP88 se considera fuertemente positivo (3+) para GP88. El porcentaje de células positivas para GP88 para cada grado puede reajustarse dependiendo del tamaño del combinado de la muestra biológica y/o la técnica de detección usada para identificar GP88 (por ejemplo, inmunotinción, hibridación in situ, hibridación in situ fluorescente (FISH), reacción en cadena de la polimerasa inversa, transferencia northern, transferencia western, transferencia southwestern, etc.). Por ejemplo, el porcentaje de células positivas o teñidas para GP88 para cada grado puede ajustarse hacia abajo cuando se usa una técnica más sensible para detectar GP88 o un combinado de muestra biológica mayor. Según una realización preferida de la invención, un porcentaje de células positivas o teñidas para GP88 de al menos aproximadamente 5%, más preferiblemente 10% y lo más preferiblemente 25% es indicativo de resistencia a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno. En otra realización preferida, un porcentaje de al menos aproximadamente 10% de células positivas o teñidas para GP88 en pacientes positivos para el receptor de estrógeno es indicativo de resistencia a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno.

La invención también proporciona métodos para diagnosticar tumorigenicidad que comprenden obtener una muestra biológica de un paciente, detectar la proteína GP88 o el polinucleótido que codifica GP88 en la muestra biológica, determinar el número de células positivas o teñidas para GP88 en la muestra y la proporción de células positivas o teñidas para GP88 comparado con el número total de células en una muestra dada. La proporción de células positivas o teñidas para GP88 respecto al número total de células es indicativa de tumorigenicidad. La detección de GP88 en muestras biológicas de lleva a cabo preferiblemente como se ha descrito anteriormente con referencia a los métodos para determinar si un paciente es resistente a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno.

En una realización preferida de la invención, se construye una escala de graduación de la intensidad de la tinción de GP88 tomando como base el porcentaje de células positivas para GP88 según las técnicas de escala de intensidad estándar conocidas en la técnica. Para los métodos del diagnóstico de tumorigenicidad, la intensidad de la tinción de GP88 en una muestra biológica se gradúa preferiblemente como sigue: menos de aproximadamente 1% de células teñidas para GP88 se considera negativo ó 0; 1-5% de células teñidas para GP88 se considera débilmente positivo para GP88 (1+); aproximadamente 5-25% de células teñidas para GP88 (2+) se considera moderadamente positivo; y más de aproximadamente 25% de células teñidas para GP88 (3+) se considera fuertemente positivo para GP88. El porcentaje de células teñidas para GP88 para cada grado se reajusta dependiendo del tamaño del combinado de la muestra biológica y la técnica de detección usada para identificar GP88 (por ejemplo, inmunotinción, hibridación in situ, hibridación in situ fluorescente (FISH), reacción en cadena de la polimerasa inversa, transferencia northern, transferencia western, transferencia southwestern, etc.). Por ejemplo, el porcentaje de células teñidas para cada grado puede ajustarse hacia abajo cuando se usa una técnica más sensible para detectar GP88 o cuando se incrementa el combinado de muestra biológica. Según una realización preferida de la invención, un porcentaje de células teñidas para GP88 de al menos 1% es indicativo de tumorigenicidad.

La presente invención también está dirigida a kits para diagnosticar la tumorigenicidad o para determinar si un paciente es resistente a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrógeno. Los kits preferidos de la invención comprenden un contenedor y una molécula para detectar GP88 (por ejemplo, anticuerpo anti-GP88, sonda de ADNc de GP88, sonda oligomérica de GP88). Los kits también pueden incluir reactivos para inmunotinción o hibridación in situ de muestras biológicas. En una realización preferida, los kits de la invención incluyen reactivos para llevar a cabo un inmunoensayo ligado a enzima ("ELISA") (por ejemplo, anticuerpos anti-GP88, GP88 recombinante conjugado o no conjugado para generar una curva estándar, y un sustrato para la detección). Otra realización preferida incluye reactivos para llevar a cabo el método de la reacción en cadena de la polimerasa inversa para detectar la presencia de polinucleótidos de GP88.

La invención también proporciona métodos para tratar o prevenir el cáncer, tal como cáncer de mama, que comprenden determinar la cantidad de GP88 o el porcentaje de células positivas para GP88 en una muestra biológica obtenida de un paciente, y administrar tamoxifeno en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el cáncer de mama si el porcentaje de células positivas o teñidas para GP88 en dicha muestra de tejido de mama es menor de aproximadamente 5%. En otra realización preferida de la invención, se administra tamoxifeno, u otra terapia antiestrógeno, a un paciente positivo para el receptor de estrógeno si el porcentaje de células positivas o teñidas para GP88 en la muestra biológica es menor de aproximadamente 10%. Si el porcentaje de células positivas o teñidas para GP88 es mayor del 5%, puede administrarse terapia anti-GP88 (es decir, uso de anticuerpos anti-GP88 o polinucleótidos antisentido para GP88) para restaurar la sensibilidad a la terapia antiestrógeno. La cantidad de antiestrógeno suficiente para tratar o prevenir el cáncer se determina caso por caso. Las directrices respecto a la administración de la terapia antiestrógeno (por ejemplo, Nolvadex®, raloxifeno, inhibidores de aromatasa, reguladores a la baja del receptor de estrógeno, etc.) a un paciente están disponibles fácilmente y son conocidas para el médico responsable.

Debe entenderse que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o entorno específico estará dentro de la capacidad de un experto en la técnica a la vista de las enseñanzas contenidas en la presente memoria. La presente invención se ilustra más exhaustivamente por los ejemplos no limitativos siguientes.

Ejemplo 1

Mediación del efecto mitogénico del estrógeno en células de cáncer de mama humano MCF-7 por el factor de crecimiento derivado de células PC (GP88).

En las células positivas para el receptor de estrógeno, 17-β-estradiol (E2), un compuesto para reemplazar el estrógeno, estimuló transcripcionalmente la expresión de PCDGF de una manera dependiente de la dosis y del tiempo. Demostramos aquí que PCDGF media el efecto mitogénico del estradiol (E2) en células MCF-7. PCDGF sustituyó a E2 para estimular la síntesis de ADN. El efecto mitogénico de E2 se inhibió de una manera dependiente de la dosis por anticuerpo neutralizante anti-PCDGF. La inhibición de la expresión de PCDGF en células MCF-7 por la transfección de antisentido también inhibió el efecto mitogénico de E2. Por el contrario, la sobreexpresión de PCDGF en células MCF-7 resultó en células que eran capaces de proliferar en ausencia de estrógeno y eran resistentes a tamoxifeno. Como E2, PCDGF estimuló la actividad proteína quinasa activada por mitógeno. PCDGF podría sustituir a E2 en la estimulación de la expresión de la ciclina D1. La estimulación de la ciclina D1 por E2 se inhibió un 50% por anticuerpo anti-PCDGF. Por el contrario, PCDGF no estimuló la expresión de c-myc, otra diana molecular de E2. Concluimos que PCDGF autocrino media el efecto mitogénico de E2 a través de la estimulación de la ciclina D1.

El cribado de líneas celulares tumorales humanas para la expresión de PCDGF indicó que estaba altamente expresado en carcinomas de mama humanos negativos para el receptor de estrógeno (ER^-). La inhibición de la expresión de PCDGF en estas células por transfección con ADNc antisentido de PCDGF resultó en un 90% de inhibición de la incidencia tumoral y tamaño tumoral cuando se inyectó a ratones desnudos. Estos datos implicaron a PCDGF en el mantenimiento del fenotipo tumoral. Como se ha indicado anteriormente, en células ER+, el PCDGF producido en respuesta a la estimulación del receptor de estrógeno media la actividad mitogénica de E2. Cuando

PCDGF está sobreexpresado, las células se vuelven independientes para estrógeno y resistentes a los efectos antineoplásicos de los antiestrógenos.

Resultados

PCDGF estimula la síntesis de ADN de células MCF-7 en ausencia de estrógeno

En primer lugar, examinamos si la adición de PCDGF estimulaba la síntesis de ADN de células MCF-7 mantenidas en ausencia de E2. En estas condiciones, la producción endógena de PCDGF era muy baja. Se observó un incremento de 2 veces en la incorporación de ^{3}H-timidina sobre el control (células mantenidas en ausencia de E2 y PCDGF) (P<0,01) a 10 ng/ml de PCDGF (Fig. 16A). La Fig. 16A ilustra que PCDGF estimula la síntesis de ADN de células MCF-7 en ausencia de E2. Las células MCF-7 (10^{6} células por pocillo) se plaquearon en una mezcla 1:1 de DMEM y medio de Ham F-12 más 5% FBS. Después de 48 h, el medio se reemplazó con PFMEM, seguido de 24 h después de medio α-MEM sin suero. Se añadieron concentraciones crecientes de PCDGF humano en triplicado al medio. EtOH solo (CON) ó 10^{-9} M E2 (E2) se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente. Se añadió ^{3}H-timidina (1 µCi/ml) 24h después durante 5h. Los resultados se expresan como medias ± SD de determinaciones en triplicado. Se observó una estimulación máxima de 4 veces con 100 ng/ml de PCDGF (P<0,001) similar a la observada con 10^{-9} M E2. PCDGF estimuló la síntesis de ADN de otra línea celular ER^{+}, T47D. Se observó una estimulación de 2,9 ± 0,3 veces de la síntesis de ADN con 100 ng/ml de PCDGF.

El efecto mitogénico de E2 se inhibe por el tratamiento de las células con anticuerpo anti-PCDGF. Tomando como base estos resultados y dado que E2 estimula la expresión de PCDGF en células MCF-7, determinamos si el PCDGF endógeno podía mediar el efecto mitogénico de E2 a través de un bucle autocrino. Para este propósito, en primer lugar examinamos si el tratamiento con anticuerpo anti-PCDGF que bloquea el PCDGF producido por las células MCF-7 inhibiría la actividad mitogénica de E2. La adición de anticuerpo anti-PCDGF humano purificado por afinidad inhibió de una manera dependiente de la dosis el crecimiento de las células estimuladas con E2 (FIG. 16B). La Figura 16B ilustra que el anticuerpo anti-PCDGF inhibe específicamente el efecto mitogénico de E2. Las células MCF-7 se trataron con 10^{-9} M E2 (E2) solo o con concentraciones crecientes de anticuerpo anti-PCDGF purificado por afinidad: 50 µg/ml (Ab1), 100 µg/ml (Ab2), 200 µg/ml (Ab3) y 300 µg/ml (Ab4). Las células tratadas con 10^{-9} M E2 y 300 µg/ml de IgG preinmune (preIgG) y las células tratadas con 10 ng/ml de IGF-II (IGF) solo o en presencia de 300 µg/ml de anticuerpo anti-PCDGF (Ab+IGF) se usaron como controles. Los resultados se expresan en la figura como medias ± SD de determinaciones en triplicado. Se observó una inhibición del 74% del efecto mitogénico de E2 con 300 µg/ml de anticuerpo anti-PCDGF (P<0,003), mientras una concentración similar de IgG no inmune no tuvo efecto. Esta concentración de anticuerpo no presentó toxicidad celular. La adición de PCDGF (200 ng/ml) restauró la proliferación de las células tratadas con anticuerpo anti-PCDGF. La especificidad del efecto del anticuerpo de PCDGF también se demostró ya que no pudo inhibir el efecto estimulador del factor de crecimiento semejante a la insulina II, un estimulador del crecimiento conocido de las células MCF-7. Estos resultados muestran que PCDGF actúa como un factor de crecimiento autocrino para mediar el efecto mitogénico de E2 para las células MCF-7.

La inhibición de la expresión de PCDGF inhibe el crecimiento de las células MCF-7 en presencia de E2. A continuación, intentamos determinar si la inhibición de la expresión de PCDGF en las células MCF-7 evitaría el efecto estimulador del crecimiento de E2. Para este propósito, examinamos el efecto mitogénico de E2 en las células MCF-7 en las que la expresión de PCDGF se había inhibido con la transfección de ADNc antisentido de PCDGF. Se determinaron los niveles de PCDGF en dos clones antisentido representativos As13 y As22, y las células MCF-7 control transfectadas con el vector vacío (MCF-7C) por análisis de transferencia Western de muestras preparadas usando números de células idénticos (FIG. 17A). La Figura 17A ilustra la inhibición de la expresión de PCDGF por la transfección de ADNc antisentido de PCDGF en células MCF-7. La expresión de PCDGF en células transfectadas con antisentido (As13 y As22) y el vector control vacío (MCF7-C) se examinó por análisis de transferencia Western. Las células AS13 (carril 1), AS22 (carril 2) y MCF-7C (carril 3) se trataron con 10^{-9} M E2 en PFMEM. El medio condicionado se recogió después de 24h y se normalizó para el mismo número de células ($4x10^{6}$ células) para la medida de la expresión de PCDGF. Las células As13 presentaron un 80% de inhibición de la expresión de PCDGF, mientras As22 mostraron un 50% de inhibición cuando se comparó con las células MCF-7C.

El efecto de E2 en la síntesis de ADN se examinó en estas células MCF-7C antisentido y control. Un ensayo de incorporación de [^{3}H]timidina mostró que el efecto estimulador de E2 en las células MCF-7C se había reducido en AS13 y AS22 en correlación con el grado de inhibición de la expresión de PCDGF (FIG. 17B). La Figura 17B ilustra que la inhibición de la expresión de PCDGF en las células MCF-7 inhibe la actividad mitogénica de E2. El efecto mitogénico de E2 se examinó en las células MCF-7C antisentido y control. Las células AS13 (barras llenas), AS22 (barras rayadas), y MCF-7C (barras abiertas) se trataron con 10^{-9} M E2 (E2), 100 ng/ml de PCDGF recombinante (PCDGF) ó 0,1% EtOH solo (Con). Se midió la incorporación de ^{3}H-timidina como se ha descrito anteriormente. Los resultados se expresan en la figura como medias ± SD. AS13 mostraron la mayor inhibición del efecto de E2. La síntesis de ADN mediada por E2 fue sólo 25% (P<0,001) en AS13 y 60% (P<0,001) en AS22, respectivamente, de la observada en las células MCF-7C. La adición de PCDGF restauró la proliferación de los clones antisentido al nivel encontrado en las células MCF-7 control cultivadas en presencia de E2.

La sobreexpresión de PCDGF da lugar a independencia de estrógeno y resistencia a tamoxifeno

Tomando como base los resultados anteriores, examinamos el efecto de la sobreexpresión constitutiva de PCDGF en células MCF-7 ER^+ en su capacidad de respuesta a estrógeno y tamoxifeno. Las células MCF-7 se transfectaron con un vector de expresión pcDNA3 que contenía ADNc de PCDGF bajo el control del promotor de citomegalovirus. Se obtuvieron varios clones que sobreexpresaban PCDGF incluyendo un clon representativo denominado O4. La FIG. 18A muestra que las células O4 producían niveles elevados de PCDGF cuando se compara con las células MCF-7C control en medio desprovisto de E2. La FIG. 18A ilustra la expresión de PCDGF en células O4 y células MCF-7C control. Las células O4 y MCF-7 control con vector vacío se cultivaron en PFMEM. El medio condicionado se recogió después de 24h para determinar la expresión de PCDGF.

