

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 002**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C07K 14/72** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2005 E 05725183 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 1730195**

54 Título: **Receptores estrogénicos y métodos de uso**

30 Prioridad:

**10.03.2004 US 552067 P**  
**13.01.2005 US 643469 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.04.2015**

73 Titular/es:

**CREIGHTON UNIVERSITY (100.0%)**  
**2500 CALIFORNIA PLAZA**  
**OMAHA, NE 68178, US**

72 Inventor/es:

**WANG, ZHAO, YI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 533 002 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Receptores estrogénicos y métodos de uso

5 **Antecedentes de la invención**

El estrógeno es un término genérico para los compuestos esteroideos que se forman en los ovarios, testículos y posiblemente en la corteza adrenal. Los ejemplos de estrógenos y compuestos que tienen actividad estrogénica incluyen dietilestilbestrol, fosfestrol, hexestrol, fosfato de poliestradiol, broparoestrol, clorotrianiseno, dienestrol, dietilestilbestrol, metestrol, colpormon, equilenina, equilin, estradiol, estriol, estrona, etinil estradiol, mestranol, mexestrol, quinestradiol y quinestrol. Los estrógenos regulan diversos procesos fisiológicos en tejidos reproductores y en tejidos mamarios, cardiovasculares, óseos, hepáticos y cerebrales. Los estrógenos también se usan en anticonceptivos orales. Otros usos de los estrógenos incluyen el alivio de las molestias de la menopausia, inhibición de la lactancia, y tratamiento de la osteoporosis, aborto inminente y diversos trastornos ováricos funcionales. Los antiestrógenos se usan para tratar el carcinoma mamario metastásico y el cáncer de próstata avanzado.

Los efectos de los estrógenos están mediados a través de receptores estrogénicos. El primer receptor estrogénico (RE) se clonó en 1986 (Green *et al.*, Nature, 320: 134 (1986) y Greene *et al.*, Science, 231: 1150 (1986)). Hasta 1995, se suponía que solo había un receptor estrogénico responsable de todos los efectos fisiológicos y farmacológicos de los estrógenos y antiestrógenos naturales y sintéticos. Sin embargo, en 1995, se clonó un segundo receptor estrogénico (Kuiper *et al.*, PNAS, 93: 5925 (1996)). El primer receptor estrogénico descubierto se denomina ahora receptor estrogénico alfa (RE- $\alpha$ ) y el segundo receptor estrogénico se denomina receptor estrogénico (RE- $\beta$ ).

El RE- $\alpha$  y el RE- $\beta$  comparten una arquitectura estructural común (Zhang *et al.*, FEBS Letters, 546: 17 (2003) y Kong *et al.*, Biochem. Soc. Trans., 31: 56 (2003)). Ambos están compuestos por tres dominios funcionales que interactúan aunque son independientes: el dominio A/B N terminal, el dominio C o de unión a ADN y el dominio D/E/F o de unión a ligando (Figura 1). El dominio N terminal del RE- $\alpha$  codifica una función de activación independiente de ligando (AF-1), una región implicada en la interacción con co-activadores y activación transcripcional de genes diana. El dominio de unión a ADN o dominio C contiene una estructura de dos dedos de cinc, que desempeña una función importante en la dimerización del receptor y en la unión a secuencias de ADN específicas. El dominio D/E/F C terminal es un dominio de unión a ligando que media la unión a ligando, la dimerización del receptor, la translocación nuclear, y una función de transactivación dependiente de ligando (AF-2). Las contribuciones relativas que tanto AF-1 como AF-2 ejercen sobre el control transcripcional varían de una manera específica del promotor de ADN y específica de la célula (Berry *et al.*, EMBO J., 9: 2811 (1990) y Tzukerman *et al.*, Mol. Endocrin., 8: 21 (1994)).

Se observó una isoforma del RE- $\alpha$  de 46 kDa que carecía de los primeros 173 aminoácidos del producto génico de longitud completa del gen del RE- $\alpha$  (dominio A/B o AF-1) que derivaba de corte y empalme alternativo del gen del RE- $\alpha$  saltando el exón 1 (Flouriot *et al.*, EMBO J., 19: 4688 (2000)). Este suceso de corte y empalme alternativo genera un ARNm que tiene un AUG en una secuencia Kozak favorable para el inicio de la traducción en fase con el resto de la fase de lectura abierta original. Por lo tanto, esta nueva isoforma del RE- $\alpha$  se denominó RE- $\alpha$ 46 y la original se denominó RE- $\alpha$ 66 (Flouriot *et al.*, EMBO J., 19: 4688 (2000)). RE- $\alpha$ 46 forma homodímeros y se une a un elemento de respuesta estrogénica (ERE) y también puede formar heterodímeros con RE- $\alpha$ 66 (Flouriot *et al.*, EMBO J., 19: 4688 (2000)). Los homodímeros de RE- $\alpha$ 46 muestran una mayor afinidad por un ERE que los homodímeros de RE- $\alpha$ 66. Además, los heterodímeros de RE- $\alpha$ 46/66 se forman preferentemente sobre los homodímeros de RE- $\alpha$ 66 y RE- $\alpha$ 46 actúa competitivamente para inhibir la transactivación mediada por el dominio AF-1 del RE- $\alpha$ 66 con ligando, pero efectúa la transactivación dependiente de AF-2 (Flouriot *et al.*, EMBO J., 19: 4688 (2000)). Por lo tanto, se pensó que el RE- $\alpha$ 46 es una isoforma de origen natural del RE- $\alpha$  que regula la señalización estrogénica mediada por el dominio AF-1 del RE- $\alpha$ 66.

El RE- $\alpha$  se expresa aproximadamente en el 15-30 % de las células epiteliales luminales y en absoluto en ninguno de los otros tipos de células en la mama humana normal. Técnicas de inmunofluorescencia de doble marcaje revelan que las células que expresan el RE- $\alpha$  están separadas de las que están marcadas con marcadores de proliferación tanto glándulas mamarias normales tanto de roedores como de seres humanos (Clarke *et al.*, Cancer Res., 57: 4987 (1997)). La expresión del RE $\alpha$  aumenta en las fases muy tempranas de hiperplasia ductal y aumenta incluso más con el aumento de la atipia, de tal manera que la mayoría de las células en hiperplasias ductales atípicas y en cáncer ductal in situ de grado nuclear bajo e intermedio contienen el RE- $\alpha$  (Khan *et al.*, Cancer Res., 54: 993 (1994) y Lawson *et al.*, Lancet, 351: 1787 (1994)). A medida que aumenta la expresión del RE- $\alpha$ , la relación inversa entre la expresión del receptor y la proliferación celular comienza a descompensarse (Shoker *et al.*, Amer. Jour. Path., 155: 1811 (1999)). Aproximadamente el 70 % de los carcinomas de mama invasivos expresan el RE- $\alpha$  y la mayoría de estos tumores contienen células proliferantes positivas al RE- $\alpha$  (Clarke *et al.*, Cancer Res., 57: 4987 (1997)).

Los receptores estrogénicos son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción activados por ligando que controlan numerosos procesos fisiológicos. Este control a menudo se produce a través de la regulación de la transcripción génica (Katzenellenbogen y Katzenellenbogen, *Breast Cancer Res.*, 2: 335 (2000); Hull *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276: 36869 (2001); McDonnell y Norris, *Science*, 296: 1642 (2002)). El receptor estrogénico utiliza mecanismos múltiples para activar o reprimir la transcripción de sus genes diana. Estos mecanismos incluyen: (a) interacción directa del receptor ocupado por el ligando con ADN en elementos de respuesta estrogénica seguido por un reclutamiento de complejos correguladores o mediadores transcripcionales, (b) interacción del RE ocupado por ligando con otros factores de transcripción tales como AP-1 (Kushner *et al.*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 74: 311 (2000)), Sp1 (Safe, *Vitam. Horm.*, 62: 231 (2001)) o NF- $\kappa$ B (McKay y Cidlowski, *Endocr. Rev.*, 20: 435 (1999)), o (c) modulación indirecta de la transcripción génica mediante el secuestro de componentes transcripcionales generales/comunes (Harnish *et al.*, *Endocrinology*, 141: 3403 (2000) y Speir *et al.*, *Circ. Res.*, 87: 1006 (2000)). Adicionalmente, la capacidad de un receptor estrogénico para regular la transcripción a través de estos diversos mecanismos parece ser específica del tipo de célula, quizá debido a diferencias en el complemento de factores correguladores transcripcionales disponibles en cada tipo de célula (Cerillo *et al.*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 67: 79 (1998); Evans *et al.*, *Circ. Res.*, 89: 823 (2001); Maret *et al.*, *Endocrinology*, 140: 2876 (1999)). Además, la regulación transcripcional depende de la naturaleza del ligando, con diversos moduladores de receptores estrogénicos selectivos naturales y sintéticos que actúan como agonistas o antagonistas de receptores estrogénicos a través de cada uno de estos diversos mecanismos (Shang y Brown, *Science*, 295: 2465 (2002); Katzenellenbogen y Katzenellenbogen, *Science*, 295: 2380 (2002); Margeat *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 326: 77 (2003); Dang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278: 962 (2003)).

Existe otra ruta de señalización mediada por estrógenos, conocida también como ruta de 'señalización de membrana', 'no clásica' o 'no genómica', que implica proteínas citoplasmáticas, factores de crecimiento y otras rutas de señalización iniciadas en membrana (Segars *et al.*, *Trends Endocrin. Met.*, 13: 349 (2002)). Diversas rutas de señalización intracelulares han mostrado comunicación con efectos rápidos iniciados por estrógenos: la ruta de la adenilato ciclasa (Aronica *et al.*, *PNAS*, 91: 8517 (1994)), la ruta de la fosfolipasa C (Le Mellay *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, 75: 138 (1999)), las rutas activadas por receptores acoplados a la proteína G (Razandi *et al.*, *Mol. Endocrin.*, 13: 307 (1999)) y la ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Watters *et al.*, *Endocrinology*, 138: 4030 (1997)). Sin embargo, todas las formas de membrana descritas hasta ahora están relacionadas con el RE- $\alpha$  pero no con el RE- $\beta$  (Segars *et al.*, *Trends Endocrin. Met.*, 13: 349 (2002)).

La señalización estrogénica se ha asociado patológicamente con un riesgo aumentado de cáncer de mama y endometrial (Summer y Fuqua, *Semin. Cancer Biol.*, 11: 339 (2001); Turner *et al.*, *Endocr. Rev.*, 15: 275 (1994); Farhat *et al.*, *FASEB J.*, 10: 615 (1996); Beato *et al.*, *Cell*, 83: 851 (1995); Dobrzycka *et al.*, *Endo. Rel. Cancer*, 10: 517 (2003)). En consecuencia, se ha descubierto que los receptores estrogénicos son esenciales en el inicio y desarrollo de la mayoría de estos cánceres. Las terapias endocrinas actuales para los cánceres de mama positivos a receptores estrogénicos están principalmente diseñadas para dirigir niveles de estrógenos, niveles de receptores estrogénicos o la actividad de estrógenos y receptores estrogénicos. El uso de tamoxifeno, un antiestrógeno parcial, en el tratamiento del cáncer de mama de fase temprana ha demostrado claramente un aumento tanto en la supervivencia sin enfermedad como en la supervivencia global. Además, recientes estudios demuestran que el tamoxifeno puede usarse como un agente quimiopreventivo para el cáncer de mama hormonodependiente. Los problemas principales de la terapia prolongada con tamoxifeno son sus efectos uterotrópicos, que dan como resultado un riesgo aumentado de cáncer endometrial, y la resistencia clínica adquirida al tamoxifeno. Esto ha conducido a una búsqueda activa de mejores moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM) que presenten las actividades agonistas o antagonistas óptimas en diversos tejidos diana sensibles a estrógenos.

El documento WO 01/00823 desvela diversas formas de corte y empalme de receptores estrogénicos humanos, incluyendo una variante que tiene un peso molecular de 66 kDa, así como anticuerpos de los mismos.

El número de acceso GenBank BX640939.1 desvela una secuencia de ácido nucleico que codifica la presente SEC ID N°: 20.

Por consiguiente, lo que se necesita son métodos adicionales y materiales que puedan usarse para explorar agentes que modulen la señalización estrogénica, así como métodos y materiales que pueden usarse para modular la señalización estrogénica.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 1, o un fragmento inmunogénico de la SEC ID N°: 1 que comprende al menos siete aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 1, preferentemente, el anticuerpo se une a una secuencia de aminoácidos representada en los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N°: 1. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Opcionalmente, el anticuerpo es anticuerpo humanizado. El anticuerpo puede unirse covalentemente a un compuesto tal como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico o un marcador detectable tal como un marcador fluorescente.

El anticuerpo puede estar presente en una composición, y la composición puede incluir un transportador farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan kits que incluyen un anticuerpo de la presente invención.

5 La presente invención también proporciona un método para preparar un anticuerpo. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. El método incluye administrar a un animal un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N<sup>o</sup>: 1, o un fragmento inmunogénico que comprende al menos siete aminoácidos contiguos de la SEC ID N<sup>o</sup>: 1, preferentemente, una secuencia de aminoácidos representada en los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N<sup>o</sup>: 1. El método incluye adicionalmente aislar el anticuerpo del animal, en el que el anticuerpo aislado se une específicamente a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N<sup>o</sup>: 1. El polipéptido o su subunidad inmunogénica puede unirse covalentemente a un polipéptido transportador. El aislamiento puede incluir obtener del animal una célula que produce el anticuerpo, y preparar un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales usando la célula. La invención también incluye un anticuerpo policlonal producido por el método y un anticuerpo monoclonal producido por el método.

15 La invención también se refiere a una célula que incluye una región codificante exógena, codificando dicha región codificante un polipéptido que incluye la SEC ID N<sup>o</sup>: 20. La región codificante puede codificar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95 % con la SEC ID N<sup>o</sup>: 20, uniéndose el polipéptido a estrógenos o antiestrógenos. La región codificante puede estar unida operativamente a un promotor constitutivo. La célula puede ser una célula eucariota o una célula procariota. La invención también proporciona una célula que expresa dichos polipéptidos.

La presente invención también proporciona un método para identificar un agente que se une a un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N<sup>o</sup>: 20, comprendiendo el método combinar *ex vivo* un polipéptido que incluya una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N<sup>o</sup>: 1, y un agente en un ensayo de unión competitiva, y detectar la formación de un complejo entre el agente y el polipéptido; y determinar la capacidad del agente para unirse preferentemente a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N<sup>o</sup>: 1. Opcionalmente, el método también incluye determinar si el agente se une a un polipéptido que incluya la SEC ID N<sup>o</sup>: 18.

30 La presente invención también proporciona métodos para detectar polipéptidos como se expone en las Reivindicaciones 25 y 26. La célula puede ser, por ejemplo, una célula tumoral, tal como una célula tumoral mamaria. El análisis puede incluir poner en contacto la célula con un anticuerpo que se une específicamente a una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N<sup>o</sup>: 1, o un fragmento inmunogénico de la misma, que comprende al menos siete aminoácidos contiguos de la SEC ID N<sup>o</sup>: 1. El análisis puede incluir amplificar un polinucleótido de ARNm para formar polinucleótidos amplificados. La amplificación incluye poner en contacto los polinucleótidos obtenidos de la célula con un primer cebador que amplificará un polinucleótido de ARNm que incluye la SEC ID N<sup>o</sup>: 22 o SEC ID N<sup>o</sup>: 25, o la combinación de las mismas, indicando la presencia de los polinucleótidos amplificados que la célula expresa el polipéptido. Un cebador del par de cebadores puede seleccionarse de los nucleótidos de la SEC ID N<sup>o</sup>: 22, nucleótidos complementarios a los nucleótidos de la SEC ID N<sup>o</sup>: 25, o la combinación de los mismos.

La invención también proporciona un método *ex vivo* para inhibir la fosforilación de ERK 1/2 o Mek 1/2 en una célula, comprendiendo el método poner en contacto una célula, que expresa un polipéptido que tiene un peso molecular de 36 kDa, medido después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS), que se une a estrógeno y que comprende una secuencia de aminoácidos representada en los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N<sup>o</sup>: 1, con un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada en los aminoácidos 13-27 en la SEC ID N<sup>o</sup>: 1.

Adicionalmente la presente invención proporciona un polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 37 o 38.

El término "comprende" y sus variaciones no tienen un significado limitante donde aparecen estos términos en la descripción y en las reivindicaciones. A menos que se especifique de otra manera, "un", "uno", "una", "el", "la" y "al menos uno/a" se usan indistintamente y significa uno o más de uno.

### 55 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la representación de la estructura de los dominios de las isoformas del receptor estrogénico alfa (RE- $\alpha$ ) humano. Se muestran los dominios (marcados con A-F), la numeración de las secuencias de aminoácidos, AF-1 y AF-2, el dominio de unión a ADN, el dominio de unión a ligando y el dominio de dimerización. También se indican los sitios de fosforilación y la función de cada dominio.

La Figura 2 es un esquema que demuestra la posible comunicación entre la membrana y las rutas de señalización genómicas del RE- $\alpha$ . Cav-1 representa caveolina-1, RE- $\alpha$ , receptor estrogénico alfa; RTK, una tirosina quinasa receptora; Ras, oncogén Ras; Mek, MAP/ERK quinasa; MAPK, una proteína quinasa activada por mitógeno; PI3K, fosfoinositol trifosfato quinasa; AKT, proteína quinasa 13; PDK1, proteína quinasa dependiente de fosfoinositol; RSK, quinasa S6 del ribosoma p90.

La Figura 3 es un dibujo que muestra que las células MCF10A infectadas con pRET desarrollan una gran colonia

en agar blando en presencia de estradiol (E2). El clon ST1 muestra un crecimiento acelerado en agar blando que contiene E2. Se incluyen células MCF7 y MCF10A como control positivo y negativo, respectivamente.

La Figura 4 es una transferencia de Western que muestra la regulación negativa de la expresión de la Caveolina-1 (Cav-1) en células MCF10A infectadas con pRET. Se analizaron las mismas cantidades de extractos celulares totales de diversas líneas celulares por transferencia de Western usando un anticuerpo anti-Cav-1 de conejo (N20). La posición de Cav-1 se indica con una flecha y el extracto celular analizado en cada carril se indica encima de cada carril.

La Figura 5 es una transferencia de Western que muestra la regulación positiva de la expresión del RE- $\alpha$  en células MCF10A infectadas con pRET. Se analizaron las mismas cantidades de extractos celulares totales de diversas líneas celulares por transferencia de Western usando anticuerpos contra RE- $\alpha$  (H22) y RE- $\beta$ . Las posiciones del RE- $\alpha$  y del RE- $\beta$  se indican con flechas y el extracto celular analizado en cada carril se indica encima de cada carril.

La Figura 6 es una transferencia de Western que muestra la activación de la fosforilación de ERK1/2 en células MCF10A infectadas con pRET. Se analizaron las mismas cantidades de extractos celulares totales de las líneas celulares por transferencia de Western usando anticuerpos contra ERK1/2 y ERK1/2 fosforilada.

La Figura 7 es una transferencia de Western que muestra la existencia de tres proteínas RE- $\alpha$  en células haploinsuficientes Cav-1, ST1 y ST3 y en células de cáncer de mama MCF7. Se analizaron las mismas cantidades de extractos celulares totales de las líneas celulares por transferencia de Western usando el anticuerpo 222 contra el RE- $\alpha$ . Las posiciones del RE- $\alpha$ 66, RE- $\alpha$ 46 y RE- $\alpha$ 36 se indican con flechas y el extracto celular analizado en cada carril se indica encima de cada carril.

La Figura 8 ilustra la organización genómica del gen del RE- $\alpha$  humano. La localización de promotores múltiples se muestra como flechas. Los sitios de inicio y detención de la traducción se indican como AUG y UGA. Los exones se muestran como recuadros numerados. También se muestra el intrón 1 con el exón 1' en un recuadro. El panel inferior muestra la estructura del ARNm de las isoformas del RE- $\alpha$ . Los sitios poli A se indican con AAA.

La Figura 9 es un dibujo de un gel de agarosa que muestra el aislamiento del ADNc que codifica la fase de lectura abierta del RE- $\alpha$ 36 por PCR. La posición del ADNc en el gel se indica con una flecha.

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos prevista de la fase de lectura abierta del RE- $\alpha$ 36. Las posiciones de aminoácidos se indican con números en el lado izquierdo de la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 20). Los últimos 27 aminoácidos que son exclusivos de RE- $\alpha$ 36 se subrayan y constituyen la SEC ID N°: 1.

La Figura 11 muestra un análisis de transferencia de Western del RE- $\alpha$ 66, RE- $\alpha$ 46 y RE- $\alpha$ 36. Los carriles marcados con RE- $\alpha$ 66, RE- $\alpha$ 46 y RE- $\alpha$ 36 representan cultivos distintos de células HEK 293 que se transfectaron con plásmidos de expresión que codifican la isoforma indicada del receptor estrogénico, y sometidas a lisis dos días después de transfectarse. El lisado de cada transfectante se inmunodetectó con un anticuerpo anti-RE- $\alpha$  (H222). Los extractos celulares de células MCF7 se usaron como control positivo. Las posiciones de RE- $\alpha$ 66, RE- $\alpha$ 46 y RE- $\alpha$ 36 se indican con flechas.

La Figura 12 muestra (a) la secuencia de ADN de la secuencia flanqueante 5' (SEC ID N°: 22) del gen que codifica al RE- $\alpha$ 36 y que incluye el promotor del RE- $\alpha$ 36, y (b) la secuencia de ADN de la secuencia flanqueante 3' (SEC ID N°: 25) del gen que codifica al RE- $\alpha$ 36 y que incluye los nucleótidos codificados por el exón 9. En la secuencia flanqueante 5' los supuestos sitios de unión de transcripción se subrayan y también se indican las proteínas que se unen a la secuencia de ácido nucleico. El sitio de inicio del ADNc también se indica con una flecha.

La Figura 13 muestra análisis de transferencia de Northern del RE- $\alpha$ 36 en diferentes células de cáncer de mama MCF10A, T47D, MCF7 y MDA-MB-231. Las posiciones del RE- $\alpha$ 36 y de la actina se indican con flechas.

La Figura 14 muestra la inhibición por RE- $\alpha$ 36 de las actividades de transactivación transcripcionales mediadas por los dominios AF-1 y AF-2 del RE- $\alpha$ 66 y RE- $\beta$ . (+E2), células tratadas con E2; (-E2), células no tratadas con E2.

La Figura 15 muestra que el RE- $\alpha$ 36 media la ruta de la MAPK quinasa iniciada en membrana estimulada por E2. (a) Transferencia de Western que muestra que el tratamiento con estradiol-17 $\beta$  (E2 $\beta$ ) de células 293 transfectadas con RE- $\alpha$ 36 induce una rápida fosforilación de Mek1/2 y ERK1/2. P-Mek1/2 y P-ERK1/2 son formas fosforiladas de Mek1/2 y ERK1/2, respectivamente. (b) El suero, pero no E2 $\beta$ , induce la fosforilación de ERK1/2 en células 293 control con vector. P-ERK1/2 es la forma fosforilada de ERK1/2. (c) Diferentes estrógenos y antiestrógenos inducen la rápida fosforilación de ERK1/2 en células 293 transfectadas con RE- $\alpha$ 36. P-ERK1/2 es la forma fosforilada de ERK1/2. (d) El tratamiento con tamoxifeno estimula constitutivamente la fosforilación de ERK1/2 en células 293 transfectadas con RE- $\alpha$ 36. P-ERK1/2 es la forma fosforilada de ERK1/2.

La Figura 16 muestra que el RE- $\alpha$ 36 media la señalización nuclear de la MAPK quinasa inducida por E2 $\beta$  y estimula el crecimiento celular. (a) Efectos de E2 $\beta$  sobre la señalización nuclear de la MAPK quinasa. Células 293 transfectadas con RE- $\alpha$  y 293 control con vector se transfectaron transitoriamente con 5 X Gal4-LUC, un plásmido indicador de luciferasa que contiene cinco sitios de unión al ADN de Gal4, y con el vector de expresión Gal-ELK que contenía un dominio de activación transcripcional ELK fusionado con el dominio de unión al ADN de Gal4 (panel superior). Después de la transfección, el cultivo celular se mantuvo en medio sin estrógenos durante 36 horas antes de añadir E2 $\beta$  (1 nM o 10 nM) durante 12 horas. Las actividades de la luciferasa con la desviación típica son representativas de más de tres experimentos realizados por duplicado. (b) E2 $\beta$  y antiestrógenos estimulan el crecimiento de células 293 transfectadas con RE- $\alpha$ 36. Se muestran datos de absorbancia a 490 nm. Se realiza el promedio de los resultados de más de cinco experimentos independientes;

se muestra la media y el ETM (error típico de la media). El significado estadístico de estos resultados también se evaluó con el ensayo de la *t* para muestras relacionadas, los valores de P fueron < 0,001 para las células 293 transfectadas con RE- $\alpha$ 36 y 293 con vector.

La Figura 17 muestra que el RE- $\alpha$ 36 es principalmente un receptor estrogénico basado en membrana. (a) Análisis de transferencia de Western de la expresión del RE- $\alpha$ 36 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama establecidas. Se separó la misma transferencia y se exploró con un anticuerpo anti-actina para garantizar la misma carga. (b) Localización subcelular del RE- $\alpha$ 36 en células 293 transfectadas con ER $\alpha$ 36. Inmunotransferencia del RE- $\alpha$ 36 en diferentes fracciones subcelulares con el anticuerpo específico contra el RE- $\alpha$ 36. C, lisado celular completo; MP membrana plasmática; C, citosol; N, núcleo. La pureza de la fracción subcelular se examinó por inmunotransferencia de diversos marcadores de proteína para la membrana plasmática, citosol, núcleo y aparato de Golgi. 5'NT, 5'nucleotidasa; D4-DGI, inhibidor de disociación de DGP; mSin3A, un componente del complejo remodelador de la histona; COPB, proteína de recubrimiento $\beta$ .

La Figura 18 muestra que E2 $\beta$  promueve el crecimiento de células de cáncer de mama negativas al RE- $\alpha$ 66, MDA-MB-231, en agar blando. Las células MDA-MB-231 crecieron en agar blando durante tres semanas en ausencia de E2 $\beta$  (0) y en presencia de E2 $\beta$  (E2) 10 nM, E2 $\beta$  10 nM y Tamoxifeno (E2+TAM) 10 nM y Tamoxifeno 10 nM (TAM) solo.

La Figura 19 muestra que E2 $\beta$  induce la señalización estrogénica iniciada en membrana en células de cáncer de mama negativas al RE- $\alpha$ 66, MDA-MB-231. El tratamiento de células MDA-MB-231 con estradiol-17 $\beta$  (E2 $\beta$ ) indujo la rápida fosforilación de ERK1/2. Las células se trataron con E2 $\beta$  (10 nM) durante tiempos diferentes, se sometieron a lisis y se analizaron por transferencia de Western usando anticuerpos dependientes e independientes de fosforilación.

### Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

Se ha descubierto que la regulación negativa del sistema de la Caveolina-1 (Cav-1) activa constitutivamente la ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), activa la expresión del receptor estrogénico alfa (RE- $\alpha$ ), y desencadena señalización estrogénica positiva. El descubrimiento ha proporcionado, por primera vez, una clara relación entre la señalización de MAPK activada y la tumorigénesis mamaria, especialmente que el progreso de cáncer de mama está estimulado por estrógenos. Este descubrimiento sugiere contundentemente que la Cav-1 desempeña una función importante en el mantenimiento del crecimiento normal de células epiteliales mamarias coordinando la comunicación entre la ruta de señalización de MAPK y la ruta de señalización estrogénica y su regularización negativa puede contribuir a descompensar estas dos rutas importantes que eventualmente conducen a la tumorigénesis mamaria. En la Figura 2 se presenta un esquema de la ruta de señalización estrogénica y la ruta de señalización de MAPK.

También se ha identificado y clonado una isoforma del receptor estrogénico alfa. Esta isoforma de 36 kDa (RE- $\alpha$ 36) del receptor estrogénico alfa se genera a partir de un promotor localizado en el primer intrón del RE- $\alpha$  original de 66 kDa (RE- $\alpha$ 66). El RE- $\alpha$ 36 se diferencia del RE- $\alpha$ 66 en que carece de los dos dominios de activación transcripcionales (AF-1 y AF-2) pero conserva la unión al ADN, la dimerización y la mayoría de los dominios de unión a ligando. La estructura del RE- $\alpha$ 36 indica que el RE- $\alpha$ 36 es un regulador de la señalización estrogénica. El RE- $\alpha$ 36 también puede mediar los efectos en membrana de la señalización estrogénica ya que se expresa principalmente en la membrana plasmática y también en el citosol y en el núcleo.

El RE- $\beta$  se ha propuesto como un regulador constitutivo de la señalización estrogénica mediada por RE- $\alpha$ 66. El hallazgo de que el RE- $\alpha$ 46 que carece del dominio AF-1 puede formar dímeros con RE- $\alpha$ 66 e inhibir la actividad de transactivación mediada por el dominio AF-1 del RE- $\alpha$ 66 indica que el RE- $\alpha$ 46 desempeña una función reguladora en la actividad funcional mediada por el dominio AF-1 del RE- $\alpha$ 66. El RE- $\alpha$ 36 carece de los dos dominios AF-1 y AF-2. Por tanto, se piensa que el RE- $\alpha$ 36 inhibe funciones biológicas en las que tanto el AF-1 como el AF-2 del RE- $\alpha$ 66 actúan como mediadores, y que el AF-2 también actúa como mediador en funciones del RE- $\alpha$ 46. Con la regulación mediada por el RE- $\alpha$ 36 y por el RE- $\alpha$ 46, ambos de los cuales podrían expresarse a diferentes niveles en diferentes tejidos, el RE- $\alpha$ 66 puede funcionar de manera diferente en diferentes tejidos diana. Se piensa que dicho mecanismo proporciona una explicación de las funciones pleiotrópicas de la señalización estrogénica en procesos biológicos diferentes.