La incorporación de timidina en las células O4 fue 2,2 veces mayor que en las células MCF-7C (P<0,01) demostrando la capacidad de las células O4 de proliferar en ausencia de E2 (FIG. 18B). La Figura 18B muestra la proliferación de las células O4 y MCF-7 control en medio PFMEM desprovisto de estrógeno. Las células se plaquearon en triplicado en medio PFMEM desprovisto de estrógeno. Las células bien se mantuvieron en ausencia de E2 (controles: Con) o se trataron durante 24 horas bien con 10^{-9} M E2 o con 200 ng/ml de PCDGF. Se añadió ^{3}H-timidina para medir la síntesis de ADN. Los resultados se expresan como medias ± SD. Además, no hubo una diferencia significativa entre el nivel de incorporación de timidina para células O4 en medio desprovisto de E2 y para células MCF-7C tratadas bien con PCDGF o E2 (P>0,05). La adición de E2 o PCDGF a células O4 no tuvo ningún efecto adicional significativo a diferencia de las células MCF-7C. En los ensayos de crecimiento a largo plazo, mientras las células MCF-7C no pudieron crecer en ausencia de E2, las células O4 proliferaron con un tiempo de duplicación de 42 h, cercano al tiempo de duplicación de 36 h de las células MCF-7C en presencia de E2. Estos datos indican que la sobreexpresión de PCDGF proporcionó una ventaja para el crecimiento en ausencia de E2.

Tomando como base estos resultados, se examinó la capacidad de respuesta a tamoxifeno de las células O4 y MCF-7C. La Figura 18C muestra una comparación de la respuesta de las células MCF-7 y O4 a tamoxifeno. Las células MCF-7C (barras llenas) y las células O4 (barras abiertas) recibieron 10^{-9} M E2 solo o en presencia de concentraciones crecientes de tamoxifeno. También se examinaron células MCF-7C tratadas con 200 ng/ml de PCDGF humano y 1 µM tamoxifeno (T+P). La síntesis de ADN se midió como se describe en la figura 16. Los resultados se expresaron como el porcentaje de los valores de la síntesis de ADN en células tratadas con E2 solo. El tamoxifeno inhibió la proliferación de las células MCF-7C de una manera dependiente de la dosis con un 60% de inhibición del efecto de E2 a 100 nM, un 80% de inhibición a 500 nM y una inhibición máxima de 90% a 1 µM de tamoxifeno (FIG. 18C). Por el contrario, las células O4 presentaron una capacidad de respuesta a tamoxifeno muy disminuida, ya que su proliferación no se vio afectada por 100 nM tamoxifeno, mientras sólo se observó un 20% y 55% de inhibición del efecto de E2 a 500 nM y 1 µM de tamoxifeno, respectivamente (P<0,001). De forma interesante, la adición de PCDGF a las células MCF-7 redujo la inhibición de tamoxifeno de 90% a 38% (P<0,0001). Estos datos muestran que PCDGF puede superar la inhibición de tamoxifeno y que la expresión incrementada de PCDGF en las células MCF-7 da lugar a resistencia a tamoxifeno.

El estado de otros parámetros asociados con la capacidad de respuesta a estrógeno, tales como expresión del receptor de estrógeno, activación de un elemento de respuesta a estrógeno por E2, y estimulación de la expresión del ARNm del receptor de progesterona por E2, se evaluó en todas las células transfectadas. No se observó ninguna diferencia en estos ensayos entre las células antisentido, control y que sobreexpresaban PCDGF (datos no mostrados). Estos datos indican que los cambios en la respuesta proliferativa a E2 observados en las células antisentido o con sobreexpresión no eran debidos a una alteración global en el número o función de ER sino que se correlacionaban con cambios en la expresión de PCDGF.

PCDGF estimula la síntesis de ADN en células MCF-7 a través de la activación de la ruta de la Proteína Quinasa Activada por Mitógeno ("quinasa MAP")

A continuación, examinamos las rutas de transducción de la señal estimuladas por PCDGF en las células MCF-7, en comparación con E2. Se ha mostrado que E2 estimula la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular. Ahora se han elucidado algunas de las dianas moleculares subyacentes. Se sabe que E2 estimula la actividad de la quinasa MAP en las células MCF-7. Aguas abajo, E2 activa la ruta c-myc y los complejos ciclcina tipo D/cdk. Estudios recientes han postulado que las rutas c-myc y ciclina D1 se activaban independientemente por E2 en células de cáncer de mama. Así, intentamos determinar si PCDGF podría reemplazar a E2 para estimular las rutas de quinasa MAP, ciclina D1 y/o c-myc en las células MCF-7.

Dos estrategias mostraron la implicación de la quinasa MAP en la mediación de la acción de PCDGF en las células MCF-7. En primer lugar, el efecto estimulador de PCDGF en la síntesis de ADN se inhibió de una manera dependiente de la dosis por el inhibidor MEK PD098059 (FIG. 19A), La Fig. 19A muestra el efecto del inhibidor de la quinasa MAP en el efecto mitogénico de PCDGF. Las células MCF-7 se cultivaron como se describe en la figura 16. Las células se pretrataron durante 60 min con 10 µM (PD10) ó 30 µM (PD30) de PD098059 antes de la adición de vehículo solo (Con) ó 100 ng/ml de PCDGF recombinante humano solo (P). Los datos de la incorporación de timidina se presentan como medias ± SD. El efecto de PCDGF se suprimió casi completamente con 10 µM de PD098059. Se observó una inhibición completa con 30 µM de PD098059, una concentración que se sabe que inhibe completamente la actividad de la quinasa MAP en otros sistemas. En segundo lugar, usando un ensayo in vitro de quinasa MAP, mostramos que PCDGF (200 ng/ml) causó un incremento de tres veces en la actividad de la quinasa MAP en las células MCF-7 (FIG. 19B). Este efecto fue suprimido por PD098059 (30 µM). La Fig. 19B ilustra la

activación de la quinasa MAP por PCDGF. Las células se cultivaron en medio PFMEM durante 24h seguido de medio α-MEM sin suero. Las muestras examinadas fueron: células MCF-7 tratadas durante 10 minutos con 0,50 ng/ml y 200 ng/ml de PCDGF humano, (carriles 1-3, respectivamente; y células MCF-7 tratadas durante 10 minutos con 200 ng/ml de PCDGF y 30 μM de PD098059 (carril 4). El ensayo de quinasa se realizó como se describe en la presente memoria. La intensidad de las bandas MBP fosforilada se analizó por escaneo densitométrico. Se usó una cantidad igual de sobrenadante original para comprobar la expresión de la quinasa MAP (Erk1 y Erk2) como un control interno para normalizar la actividad de la quinasa MAP.

PCDGF estimula la expresión de ciclina D1 pero no de c-myc en las células MCF-7

Se llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto de PCDGF en la expresión de la ciclina D1. PCDGF estimuló de manera dependiente del tiempo la expresión de la ciclina D1 en las células MCF-7 alcanzando un máximo de 4 veces sobre los controles no tratados después de 5h (FIG. 20A). El efecto estimulador de la ciclina D1 fue suprimido por PD98095 de una manera idéntica a su inhibición del efecto mitogénico de PCDGF. La Figura 20A muestra la estimulación de la expresión de la ciclina D1 por PCDGF. Las células MCF-7 se cultivaron en triplicado en medio PFMEM y se sincronizaron por tratamiento con 1 μM tamoxifeno. El medio se reemplazó por medio fresco suplementado con 200 ng/ml de PCDGF solo o con 30 μM de PD98095 (parte superior) o con 10^{-9}M E2 (parte inferior). Las células se lisaron a los tiempos indicados para determinar la expresión de la ciclina D1 por análisis de transferencia Western con 60 μg de lisados celulares completos, usando anticuerpo anti-ciclina D1. Las muestras fueron células MCF-7 tratadas con 200 ng/ml de PCDGF a 0h (carril 1), 3h (carril 2), 5h (carril 3) y 12h (carril 4); células MCF-7 no tratadas a 5 hr (carril 5); células MCF-7 tratadas con 200 ng/ml de PCDGF y PD08950 a 5 hr (carril 6); y células MCF-7 tratadas con 10^{-9}M E2 al tiempo 0, 3 hr y 5 hr (carriles 7-9, respectivamente).

La estimulación de la expresión de la ciclina D1 por PCDGF estuvo acompañada del incremento en la fosforilación y expresión de pRb, requerida estrictamente para la progresión de la fase G1. Después de 6 horas de tratamiento con PCDGF, pRb estaba hiperfosforilado. Después de 24 hr, todo el pRb estaba en la forma hiperfosforilada con un incremento de 5 veces en la expresión de la proteína cuando se compara con las células no tratadas. Este efecto también fue bloqueado por PD98095 (datos no mostrados).

A continuación, comparamos las capacidades de E2 y PCDGF para estimular la expresión de c-myc, otra diana para la acción del estrógeno en las células MCF-7. Como se muestra en la FIG. 20B, E2 (10^{-9} M) estimuló un incremento rápido en la expresión de c-myc en células MCF-7 desprovistas de esteroide con una inducción máxima de 4 veces en 3 horas. El nivel de inducción de c-myc por E2 se sostuvo durante más de 10 horas. Por el contrario, PCDGF no tuvo efecto en la expresión de la proteína c-myc durante el mismo periodo de tiempo (FIG. 20B). La Figura 20B ilustra el efecto de E2 y PCDGF en la expresión de c-myc. Las células MCF-7 se sincronizaron por tratamiento con 1 μM tamoxifeno. Las células se trataron con 10^{-9} M E2 (parte superior) ó 200 ng/ml de PCDGF (parte inferior) durante los periodos de tiempo indicados. La detección de la expresión de c-myc por transferencia Western se realizó usando 60 μg de lisados celulares completos y un anticuerpo policlonal anti-myc.

Debido a que PCDGF indujo la expresión de la ciclina D1 pero no de c-myc, determinamos si el incremento de PCDGF endógeno estaba implicado en la capacidad de E2 de estimular la expresión de la ciclina D1. El tratamiento de las células MCF-7 con anticuerpo neutralizante anti-PCDGF (300 μg/ml) resultó en un 52 ± 8% de inhibición de la estimulación de la ciclina D1 por E2, 5 hrs después de la adición del anticuerpo. Este grado de inhibición se sostuvo 12 horas después de la adición del anticuerpo. Estos datos muestran que la capacidad de E2 de estimular la ciclina D1 en las células MCF-7 está mediada, al menos parcialmente, por el PCDGF producido endógenamente.

Discusión

Hemos reportado previamente que las células de carcinoma mamario humano ER^+ expresan PCDGF y que E2 estimula la expresión de PCDGF de una manera dependiente de la dosis y del tiempo. En la presente memoria demostramos que PCDGF media el efecto estimulador del crecimiento de E2. Mostramos que PCDGF estimula la proliferación de las células de cáncer de mama humano MCF-7 y T47D mantenidas en ausencia de E2. A continuación, mostramos que el bloqueo de la ruta autocrina de PCDGF con anticuerpo anti-PCDGF inhibe el efecto mitogénico de E2. Este efecto fue específico para PCDGF porque el anticuerpo fue incapaz de inhibir el efecto mitogénico de IGF-II. La implicación de PCDGF en el efecto mitogénico de E2 se demostró adicionalmente mostrando que la inhibición de la expresión de PCDGF por transfección con ADNc antisentido reducía el efecto mitogénico de E2 en las células MCF-7 en correlación con el grado de inhibición de la expresión de PCDGF. La adición de PCDGF exógeno restauró la proliferación de estas células antisentido. Además, la expresión incrementada de PCDGF en las células MCF-7 dio lugar a células capaces de proliferar en ausencia de E2 y que eran resistentes a tamoxifeno. El hecho de que no hubo ningún cambio en otros parámetros de la respuesta a E2 tales como expresión de ER, activación del elemento de respuesta a estrógeno-gen informador luciferasa, o estimulación de la expresión del receptor de progesterona, indicó que la alteración del efecto mitogénico de E2 en las células transfectadas no se debía a un cambio en los receptores de E2 sino específicamente a un cambio en la expresión de PCDGF.

Nuestros resultados muestran que PCDGF regula al alza la ciclina D1 para mediar el efecto mitogénico de E2 en células de cáncer de mama humano. Apoyando esta hipótesis, E2 inhibió la estimulación de la expresión de la

ciclina D1 se inhibió un 52% en 5-12 horas después de tratamiento de las células MCF-7 con anticuerpo neutralizante anti-PCDGF. En conclusión, los estudios descritos en la presente memoria identifican a PCDGF como un nuevo mediador, al menos en parte, del efecto mitogénico de E2 en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7.

Ejemplo 2

Determinación de la resistencia a tamoxifeno.

Hemos mostrado que la inhibición de la expresión de GP88 por transfección de ADNc antisentido en células de cáncer de mama negativas para ER resultó en la inhibición de la tumorigenicidad indicando la importancia de la sobreexpresión de GP88 en las propiedades tumorigénicas de las células de cáncer de mama. Como el cáncer de mama tiene una naturaleza heterogénea y puede afectar a varios compartimentos funcionales celulares de la glándula, es preferible examinar biopsias representativas de los diferentes estadios del modelo de progresión para la expresión de GP88. Se ha mostrado que la detección de marcadores tumorales es la estrategia preferida para evaluar y predecir el curso clínico del cáncer de mama en el momento del diagnóstico o tratamiento primario y es importante en la determinación de la elección de la terapia. Estos estudios son directamente relevantes para la salud de las mujeres porque proporcionan un análisis del nuevo factor de crecimiento PCDGF como un marcador de pronóstico potencial del cáncer de mama.

La expresión de GP88 se siguió por análisis inmunohistoquímico de secciones de biopsias incluidas en parafina usando un anticuerpo anti-GP88 humano purificado por afinidad (FIG. 21). Los estadios progresivos de la enfermedad examinados incluyen hiperplasia benigna → hiperplasia ductal atípica (ADH) → (Carcinoma ductal in situ) DCIS → Carcinoma Ductal Invasivo (IDC) → Enfermedad Metastásica. También se examinaron en paralelo marcadores seleccionados representativos de alteraciones genéticas y biológicas que ocurren durante la progresión del cáncer de mama.

Para cada estadio de la enfermedad examinado (es decir, estadios benignos incluyendo hiperplasia epitelial y cambios fibrocísticos, hiperplasia ductal atípica, carcinoma ductal in situ, carcinoma ductal invasivo; y carcinoma mamario metastásico), la expresión de GP88 se detectó en paralelo con la detección de otros marcadores tales como Ki-67 (marcador de proliferación), p53 (supresor tumoral), ER/PR (capacidad de respuesta), expresión de cerbB2 (receptor de factor de crecimiento), y se correlacionó con el grado, estadio de la enfermedad y con el estado de los ganglios linfáticos.

Las biopsias se clasificaron por la determinación histopatológica del estadio y tipo de lesión y examinando varios marcadores de pronóstico diferentes tales como Ki-67, y estado de ER/PR. Los resultados indicaron que la expresión de GP88 en las células epiteliales en carcinoma ductal ER-/PR grado 3 correspondía a tumores con mal pronóstico. La expresión de GP88 en las células epiteliales de tejido normal o carcinoma lobular benigno fue negativa.

Métodos

Preparación de tejidos. Se cortaron secciones de tejido de 4 µm de espesor de bloques de parafina y se montaron en portaobjetos de vidrio cargados eléctricamente. La desparafinización, fijado, recuperación de antígeno y rehidratación de las secciones se hizo por procedimientos estándar.

Preparación del anticuerpo anti-GP88 humano: Un método preferido para detectar la expresión de GP88 es por inmunotinción usando anticuerpo anti-PCDGF humano purificado por afinidad. El anticuerpo anti-GP88 humano policlonal o monoclonal fue desarrollado inmunizando conejos o ratones con PCDGF recombinante humano expresado y purificado en el laboratorio del inventor. Para los anticuerpos policlonales, la fracción IgG anti-GP88 se preparó a partir de antisuero de conejo por precipitación con sulfato de sodio y diálisis. Esta fracción se purificó por afinidad por cromatografía en una columna de Sefarosa conjugada con GP88 preparada acoplando GP88 humano puro a Sefarosa activada con CNBr. Esta fracción de anticuerpo altamente purificada se analizó por cromatografía SDS-PAGE y se mostró que contenía una única banda correspondiente a la IgG y se mostró por inmunotinción que proporcionaba una tinción altamente específica sin fondo en células fijadas y en secciones de tejido. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos monoclonales anti-GP88.