### *Polipéptidos y peptidomiméticos de la invención*

En el presente documento se desvelan polipéptidos y la invención proporciona polipéptidos. Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere en general a un polímero de dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Todos los términos, péptido, oligopéptido y proteína, se incluyen en la definición de polipéptido y estos términos se usan indistintamente. Debe entenderse que estos términos no implican una longitud específica de un polímero de aminoácidos, ni pretenden significar o diferenciar si el polipéptido se produce usando técnicas recombinantes, síntesis química o enzimática, o es de origen natural. En el presente documento se desvelan y se describen numerosos ejemplos de polipéptidos que están dentro del ámbito de la invención. En el caso de que un polipéptido o polinucleótido sea de origen natural, dicho polipéptido o polinucleótido está aislado y,

opcionalmente, purificado. Un polipéptido o polinucleótido “aislado” es uno que está separado y es distinto de su entorno natural. Un polipéptido o polinucleótido “purificado” es uno que está al menos un 60 % liberado, preferentemente un 75 % liberado, y más preferentemente un 90 % liberado de otros componentes con los que normalmente está asociado. Los polipéptidos y nucleótidos que se producen fuera del organismo en el que se producen de manera natural, por ejemplo, a través de medios químicos o recombinantes, se considera que están aislados y purificados por definición, ya que nunca se presentan en un entorno natural. Un “polipéptido exógeno” se refiere a un polipéptido extraño, es decir, un polipéptido que no está normalmente presente en una célula, o un polipéptido que está normalmente presente en una célula pero que se ha introducido en la célula mediante un procedimiento experimental, por ejemplo, por introducción de un polinucleótido que codifica el polipéptido.

Los polipéptidos que se desvelan en el presente documento pueden ser biológicamente activos. En el presente documento dicha actividad biológica se denomina “actividad RE- $\alpha$ 36”. Un ejemplo de un bioensayo que puede usarse para determinar si un polinucleótido de la invención es biológicamente activo, implica poner en contacto una célula que exprese este polipéptido con un estrógeno o con un antiestrógeno y determinar si las actividades de la ruta MAPK aumentan o disminuyen en presencia del estrógeno o antiestrógeno, cuando se comparan con las actividades MAPK en una célula control que no expresa el polipéptido de la invención. Preferentemente, las actividades MAPK son, la fosforilación de ERK 1/2 y de Mek 1/2, y preferentemente la fosforilación de ERK 1/2 inducida por un polipéptido de la presente invención no está disminuida en presencia de un antiestrógeno. Preferentemente, la actividad del RE- $\alpha$ 36 se inicia en la membrana. La actividad del RE- $\alpha$ 36 puede medirse exponiendo una célula que exprese un polipéptido que pueda tener actividad RE- $\alpha$ 36 con diferentes ligandos. Como ejemplos de ligandos que pueden usarse se incluyen, sin limitación, estrona (E1), 17 $\alpha$ -estradiol (E2 $\alpha$ ), 17 $\beta$ -estradiol (E2 $\beta$ ), estriol (E3), estetrol (E4) o un estrógeno unido a una molécula impermeable a membrana, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA). Generalmente, cuando la actividad del RE- $\alpha$ 36 a medir va a limitarse a la actividad del RE- $\alpha$ 36 iniciada en membrana, se usa un estrógeno unido a una molécula impermeable a membrana. La cantidad de estrógeno que se usa puede variar, y está preferentemente en el intervalo de entre 1 nM y 10 nM. La célula expuesta al estrógeno es preferentemente una célula quiescente. Se permite que la exposición se produzca durante entre 5 y 90 minutos y después, la célula se somete a lisis, y los polipéptidos presentes en la célula se resuelven por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Después de transferir los polipéptidos resueltos a una membrana, se usan anticuerpos contra las formas no fosforiladas y fosforiladas de ERK 1/2 y Mek 1/2 para evaluar la activación de la ruta MAPK. Opcionalmente, puede incluirse un antiestrógeno, tal como Tamoxifeno, 4OH-Tamoxifeno o ICI-182.780, para determinar si la fosforilación de ERK 1/2 es insensible a antiestrógenos.

En el presente documento se desvela un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 20. Este polipéptido, y polipéptidos relacionados, como se describe en el presente documento, también se denominan en el presente documento RE- $\alpha$ 36, isoforma RE- $\alpha$ 36, y subunidad  $\alpha$ 36 del receptor RE. Como se muestra en la Figura 1, la isoforma RE- $\alpha$ 36 carece de restos de aminoácidos amino terminales 1-183, restos de aminoácidos carboxilo terminales 430-595 y tiene una adición de 27 restos de aminoácidos en su extremo C cuando se compara con la isoforma RE- $\alpha$ 66 (véase la Tabla 1). Los isómeros del receptor estrogénico alfa incluyen RE- $\alpha$ 36, RE- $\alpha$ 46, RE- $\alpha$ 66. Los isómeros del receptor estrogénico beta incluyen RE- $\beta$ . También se desvelan receptores estrogénicos que incluyen una isoforma RE- $\alpha$ 36. Sin pretender ser limitante, la isoforma RE- $\alpha$ 36 se piensa que modula la respuesta de una célula a estrógenos a través de la regulación de la función de los receptores estrogénicos formando un dímero con el RE- $\alpha$ 66, con el RE- $\alpha$ 46 o con el RE- $\beta$ . Además, se piensa que el RE- $\alpha$ 36 carece de actividad del factor de activación 1 (AF-1) y del factor de activación 2 (AF-2), y por tanto carece de la actividad de transcripción intrínseca. Sin embargo, se piensa que el RE- $\alpha$ 36 conserva un dominio de dimerización intacto que permite que el RE- $\alpha$ 36 forme dímeros con el RE- $\alpha$ 46, con el RE- $\alpha$ 66 o con el RE- $\beta$ . Se piensa que esta interacción permite que el RE- $\alpha$ 36 module la actividad del RE- $\alpha$ 46, del RE- $\alpha$ 66 y del RE- $\beta$  que contienen receptores estrogénicos.

Tabla 1

Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos	
SEC ID Nº y Descripción	Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos
SEC ID Nº: 18, RE-α66, Números de Acceso M12674, AAA52399	<p>MTMTLHTKASGMALLHQIQGNELEPLNRPQLKIPLERPL                      GEVYLDSSKPAVYNYPEGAAYEFNAAAAANAQVYGQTGL                      PYGPGSEAAAFGSNGLGGFPPLNSVSPSPLMLLHPPPQL                      SPFLQPHGQQVPYYLENEPSGYTVREAGPPAFYRPNSDN                      RRQGRERLASTNDKGSMMAMESAKETRYCAVCNDYASGY                      HYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMC PATNQCTIDKNRR                      KSCQACRLRKCYEVGMMKGGIRKDRRGGRMLKHKRQRDD                      GEGRGEVGSAGDMRAANLWPSPLMIKRSKNSLALS LTA                      DQMV SALLDAEPPILYSEYDPT RPFSEASMMGLLTNLAD                      RELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLCAWLEILMIG                      LVWRSM EHPVKLLFAPNLLLDRNQKCV EGMVEIFDMLL                      ATSSRF RMMNLQGEFVCLKSI ILLNSGVYTFLSSTLKS                      LEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQR LAQL                      LLILSHIRHMSNKGMEHLYSMCKNVVPLYDLLLEMLDA                      HRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSLQKYYIT                      GEAE GFPATV</p>

SEC ID N°: 19, RE-α66,  
 Números de Acceso M12674,  
 AY425004

ATGACCATGACCCCTCCACACCAAAGCATCTGGGATGGCCCTACTGCATCA  
 GATCCAAGGGAACGAGCTGGAGCCCTGAACCGTCCGCAGCTCAAGATCC  
 CCCTGGAGCGGCCCTGGGCGAGGTGTACCTGGACAGCAGCAAGCCC GCC  
 GTGTACAACTACCCCGAGGGCGCCGCCTACGAGPTCAACGCCGCGGCCGC  
 CGCCAACGCGCAGGTCTACGGTCAAGCCGGCCTCCCTACGGCCCCGGGT  
 CTGAGGCTGCGGCGTTCCGGCTCCAACGGCCTGGGGGGTTTCCCCCACTC  
 AACAGCGTGTCTCCGAGCCCGCTGATGCTACTGCACCCGCCCGCAGCT  
 GTCGCCTTTCCTGCAGCCCCACGGCCAGCAGGTGCCCTACTACCTGGAGA  
 ACGAGCCAGCGGCTACACGGTGC GCGAGGCCGCCGCCCGCCGATTTAC  
 AGGCCAAATTAGATAATCGACGCCAGGGTGGCAGAGAAAGATTGGCCAG  
 TACCAATGACAAGGGAAGTATGGCTATGGAATCTGCCAAGGAGACTCGCT  
 ACTGTGCAGTGTGCAATGACTATGCTTACGGCTACCATTATGGAGTCTGG  
 TCCTGTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTCAAGAGAAGTATCAAGGACATAA  
 CGACTATATGTGTCCAGCCACCAACCAGTGCACCATTGATAAAAAACAGGA  
 GGAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGGCTCCGCAAATGCTACGAAGTGGGAATG  
 ATGAAAGGTGGGATACGAAAAGACCGAAGAGGAGGGAGAATGTTGAAACA  
 CAAGCGCCAGAGAGATGATGGGGAGGGCAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTG  
 GAGACATGAGAGCTGCCAACCTTTGGCCAAGCCCGCTCATGATCAAACGC  
 TCTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCCTGACGGCCGACCAGATGGTCA  
 TGCCCTTGTGGATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAGTATGATCCTA  
 CCAGACCCCTCAGTGAAGCTTCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCA  
 GACAGGGAGCTGGTTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCAGGCTT  
 TGTGGATTTGACCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGCCTGGC  
 TAGAGATCCTGATGATGGTCTCGTCTGGCGCTCCATGGAGCACCCAGTG  
 AAGCTACTGTTTGTCTCTAACTTGCTCTTGGACAGGAACCAGGAAAATG  
 TGTAGAGGGCATGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTC  
 GGTTCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATCT  
 ATTATTTGCTTAATTCTGGAGTGTACACATTTCTGTCCAGCACCCGTAA  
 GTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGAGTCTGGACAAGATCACAG  
 ACACCTTGATCCACCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCTGCAGCAGCAG  
 CACCAGCGGCTGGCCCAGCTCCTCCTCATCCTTCCCCACATCAGGCACAT  
 GAGTAACAAAGGCATGGAGCATCTGTACAGCATGAAGTGCAAGAACGTGG  
 TGCCCCCTATGACCTGCTGCTGGAGATGCTGGACGCCACCGCCTACAT  
 GCGCCACTAGCCGTGGAGGGGCATCCGTGGAGGAGACGACCAAAGCCA  
 CTTGGCCACTGCGGGCTTACTTTCATCGCATTCTTGCAAAAGTATTACA  
 TCACGGGGAGGCAGAGGGTTTCCCTGCCACAGTCTGA

<p>SEC ID N°: 21, RE-<math>\alpha</math>36, Nucleótidos 234-1166 de Número de Acceso BX640939</p>	<p><b>ATGGCTATGGAATCTGCCAAGGAGACTCGCTACTGTGCAGTGTGCAATGA CTATGCTTCAGGCTACCATTATGGAGTCTGGTCTGTGAGGGCTGCAAGG CCTTCTTCAAGAGAAGTATTCAAGGACATAACGACTATATGTGTCCAGCC ACCAACCAGTGCACCATTGATAAAAAACAGGAGGAAGAGCTGCCAGGCCTG CCGGCTCCGCAAATGCTACGAAGTGGGAATGATGAAAGGTGGGATACGAA AAGACCGAAGAGGAGGGAGAATGTTGAAAACAAGCGCCAGAGAGATGAT GGGAGGGCAGGGGTGAAGTGGGTCTGCTGGAGACATGAGAGCTGCCAA CCTTGGCCAAGCCCGCTCATGATCAAACGCTCTAAGAAGAACAGCCTGG CCTGTCCCTGACGGCCGACCAGATGGTCAGTGCCTTGTGGATGCTGAG CCCCCATACTCTATTCCGAGTATGATCCTACCAGACCCCTCAGTGAAGC TTCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCAGACAGGGAGCTGGTTACA TGATCAACTGGGCGAAGAGGGTCCAGGCTTTGTGGATTTGACCCCTCCAT GATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGG TCTCGTCTGGCGCTCCATGGAGCACCCAGGGAAGCTACTGTTTCTCCTA ACTTGCTCTTGGACAGGAACCAGGGAAAATGTGTAGAGGGCATGGTGGAG ATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTTCCGCATGATGAATCT GCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATCTATTCTTTGCTTAATTCTG GTATCTCAGATGTAGAAGCAAAGAAGAGAATCCTGAACCTGCATCCTAAA ATATTTGGAAACAAGTGGTTTCCTCGTGTCTAA</b></p>
---	--

5 Los polipéptidos desvelados incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a la SEC ID N°: 20. Dichos polipéptidos incluyen los que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos una sola unidad de porcentaje mayor del 70 % idéntica a la SEC ID N°: 20, por ejemplo, una identidad del 71 %  
10 %, 72 %, 73 %, y así sucesivamente hasta una identidad del 100 % con la SEC ID N°: 20. Preferentemente, los polipéptidos incluyen los que tienen una secuencia de aminoácidos que es, en orden creciente de preferencia, al menos aproximadamente 80 % idéntica, al menos aproximadamente 90 % idéntica, o al menos aproximadamente 95 % idéntica a la SEC ID N°: 20. Preferentemente el polipéptido es biológicamente activo. Preferentemente el polipéptido tiene un peso molecular de 36 kDa, medido después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS). Normalmente, los restos implicados en la fosforilación del RE- $\alpha$ 66, por ejemplo, S236, K302 y K303 se conservan, y son aquellos restos que están implicados en la función del dominio de unión a ADN, dominio de unión a ligando y dominios de dimerización del RE- $\alpha$ 66. En la técnica se conocen restos que funcionan en la unión a ADN, unión a ligando y/o dimerización.

15 El porcentaje de identidad entre dos secuencias polipeptídicas se determina generalmente alineando los restos de las dos secuencias de aminoácidos para optimizar el número de aminoácidos idénticos a lo largo de sus secuencias; se permiten huecos en cualquiera o en ambas secuencias al realizar el alineamiento para optimizar el número de aminoácidos idénticos, aunque en cada secuencia los aminoácidos deben, no obstante, permanecer en su debido orden. Preferentemente, se comparan dos secuencias de aminoácidos usando el programa Blastp, versión 2.0.9 del algoritmo de búsqueda BLAST 2, como describen Tatusova *et al.* (FEMS Microbiol. Lett., 174,247-250 (1999)) y se encuentra disponible en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>. Preferentemente, para todos los parámetros de búsqueda de BLAST 2, se usan los valores por defecto, que incluyen, matriz = BLOSUM62; penalización por apertura de hueco = 11, penalización por extensión de hueco = 1, caída de alineación de hueco = 50, esperanza = 10, tamaño de palabra = 3 y opcionalmente, filtrar. En la comparación de dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo de búsqueda BLAST, una similitud estructural se denomina "identidad".

20 La invención también proporciona polipéptidos que son fragmentos de la isoforma del receptor estrogénico RE- $\alpha$ 36 como se reivindica en las Reivindicaciones 37 a 38. Dichos fragmentos son útiles para preparar anticuerpos que se unen específicamente a la isoforma del receptor estrogénico RE- $\alpha$ 36. Los ejemplos de fragmentos que son útiles para suscitar anticuerpos incluyen una isoforma del receptor estrogénico que se ha truncado, bien en el extremo N, o en el extremo C, o en ambos, mediante uno o más aminoácidos, siempre que el fragmento contenga al menos 7 aminoácidos contiguos, incluso más preferentemente al menos 10 aminoácidos contiguos, y más preferentemente al menos 12 aminoácidos contiguos.

35 La divulgación proporciona polipéptidos de fusión que tienen un polipéptido transportador acoplado un polipéptido como se desvela en el presente documento. Un polipéptido transportador puede usarse para aumentar o disminuir la solubilidad de un polipéptido de fusión. El polipéptido transportador también puede usarse para aumentar la inmunogenicidad del polipéptido de fusión para aumentar la producción de anticuerpos que se unen a un polipéptido de la invención. Por ejemplo, un polipéptido transportador puede fusionarse con un fragmento de un polipéptido como se desvela en el presente documento para facilitar la producción de anticuerpos que se unen específicamente al RE- $\alpha$ 36. Un ejemplo de dicho fragmento es un polipéptido que tiene los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N°: 1. La divulgación no está limitada por los tipos de polipéptidos transportadores usados para crear polipéptidos de fusión.

Los ejemplos de polipéptidos transportadores incluyen hemocianina de lapa americana, albúmina de suero bovino, ovoalbúmina, albúmina de suero de ratón, albúmina de suero de conejo y similar. Los polipéptidos transportadores también pueden usarse para proporcionar la separación o detección de un polipéptido de fusión. Los ejemplos de dichas proteínas transportadoras incluyen glutatión S-transferasa, proteína de unión a maltosa, proteína de unión a quitina, y polipéptidos que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos: QFFGLM (SEC ID N°: 2), EQKLISEEDL (SEC ID N°: 3), KAEDESS (SEC ID N°: 4), YPYDVP-DYA (SEC ID N°: 5), DYKDDDDK (SEC ID N°: 6), YTDIEMNRLGK (SEC ID N°: 7), MASMTGGGQMG (SEC ID N°: 8), DTYRYI (SEC ID N°: 9), TDFYLK (SEC ID N°: 10), HHHHHH (SEC ID N°: 11), HPOL (SEC ID N°: 12), QYPALT (SEC ID N°: 13), QRQYGDVFKGD (SEC ID N°: 14), EYMPME (SEC ID N°: 15), EFMPME (SEC ID N°: 16), y RYIRS (SEC ID N°: 17). Por consiguiente, se puede detectar o aislar un polipéptido de fusión por interacción con otros componentes que se unen a la parte del polipéptido transportador del polipéptido de fusión. Por ejemplo, un polipéptido de fusión que tiene avidina como polipéptido transportador puede detectarse o separarse con biotina usando métodos conocidos. También puede usarse un polipéptido transportador para producir la fusión del polipéptido para formar un cuerpo de inclusión después de la expresión en una célula. Un polipéptido transportador también puede ser una señal exportadora que produce la exportación de un polipéptido de fusión fuera de una célula, o que dirige a un polipéptido de fusión a un compartimento en el interior de una célula, tal como el periplasma.

También se desvelan dos o más polipéptidos de la invención que están unidos de manera ininterrumpida en una sola cadena de aminoácidos. En el presente documento dicho polipéptido recibe el nombre de polipéptido. Los polipéptidos pueden conectarse mediante enlazadores (véase Stahl *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 6.558.924). Dicha poliproteína puede aislarse y después escindirse para producir polipéptidos o polipéptidos acoplados como se desvela en el presente documento. La poliproteína puede escindirse usando numerosos métodos, tales como escisión química o con proteasas. Por consiguiente, pueden diseñarse enlazadores para escindir con proteasas o productos químicos específicos. Los ejemplos de compuestos que pueden usarse para escindir poliproteínas como se desvela en el presente documento, incluyen productos químicos y enzimas. Los ejemplos de productos químicos incluyen bromuro de cianógeno, ácido fórmico y calor, hidroxilamina y calor, ácido yodoisobenzoico-2-(2-nitrofenil)-3-metil-3-bromindolina en ácido acético y similares. Los ejemplos de enzimas incluyen subtilisina Ala-64, clostripaína, colagenasa, enteroquinasa, factor Xa, renina,  $\alpha$ -trombina, tripsina, quimiotripsina, proteasa del virus del grabado del tabaco, y similares. Las poliproteínas pueden usarse para aumentar la producción eficaz de los polipéptidos como se desvela en el presente documento. En la técnica se conocen métodos para producir poliproteínas (véase Coolidge *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 6.127.150).

Los polipéptidos de la invención incluyen análogos que se han modificado por sustitución o delección de uno o más aminoácidos contiguos o no contiguos o que se han modificado química o enzimáticamente, por ejemplo, por unión a un grupo indicador, mediante una modificación o derivatización, o ciclado, de un grupo N-terminal, C-terminal u otro grupo funcional, siempre que el análogo conserve la actividad biológica o sea capaz de estimular la producción de anticuerpos que se unan al RE- $\alpha$ 36. En algunos aspectos, la divulgación proporciona polipéptidos que no son análogos.

Los sustitutos de un aminoácido en los polipéptidos de la invención son preferentemente sustituciones conservativas, que se seleccionan de otros miembros de la clase a la cual pertenecen los aminoácidos. Por ejemplo, se sabe bien en la técnica de la bioquímica de proteínas que un aminoácido perteneciente a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica similar (tal como carga, hidrofobia e hidrofilia) puede generalmente sustituirse por otro aminoácido sin alterar sustancialmente la estructura de un polipéptido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los ejemplos de sustituciones conservativas preferidas incluyen Arg por Lys y viceversa para mantener una carga positiva; Asp por Glu y viceversa para mantener una carga negativa; Thr por Ser para conservar un OH libre; y Asn por Gln para conservar un NH<sub>2</sub> libre. Los aminoácidos relacionados (tales como 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, homocisteína, ácido 2-aminoadípico, ácido 2-aminopimérico, ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, ácido  $\beta$ -carboxiaspártico), las amidas aminoacídicas (ornitina, homoarginina, N-metil lisina, dimetil lisina, trimetil lisina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico, homoarginina, sarcosina e hidroxilisina) y las fenilalaninas sustituidas, norleucina, norvalina, ácido 2-amino octanoico, ácido 2-amino heptanoico, estatina,  $\beta$ -valina, naftilalaninas, ácido tetrahidroquinolin-3-carboxílico y las tirosinas halogenadas pueden cambiarse por un aminoácido similar.

La divulgación proporciona peptidomiméticos de los polipéptidos de la invención. Un peptidomimético describe un polipéptido en el que al menos uno de los enlaces peptídicos se ha reemplazado por un enlace no peptídico, tal como los comúnmente usados en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos, con propiedades análogas a las del polipéptido molde. (Fauchere, J., *Adv. Drug Res.*, 15: 29 (1986), Evans *et al.*, *J. Med. Chem.*, 30: 1229 (1987), y Janda *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 6.664.372). Los peptidomiméticos son estructuralmente similares a los polipéptidos que tienen enlaces peptídicos, pero tienen una o más uniones peptídicas opcionalmente reemplazadas por una unión tal como --CH<sub>2</sub>NH--, --CH<sub>2</sub>S--, --CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>--, --CH=CH--(cis y trans), --COCH<sub>2</sub>--, --CH(OH)CH<sub>2</sub>--, y --CH<sub>2</sub>SO--, mediante métodos conocidos en la técnica. Las ventajas de los peptidomiméticos sobre las realizaciones con polipéptidos naturales pueden incluir producción más rentable, mayor estabilidad química,

especificidad alterada y propiedades farmacológicas mejoradas, tales como semivida, absorción, fuerza y eficacia.

La sustitución de uno o más aminoácidos dentro de un polipéptido o un peptidomimético con un D aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse para generar polipéptidos y peptidomiméticos que sean, por ejemplo, más estables y más resistentes a proteasas endógenas.

Los polipéptidos y peptidomiméticos de la invención y como se describe en el presente documento pueden modificarse para su uso *in vivo* por la adición, en el extremo amino y/o extremo carboxilo, de un agente bloqueante para disminuir la degradación *in vivo*. Esto puede ser útil en aquellas situaciones en las que el extremo del polipéptido tiende a degradarse por proteasas *in vivo*. Dichos agentes bloqueantes pueden incluir, sin limitación, secuencias peptídicas adicionales relacionadas o no relacionadas que pueden unirse a los restos terminales amino y/o carboxilo del polipéptido o peptidomimético de la invención y como se describe en el presente documento. Esto puede realizarse durante la síntesis química, o mediante tecnología de ADN recombinante por métodos conocidos para los expertos habituales en la técnica. Como alternativa, los agentes bloqueantes, tales como ácido pirroglutámico, u otras moléculas conocidas en la técnica, pueden unirse a los restos terminales amino y/o carboxilo, o el grupo amino en el extremo amino o grupo carboxilo en el extremo carboxilo puede reemplazarse por un grupo funcional diferente. Por consiguiente, la invención proporciona polipéptidos y peptidomiméticos que están bloqueados en el extremo amino, el extremo carboxilo o la combinación de los mismos.

Los polipéptidos de la invención y como se desvela en el presente documento pueden producirse a una gran o pequeña escala a través del uso de numerosos sistemas de expresión que incluyen, pero sin limitación, células o microorganismos que se transforman con un vector recombinante en el que se ha insertado un polipéptido como se desvela en el presente documento. El uso de dichos vectores y métodos recombinantes se describen más adelante. Estos vectores pueden usarse para transformar diversos organismos. Como ejemplos de dichos organismos se incluyen bacterias (por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*); levaduras (por ejemplo *Saccharomyces* y *Pichia*); células de insectos (por ejemplo, baculovirus); de plantas; o de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, VERO, HeLa, MDCK, W138 y NIH 3T3). También son útiles, como células hospedadoras, las células primarias o secundarias obtenidas directamente de un mamífero que se ha transfectado con un vector.

También pueden usarse métodos sintéticos para producir polipéptidos y peptidomiméticos de la invención y como se desvela en el presente documento. Dichos métodos son conocidos y rutinarios en la técnica. Por ejemplo, el método de síntesis peptídica en fase sólida es un método establecido y muy usado. Los polipéptidos pueden purificarse fácilmente por fraccionamiento sobre columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en resina de intercambio aniónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; cromatografía de afinidad por ligando y similares. Los polipéptidos también pueden purificarse fácilmente a través de la unión de un polipéptido de fusión con medios de separación, seguido de escisión del polipéptido de fusión para liberar un polipéptido purificado. Por ejemplo, puede crearse un polipéptido de fusión que incluya un sitio de escisión del factor Xa entre el polipéptido y el polipéptido transportador. El polipéptido de fusión puede estar unido a una columna de afinidad a la cual se une la parte del polipéptido transportador del polipéptido de fusión. El polipéptido de fusión puede después escindirarse con factor Xa para liberar el polipéptido. Dicho sistema se ha usado junto con un kit de eliminación del factor Xa para la purificación de los polipéptidos como se desvela en el presente documento.

#### *Polinucleótidos*

También se desvelan polinucleótidos que codifican los polipéptidos como los desvelados en el presente documento. El término "polinucleótido" se refiere en general a un polímero de dos o más nucleótidos unidos covalentemente en una orientación de 5' a 3'. Un polinucleótido puede incluir secuencias de nucleótidos que tienen diferentes funciones, incluyendo, por ejemplo, secuencias codificantes, y secuencias no codificantes tales como secuencias reguladoras. Más adelante se define lo que es una secuencia codificante, una secuencia no codificante y una secuencia reguladora. Las expresiones ácido nucleico, molécula de ácido nucleico y oligonucleótido y proteína, incluidas en la definición de polinucleótido y estos términos, se usan indistintamente. Debe entenderse que estas expresiones no significan una longitud específica de un polímero de nucleótidos, ni tampoco pretenden implicar o diferenciar si el polinucleótido se produce usando técnicas recombinantes, síntesis química o enzimática, o si es de origen natural.

Los polinucleótidos pueden ser bicatenarios o monocatenarios, y la secuencia de la segunda cadena, complementaria, la dictamina la secuencia de la primera cadena. El término "polinucleótido" se interpreta por lo tanto en general como que abarca un polímero de ácido nucleico monocatenario, su complemento, y el dúplex formado por el mismo. La "complementariedad" de polinucleótidos se refiere a la capacidad de dos polinucleótidos monocatenarios para emparejar sus bases entre sí, emparejándose una adenina de un polinucleótido con una timidina (o uracilo, en el caso de ARN) del otro, y emparejándose una citidina de un polinucleótido con una guanina del otro. Dos polinucleótidos son complementarios entre sí cuando una secuencia de nucleótidos en un polinucleótido puede emparejarse con una secuencia de nucleótidos en un segundo nucleótido. Por ejemplo, 5'-ATGC y 5'-GCAT son completamente complementarias, como lo son 5'-GCTA y 5'-TAGC.