La inmunotinción se hizo por incubación de secciones de tejido preparadas como se ha descrito anteriormente durante 1 hora a temperatura ambiente en cámaras de humedad con el anticuerpo específico seguido de incubación con anticuerpo anti-GP88. La unión del anticuerpo se detecta preferiblemente por incubación con anticuerpos secundarios biotinilados y complejo de estreptavidina peroxidasa (kit Ventana). El revelado cromogénico se obtiene preferiblemente por la inmersión de las secciones en disolución de 3,3'-diaminobencidina (0,25 mg/mL con 3% de peróxido de hidrógeno). Los portaobjetos se contratiiñen, preferiblemente con hematoxilina, y se cubren.

El análisis de los datos de inmunotinción se hizo por examen microscópico. La clasificación de los marcadores seleccionados se hizo usando métodos publicados como se indica más adelante. Los métodos de clasificación de la intensidad de la tinción de la técnica anterior incluyen los siguientes: estado de ER y PR y la presencia de la forma mutada de p53 se determinan graduando la tinción nuclear por el método usado universalmente (<5% de tinción

nuclear - negativo; a la tinción positiva se le asigna una puntación de intensidad de débil (1+) a moderada (2+) a fuerte (3+). La tinción de c-erbB-2 se evalúa por la presencia e intensidad de la tinción de la membrana y se gradúa como sigue: <5% de tinción - negativo; la tinción positiva se gradúa de débil (1+) a moderada (2+) a fuerte (3+). La expresión de estromelisina-3 se gradúa separadamente en las células tumorales y el estroma circundante y la clasificación se realiza preferiblemente usando el método usado para ER/PR, p 53 y c-erbB-2. Las metodologías de graduación de la intensidad de la tinción son directamente aplicables a la detección de GP88.

Nuestros resultados muestran que en tejido normal y en la lesión benigna, las células epiteliales no se tiñen para GP88. Por el contrario, en carcinoma ductal invasivo ER^-/PR^-, las células epiteliales presentan una tinción positiva muy fuerte para GP88. La presencia de células epiteliales positivas para GP88 puede clasificarse y puede asignarse un grado según los métodos usados rutinariamente para la clasificación e indexado de otros marcadores de pronóstico de cáncer de mama. La escala de clasificación e indexado siguiente se usó para evaluar la tinción de GP88: menos de aproximadamente 5% de tinción es negativo; aproximadamente 10-25% de tinción positiva se gradúa de débil (1+) a (moderado 25-50% de células positivas (2+)) a fuerte (3+) (más de 50% de células positivas). El porcentaje de células positivas para cada grado se reajustó hacia abajo siempre que se obtiene un análisis de un gran número de muestras.

Además del método y tipo de muestras biológicas descritas anteriormente, la detección de la expresión de GP88 para predecir la respuesta a la terapia antiestrógeno puede extenderse a medir el incremento de la expresión de GP88 en fluidos biológicos tales como suero o plasma, orina o aspirado de pezón. La detección de la expresión de GP88 para predecir la respuesta a la terapia antiestrógeno también puede extenderse fácilmente a medir el incremento de la expresión de GP88 en extractos celulares.

Los métodos de detección incluyen, sin limitación, inmunoensayo ligado a enzima, tal como un anticuerpo conjugado directamente a una enzima (tal como, sin limitación, peroxidasa, fosfatasa alcalina, biotina) o a una etiqueta fluorescente, o al uso de un anticuerpo secundario conjugado (tal como, sin limitación, peroxidasa, fosfatasa alcalina, estreptavidina o una etiqueta fluorescente).

Los métodos preferidos para la clasificación de marcadores seleccionados son muy conocidos en la técnica y se describen en las referencias siguientes, cuyos contenidos se incorporan por la presente por referencia en esta solicitud: (1) Ferno, M. (1998) Prognostic factors in breast cancer, Anticancer Research, 18, 2167-2172; (2) Harbeck N., Dettmar, P., Thomssen, C., Henlselmann, B., Kuhn, W., Ulm, K., Janicke, F., Hofler, H., Graeff, H., Schmitt, M. (1998), Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer, Anticancer Res.18, 2187-2198; (3) Allred, D.C., Harvey, J.M., Berardo, M., Clark, G.M. (1998), Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis, Mod. Pathol. 11,155-168; y (4) Thor, A.D., Moore, D.H., Edgerton, S.M., Kawasaki, E.S., Reihsaus, E., Lynch, H.T., Marcus, J.N., Scwartz, L., Chen, L.C., Mayall, B.H. (1992), Increased accumulation of the p53 suppressor gene product is an independent prognostic variable for breast cancer, J. Natl. Cancer. Inst., 84, 845-855.

Tinción de GP88 con anticuerpo anti-GP88

Las biopsias de tejido de mama incluidas en parafina de pacientes con cáncer de mama se tiñeron con anticuerpo anti-GP88 usando técnicas inmunohistoquímicas. Como se muestra en la FIG. 21, las lesiones benignas no presentaron tinción de GP88 mientras las muestras de carcinoma ductal invasivo ("IDC") presentaron una tinción fuerte de células positivas para GP88. La expresión de GP88 está elevada en el carcinoma ductal invasivo tumorigénico comparado con las lesiones benignas.

Intensidad de la tinción de GP88 en tumores de carcinoma ductal invasivo (IDC) positivos para el receptor de estrógeno (ER+) y negativos para el receptor de estrógeno (ER-)

Se inmunotiñeron muestras biológicas de tumores IDC con anticuerpo anti-GP88 y se clasificaron según su estado del receptor de estrógeno (ER+ = positivo para el receptor de estrógeno, ER- = negativo para el receptor de estrógeno) y el grado de intensidad de la tinción de GP88. Como se muestra en la FIG. 22, un incremento en la intensidad de la tinción de GP88 se correlaciona directamente con pérdida del receptor de estrógeno en los tumores IDC. A una intensidad de tinción de 0, todas las muestras de tumor IDC analizadas fueron ER+. A una intensidad de tinción de 1, el 80% de los tumores IDC fue ER+ y 20% fue ER-. A una intensidad de tinción de 2, el 50% de los tumores IDC fue ER+ y 50% fue ER-. El 20% de los tumores IDC fue ER+ a una intensidad de tinción de 3 mientras el 80% fue ER-. Así, al incrementar la intensidad de la tinción de GP88, disminuye el porcentaje de tumores IDC ER+.

Capacidad de respuesta a tamoxifeno de tumores IDC ER+ clasificados según la intensidad de la tinción de GP88

Un incremento en la intensidad de la tinción de GP88 indica que una célula ha perdido la dependencia de estrógeno para crecer y se ha convertido en independiente de estrógeno. El crecimiento de la célula ya no está controlado por señales externas de hormonas tales como estrógeno, sino que está controlado por señales de crecimiento autocrinas de GP88. Previamente, se pensaba que la presencia del receptor de estrógeno era indicativa de si la célula era capaz de responder a terapia antiestrógeno. Sin embargo, cuando una célula se ha convertido de dependiente de estrógeno en independiente de estrógeno, la presencia del receptor de estrógeno es irrelevante

respecto a si la terapia antiestrógeno será efectiva ya que la señal del crecimiento celular es constitutiva y no está controlada por la presencia o ausencia de estrógenos o antiestrógenos. Así, los tumores positivos para el receptor de estrógeno con altos niveles de GP88 (2+ o más) son resistentes a la terapia antiestrógeno a pesar del hecho de que las células presentan el receptor de estrógeno.

Con el fin de examinar el efecto de los niveles incrementados de GP88 en la resistencia antiestrógeno, se obtuvieron muestras de tumor IDC de pacientes resistentes a tratamiento con tamoxifeno y de pacientes que respondían a tratamiento con tamoxifeno. Las muestras tumorales se inmunotiñeron con anticuerpo anti-GP88 humano como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la FIG. 23, los tumores IDC se clasificaron según su intensidad de tinción de GP88 en una escala de graduación de 0 a 3 (eje de las x). El porcentaje de tumores IDC totales que fueron positivos para el receptor de estrógeno (ER+) se determinó y se clasificó bien como que responden a tamoxifeno (barras blancas) o resistentes a tamoxifeno (barras negras) a lo largo del eje de las y. A un grado de intensidad de tinción de 0, todos los tumores IDC ER+ (40% del número total de tumores) eran de pacientes que respondían a tamoxifeno. A un grado de intensidad de tinción de 1, todos los tumores IDC ER+ (60% del número total de tumores) eran de pacientes que respondían a tamoxifeno. Sin embargo, al desplazarse la intensidad de la tinción de grado 1 a grado 2, todos los tumores IDC ER+ (80% del número total de tumores) eran de pacientes resistentes a tamoxifeno. A un grado de intensidad de tinción de 3, todos los tumores ER+ (30% del número total de tumores) eran de pacientes resistentes a tamoxifeno. Así, incluso los tumores IDC ER+ se volvieron cada vez más resistentes a los efectos de tamoxifeno se incrementa al incrementar la intensidad de GP88 de grado 0 hasta grado 3. Además, cuando la intensidad de la tinción se incrementa de un grado 1 a 2, los tumores IDC ER+ se desplazaron completamente de capaces de responder a tamoxifeno a resistentes a tamoxifeno. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría, parece que la disminución posterior en el porcentaje de tumores resistentes a tamoxifeno desde el estadio 3 al estadio 4 es atribuible a la pérdida de receptor de estrógeno (es decir, el porcentaje de tumores IDC ER+) al incrementarse el nivel de GP88. Por lo tanto, la FIG, 23 establece que niveles crecientes de GP88 desplazan a las células de un estadio de respuesta a la terapia antiestrógeno (grados 0 y 1) a resistente a terapia antiestrógeno (grados 2 y 3) incluso antes de la pérdida del receptor de estrógeno. Así, comparado con la presencia del receptor de estrógeno, GP88 sirve como un indicador de pronóstico más exacto y fiable de si un paciente responderá a, o será perjudicado innecesariamente con, terapia antiestrógeno.

La descripción anterior y los dibujos adjuntos sólo son ilustrativos de las realizaciones ejemplares, que pueden conseguir las características y ventajas de la presente invención. No se pretende que la invención esté limitada a las realizaciones mostradas y descritas con detalle en la presente memoria. La invención sólo está limitada por el alcance de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar la tumorigenicidad del cáncer de mama en un paciente humano, que comprende:

i. detectar GP88 en células de una muestra biológica obtenida de un paciente;

ii. determinar el número de células positivas para GP88 en dicha muestra; y

iii. determinar la proporción de células positivas para GP88 respecto al número total de células en dicha muestra biológica, en el que dicha proporción es indicativa de la tumorigenicidad del cáncer de mama, y en el que la muestra biológica que contiene las células de dicho paciente es una muestra de tejido de mama; GP88 en dichas células de dicho tejido de mama se detecta por inmunotinción con anticuerpo anti-GP88 humano; el número de células positivas para GP88 en dicha muestra se determina por examen microscópico; y una proporción de al menos 10% de células positivas para GP88 respecto al número total de células en dicho tejido de mama indica la tumorigenicidad del cáncer de mama.

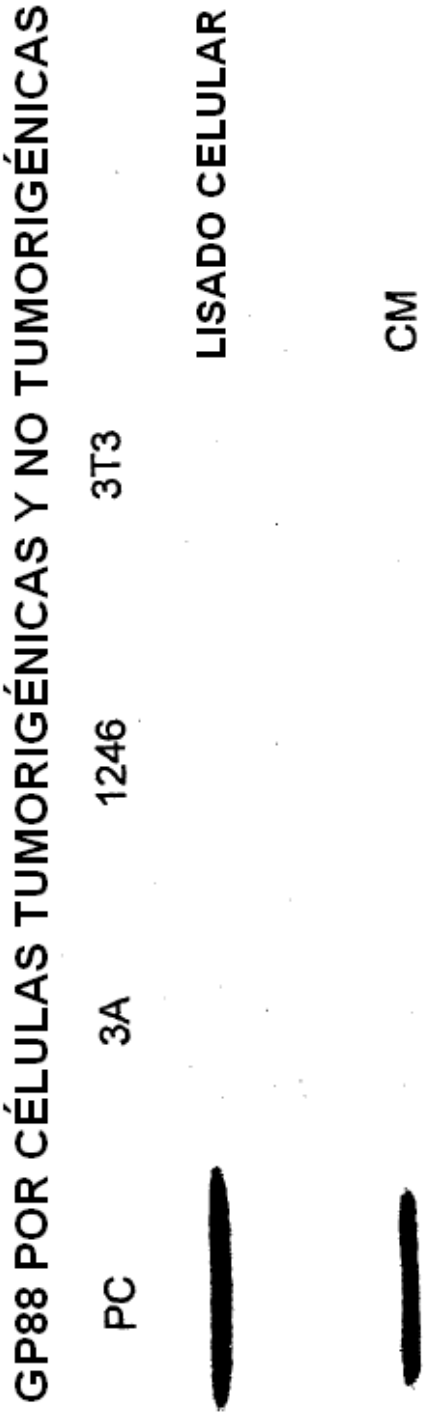

PRODUCCIÓN DE GP88 POR CÉLULAS TUMORIGÉNICAS Y NO TUMORIGÉNICAS
PC
3A
1246
3T3
LISADO CELULAR
CM

FIG.1A

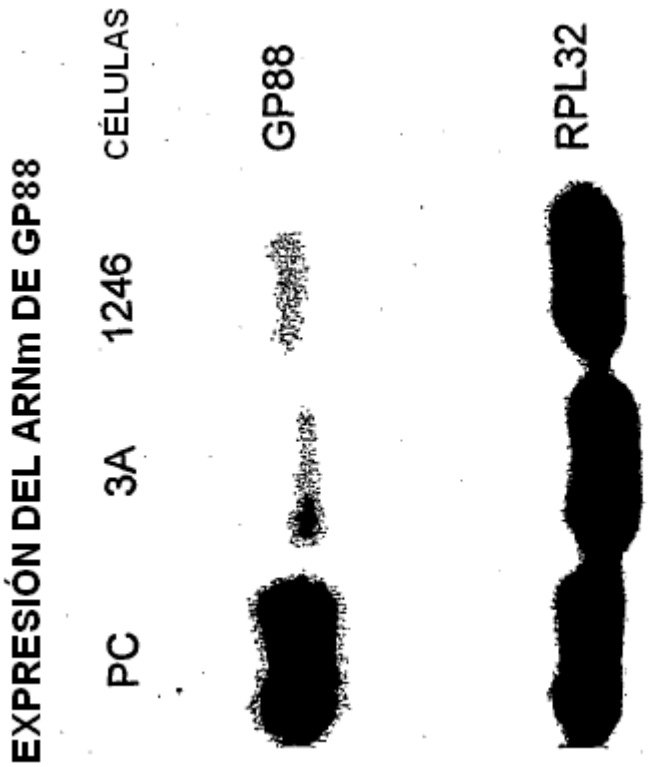


FIG.1B

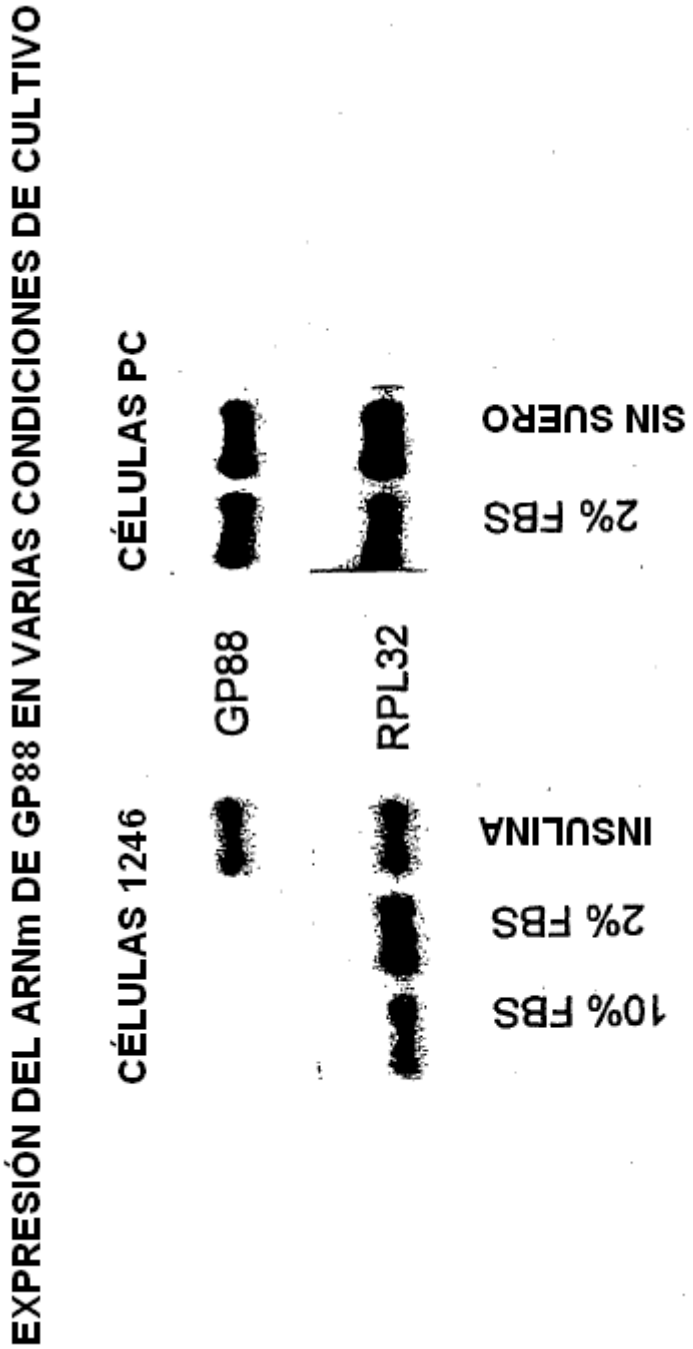

EXPRESIÓN DEL ARNm DE GP88 EN VARIAS CONDICIONES DE CULTIVO
CÉLULAS 1246
CÉLULAS PC
GP88
RPL32
INSULINA
10% FBS
2% FBS
SIN SUERO
2% FBS

FIG.1C

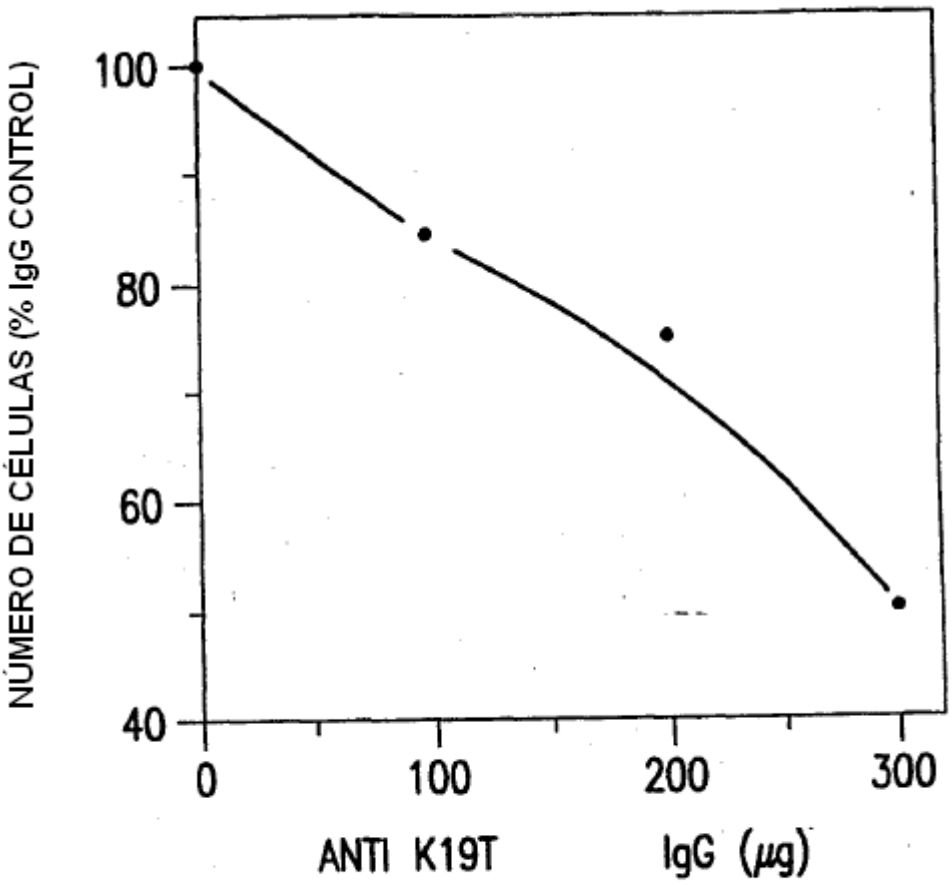
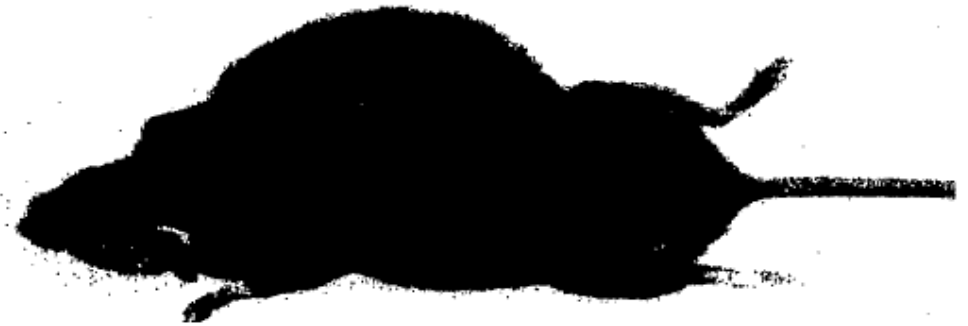

NÚMERO DE CÉLULAS (% IgG CONTROL)
100
80
60
40
0
100
200
300
ANTI K19T
IgG (μg)

FIG.2

AUSENCIA DE LA FORMACIÓN DE TUMORES EN RATONES C3H POR INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GP88

CÉLULAS PC TRANSFECTADAS CON ANTISENTIDO DE GP88



CÉLULAS PC TRANSFECTADAS CONTROL

FIG.3

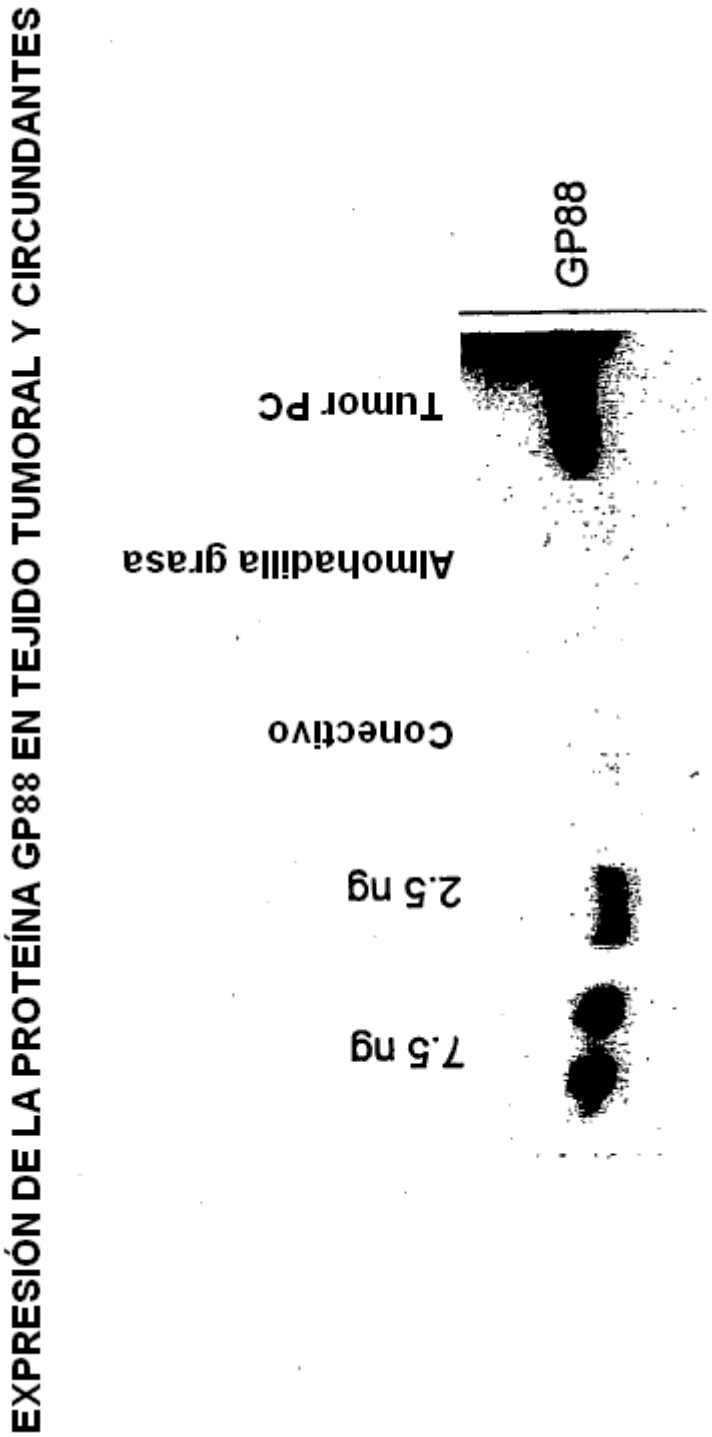

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GP88 EN TEJIDO TUMORAL Y CIRCUNDANTES
GP88
Tumor PC
Almohadilla grasa
Conectivo
2.5 ng
7.5 ng

FIG.4

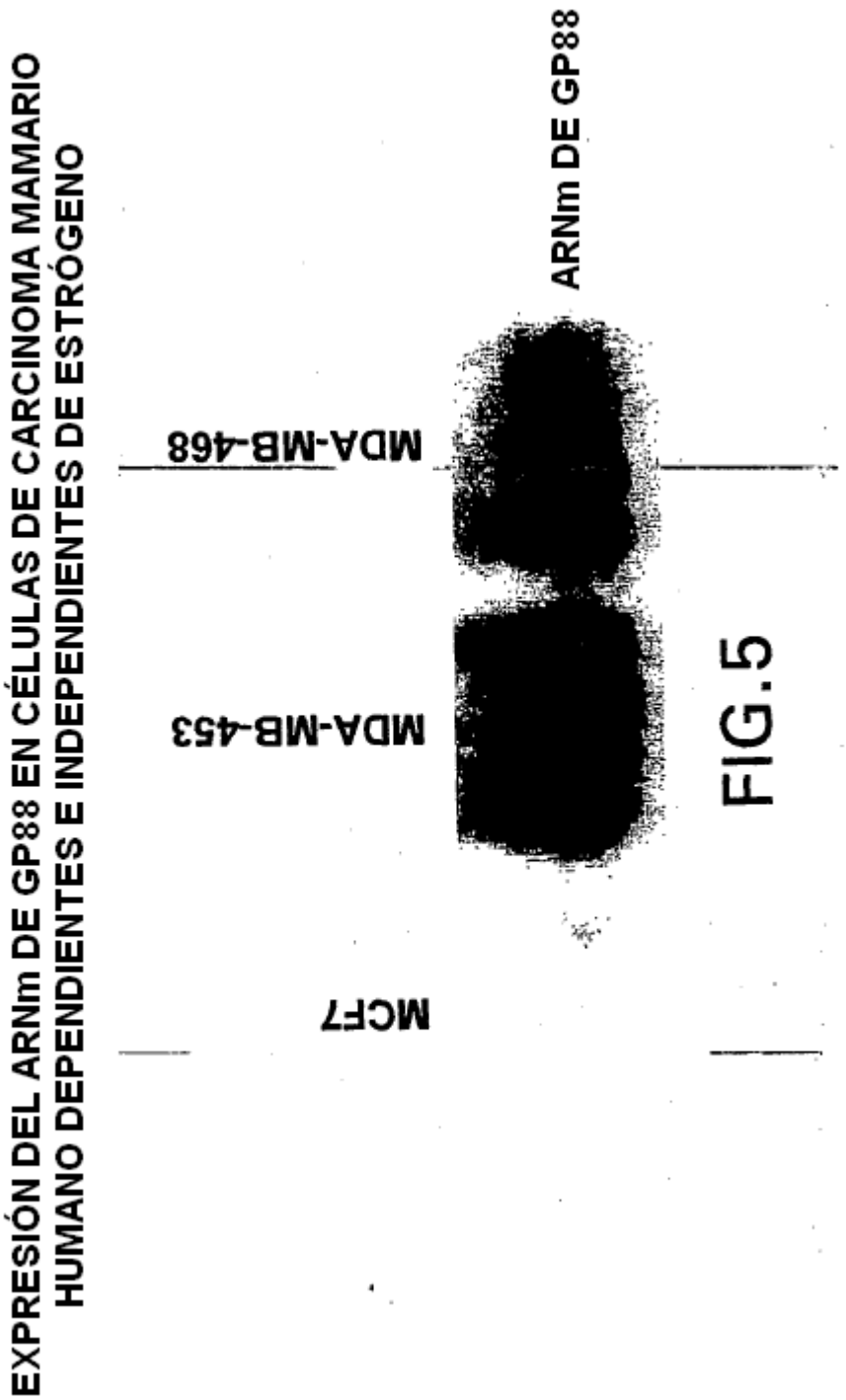

EXPRESIÓN DEL ARNm DE GP88 EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE ESTRÓGENO
ARNm DE GP88
MDA-MB-468
MDA-MB-453
MCF7

FIG.5

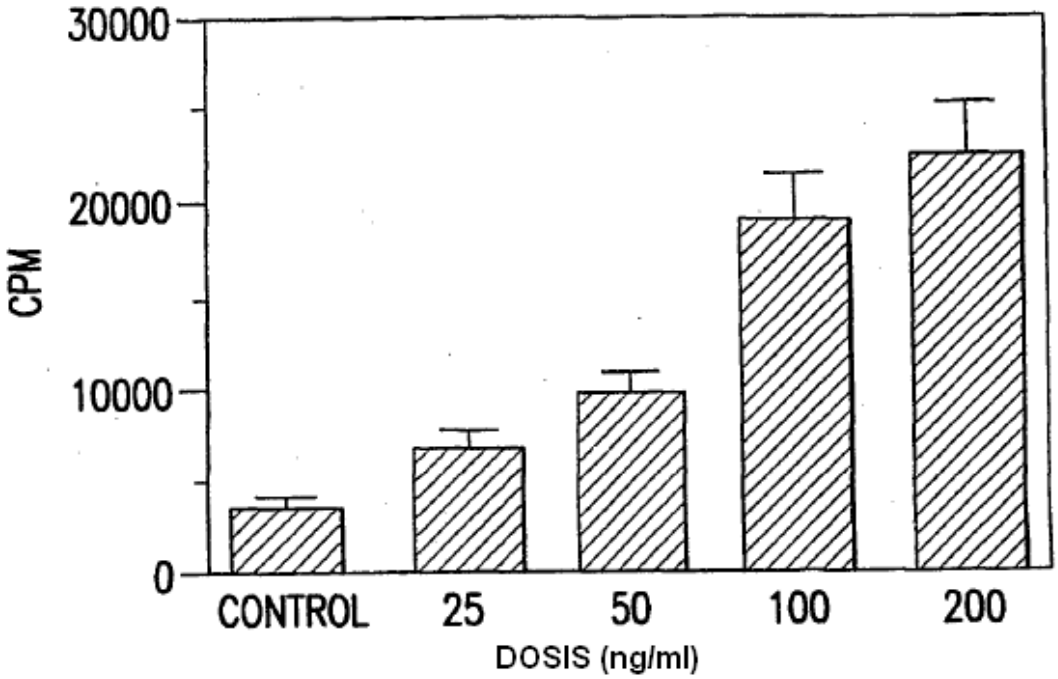

30000
20000
10000
0
CPM
CONTROL
25
50
100
200
DOSIS (ng/ml)