Un ejemplo de un polinucleótido desvelado es la SEC ID N°: 21 (véase la Tabla 1, también los nucleótidos 234-1166 de la secuencia de nucleótidos presente en el número de acceso GenBank BX640939). Los polinucleótidos desvelados también incluyen polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que es "sustancialmente complementaria" a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención, o el complemento de dicha secuencia de nucleótidos. Los polinucleótidos "sustancialmente complementarios" pueden incluir al menos un emparejamiento erróneo, sin embargo, los dos polinucleótidos aún tendrán la capacidad de hibridarse. Por ejemplo, el nucleótido central de cada una de las dos moléculas de ADN 5'-AGCAAATAT y 5'-ATATATGCT no se emparejará, pero estos dos polinucleótidos son, no obstante, sustancialmente complementarios como se define en el presente documento. Dos polinucleótidos son sustancialmente complementarios si se hibridan en condiciones de hibridación ilustradas por 2X SSC (SSC: NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM, pH 7,6) a 55 °C. Los polinucleótidos sustancialmente complementarios desvelados preferentemente comparten al menos una región de al menos 20 nucleótidos de longitud cuya región compartida tiene al menos una identidad de nucleótidos del 60 %, preferentemente al menos una identidad de nucleótidos del 80 %, más preferentemente al menos una identidad de nucleótidos del 90 %, y más preferentemente al menos una identidad de nucleótidos del 95 %. Los polinucleótidos sustancialmente complementarios particularmente preferidos comparten una pluralidad de dichas regiones. Preferentemente los polinucleótidos tienen una secuencia de nucleótidos que es al menos 70 % idéntica a la SEC ID N°: 21. Más preferentemente, los polinucleótidos tienen una secuencia de nucleótidos que es al menos un solo porcentaje de unidad mayor que el 70 % idéntica a la SEC ID N°: 21, por ejemplo, 71 %, 72 %, 73 % de identidad y así sucesivamente hasta el 100 % de idéntica a la SEC ID N°: 21. Incluso más preferentemente, los polinucleótidos tienen una secuencia de nucleótidos que es al menos 80 % idéntica, al menos 90 % idéntica o al menos 95 % idéntica a la SEC ID N°: 21. Más preferentemente, los polinucleótidos tienen una secuencia de nucleótidos que es 100 % idéntica a la SEC ID N°: 21. Un polinucleótido que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEC ID N°: 21 tiene actividad de RE- $\alpha$ 36.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de polinucleótidos se determina generalmente alineando las bases de dos secuencias de polinucleótidos para optimizar el número de bases idénticas a lo largo de toda la longitud de sus secuencias; al realizar el alineamiento se permiten huecos en cualquiera o en ambas secuencias para optimizar el número de bases idénticas, aunque sin embargo las bases en cada secuencia no tienen que permanecer en su orden apropiado. Las dos secuencias de polinucleótidos se comparan preferentemente usando el programa Blastn, versión 2.0.11 del algoritmo de búsqueda BLAST 2, también como describen Tatusova *et al.* (FEMS Microbiol. Lett, 174, 247-250 (1999)) y disponible en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>. Preferentemente, para todos los parámetros de búsqueda BLAST 2, se usan los valores por defecto, incluyendo recompensa por coincidencia = 1, penalización por emparejamiento erróneo = -2, penalización por apertura de hueco = 5, penalización por extensión de hueco = 2, caída de alineación de hueco = 50, esperanza = 10, tamaño de palabra = 11 y opcionalmente, filtrar. Las localizaciones y los niveles de la identidad de secuencias de nucleótidos entre dos secuencias de polinucleótidos también pueden determinarse fácilmente usando el programa informático de alineamiento de secuencias múltiple CLUSTALW (J. Thompson *et al.*, Nucl. Acids Res., 22: 4673-4680 (1994)), disponible en la página web [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/).

Debe entenderse que un polinucleótido que codifica un polipéptido como se desvela en el presente documento no está limitado a un polinucleótido que contiene toda o una parte de la secuencia de nucleótidos de ADNc o genómico de origen natural, sino también incluye la clase de polinucleótidos que codifica dichos polipéptidos como resultado de la degeneración del código genético. Por ejemplo, la secuencia de polinucleótidos de origen natural SEC ID N°: 21 es además un miembro de la clase de secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene aminoácidos de la SEC ID N°: 20. La clase de secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia polipeptídica seleccionada es larga pero finita, y la secuencia de nucleótidos de cada miembro de la clase puede determinarla fácilmente un experto en la técnica por referencia al código genético convencional, en el que se sabe que diferentes tripletes de nucleótidos (codones) codifican el mismo aminoácido.

Un polinucleótido que "codifica" un polipéptido, como se desvela en el presente documento, incluye opcionalmente regiones tanto codificantes como no codificantes, y por lo tanto se entiende que, a menos que se indique expresamente otra cosa, un polinucleótido que "codifica" un polipéptido no se limita estructuralmente a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido sino que puede incluir otras secuencias de nucleótidos fuera (es decir, en 5' o 3') de la región codificante. Una "región codificante" o "secuencia codificante" es una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido y que, cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas, expresa el polipéptido codificado. Los límites de una región codificante se determinan generalmente por un codón de inicio de la traducción en su extremo 5' y por un codón de detención de la traducción en su extremo 3'. Una "región codificante exógena" se refiere a una región codificante extraña, es decir, una región codificante que no está normalmente presente en una célula, o una región codificante que está normalmente presente en una célula pero que se ha introducido en la célula mediante procedimientos experimentales, que está unida operativamente a una región reguladora a la cual normalmente no está unida operativamente, o la combinación de las mismas.

Un polinucleótido puede tener una topología lineal o circular. Un polinucleótido puede ser, por ejemplo, una parte de un vector. Un vector puede posibilitar la clonación adicional (amplificación del polinucleótido), es decir, un vector de clonación, o la expresión del polipéptido codificado por la región codificante, es decir, un vector de expresión. Un vector puede incluir, pero sin limitación, un plásmido, un fagémido, un factor F, un virus, un cósmido o un fago. El

vector puede tener una forma lineal o circular, bicatenaria o monocatenaria. El vector también puede transformar un hospedador procarionta o eucariota por integración en el genoma celular o existir intracromosómicamente (por ejemplo, como un plásmido de replicación autónomo con un origen de replicación). El polinucleótido en el vector puede estar bajo el control de, y estar unido operativamente a, un promotor apropiado u otra secuencia reguladora para la transcripción *in vitro* o en una célula hospedadora, tal como una célula eucariota, o un microbio, por ejemplo, una bacteria. Los ejemplos preferidos de células eucariotas incluyen las líneas celulares MDA-MB-231, Hela, CHO y MCF10A. Una secuencia reguladora, o región reguladora, se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba, dentro, o aguas abajo de una región codificante, y unidas operativamente a, una secuencia codificante. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen secuencias potenciadoras, promotoras, líder de la transcripción, intrones y secuencias señal de poliadenilación. Estas incluyen secuencias naturales y sintéticas así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Las secuencias reguladoras no están limitadas a promotores. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras adecuadas útiles en la presente invención incluirán, sin limitación, promotores constitutivos, promotores específicos de tejido, promotores específicos de desarrollo, promotores inducibles y promotores virales. La expresión "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición de componentes de tal manera que estén en relación que los permita funcionar de su manera deseada. Una secuencia reguladora está "unida operativamente" a una región codificante cuando se une de tal manera que la expresión de la región codificante se realiza en condiciones compatibles con la secuencia reguladora.

El vector puede ser un vector lanzadera que actúe en hospedadores múltiples. El vector también puede ser un vector de clonación que contenga normalmente uno o un número más pequeño de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en cuyas secuencias de ADN extraño puedan insertarse de una manera determinable. Dicha inserción puede suceder sin perder función biológica esencial del vector de clonación. Un vector de clonación también puede contener un gen marcador que sea adecuado para su uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Los ejemplos de genes marcadores son genes de resistencia a tetraciclina o de resistencia a ampicilina. Muchos vectores de clonación se encuentran disponibles en el comercio (por ejemplo Stratagene, New England Biolabs, Clontech). Un vector puede ser un vector de expresión que contenga secuencias reguladoras que dirijan la expresión de un polinucleótido que esté insertado en el vector de expresión. En la técnica se conocen numerosos vectores disponibles en el comercio (Stratagene, La Jolla, CA; New England Biolabs, Beverly, MA). Un vector de expresión puede usarse en ensayos de transcripción y de traducción *in vitro*.

En la técnica se conocen bien métodos para introducir un polinucleótido en un vector (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)). En resumen, un vector en el que va insertarse un polinucleótido se trata con una o más enzimas de restricción (endonucleasas de restricción) para producir un vector linealizado que tenga un extremo romo, un extremo "adherente" con un saliente en la posición 5' o 3', o cualquier combinación de lo anterior. El vector también puede tratarse con una enzima de restricción y posteriormente tratarse con otra enzima modificadora, tal como una polimerasa, una exonucleasa, una fosfatasa o una quinasa, para crear un vector linealizado que tenga características útiles para el ligamiento de un polinucleótido en el vector. El polinucleótido que va a insertarse en el vector se trata con una o más enzimas de restricción para crear un segmento linealizado que tenga un extremo romo, un extremo "adherente", con un saliente en la posición 5' o 3', o cualquier combinación de lo anterior. El polinucleótido también puede tratarse con una enzima de restricción y posteriormente tratarse con otra enzima modificadora de ADN. Dichas enzimas modificadoras de ADN incluyen, sin limitación, polimerasa, exonucleasa, fosfatasa o una quinasa, para crear un polinucleótido que tenga características útiles para el ligamiento de un polinucleótido en el vector.

Después, el vector tratado y el polinucleótido se ligan entre sí para formar una construcción que contenga un polinucleótido de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)). En resumen, el fragmento de ácido nucleico tratado y el vector tratado se combinan en presencia de un tampón y una ligasa adecuados. Después la mezcla se incuba en condiciones apropiadas para permitir que la ligasa se ligue al fragmento de ácido nucleico en el vector.

También se desvelan métodos para preparar un polipéptido como se describe en el presente documento y métodos para preparar los polinucleótidos que los codifica. Los métodos incluyen métodos biológicos, enzimáticos y químicos, así como combinaciones de los mismos, y son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un polinucleótido puede expresarse en una célula hospedadora usando tecnologías de ADN recombinantes convencionales, puede sintetizarse enzimáticamente *in vitro* usando un sistema basado en ARN acelular, o puede sintetizarse usando tecnologías químicas tales como síntesis peptídica en fase sólida. Cuando se usa tecnología de ADN recombinante, la célula hospedadora puede ser, por ejemplo una célula bacteriana, una célula de insecto, una célula de levadura o una célula de mamífero.

También se desvelan polinucleótidos que tienen actividad promotora. En un aspecto, el promotor desvelado incluye una secuencia de nucleótidos representada en la SEC ID N°: 22, o una parte de la misma. En otro aspecto, un promotor desvelado tiene una secuencia de nucleótidos que es al menos un solo porcentaje mayor del 70 % idéntico a la SEC ID N°: 22, por ejemplo 71 %, 72 %, 73 % de identidad, y así sucesivamente hasta el 100 % de identidad con la SEC ID N°: 22. En el presente documento se describen métodos para determinar el porcentaje de identidad. Incluso más preferentemente, el promotor tiene una secuencia de nucleótidos que es al menos 80 % idéntica, al

menos 90 % idéntica o al menos 95 % idéntica a la SEC ID N°: 22. Se desvela una actividad regulada por receptores estrogénicos (RE) promotores. Como se usa en el presente documento, la actividad regulada por RE se refiere a la expresión aumentada de una región codificante unida operativamente en presencia de RE- $\alpha$ 66, preferentemente, en presencia de RE- $\alpha$ 66 unido a un estrógeno. Un promotor desvelado se expresa de una manera dependiente e independiente de estrógenos. Un promotor desvelado puede estar unido operativamente a una región codificante que codifica un polipéptido, incluyendo un polipéptido marcador. Como ejemplos de polipéptidos marcadores se incluyen marcadores detectables (por ejemplo, proteínas fluorescentes, enzimas, marcadores antigénicos y similares) y marcadores de selección (polipéptidos que producen resistencia a fármacos, susceptibilidad a fármacos o déficit nutricional, o corrigen un déficit nutricional y similar).

### Anticuerpos

La divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos y peptidomiméticos de la divulgación. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que puede "unirse específicamente" a un polipéptido es un anticuerpo que interacciona solamente con el epítipo del antígeno que induce la síntesis del anticuerpo, o que interacciona con un epítipo estructuralmente relacionado. Un anticuerpo que "se une específicamente" a un epítipo interaccionará, en las condiciones apropiadas, con el epítipo incluso en presencia de diversas posibles dianas de unión. En algunos aspectos, un anticuerpo de la presente invención se une específicamente al RE- $\alpha$ 36 o a una parte del mismo, y no se une específicamente al RE- $\alpha$ 66 o al RE- $\alpha$ 46.

Por consiguiente, los polipéptidos y peptidomiméticos de la divulgación y fragmentos de los mismos pueden usarse como antígenos para producir anticuerpos, incluyendo anticuerpos de vertebrados, anticuerpos híbridos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos alterados, anticuerpos univalentes, anticuerpos monoclonales y policlonales, proteínas Fab, anticuerpos de un solo dominio. Por ejemplo, un polipéptido que tiene la SEC ID N°: 1 o un fragmento de la misma, tal como los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N°: 1, puede usarse para generar anticuerpos que se unan específicamente al RE- $\alpha$ 36. Un polipéptido o peptidomimético de la presente divulgación, o sus fragmentos, pueden modificarse uniéndose covalentemente a un transportador inmunogénico, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino, ovoalbúmina, albúmina de suero de ratón, albúmina de suero de conejo y similar.

Si se desean anticuerpos policlonales, puede inmunizarse un animal seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo o ave, tal como pollo) con el antígeno deseado. El suero del animal inmunizado se extrae y se trata de acuerdo con métodos conocidos y rutinarios. Si el suero contiene anticuerpos policlonales contra un polipéptido de la invención que contiene anticuerpos contra otras antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. En la materia se conocen técnicas para producir y procesar antisueros policlonales (véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pub. 1988).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos o peptidomiméticos de la presente divulgación o sus fragmentos pueden producirse fácilmente por un experto habitual en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales por hibridomas es bien conocida (véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pub. 1988). Pueden crearse líneas celulares inmortal productoras de anticuerpos (hibridomas) por fusión celular, y también por otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con el virus de Epstein-Barr. Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra los polipéptidos y peptidomiméticos de la invención pueden explorarse con respecto a diversas propiedades, por ejemplo, afinidad del epítipo. Otros métodos bien conocidos para preparar anticuerpos incluyen el uso de técnicas de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Kay *et al.*, *Phage display of peptides and proteins: A laboratory manual*. San Diego: Academic Press (1996)).

Un anticuerpo de la invención puede derivar de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Los anticuerpos monoclonales humanizados pueden producirse transfiriendo regiones determinantes de la complementariedad de ratón de cadenas variables pesadas y ligeras de una inmunoglobulina de ratón dentro de un dominio variable humano, y después sustituyendo restos humanos en las regiones marco conservadas de los homólogos murinos. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos monoclonales humanizados elimina los posibles problemas asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes murinas. Se describen técnicas generales para la clonación de dominios variables de inmunoglobulina murina (Orlandi *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86: 3833 (1989), y se describen técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323 (1988)).

Los fragmentos de anticuerpo de la invención pueden prepararse por métodos conocidos rutinarios incluyendo hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* de un polinucleótido que codifica el fragmento. Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo por digestión (por ejemplo, con pepsina o papaína) de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpo por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede escindirse posteriormente usando un agente reductor de tiol y opcionalmente un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo dando como resultado la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab'

monovalentes y un fragmento Fc directamente.

También pueden usarse otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena pesada-ligera, escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que reconoce el anticuerpo intacto.

Los anticuerpos pueden explorarse para determinar la identidad del epítipo al cual se unen. Un epítipo se refiere al sitio de un antígeno, tal como un polipéptido de la invención, al cual se une el paratopo de un anticuerpo. Un epítipo normalmente consta de grupos de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales glucídicas, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. En la técnica se conocen métodos que pueden usarse para identificar un epítipo (Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, página 319 (Cold Spring Harbor Pub. 1988).