FIG.6A

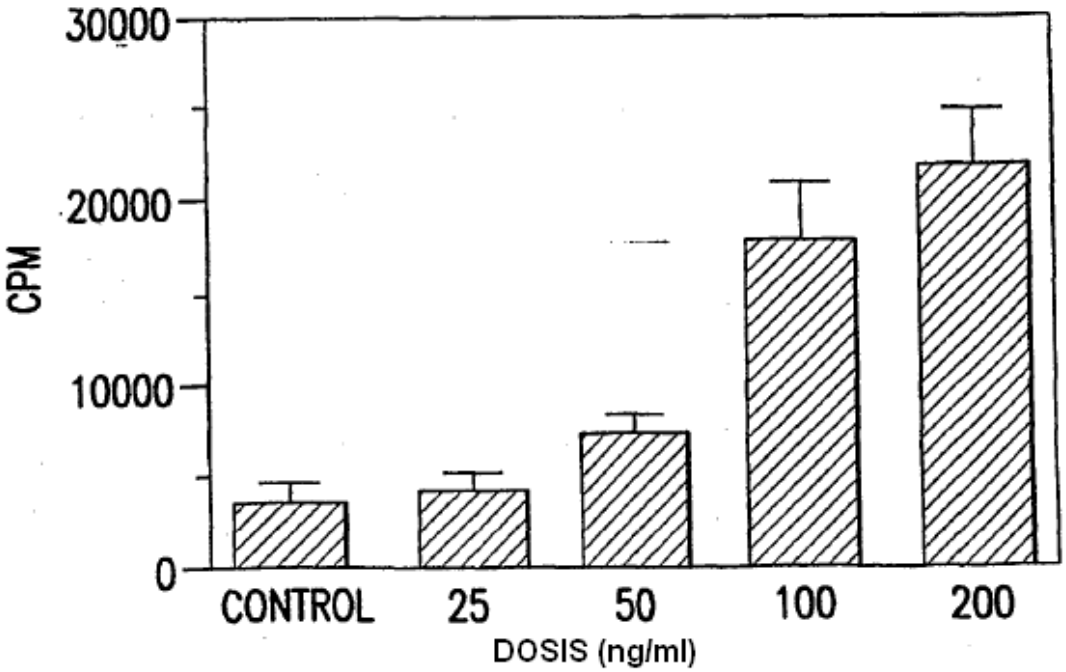

30000
20000
10000
0
CPM
CONTROL
25
50
100
200
DOSIS (ng/ml)

FIG.6B

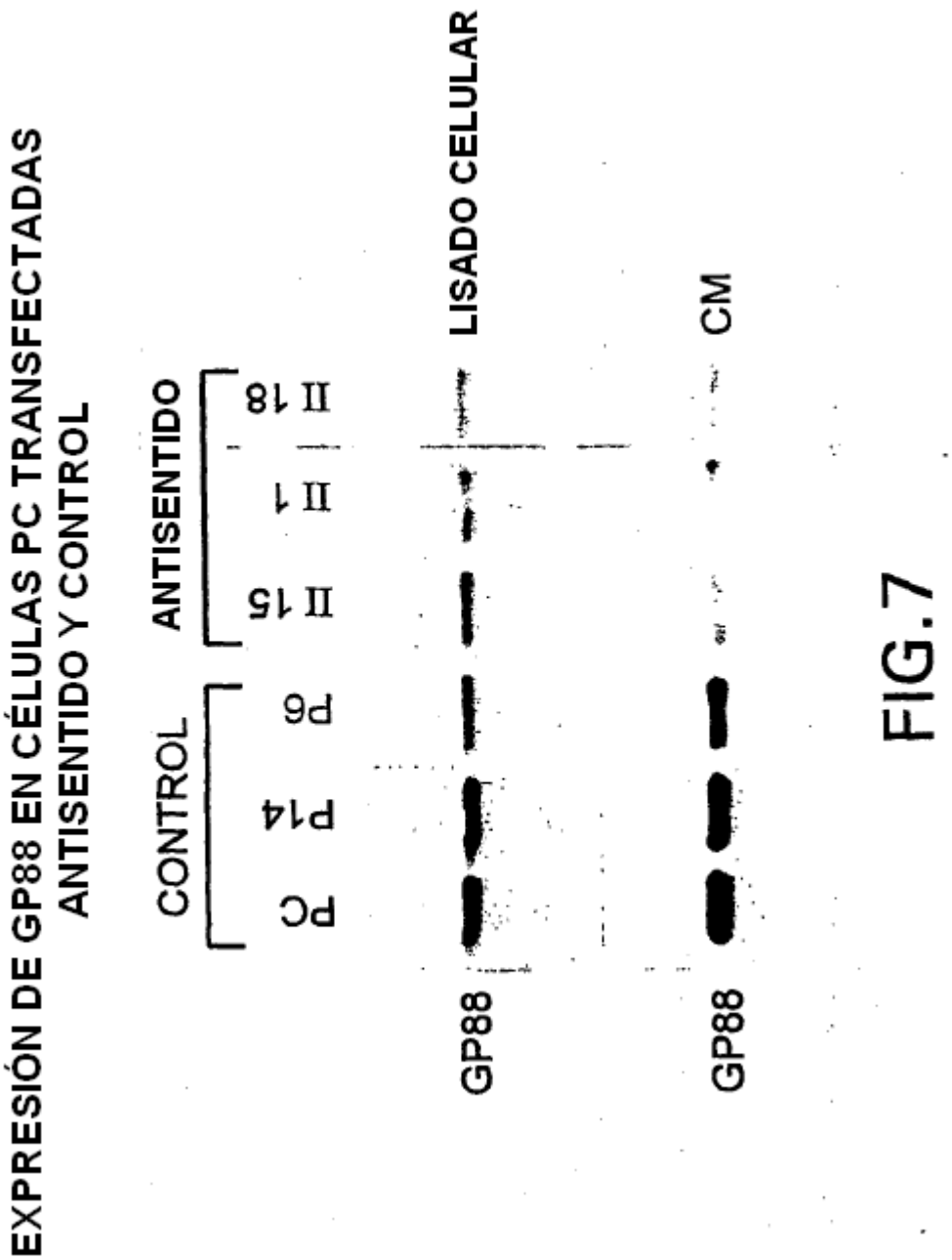

EXPRESIÓN DE GP88 EN CÉLULAS PC TRANSFECTADAS
ANTISENTIDO Y CONTROL
CONTROL
ANTISENTIDO
PC
P14
P6
II 15
II 1
II 18
LISADO CELULAR
CM
GP88
GP88

FIG.7

ADNc de GP88 de Ratón

```
C GGA CCC CGA CGC AGA CAG ACC ATG TGG GTC CTG ATG AGC TGG CTG      46
                              M   W   V   L   M   S   W   L       8

GCC TTC GCG GCA GGG CTG GTA GCC GGA ACA CAG TGT CCA GAT GGG CAG    94
A   F   A   A   G   L   V   A   G   T   Q   C   P   D   G   Q     24

TTC TGC CCT GTT GCC TGC TGC CTT GAC CAG GGA GGA GCC AAC TAC AGC    142
F   C   P   V   A   C   C   L   D   Q   G   G   A   N   Y   S     40

TGC TGT AAC CCT CTT CTG GAC ACA TGG CCT AGA ATA ACG AGC CAT CAT    190
C   C   N   P   L   L   D   T   W   P   R   I   T   S   H   H     56

CTA GAT GGC TCC TGC CAG ACC CAT GGC CAC TGT CCT GCT GGC TAT TCT    238
L   D   G   S   C   Q   T   H   G   H   C   P   A   G   Y   S     72

TGT CTT CTC ACT GTG TCT GGG ACT TCC AGC TGC TGC CCG TTC TCT AAG    286
C   L   L   T   V   S   G   T   S   S   C   C   P   F   S   K     88

GGT GTG TCT TGT GGT GAT GGC TAC CAC TGC TGC CCC CAG GGC TTC CAC    334
G   V   S   C   G   D   G   Y   H   C   C   P   Q   G   F   H     104

TGT AGT GCA GAT GGG AAA TCC TGC TTC CAG ATG TCA GAT AAC CCC TTG    382
C   S   A   D   G   K   S   C   F   Q   M   S   D   N   P   L     120

GGT GCT GTC CAG TGT CCT GGG AGC CAG TTT GAA TGT CCT GAC TCT GCC    430
G   A   V   Q   C   P   G   S   Q   F   E   C   P   D   S   A     136

ACC TGC TGC ATT ATG GTT GAT GGT TCG TGG GGA TGT TGT CCC ATG CCC    478
T   C   C   I   M   V   D   G   S   W   G   C   C   P   M   P     152

CAG GCC TCT TGC TGT GAA GAC AGA GTG CAT TGC TGT CCC CAT GGG GCC    526
Q   A   S   C   C   E   D   R   V   H   C   C   P   H   G   A     168

TCC TGT GAC CTG GTT CAC ACA CGA TGC GTT TCA CCC ACG GGC ACC CAC    574
S   C   D   L   V   H   T   R   C   V   S   P   T   G   T   H     184

ACC CTA CTA AAG AAG TTC CCT GCA CAA AAG ACC AAC AGG GCA GTG TCT    622
T   L   L   K   K   F   P   A   Q   K   T   N   R   A   V   S     200

TTG CCT TTT TCT GTC GTG TGC CCT GAT GCT AAG ACC CAG TGT CCC GAT    670
L   P   F   S   V   V   C   P   D   A   K   T   Q   C   P   D     216
```

FIG.8A

ADNc de GP88 de Ratón (continuación)

```
GAT TCT ACC TGC TGT GAG CTA CCC ACT GGG AAG TAT GGC TGC TGT CCA    718
D   S   T   C   C   E   L   P   T   G   K   Y   G   C   C   P    232

ATG CCC AAT GCC ATC TGC TGT TCC GAC CAC CTG CAC TGC TGC CCC CAG    766
M   P   N   A   I   C   C   S   D   H   L   H   C   C   P   Q    248

GAC ACT GTA TGT GAC CTG ATC CAG AGT AAG TGC CTA TCC AAG AAC TAC    814
D   T   V   C   D   L   I   Q   S   K   C   L   S   K   N   Y    264

ACC ACG GAT CTC CTG ACC AAG CTG CCT GGA TAC CCA GTG AAG GAG GTG    862
T   T   D   L   L   T   K   L   P   G   Y   P   V   K   E   V    280

AAG TGC GAC ATG GAG GTG AGC TGC CCT GAA GGA TAT ACC TGC TGC CGC    910
K   C   D   M   E   V   S   C   P   E   G   Y   T   C   C   R    296

CTC AAC ACT GGG GCC TGG GGC TGC TGT CCA TTT GCC AAG GCC GTG TGT    958
L   N   T   G   A   W   G   C   C   P   F   A   K   A   V   C    312

TGT GAG GAT CAC ATT CAT TGC TGC CCG GCA GGG TTT CAG TGT CAC ACA   1006
C   E   D   H   I   H   C   C   P   A   G   F   Q   C   H   T    328

GAG AAA GGA ACC TGC GAA ATG GGT ATC CTC CAA GTA CCC TGG ATG AAG   1054
E   K   G   T   C   E   X   G   I   L   Q   V   P   W   M   K    344

AAG GTC ATA GCC CCC CTC CGC CTG CCA GAC CCA CAG ATC TTG AAG AGT   1102
K   V   I   A   P   L   R   L   P   D   P   Q   I   L   K   S    360

GAT ACA CCT TGT GAT GAC TTC ACT AGG TGT CCT ACA AAC AAT ACC TGC   1150
D   T   P   C   D   D   F   T   R   C   P   T   N   N   T   C    376

TGC AAA CTC AAT TCT GGG GAC TGG GGC TGC TGT CCC ATC CCA GAG GCT   1198
C   K   L   N   S   G   D   W   G   C   C   P   I   P   E   A    392

GTC TGC TGC TCA GAC AAC CAG CAT TGC TGC CCT CAG GGC TTC ACA TGT   1246
V   C   C   S   D   N   Q   H   C   C   P   Q   G   F   T   C    408

CTG GCT CAG GGG TAC TGT CAG AAG GGA GAC ACA ATG GTG GCT GGC CTG   1294
L   A   Q   G   Y   C   Q   K   G   D   T   M   V   A   G   L    424

GAG AAG ATA CCT GCC CGC CAG ACA ACC CCG CTC CAA ATT GGA GAT ATC   1342
E   K   I   P   A   R   Q   T   T   P   L   Q   I   G   D   I    440
```

FIG.8B

ADNc de GP88 de Ratón (continuación)

```
GGT TGT GAC CAG CAT ACC AGC TGC CCA GTA GGG CAA ACC TGC TGC CCA   1390
G   C   D   Q   H   T   S   C   P   V   G   Q   T   C   C   P     456

AGC CTC AAG GGA AGT TGG GCC TGC TGC CAG CTG CCC CAT GCT GTG TGC   1438
S   L   K   G   S   W   A   C   C   Q   L   P   H   A   V   C     472

TGT GAG GAC CGG CAG CAC TGT TGC CCG GCC GGG TAC ACC TGC AAC GTG   1486
C   E   D   R   Q   H   C   C   P   A   G   Y   T   C   N   V     488

AAG GCG AGG ACC TGT GAG AAG GAT GTC GAT TTT ATC CAG CCT CCC GTG   1534
K   A   R   T   C   E   K   D   V   D   F   I   Q   P   P   V     504

CTC CTG ACC CTC GGC CCT AAG GTT GGG AAT GTG GAG TGT GGA GAA GGG   1582
L   L   T   L   G   P   K   V   G   N   V   E   C   G   E   G     520

CAT TTC TGC CAT GAT AAC CAG ACC TGT TGT AAA GAC AGT GCA GGA GTC   1630
H   F   C   H   D   N   Q   T   C   C   K   D   S   A   G   V     536

TGG GCC TGC TGT CCC TAC CTA AAG GGT GTC TGC TGT AGA GAT GGA CGT   1678
W   A   C   C   P   Y   L   K   G   V   C   C   R   D   G   R     552

CAC TGT TGC CCC GGT GGC TTC CAC TGT TCA GCC AGG GGA ACC AAG TGT   1726
H   C   C   P   G   G   F   H   C   S   A   R   G   T   K   C     568

TTG CGA AAG AAG ATT CCT CGC TGG GAC ATG TTT TTG AGG GAT CCG GTC   1774
L   R   K   K   I   P   R   W   D   M   F   L   R   D   P   V     584

CCA ACA CCG CTA CTG TAA GGA AGG GCT ACA GAC TTA AGG AAC TCC ACA   1822
P   R   P   L   L   *                                             589

GTC CTG GGA ACC CTG TTC CGA GGG TAC CCA CTA CTC AGG CCT CCC TAG   1870
CGC CTC CTC CCC TAA CGT CTC CCC GGC CTA CTC ATC CTG AGT CAC CCT   1918
ATC ACC ATG GGA GGT GGA GCC TCA AAC TAA AAC CTT CTT TTA TGG AAA   1966
GAA GGC TGT GGC CAA AAG CCC CGT ATC AAA CTG CCA TTT CTT CCG GTT   2014
TCT GTG GAC CTT GTG GCC AGG TGC TCT TCC CGA GCC ACA GGT GTT CTG   2062
TGA GCT TGC TTG TGT GTG TGT GCG CGT GTG CGT GTG TTG CTC CAA TAA   2110
AGT TTG TAC GCT TTC TGA AAA AAA AAA                              2137
```

FIG.8C

Secuencia de nucleótidos del precursor granulina/epitelina humano (GP88 humano). Granulina humana Genbank M75161$

cgcaggcaga ccatgtggac cttggtgagc tgggtggcct taacagcagg gctggtggct
ggaacgcggt gcccagatgg tcagttctgc cctgtggcct gctgcctgga ccccggagga
gccagctaca gctgctgccg tccccttctg gacaaatggc ccacaacact gagcaggcat
ctgggtggcc cctgccaggt tgatgcccac tgctctgccg gccactcctg catctttacc
gtctcaggga cttccagttg ctgccccttc ccagaggccg tggcatgcgg ggatggccat
cactgctgcc cacggggctt ccactgcagt gcagacggga gatcctgctt ccaaagatca
ggtaacaact ccgtgggtgc catccagtgc cctgatagtc agttcgaatg cccggacttc
tccacgtgct gtgttatggt cgatggctcc tgggggtgct gccccatgcc ccaggcttcc
tgctgtgaag acagggtgca ctgctgtccg cacggtgcct tctgcgacct ggttcacacc
cgctgcatca cacccacggg cacccacccc ctggcaaaga agctccctgc ccagaggact
aacagggcag tggccttgtc cagctcggtc atgtgtccgg acgcacggtc ccggtgccct
gatggttcta cctgctgtga gctgcccagt gggaagtatg gctgctgccc aatgcccaac
gccacctgct gctccgatca cctgcactgc tgcccccaag acactgtgtg tgacctgatc
cagagtaagt gcctctccaa ggagaacgct accacggacc tcctcactaa gctgcctgcg
cacacagtgg gcgatgtgaa atgtgacatg gaggtgagct gcccagatgg ctatacctgc
tgccgtctac agtcgggggc ctggggctgc tgcccttta cccaggctgt gtgctgtgag
gaccacatac actgctgtcc cgcggggttt acgtgtgaca cgcagaaggg tacctgtgaa
caggggcccc accaggtgcc ctggatggag aaggccccag ctcacctcag cctgccagac
ccacaagcct tgaagagaga tgtcccctgt gataatgtca gcagctgtcc ctcctccgat
acctgctgcc aactcacgtc tggggagtgg ggctgctgtc caatcccaga ggctgtctgc
tgctcggacc accagcactg ctgcccccag cgatacacgt gtgtagctga ggggcagtgt
cagcgaggaa gcgagatcgt ggctggactg gagaagatgc ctgcccgccg cggttcctta
tcccacccca gagacatcgg ctgtgaccag cacaccagct gcccggtggg cggaacctgc
tgcccgagcc agggtgggag ctgggcctgc tgccagttgc cccatgctgt gtgctgcgag
gatcgccagc actgctgccc ggctggctac acctgcaacg tgaaggctcg atcctgcgag
aaggaagtgg tctctgccca gcctgccacc ttcctggccc gtagccctca cgtgggtgtg
aaggacgtgg agtgtgggga aggacacttc tgccatgata accagacctg ctgccgagac
aaccgacagg gctgggcctg ctgtccctac gcccagggcg tctgttgtgc tgatcggcgc
cactgctgtc ctgctggctt ccgctgcgca cgcaggggta ccaagtgttt gcgcagggag
gccccgcgct gggacgcccc tttgagggac ccagccttga gacagctgct gtgagggaca
gtactgaaga ctctgcagcc ctcgggaccc cactcggagg gtgccctctg ctcaggcctc
gtactgaaga ctctgcagcc ctcgggaccc cactcggagg gtgccctctg ctcaggcctc
cctagcacct ccccctaacc aaattctccc tggaccccat tctgagctcc ccatcaccat
gggaggtggg gcctcaatct aaggcccttc cctgtcagaa gggggttgag gcaaaagccc
attacaagct gccatccccc ccccgtttca gtggaccctg tggccaggtg cttttcccta
tccacagggg tgtttgtgtg ttgggtgtgc tttcaataaa gtttgtcact ttctt*

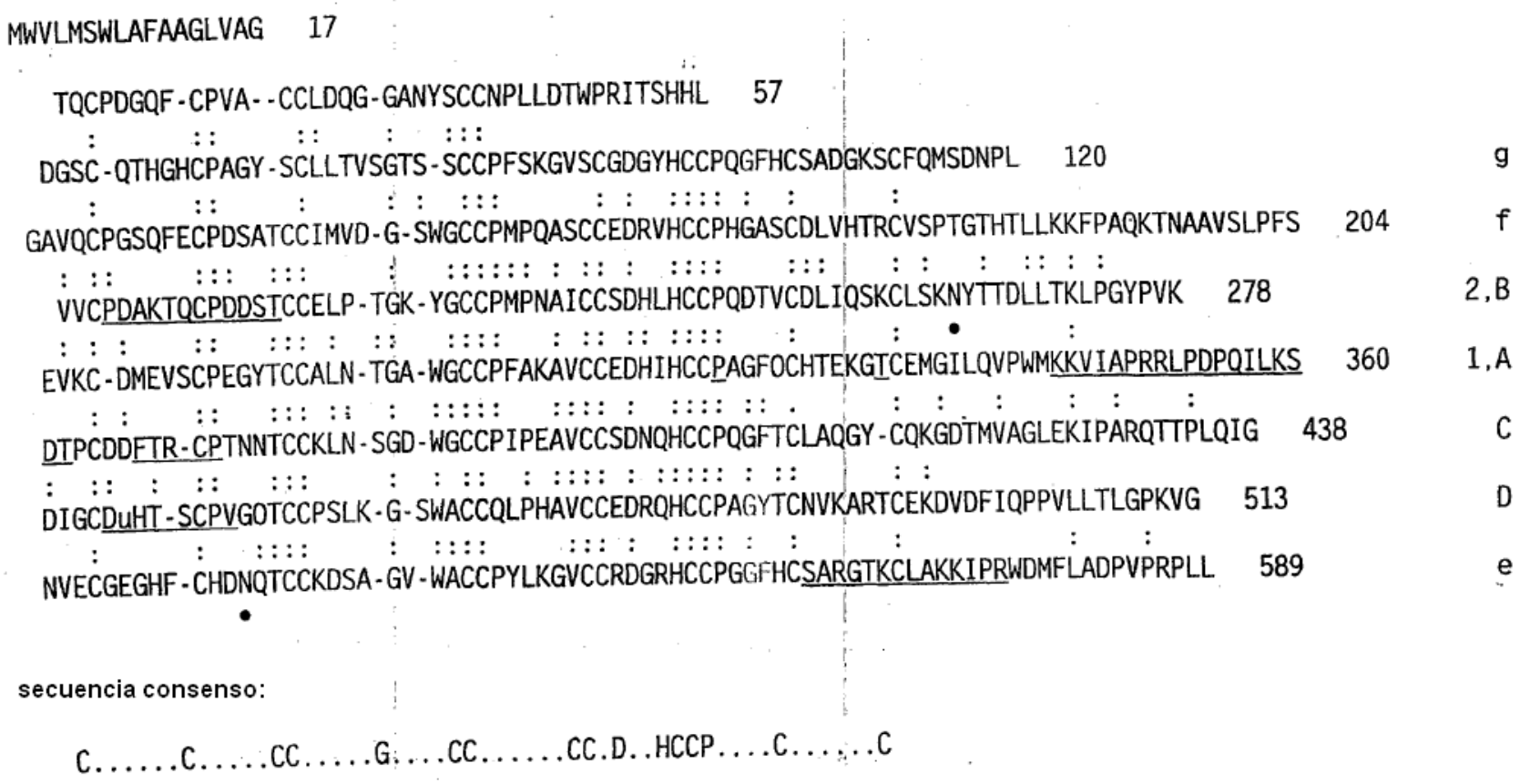
FIG.9A

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

MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRP
LLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRG
FHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCED
RVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDG
STCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTYLPA
HTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGT
CEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIP
EAVCCSDHQHCCPQRYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRGSLSHPRDIGCDQHTSC
PVGGTCCPSQGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL
ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYAQGVCCADRRHCCPAGFRCA
RRGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL*

FIG.9B

Secuencia de la proteína GP88 de ratón



secuencia consenso:

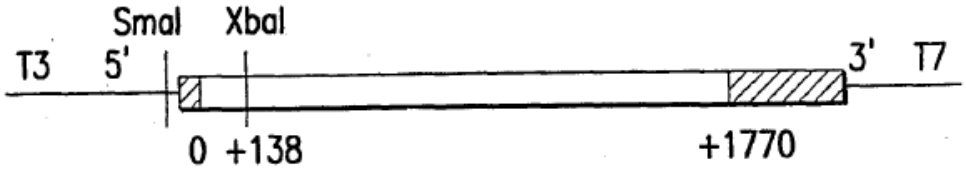
C.....C.....CC.....G....CC.....CC.D..HCCP....C.....C

1,2: epitelina 1, 2 de ratón.
A, B, C, D, e, f, g: granulina A, B, C, D, E, F, G: los extremos N de la granulina A, B, C, D se han secuenciado.
La secuencia del precursor epitelina de ratón es de Plowman et al. (1992).

FIG.10

ES 2 531 368 T3

CLON de ADNc de GP88 en SK



ESTRUCTURA DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pCMV4

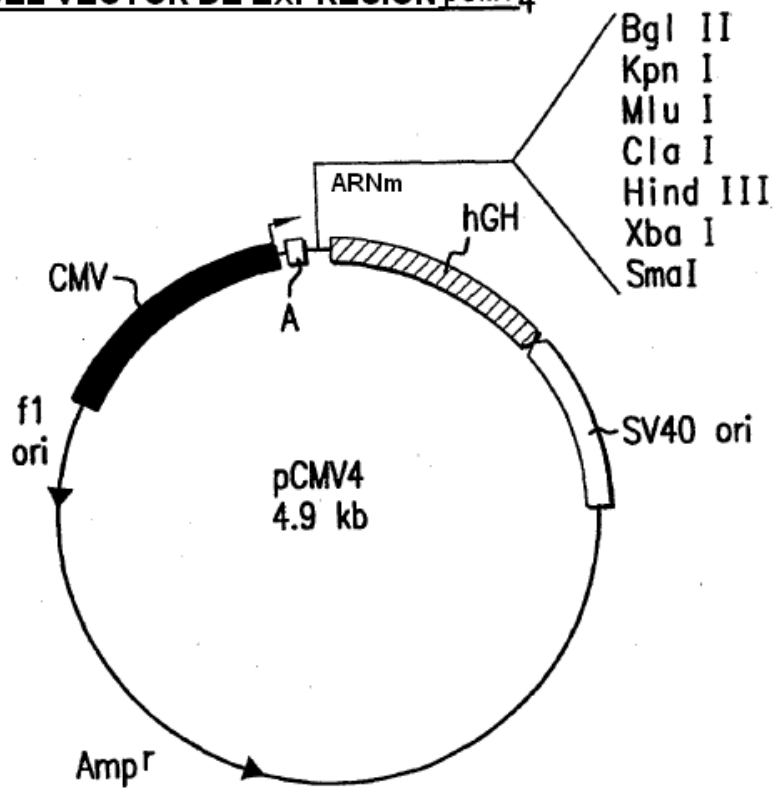


FIG.11

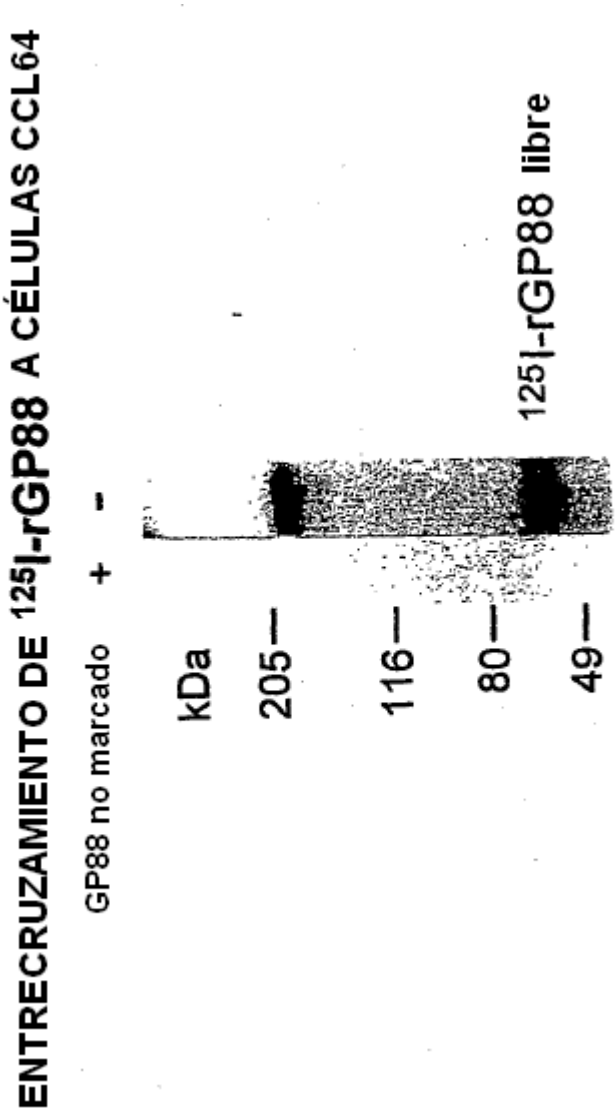

ENTRECRUZAMIENTO DE 125I-rGP88 A CÉLULAS CCL64
GP88 no marcado
+
-
kDa
205
116
80
49
125I-rGP88 libre

FIG.12

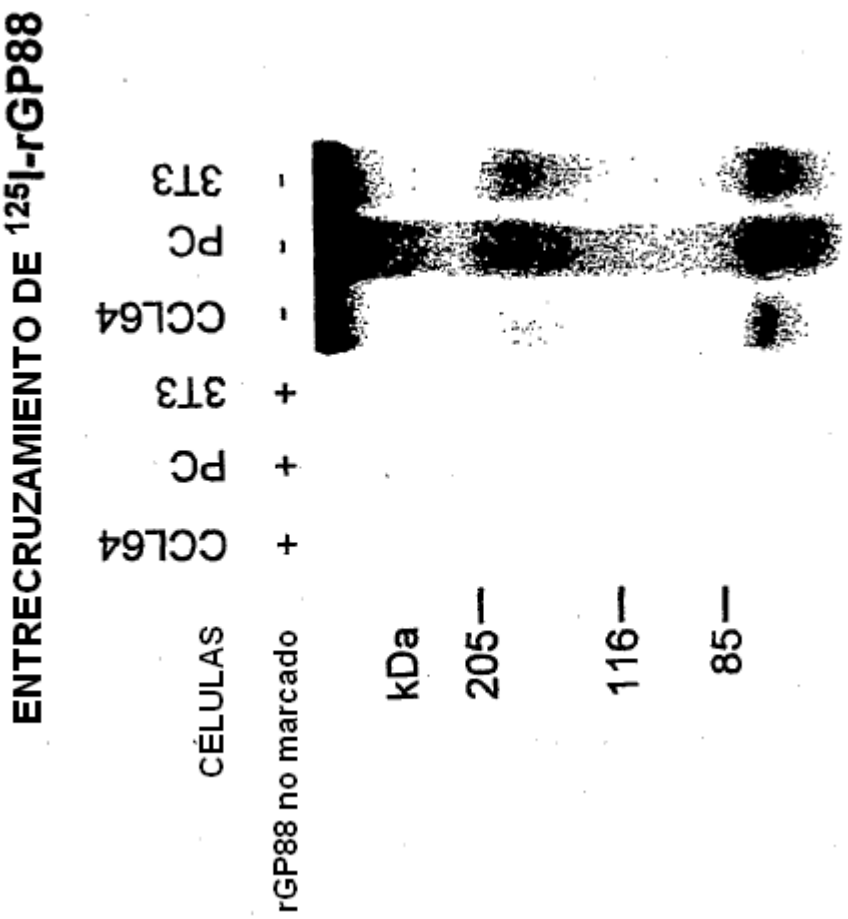

ENTRECRUZAMIENTO DE ^{125}I-rGP88
CÉLULAS
rGP88 no marcado
CCL64
PC
3T3
CCL64
PC
3T3
kDa
205
116
85