Los anticuerpos pueden explorarse con respecto a su capacidad para unirse específicamente a un polipéptido o peptidomimético de la presente divulgación. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos que se unan específicamente a la isoforma RE- $\alpha$ 36 o a una parte de la misma, pero no a la isoforma RE- $\alpha$ 46 o  $\alpha$ -66, usando métodos rutinarios en la técnica (véase, Kitajima *et al.*, Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 6.534.281, y Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pub. 1988).

Los anticuerpos de la invención pueden acoplarse a una gran variedad de compuestos. Los ejemplos de compuestos incluyen marcadores detectables. Los ejemplos de dichos marcadores detectables incluyen marcadores fluorescentes, enzimas, radioisótopos, y similares, tales como avidina o biotina, que permiten la detección de un anticuerpo. En la técnica se conocen métodos para acoplar anticuerpos a marcadores detectables, y marcadores detectables útiles. Dichos anticuerpos son útiles en sistemas automatizados para la detección del RE- $\alpha$ 36. Un anticuerpo puede unirse covalentemente a un agente quimioterapéutico. En la técnica se conocen agentes quimioterapéuticos útiles en el tratamiento de cánceres, tales como cáncer de mama y cáncer de próstata. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen centromán, acetato de delmadinona, droloxifeno, idoxifeno, tamoxifeno, raloxifeno, toremifeno, fulvestrant y faslodex, un bisfosfonato, calcitonina, tribolona, hormona paratiroidea, o ranelato de estroncio. Otros ejemplos incluyen una citocina, o una toxina, tal como la cadena A de la toxina diftérica.

#### *Composiciones*

La presente invención también proporciona composiciones que incluyen un anticuerpo de la presente invención. También se desvelan composiciones que incluyen polinucleótidos y peptidomiméticos. Dichas composiciones incluyen normalmente un transportador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento un "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye solución salina, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similar, compatibles con la administración farmacéutica. En las composiciones también pueden incorporarse compuestos adicionales activos.

Las composiciones de la invención pueden prepararse de muchas formas que incluyen comprimidos, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones acuosas, suspensiones y liposomas u otras formulaciones de liberación lenta, tales como geles poliméricos conformados. Puede formularse una forma de dosificación oral de tal manera que el polipéptido, peptidomimético, o anticuerpo se libere en el intestino después de traspasar a través del estómago. Dichas formulaciones se describen en Hong *et al.*, Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 6.306.434 y en las referencias que esta incluye.

Las composiciones orales líquidas pueden estar, por ejemplo, en forma de suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, acuosos u oleaginosos, o pueden presentarse con un producto en polvo para su constitución con agua u con otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas composiciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes.

Una composición puede formularse para administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua) y puede presentarse en forma de dosificación unitaria en ampollas, jeringas previamente cargadas, envases de infusión de pequeño volumen o envases multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden tener formas tales como suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones adecuadas para administración rectal pueden prepararse como supositorios de dosis unitaria. Los transportadores adecuados que pueden incluirse en la composición incluyen los ejemplos de soluciones salinas y otros materiales normalmente usados en la técnica.

Para la administración por inhalación, una composición puede administrarse convenientemente desde un envase insuflador, nebulizador o presurizado u desde otro medio de administración conveniente de un pulverizador en aerosol. Los envases presurizados pueden incluir un propulsor adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida.

Como alternativa, para la administración por inhalación o insuflación, una composición puede tener forma de una composición en polvo seco, por ejemplo, una mezcla de polvo de un modulador y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos o, por ejemplo, en envases de gelatina o blíster, dese los que puede administrarse el polvo usando un inhalador o insuflador. Para la administración intranasal, una composición puede administrarse mediante un pulverizador líquido, tal como mediante un atomizador en un frasco de plástico.

Una composición puede formularse para administración transdérmica. Una composición también puede formularse como una solución, suspensión o dispersión acuosa, un gel acuoso, una emulsión de agua en aceite, o una emulsión de aceite en agua. Una formulación transdérmica también puede prepararse por encapsulación de una composición dentro de un polímero. La forma de dosificación puede aplicarse directamente a la piel como una loción, crema, bálsamo, o a través del uso de un parche.

Las composiciones de la invención también pueden contener otros ingredientes, tales como aromatizantes, colorantes, agentes antimicrobianos y conservantes. Además, una composición de la invención puede incluir ingredientes farmacéuticamente activos tales como hormonas, agentes antinecróticos, vasodilatadores, agentes farmacéuticos y similares.

La eficacia de toxicidad y terapéutica de dichas composiciones puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, determinando la DL<sub>50</sub> (la dosis letal al 50 % de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y este puede expresarse como la proporción de DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren los compuestos que presenten índices terapéuticos elevados.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celulares y de estudios con animales pueden usarse en la formulación de una serie de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se sitúa preferentemente en un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para un compuesto usado en los métodos de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede calcularse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración plasmática en circulación que incluye la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición máxima media de los síntomas) según se determine en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de una manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse niveles en plasma, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento. En un aspecto, el intervalo de dosificación para su uso en seres humanos es una cantidad suficiente para dar como resultado concentraciones en suero que son al menos de 10 micromolar (μM), preferentemente, al menos de 25 μM, más preferentemente, de 50 μM.

Las composiciones pueden administrarse de una o más veces al día a una a más veces a la semana, incluyendo una vez cada dos días. El experto en la materia apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación y el tiempo necesario para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad eficaz de una composición puede incluir un solo tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos.

#### *Métodos de detección*

La presente invención proporciona métodos para detectar un polipéptido como se reivindica en la reivindicación 25 o 26. Como se usa en el presente documento, la expresión "ex vivo" se refiere a una célula que no se ha retirado, por ejemplo, aislado, del organismo de un sujeto. Las células *ex vivo* incluyen, por ejemplo, células primarias (por ejemplo, células que se han retirado recientemente de un sujeto y que son capaces de limitar su crecimiento o mantenimiento en el medio de cultivo tisular) y células cultivadas (por ejemplo, células que son capaces de extender el crecimiento o mantenerse en medio de cultivo tisular). La célula es, preferentemente, una célula de mamífero tal como, por ejemplo, de ratón, de rata, de primate (por ejemplo de mono, de ser humano), preferentemente de ser humano. Los ejemplos preferidos de células incluyen células mamarias, tal como una célula tumoral mamaria, y células de próstata, tal como una célula tumoral de próstata. Una célula puede obtenerse de un sujeto, por ejemplo, mediante biopsia de un tejido humano de mama o próstata. Pueden usarse muestras obtenidas de casi cualquier tipo de tejido. Pueden cultivarse células de control *in vitro* de acuerdo con métodos conocidos en la materia. Las células que no expresan un receptor estrogénico RE-α de 36 kDa y que por tanto pueden usarse como control

negativo incluyen células HEK293. Las células de control positivas incluyen células que se crecen a densidad celular baja en presencia de suero y células negativas a BRCA1. Preferentemente, las células crecen a baja densidad en presencia de suero. También pueden obtenerse células de control a partir de muestras tisulares a través de, por ejemplo, biopsia.

5 En un aspecto, el método incluye analizar la célula poniendo en contacto la misma con un anticuerpo de la presente invención. El que una célula exprese un polipéptido que se una específicamente al anticuerpo puede determinarse usando métodos de detección que son rutinarios y conocidos en la materia. Los ejemplos de inmunoensayos incluyen ensayos competitivos y no competitivos, tales como radioinmunoensayo, ensayo inmunoenzimométrico, 10 ensayo inmunofluorométrico o ensayos inmunoenzimáticos. También pueden usarse métodos quimioluminiscentes con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina u otros agentes de detección quimioluminiscentes. También pueden usarse ensayos de transferencia de western y cromatográficos en el método de la invención. Un anticuerpo de la presente invención usado para detectar un polipéptido como se desvela en el presente documento puede acoplarse a un marcador detectable y por tanto detectarse directamente, o puede usarse un anticuerpo secundario. 15 Cuando se usan métodos de detección que permiten la detección del polipéptido en diferentes áreas de la célula, se considera que una célula que expresa un RE- $\alpha$ 36 es normalmente positiva a RE- $\alpha$ 36 cuando el polipéptido está asociado predominantemente con la membrana plasmática y el citoplasma, y cuando menos del 20 % de la señal está asociada con el núcleo.

20 En otro aspecto, el método incluye analizar la célula amplificando un polinucleótido, preferentemente, un polinucleótido de ARN (por ejemplo, un ARNm), para formar polinucleótidos amplificados. Preferentemente, un polinucleótido se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), preferentemente, por PCR con transcriptasa inversa (RT). En la técnica se conocen métodos para sintetizar un polinucleótido de ADN a partir de un polinucleótido de ARN y son rutinarios. Los polinucleótidos obtenidos de la célula se ponen en contacto con un par 25 de cebadores que amplificarán un polinucleótido que incluye la SEC ID N<sup>o</sup>: 22 o SEC ID N<sup>o</sup>: 25, o la combinación de las mismas. La presencia de polinucleótidos amplificados resultantes de dicho par de cebadores indica que la célula expresa el receptor estrogénico. Como se usa en el presente documento, la expresión "par de cebadores" se refiere a dos oligonucleótidos diseñados para flanquear una región de un polinucleótido a amplificar. Un cebador es complementario a los nucleótidos presentes en la cadena en sentido en un extremo de un polinucleótido a amplificar 30 y otro cebador es complementario a los nucleótidos presentes en la cadena antisentido en el otro extremo del polinucleótido a amplificar. El polinucleótido a amplificar puede denominarse polinucleótido molde. Los nucleótidos de un polinucleótido cuyo cebador es complementario pueden denominarse secuencia diana. Un cebador puede tener al menos aproximadamente 15 nucleótidos, preferentemente, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, más preferentemente, al menos aproximadamente 25 nucleótidos. Las condiciones para amplificar un polinucleótido por PCR varían dependiendo de la secuencia de nucleótidos de los cebadores usados y los métodos para determinar 35 dichas condiciones son rutinarios en la técnica.

Después de la amplificación, la presencia de los polinucleótidos amplificados puede determinarse, por ejemplo, por electroforesis en gel. Los polinucleótidos amplificados pueden visualizarse por tinción (por ejemplo, con bromuro de etidio) o marcarse con un marcador adecuado conocido por los expertos en la técnica, incluyendo marcadores 40 radioactivos y no radioactivos. Los marcadores radioactivos típicos incluyen <sup>33</sup>P. Los marcadores no reactivos incluyen, por ejemplo, ligandos tales como biotina o digoxigenina, así como enzimas, tales como, fosfatasa o peroxidasa, o los diversos quimioluminiscentes tales como luciferina, o compuestos fluorescentes como fluoresceína y sus derivados.

45 Opcionalmente, la presencia en una célula de un polipéptido RE- $\alpha$ 66, un polipéptido RE- $\alpha$ 46, RE- $\beta$  o la combinación de los mismos, también puede determinarse. Los métodos para detectar la presencia de RE- $\alpha$ 66, RE- $\alpha$ 46, RE- $\beta$ , o la combinación de los mismos, incluyen el uso de detección inmunológica usando métodos de detección basados en anticuerpos o polinucleótidos tales como la amplificación de un polinucleótido. Cuando se usan métodos de 50 detección que permiten la detección del polipéptido en diferentes áreas de la célula, una célula que exprese un RE- $\alpha$ 66 o RE- $\alpha$ 46 se considera normalmente positiva a RE- $\alpha$ 66 o a RE- $\alpha$ 46 cuando el polipéptido se asocia predominantemente con el núcleo de la célula, por ejemplo, más del 90 % de la señal está asociada con el núcleo.

Aproximadamente el 70-80 % de todos los cánceres de mama expresan RE- $\alpha$ 66 y se denominan cánceres de mama 55 positivos a RE. Esto tumores normalmente crecen más lentamente, se diferencian mejor y están asociados con un mejor pronóstico global (Clark, en: Harris JR, editor. Diseases of the breast, volumen 2. Lippincott Williams & Wilkins, 38: 103-116 (2000)). Los métodos para detectar la presencia de un polinucleótido como se reivindica en las reivindicaciones 25 y 26 son útiles como marcador de diagnóstico para diferenciar cáncer positivo a estrógenos y negativo a estrógenos, preferentemente, cáncer de mama. Los resultados desvelados en los Ejemplos del presente documento indican contundentemente que la señalización de estrógenos mediada por RE- $\alpha$ 36 contribuye a 60 tumorogénesis mamaria y sugieren que el RE- $\alpha$ 36 puede estar implicado en la tumorogénesis de cánceres de mama negativos a RE- $\alpha$ 66. Los resultados desvelados en los Ejemplos del presente documento también indican que una célula que expresa altamente un polipéptido de la presente invención es más resistente a dosis más bajas de un antiestrógeno, por ejemplo, tamoxifeno, en comparación con una célula que expresa altos niveles de RE- $\alpha$ 66 pero niveles más bajos de RE- $\alpha$ 36. Por tanto, los métodos para detectar la presencia de un polipéptido como se describe 65

en el presente documento permiten identificar una nueva clase de pacientes, es decir, negativos a RE- $\alpha$ 66 y positivos a RE- $\alpha$ 36. Los métodos para detectar la presencia de un polipéptido como se desvela en el presente documento también son útiles para determinar la sensibilidad de una célula a un antiestrógeno, y proporcionar información relevante, por ejemplo, para determinar un ciclo de tratamiento apropiado para un individuo. Por ejemplo, un médico puede decidir que un sujeto con células tumorales mamarias positivas a RE- $\alpha$ 36 puede necesitar dosis más altas de tamoxifeno para superar la resistencia a niveles más bajos.

La detección de la presencia de RE- $\alpha$ 66, RE- $\alpha$ 46, RE- $\alpha$ 36, RE- $\beta$ , o combinación de los mismos, también permite comparar la proporción de los receptores estrogénicos. La determinación de la proporción de dos o más de los receptores estrogénicos permite predecir la sensibilidad de una célula a un antiestrógeno, por ejemplo, tamoxifeno. Por ejemplo, en este aspecto de la invención, la proporción de RE- $\alpha$ 36 con respecto a RE- $\alpha$ 46, la proporción de RE- $\alpha$ 36 con respecto a RE- $\alpha$ 66, la proporción de RE- $\alpha$ 36 con respecto a RE- $\beta$ , o una combinación de las mismas, en una célula se determina y se compara con la proporción correspondiente en una célula de control. Dicha proporción se denomina en el presente documento proporción de RE- $\alpha$ 36. En un ejemplo, la célula de control puede ser una célula que es refractaria al tratamiento con un antiestrógeno. En otro ejemplo, la célula de control es una célula que no es refractaria al antiestrógeno. Si una proporción de RE- $\alpha$ 36 descrita anteriormente determinada en la célula de ensayo es la misma que la proporción de RE- $\alpha$ 36 descrita en la célula de control, entonces la célula de ensayo se clasifica de acuerdo con el estado de célula de control. Por ejemplo, si la proporción de RE- $\alpha$ 36 con respecto a RE- $\alpha$ 66 de la célula de ensayo es la misma que la proporción de RE- $\alpha$ 36 con respecto a RE- $\alpha$ 66 en una célula de control que se sabe que es refractaria al tratamiento con tamoxifeno, entonces la célula de ensayo se clasifica como que es refractaria al tratamiento con tamoxifeno. Sin embargo, si la proporción de RE- $\alpha$ 36 con respecto a RE- $\alpha$ 66 en la célula de ensayo es la misma que la proporción de RE- $\alpha$ 36 con respecto a RE- $\alpha$ 66 en una célula de control que no es refractaria a tratamiento con tamoxifeno, entonces la célula de ensayo se clasifica como que no es refractaria al tratamiento con tamoxifeno. En otro ejemplo, la proporción de RE- $\alpha$ 36 determinada en una célula de ensayo se compara con la proporción correspondiente en una célula de control que se sabe que es refractaria al tratamiento con tamoxifeno, y con la proporción en una célula de control que se sabe que es no es refractaria al tratamiento con tamoxifeno. La célula de ensayo se clasifica después como que es refractaria al tratamiento con tamoxifeno, o no refractaria al tratamiento con tamoxifeno, como se describe anteriormente. Un ejemplo de una célula de control que se sabe que no es refractaria al tratamiento con tamoxifeno es MCF7 (número de acceso de la Colección ATTC HTB-22). Un ejemplo de una célula de control que se sabe que es refractaria a tratamiento con tamoxifeno a dosis bajas es MDA-MB-231. Las células de cáncer de mama que se sabe que son refractarias al tratamiento con tamoxifeno también pueden usarse como células de control comparando una proporción de RE- $\alpha$ 36 en una célula de ensayo.