FIG.13

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

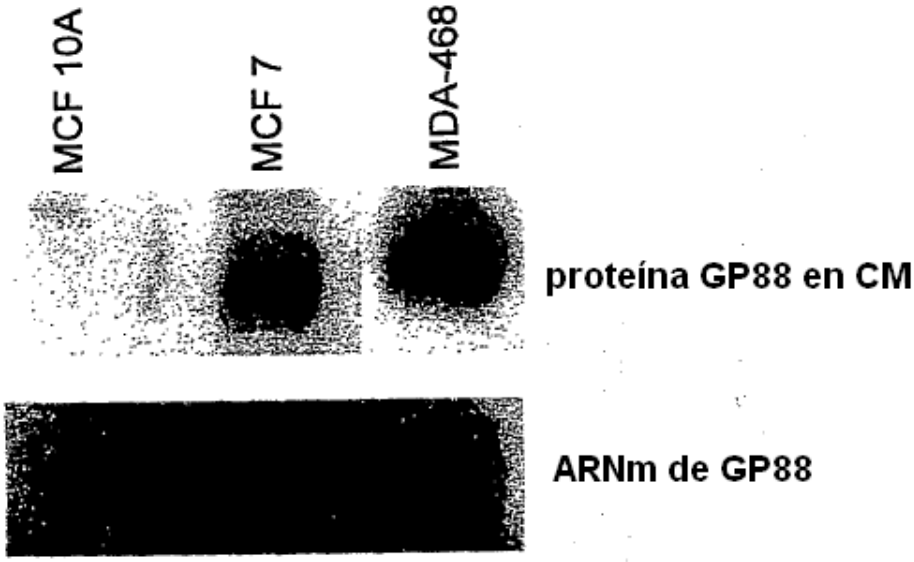


FIG.14

LA EXPRESIÓN DE GP88 SE INHIBE POR LA TRANSFECCIÓN DE ADNc ANTISENTIDO DE GP88 EN EL CARCINOMA DE MAMA HUMANO MDA-468

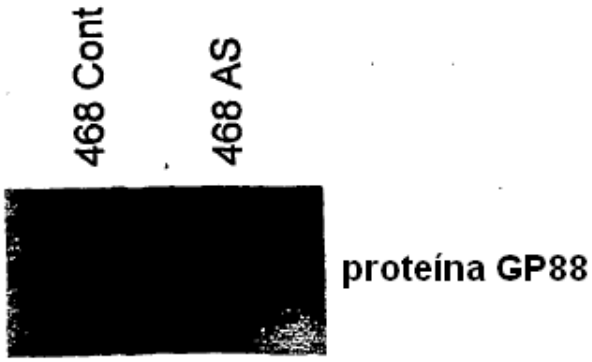


FIG.15

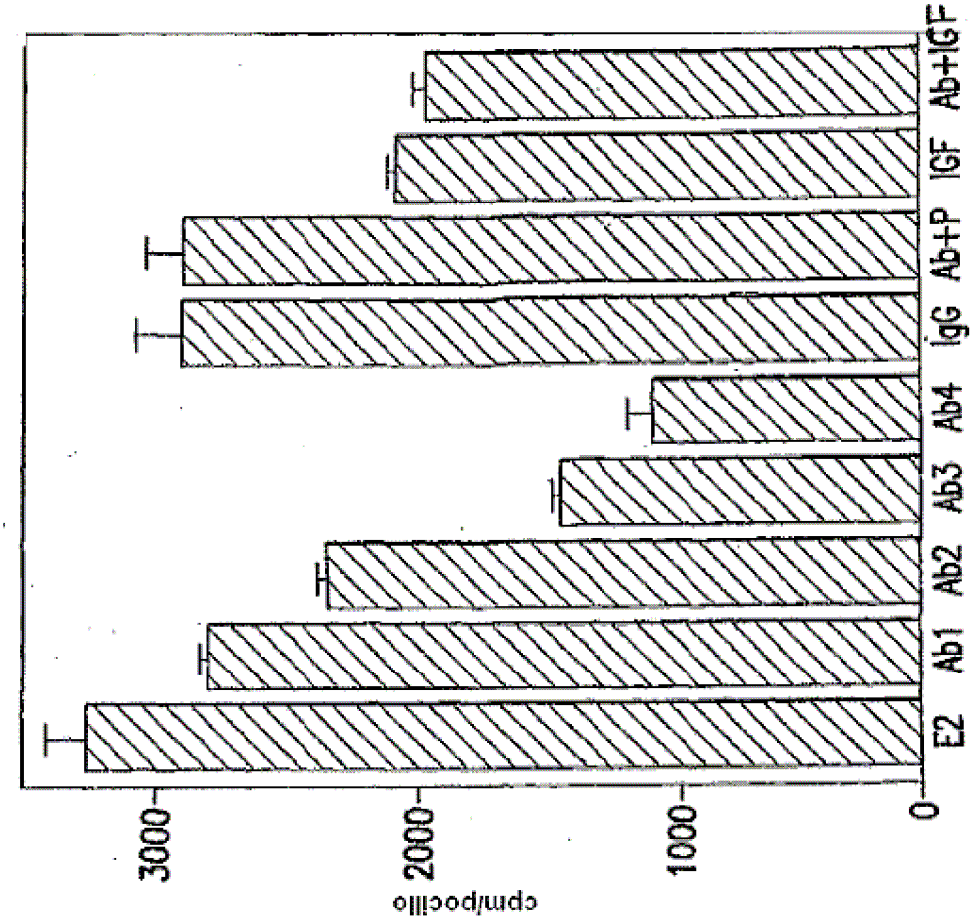


FIG.16B

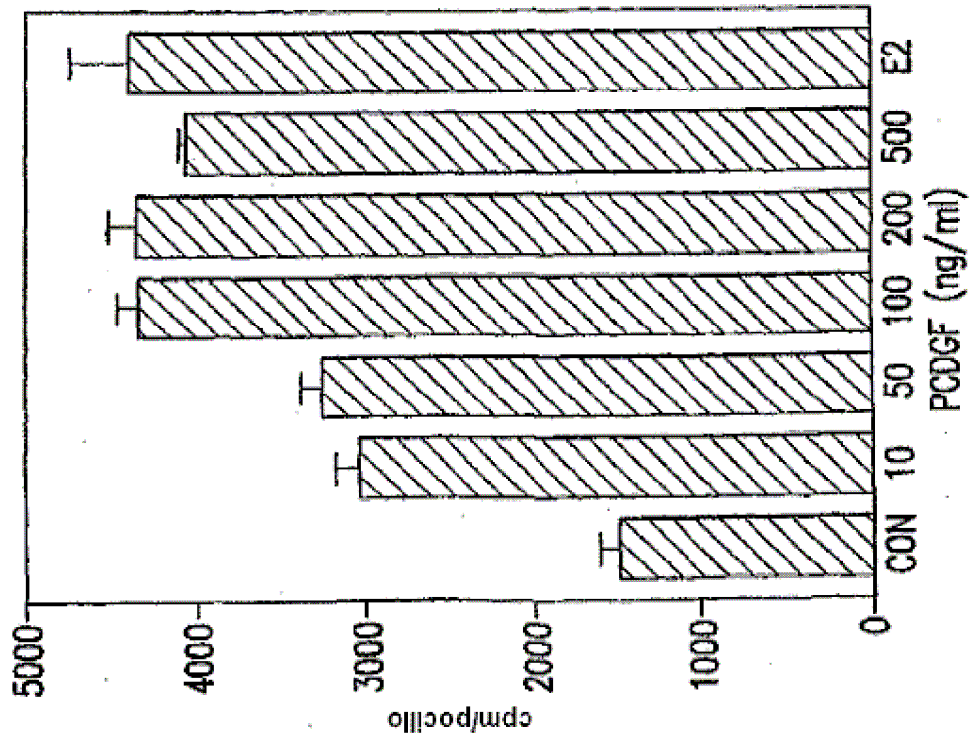


FIG.16A

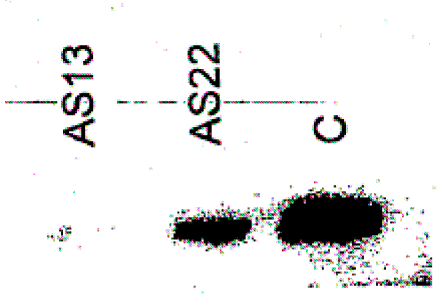


FIG.17A

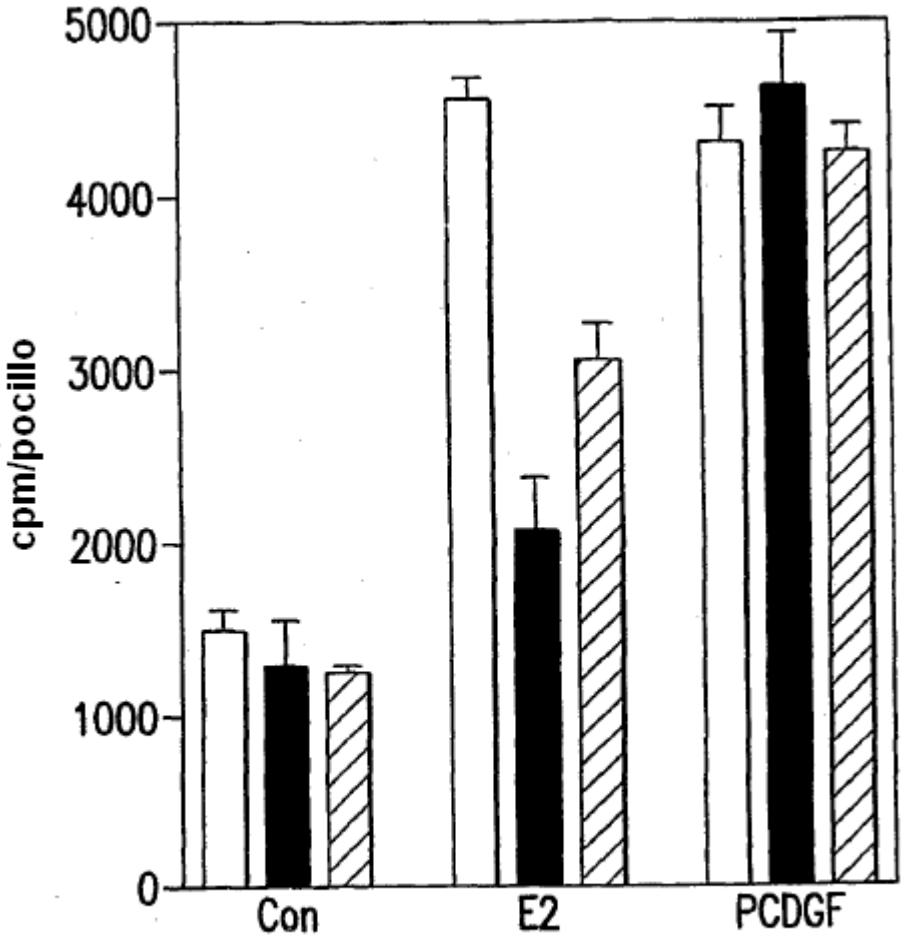


FIG.17B

FIG.18A

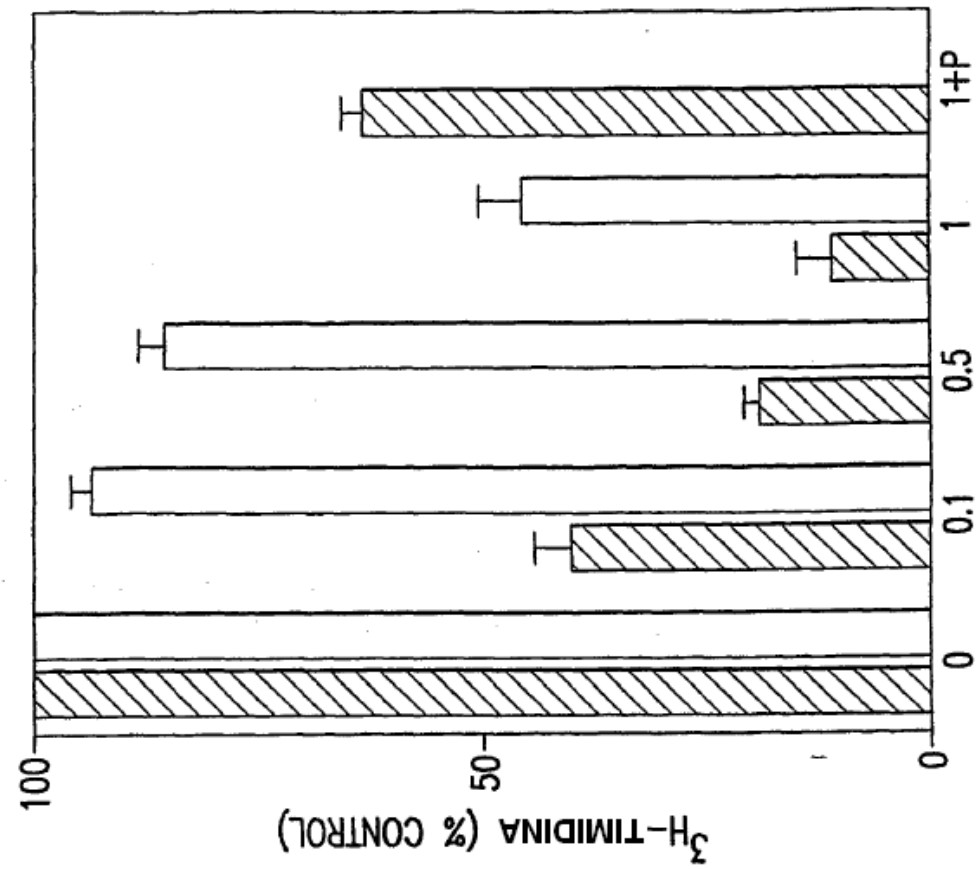


FIG.18C

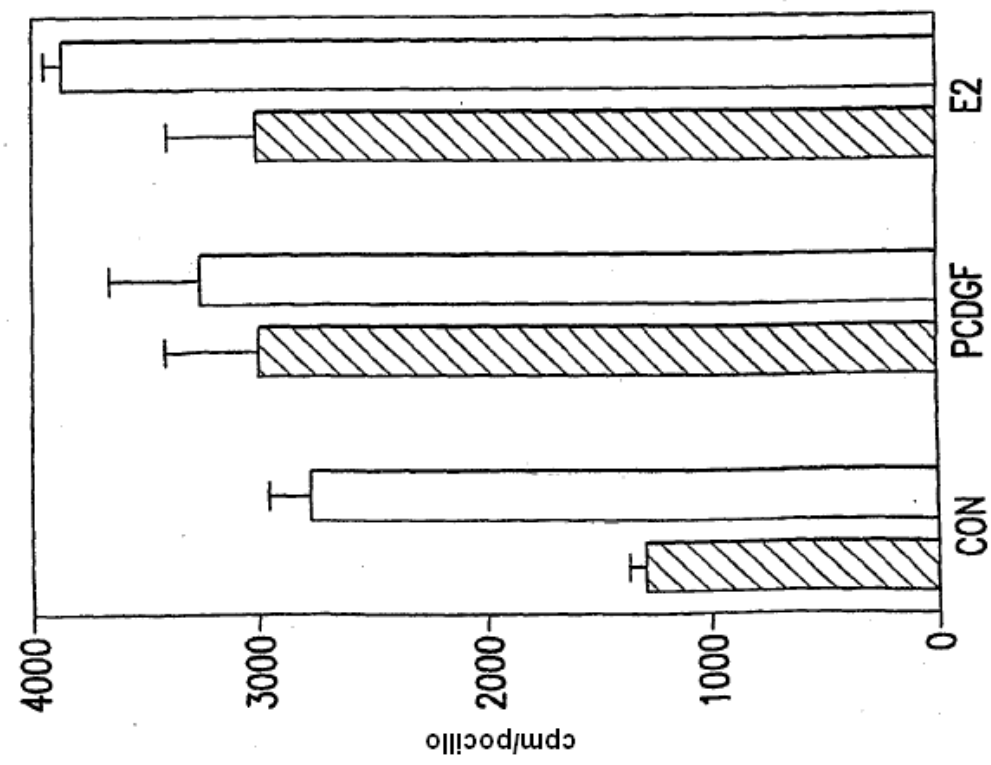


FIG.18B

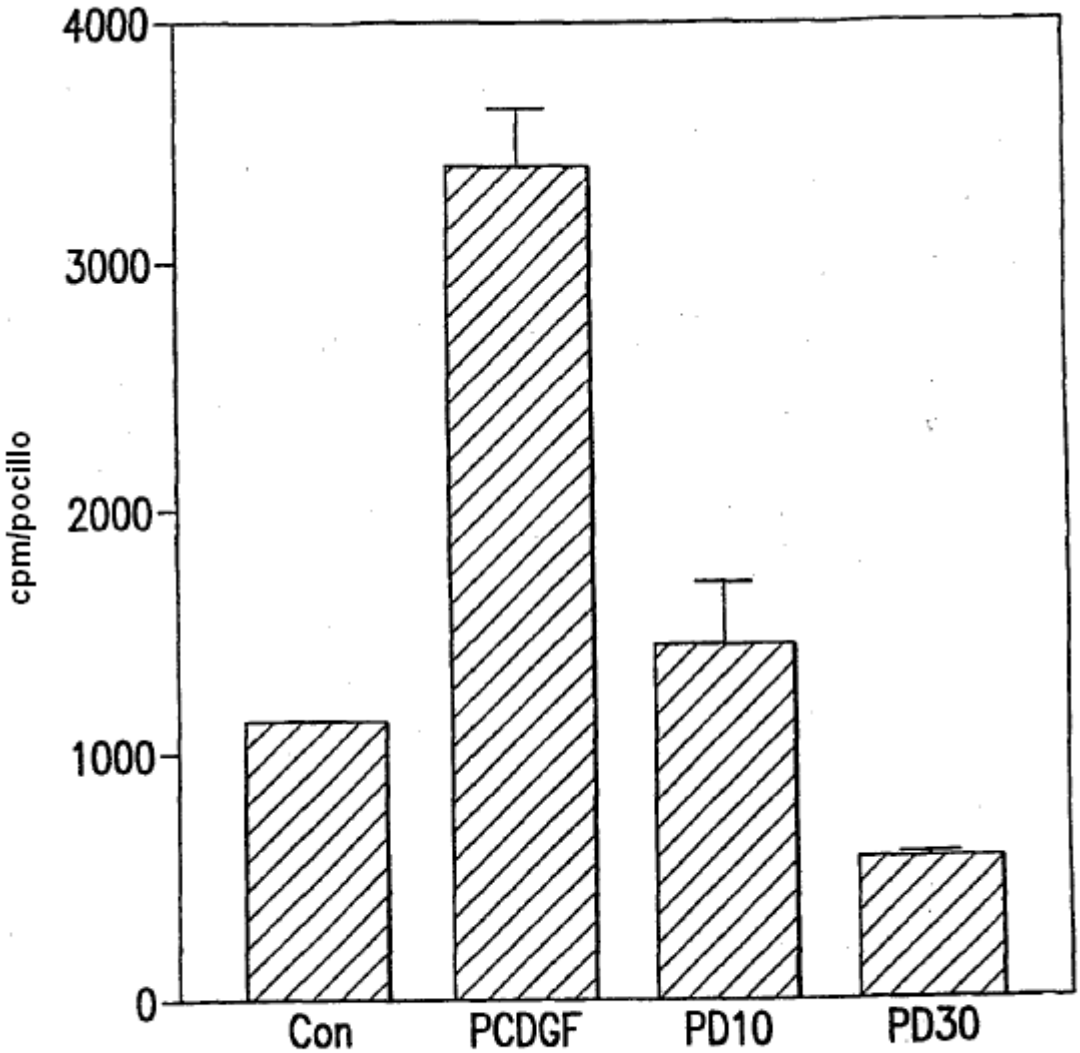


FIG.19A

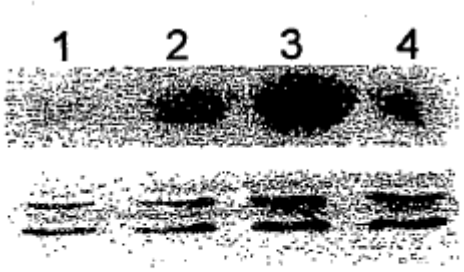


FIG.19B

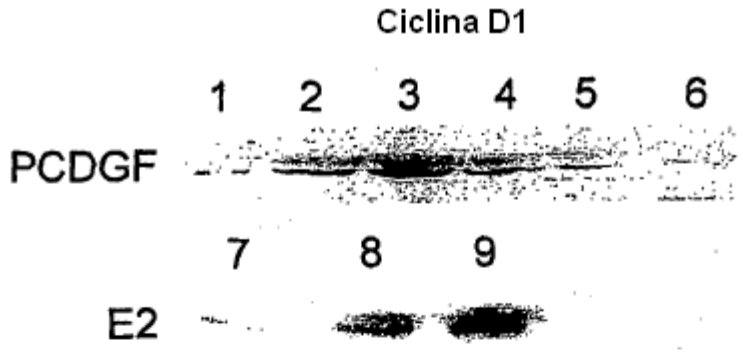


FIG.20A

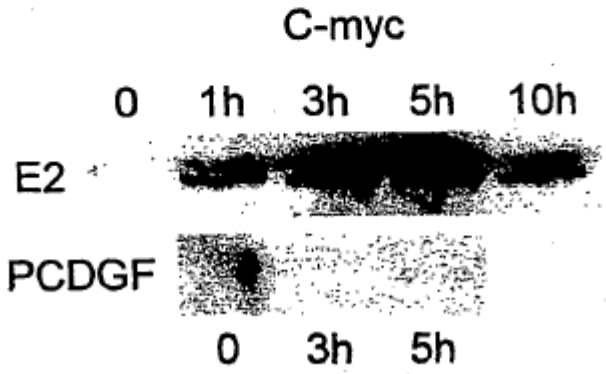


FIG.20B

CARCINOMA DUCTAL INVASIVO

LESIÓN BENIGNA

TINCIÓN DE GP88 CON ANTICUERPO ANTI-GP88
EN BIOPSIAS DE CÁNCER DE MAMA INCLUIDAS EN PARAFINA
POR INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

FIG.21

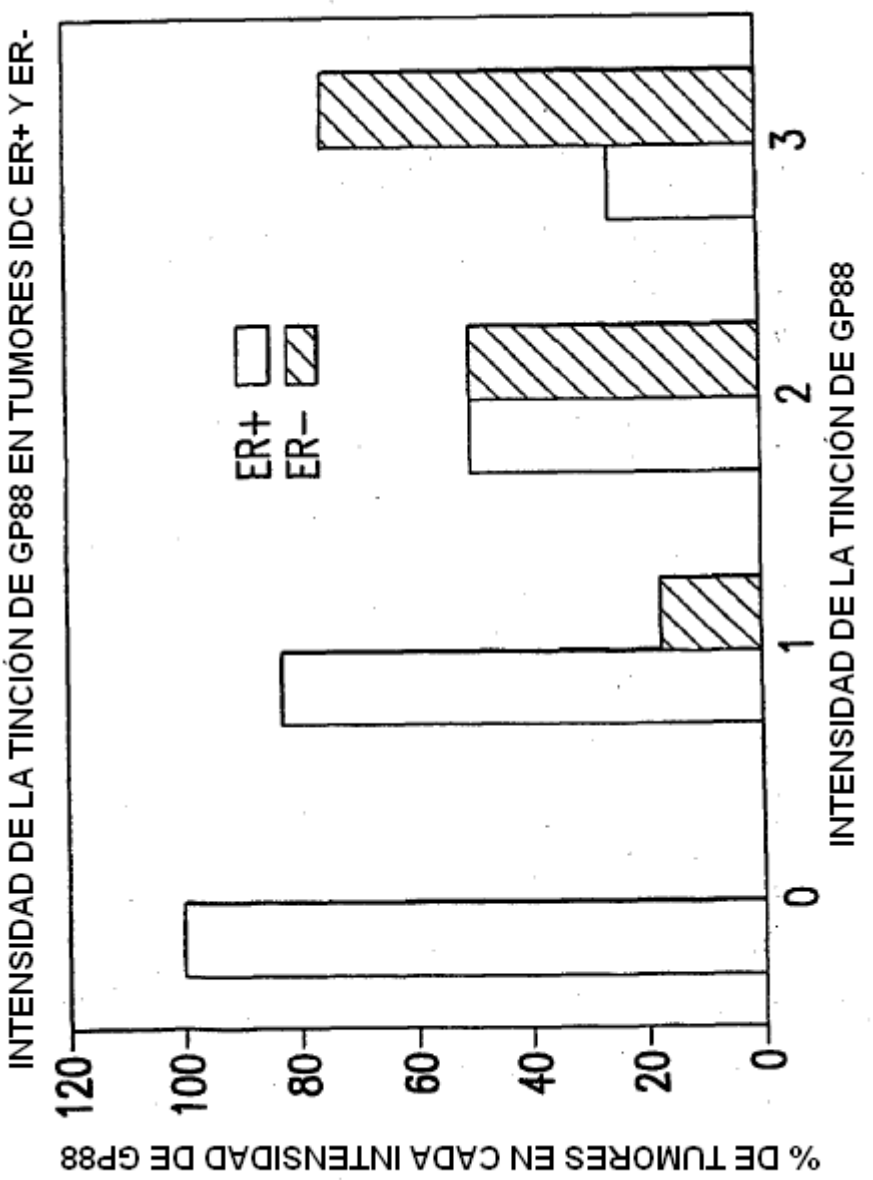

INTENSIDAD DE LA TINCIÓN DE GP88 EN TUMORES IDC ER+ Y ER-
% DE TUMORES EN CADA INTENSIDAD DE GP88
120
100
80
60
40
20
0
ER+
ER-
0
1
2
3
INTENSIDAD DE LA TINCIÓN DE GP88

FIG.22

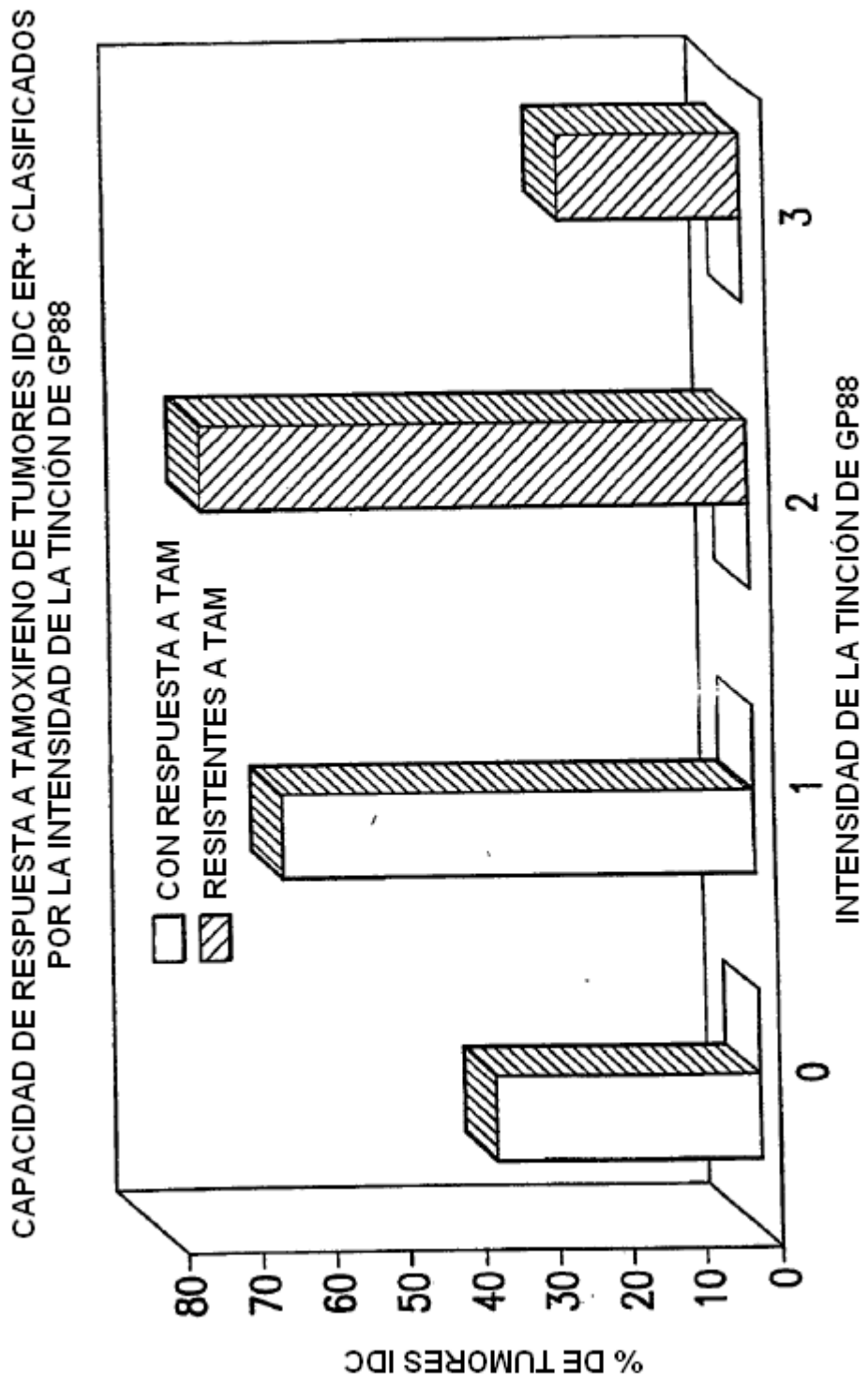

CAPACIDAD DE RESPUESTA A TAMOXIFENO DE TUMORES IDC ER+ CLASIFICADOS POR LA INTENSIDAD DE LA TINCIÓN DE GP88
CON RESPUESTA A TAM
RESISTENTES A TAM
% DE TUMORES IDC
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
1
2
3
INTENSIDAD DE LA TINCIÓN DE GP88

FIG.23