#### *Identificación de agentes que se unen a un polipéptido de la presente invención*

La presente invención también proporciona métodos para identificar un agente que se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N<sup>o</sup>: 20. Dichos métodos también se denominan métodos de exploración. El método incluye combinar *ex vivo* un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N<sup>o</sup>: 1 con un agente en un ensayo de unión competitiva y determinar si el agente se une al polipéptido. La determinación de si un agente se une a un polipéptido implica detectar la formación de un complejo entre el agente y el polipéptido. Los métodos para determinar el complejo incluyen, por ejemplo, detectar directamente la unión de un agente con el polipéptido y detectar la unión del agente con el polipéptido usando un ensayo de unión competitiva. El ensayo puede ser un ensayo acelular. El ensayo puede realizarse en presencia o en ausencia de un estrógeno o antiestrógeno. Opcionalmente, el método también incluye determinar si el agente se une a un polipéptido RE- $\alpha$ 66, tal como un polipéptido con una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N<sup>o</sup>: 18. Preferentemente, un agente no se une a un polipéptido RE- $\alpha$ 66.

Un agente puede obtenerse usando cualquiera de las numerosas estrategias en métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo bibliotecas biológicas, bibliotecas de fase en solución o de fase sólida paralela espacialmente localizables, métodos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución, el método de biblioteca de "una perla un compuesto" y métodos de bibliotecas sintéticas usando selección por cromatografía de afinidad. La estrategia de bibliotecas biológicas incluyen bibliotecas peptídicas, aunque las otras cuatro estrategias son aplicables a péptidos, oligómeros no peptídicos, o bibliotecas de compuestos de molécula pequeña (Lam, *AnticancerDrug Des.* 12: 145 (1997)). En la técnica pueden encontrarse ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares (véase, por ejemplo, DeWitt *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909 (1993); Erb *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422 (1994); Zuckermann *et al.* *J. Med. Chem.* 37: 2678 (1994); Cho *et al.* *Science* 261: 1303 (1993); Carrel *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059 (1994); Carell *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061 (1994); y Gallop *et al.* *J. Med. Chem.* 37: 1233 (1994)). Las fuentes de posibles agentes a explorar también incluyen, por ejemplo, medios de fermentación de bacterias y hongos y extractos celulares de plantas y otras vegetaciones.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse, por ejemplo, en solución (por ejemplo, Houghten *Bio/Techniques* 13: 412-421(1992)), o sobre perlas (Lam *Nature* 354: 82-84(1991)), microplacas (Fodor *Nature* 364: 555-556 (1993)), bacterias (Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.223.409), esporas (Patentes de Estados Unidos Nos

5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869(1992)), o fagos (Scott *et al.* Science 249: 386-390(1990); Devlin Science 249: 404-406(1990); Cwirla *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-6382(1990); y Felici J. Mol. Biol. 222: 301-310(1991)).

5 La determinación de la capacidad de un agente para unirse a un polipéptido puede realizarse, por ejemplo, acoplado el agente con un radioisótopo o marcador enzimático de tal manera que la unión del agente con el polipéptido puede determinarse detectando el compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, pueden marcarse agentes con  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , o  $^3\text{H}$  bien directa o indirectamente y el radioisótopo puede detectarse por recuento directo de radioemisión o por recuento de centelleo. Como alternativa, los agentes pueden marcarse enzimáticamente, por ejemplo, con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático puede detectarse determinando la conversión de un sustrato preparado en producto.

15 De manera similar, se puede determinar la capacidad de un agente para alterar (por ejemplo estimular o inhibir) la unión de un polipéptido como se desvela en el presente documento con un ligando conocido del polipéptido, por ejemplo, una molécula con la que un polipéptido como se desvela en el presente documento se une o interacciona en la naturaleza. Un ejemplo de dicho ligando es el estrógeno, así como un antiestrógeno, tal como tamoxifeno. En un aspecto preferido, la capacidad de un agente para alterar la unión de un polipéptido como se desvela en el presente documento para unirse a un ligando puede determinarse controlando la actividad del polipéptido como se desvela en el presente documento.

20 Aún en otro aspecto adicional, un ensayo como se desvela en el presente documento incluye poner en contacto un polipéptido como se desvela en el presente documento con un agente y determinar la capacidad del agente para unirse al polipéptido. La unión del agente con el polipéptido puede determinarse bien directa o indirectamente como se describe anteriormente. En un aspecto preferido, el ensayo incluye poner en contacto un polipéptido como se desvela en el presente documento con un ligando que se sabe que se une al polipéptido para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un agente, y determinar la capacidad del agente para unirse preferencialmente al polipéptido en comparación con el ligando.

30 En otro aspecto, un ensayo incluye poner en contacto un polipéptido como se desvela en el presente documento con un agente y determinar la capacidad del agente para alterar (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad del polipéptido.

35 En un aspecto adicional, un ensayo incluye explorar agentes que alteran (por ejemplo estimulan o inhiben) la capacidad de un polipéptido como se desvela en el presente documento para regular la transactivación transcripcional de un elemento de respuesta estrogénica, incluyendo, por ejemplo, actividades mediadas por los dominios AF-1 y/o AF-2 del RE- $\alpha$ 66. Preferentemente, se usa un polipéptido de fusión que incluye un polipéptido como se desvela en el presente documento y un polipéptido que tiene un dominio de activación transcripcional, o un dominio represor transcripcional. Un ejemplo de un polipéptido que tiene un dominio de activación transcripcional es VP-16, y en la técnica se conocen otros polipéptidos útiles que tienen un dominio de activación transcripcional o un dominio represor transcripcional. Normalmente, dicho polipéptido de fusión se usa junto con un polinucleótido que tiene un elemento de respuesta estrogénica aguas arriba de un promotor y una secuencia codificante unida operativamente. Puede usarse diversos promotores incluyendo, por ejemplo, un promotor de timidina quinasa. Preferentemente, la región codificante unida operativamente codifica un marcador detectable, tal como luciferasa, o un polipéptido fluorescente tal como proteína fluorescente verde. En un aspecto, el polipéptido de fusión con dominio de activación transcripcional, el polinucleótido y el agente se combinan usando condiciones que promueven la expresión de la región codificante presente en el polinucleótido en ausencia del agente, y se determina el efecto del agente alterando la transcripción. Opcionalmente, también puede estar presente un polipéptido RE- $\alpha$ 66 y/o RE- $\beta$  y el ensayo puede usarse para identificar agentes que alteran (por ejemplo, estimulan o inhiben) la capacidad de un polipéptido como se desvela en el presente documento para modular actividades transcripcionales independientes de ligando y dependientes de ligando del polipéptido RE- $\alpha$ 66 o RE- $\beta$ . Preferentemente, tanto el polinucleótido de fusión como el polinucleótido que incluye un elemento de respuesta estrogénica aguas arriba de un promotor y una secuencia codificante unida operativamente están presentes en una célula. Sin desear ser limitante, se espera que los agentes que alteran la capacidad de un polipéptido como se desvela en el presente documento para regular la transactivación transcripcional pueden incluir agentes que alteran la conformación de un polipéptido como se desvela en el presente documento para aumentar o disminuir la capacidad del

60 En los ensayos, puede ser deseable inmovilizar bien un polipéptido como se describe en el presente documento, su ligando, o bien el agente para facilitar la separación de formas que forman complejos o que no forman de una o de las dos moléculas, así como a adecuar la automatización del ensayo. En una realización, puede proporcionarse una proteína de fusión que ayuda a que un dominio permita que el polipéptido como se describe en el presente documento se una a una matriz. Por ejemplo, polipéptidos de fusión con glutatión-S-transferasa pueden adsorberse sobre perlas de glutatión sepharosa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que después se combinan con el agente, y la mezcla se incuba en condiciones conductoras para la formación del complejo (por ejemplo, a condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, las perlas o los pocillos de placas de microtitulación pueden lavarse para retirar cualquier componente no unido y la formación del complejo se mide bien directa o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Como

alternativa, los complejos pueden disociarse de la matriz, y determinarse el nivel de unión.

Otras técnicas para inmovilizar polipéptidos sobre matrices también pueden usarse en los ensayos de exploración de la invención. Por ejemplo, un polipéptido como se desvela en el presente documento puede inmovilizarse usando conjugación de biotina y estreptavidina. Un polipéptido como se desvela en el presente documento puede marcarse con biotina usando biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) con técnicas bien conocidas en la materia (por ejemplo, kit de biotilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) y, por ejemplo, inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemicals). Como alternativa, los anticuerpos reactivos con un polipéptido como se desvela en el presente documento pueden derivatizarse en los pocillos de la placa, y el polipéptido no unido quedar atrapado en los pocillos por conjugación del anticuerpo. Los métodos para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido como se desvela en el presente documento.

También se describen nuevos agentes identificados por los ensayos de exploración descritos anteriormente y usos de los mismos para tratamientos como se describe en el presente documento.

#### *Métodos de tratamiento*

También se desvelan métodos para el tratamiento de determinadas enfermedades en un sujeto. El sujeto es un mamífero, preferentemente un ser humano. Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad" se refiere a cualquier desviación de o interrupción de la estructura o función normal de una parte, órgano o sistema, o combinación de los mismos, de un sujeto que se manifiesta por un síntoma o conjunto de síntomas característicos. Las enfermedades incluyen cánceres dependientes de la señalización mediante receptores de hormonas esteroideas, tales como receptores de estrógenos. Los ejemplos de dichas enfermedades se denominan cánceres relacionados con estrógeno e incluyen cáncer de mama y cáncer de próstata. Normalmente, si un sujeto tiene una enfermedad, y si un sujeto responde al tratamiento, se determina por evaluación de los síntomas asociados con la enfermedad. Como se usa en el presente documento, el término "síntoma" se refiere a una prueba objetiva de una enfermedad presente en un sujeto. Los síntomas asociados con enfermedades a las que se hace referencia en el presente documento y la evaluación de dichos síntomas son rutinarios y conocidos en la técnica. Los ejemplos de síntomas de cánceres dependientes de la señalización mediante receptores de hormonas esteroideas incluyen, por ejemplo, la presencia y el tamaño de tumores, y la presencia y cantidad de biomarcadores. Los biomarcadores son compuestos, normalmente polipéptidos, presentes en un sujeto e indicativos de la progresión de cáncer. Los ejemplos de biomarcadores incluyen, por ejemplo, la expresión de Her-2, y la expresión de ciclina D1.

El tratamiento de una enfermedad puede ser profiláctico o, como alternativa, puede iniciarse después del desarrollo de una enfermedad. El tratamiento que es profiláctico, por ejemplo, iniciado antes de que un sujeto manifieste los síntomas de una enfermedad, se denomina en el presente documento tratamiento de un sujeto que está "en riesgo" de desarrollar una enfermedad. Un ejemplo de un sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad es una persona que tiene un factor de riesgo, tal como un marcador genético, que está asociado con la enfermedad. Los ejemplos de marcadores genéticos que indican que un sujeto tiene una predisposición a desarrollar determinados cánceres, tales como cáncer de mama o cáncer de próstata, incluyen alteraciones en los genes BRAC1 y/o BRAC2. El tratamiento puede realizarse antes, durante, o después de la aparición de las enfermedades descritas en el presente documento. El tratamiento iniciado después del desarrollo de una enfermedad puede dar como resultado la disminución de la gravedad de los síntomas de una de las afecciones, o puede eliminar completamente los síntomas.

En algunos aspectos, los métodos incluyen normalmente poner en contacto una célula con una composición que incluye una cantidad eficaz de un agente que inhibe la actividad de un polipéptido como se desvela en el presente documento, por ejemplo, un agente identificado usando un método descrito en el presente documento. Preferentemente, dicho agente se une a un polipéptido como se desvela en el presente documento. En algunos aspectos, el agente no es preferentemente un antiestrógeno. Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para inhibir en una célula la actividad de un polipéptido como se desvela en el presente documento, disminuir los síntomas asociados con una enfermedad, o la combinación de los mismos. En un aspecto, una composición puede incluir una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención. Preferentemente, un anticuerpo se une covalentemente a un agente quimioterapéutico, tal como, por ejemplo tamoxifeno. La composición puede opcionalmente incluir otros agentes quimioterapéuticos. Si se espera que un agente o un anticuerpo, preferentemente, un anticuerpo, funcione en el método de tratamiento desvelado, puede evaluarse usando modelos *ex vivo* y modelos animales. Dichos modelos son conocidos en la técnica y son generalmente aceptados como representativos de enfermedades o métodos de tratamiento de seres humanos. Un ejemplo preferido de dicho modelo animal es el ratón desnudo. Por ejemplo, pueden inocularse células de cáncer de mama en el pániculo adiposo mamario de ratones hembra desnudos ovariectomizados, y la formación de la lesión puede seguirse y evaluarse, por ejemplo, por palpación, medición con calibradores de vernier, y peso tumoral. También se dispone de modelos de animales transgénicos. Por ejemplo, los modelos para el estudio de cáncer de próstata, tal como el modelo TRAMP (véase, por ejemplo, Greenberg *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 2429-3443 (1995)) y para el cáncer de mama, tal como el modelo MMTV-Wnt-1 (véase, por ejemplo, Tsukamoto *et al.*,

Cell, 55: 619-625 (1988)) son comúnmente aceptados como modelos de enfermedades humanas.

En otro aspecto, una célula se pone en contacto con una composición que incluye un polinucleótido, donde el polinucleótido ocasiona el silenciamiento post-transcripcional de una región codificante que codifica un polipéptido como se desvela en el presente documento. Dicho polinucleótido se denomina en el presente documento polinucleótido silenciador. El polinucleótido silenciador puede introducirse en una célula como un polinucleótido de ARN, o como un vector que incluye un polinucleótido de ADN que codifica y expresará el polinucleótido de ARN. Puede administrarse más de un tipo de polinucleótido. Por ejemplo, dos o más polinucleótidos que están diseñados para silenciar el mismo ARNm pueden combinarse y usarse los métodos del presente documento. Como alternativa, pueden usarse dos o más polinucleótidos conjuntamente donde cada uno de los polinucleótidos se diseña para silenciar diferentes ARNm.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, bien ribonucleótidos, desoxinucleótidos, o una combinación de los mismos, e incluye moléculas tanto monocatenarias como bicatenarias. Un polinucleótido puede obtenerse directamente a partir de una fuente natural, o puede prepararse con la ayuda de técnicas recombinantes, enzimáticas o químicas. Preferentemente, un polinucleótido de la presente invención está aislado. Como se usa en el presente documento, una "región codificante diana" y "secuencia codificante diana" se refiere a la región codificante cuya expresión inhibe un polinucleótido silenciador. Como se usa en el presente documento, un "ARNm diana" es un ARNm codificado por una región codificante diana. Un ejemplo de una región codificante diana es la secuencia de nucleótidos que codifica un RE- $\alpha$ 36 (SEC ID N<sup>o</sup>: 21), la secuencia de nucleótidos flanqueante 5' (SEC ID N<sup>o</sup>: 20), o la secuencia de nucleótidos flanqueante 3', incluyendo la secuencia de nucleótidos codificada por el exón 9 (SEC ID N<sup>o</sup>: 25).

Los polinucleótidos silenciadores incluyen polinucleótidos de ARN bicatenarios (ARNbc). La secuencia de un polinucleótido silenciador incluye una cadena, denominada en el presente documento cadena en sentido, de entre 16 a 30 nucleótidos, por ejemplo, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. La cadena en sentido es sustancialmente idéntica, preferentemente idéntica, a un ARNm diana. Como se usa en el presente documento, el término "idéntico" significa que la secuencia de nucleótidos de la cadena en sentido tiene la misma secuencia de nucleótidos que una parte del ARNm diana. Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente idéntica" significa que la secuencia de la cadena en sentido es diferente de la secuencia de un ARNm diana en 1, 2 o 3 nucleótidos, preferentemente 1 nucleótido, y los restantes nucleótidos son idénticos a la secuencia del ARNm. Estos 1, 2 o 3 nucleótidos de la cadena en sentido se denominan nucleótidos no complementarios. Cuando un polinucleótido silenciador incluye una cadena en sentido que es sustancialmente idéntica a un ARNm diana, los nucleótidos no complementarios 1, 2 o 3 se localizan preferentemente en el centro de la cadena en sentido. Por ejemplo, si la cadena en sentido tiene una longitud de 21 nucleótidos, los nucleótidos no complementarios son normalmente los nucleótidos 9, 10, 11 o 12, preferentemente los nucleótidos 10 u 11. La otra cadena de un polinucleótido de ARNbc, denominada en el presente documento cadena antisentido, es complementaria a la cadena en sentido. El término "complementario" se refiere a la capacidad de dos polinucleótidos monocatenarios para formar pares de bases entre sí, emparejándose una adenina de un polinucleótido con una timina o un uracilo de un segundo polinucleótido y emparejándose una citosina de un polinucleótido con una guanina de un segundo polinucleótido. Los polinucleótidos silenciadores también incluyen los polinucleótidos de ADN bicatenarios que corresponden a los polinucleótidos de ARNbc. También se incluyen los polinucleótidos de ARN monocatenario y polinucleótidos de ADN monocatenario correspondientes a las cadenas en sentido y cadenas antisentido desveladas en el presente documento. Debe entenderse que las secuencias desveladas en el presente documento como secuencias de ADN pueden convertirse de una secuencia de ADN a una secuencia de ARN reemplazando cada nucleótido de timidina con un nucleótido de uracilo. Sin pretender ser limitante, los polinucleótidos como se desvela en el presente documento ocasionan el silenciamiento post-transcripcional de una región codificante diana. En la técnica se conocen modificaciones en los polinucleótidos para su uso en el silenciamiento y de este modo los polinucleótidos silenciadores pueden modificarse.

Las cadenas en sentido y antisentido de un polinucleótido silenciador de ARNbc como se desvela en el presente documento también pueden unirse covalentemente, normalmente mediante un espaciador constituido por nucleótidos. Dicho polinucleótido a menudo se denomina en la técnica ARN de horquilla corto (ARNhc). Después del emparejamiento de bases de las cadenas en sentido y antisentido, la región espaciadora forma un bucle. El número de nucleótidos que constituye el bucle puede variar, y se han descrito bucles entre 3 y 23 nucleótidos (Sui *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 5515-5520 (2002), y Jacque *et al.*, Nature, 418, 435-438 (2002)).

Un polinucleótido silenciador ocasiona la inhibición post-transcripcional de la expresión, denominada también silenciamiento de una región codificante diana. Sin pretender limitarse a la teoría, después de la introducción en una célula un polinucleótido silenciador se hibridará con un ARNm diana y endonucleasas celulares de señal escindirán el ARNm diana. El resultado es la inhibición de la expresión del polipéptido codificado por el ARNm. Si la expresión de una región codificante diana se inhibe puede determinarse, por ejemplo, midiendo la disminución en la cantidad de ARNm diana en la célula, midiendo una disminución en la cantidad del polipéptido codificado por el ARNm, o midiendo una disminución en la actividad del polipéptido codificado por el ARNm. Un polinucleótido silenciador puede estar presente en un vector. Un polinucleótido silenciador puede estar presente en un vector como dos polinucleótidos complementarios distintos, cada uno de los cuales puede expresarse para producir una cadena en

sentido y antisentido del ARNbc, o como solo polinucleótido que contenga una cadena en sentido, una región bucle y una cadena antisentido, que puede expresarse para producir un polinucleótido de ARN que tenga una cadena en sentido y antisentido del ARNbc.

5 Puede diseñarse un polinucleótido silenciador usando métodos que son rutinarios y conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede identificarse un polinucleótido silenciador escaneando las secuencias dinucleótidas AA de la región codificante; cada AA y los nucleótidos aguas abajo (3') consecutivos de 16 a 30 del ARNm pueden usarse como  
 10 cadena en sentido de un polinucleótido candidato. Un polinucleótido candidato es el polinucleótido que va a ensayarse para determinar si disminuye la expresión de uno de un polipéptido como se desvela en el presente documento. El polinucleótido candidato puede ser idéntico a los nucleótidos localizados en la región codificante del polipéptido, o localizarse en las regiones no traducidas 5' o 3' del ARNm. Opcionalmente y preferentemente, un polinucleótido candidato se modifica para que incluya 1, 2 o 3, preferentemente 1, nucleótidos no complementarios. Otros métodos se conocen en la técnica y se usan rutinariamente para diseñar y seleccionar polinucleótidos  
 15 candidatos. Un polinucleótido candidato puede comenzar, pero no necesariamente, con el dinucleótido AA en el extremo 5' de la cadena en sentido. Un polinucleótido candidato también puede incluir salientes de 1, 2 o 3 nucleótidos, normalmente en el extremo 3' de la cadena en sentido, cadena antisentido o en ambas. Los polinucleótidos candidatos se exploran normalmente usando algoritmos disponibles al público (por ejemplo, BLAST) para comparar las secuencias de polinucleótidos candidatas con las secuencias codificantes. Aquellos que probablemente forman un dúplex con un ARNm expresado por una región codificante no diana se eliminan  
 20 normalmente de consideraciones posteriores. Los restantes polinucleótidos candidatos pueden después ensayarse para determinar si inhiben la expresión de uno de los polipéptidos descritos en el presente documento.

En general, los polinucleótidos candidatos se ensayan individualmente introduciendo un polinucleótido candidato en una célula que exprese un polipéptido como se desvela en el presente documento. Los polinucleótidos candidatos  
 25 pueden prepararse *in vitro* y después introducirse en una célula. Los métodos para la síntesis *in vitro* incluyen, por ejemplo, síntesis química con un sintetizador de ADN/ARN convencional. Los proveedores comerciales de polinucleótidos sintéticos y reactivos para dicha síntesis son muy conocidos. Los métodos de síntesis *in vitro* también incluyen, por ejemplo, la transcripción *in vitro* usando un vector circular o lineal en un sistema celular.

30 El polinucleótido candidato también puede prepararse introduciendo en una célula una construcción que codifique el polinucleótido candidato. Dichas construcciones se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, un vector que codifica y expresa una cadena en sentido y una cadena antisentido de un polinucleótido candidato, y casetes de expresión de ARN que incluyen la secuencia que codifica la cadena en sentido y una cadena antisentido de un polinucleótido candidato flanqueado por secuencias reguladoras unidas operativamente, tales como un promotor de  
 35 la ARN polimerasa III y un terminador de la ARN polimerasa III, que da como resultado la producción de un polinucleótido de ARN. La célula puede ser *ex vivo* o *in vivo*. Los polinucleótidos candidatos pueden también ensayarse en modelos animales.

40 Cuando se evalúa si un polinucleótido candidato funciona para inhibir la expresión de uno de los polipéptidos descritos en el presente documento, la cantidad de ARNm diana en una célula que contiene un polinucleótido candidato puede medirse y compararse con el mismo tipo de célula que no contiene un polinucleótido candidato. En la técnica se conocen métodos para medir niveles de ARNm en una célula y son rutinarios. Dichos métodos incluyen RT-PCR cuantitativa. Los cebadores y las condiciones específicas para la amplificación de un ARNm varían dependiendo del ARNm y puede determinarse fácilmente por el experto en la materia. Otros métodos incluyen, por  
 45 ejemplo, transferencia de Northern y análisis de matriz.

Otros métodos para evaluar si un polinucleótido candidato funciona para inhibir la expresión de uno de los polipéptidos descritos en el presente documento incluyen monitorizar el polipéptido. Por ejemplo, pueden usarse ensayos para medir una disminución en la cantidad del polipéptido codificado por el ARNm, o medir una disminución  
 50 en la actividad del polipéptido codificado por el ARNm. Los métodos para medir una disminución en la cantidad de un polipéptido incluyen ensayar el polipéptido presente en células que contienen un polinucleótido candidato y comparar el mismo tipo de célula que no contiene el polinucleótido candidato. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención puede usarse, por ejemplo, en inmunotransferencia de Western, inmunoprecipitación o inmunohistoquímica. Los anticuerpos de cada uno de los polipéptidos descritos en el presente documento se encuentran disponibles en el comercio. También pueden usarse métodos para medir una disminución en la actividad  
 55 de uno de un polipéptido desvelado en el presente documento.

#### *Kits*

60 La invención proporciona kits que contienen reactivos como se describe en las reivindicaciones que pueden usarse en los métodos de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, determinar si una célula expresa un polipéptido de la presente invención. Dichos kits pueden contener material de envasado y un anticuerpo de la presente invención. Dichos kits también pueden usarse por personal médico para la formulación de composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que contienen un anticuerpo de la invención.

65 El material de envasado proporciona un medio protegido para el anticuerpo. Por ejemplo, el material de envasado

puede conservar el anticuerpo de la contaminación. Además, el material de envasado puede conservar un anticuerpo en solución evitando que se seque. Los ejemplos de materiales adecuados que pueden usarse para materiales de envasado incluyen vidrio, plástico, metal y similares. Dichos materiales pueden silanizarse para impedir la adhesión de un anticuerpo con el material de envasado.

En un ejemplo, la invención proporciona un kit que incluye material de envasado, un primer anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, y un segundo anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido RE- $\alpha$ 66. Opcionalmente el kit puede incluir componentes adicionales tales como tampones, recipientes de reacción, anticuerpos secundarios y jeringas.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

La haploinsuficiencia de caveolina-1 produce la activación de la expresión de RE- $\alpha$  y la transformación estimulada por estrógenos de células epiteliales de mama normales

Se preparó una biblioteca de clones celulares con genes atrapados de células epiteliales mamarias humanas normales MCF10A a través del uso de un vector retroviral (RET) atrapador poli-A proporcionado por el Dr. Philip Leder's laboratory at Harvard Medical School (Ishida *et al.*, Nucl. Acid Res., 27: 580 (1999)). En resumen, este vector usó una estrategia atrapadora poli A mejorada para la identificación eficaz de genes funcionales independientemente de su estado de expresión en células diana. Una combinación de un fuerte aceptor de corte y empalme y una señal de poliadenilación eficaz garantizan la completa alteración de la función de genes "atrapados". La inclusión de un ADNc de GFP sin promotor en el vector RET permite monitorizar fácilmente en células vivas el patrón de expresión del gen atrapado. Un retrovirus que contiene el vector RET se usó para infectar células MCF10A. Después, las células se exploraron con respecto a la resistencia a G418 para establecer una biblioteca de genes atrapados de células MCF10A. Después de la selección por G418 durante tres semanas, se monitorizó la expresión de GFP, bajo el control del promotor endógeno del gen "atrapado", y se seleccionaron clones que expresaban resistencia a G418 y GFP. Esta biblioteca representaba  $3 \times 10^5$  clones independientes infectados, en los que el vector RET alteró un alelo de un gen funcional.

Se pensó que la pérdida de expresión de genes con actividad supresora tumoral podría conferir el fenotipo transformado a células MCF10A normales. Se realizó un ensayo de clonación en agar blando y se identificaron células de la biblioteca celular con genes atrapados que adquirieron crecimiento independiente de anclaje, una característica del fenotipo transformado. Más de 100 colonias positivas ( $\geq 30$  células) de la biblioteca de células resistentes a G418 crecieron en agar blando mientras que las células MCF10A parentales no lo hicieron. Se aislaron veinte clones celulares, se expandieron y después se seleccionaron de nuevo en agar blando que contenía suero regular más 17 $\beta$ -estradiol (E2)  $10^{-8}$  M y suero tratado con carbón vegetal cubierto con dextrina que carecía de hormonas esteroideas durante tres semanas. Se aislaron cuatro clones celulares (ST1, ST3, ST4 y ST6) que presentaban crecimiento acelerado en agar blando que contenía E2 extra y se expandieron (Figura 3).

La RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) – 3', que permite la captura de secuencias de ARNm en 3' desconocidas que se encuentran entre el exón de un gen candidato y la cola poli A, se usó para clonar posibles genes cuya alteración conduce a la transformación de células MCF10A. Se pensó que la transformación de las células MCF10A se debía a una señalización estrogénica positiva. Los fragmentos de la PCR purificados resultantes del procedimiento RACE se clonaron y se secuenciaron. Usando una búsqueda BLASTN, las secuencias de ADN de dos clones (ST1 y ST3) se emparejaron idénticamente con la secuencia del exón 3 de la caveolina-1 (Cav-1) localizada en el cromosoma 7 (número de acceso GenBank XM048940). Este resultado indica que un alelo del gen de Cav-1 estaba alterado en al menos 2 clones. Además de Cav-1, se identificaron otros dos genes usando la misma técnica. El gen alterado en el clon ST4 fue SPRR1B (número de acceso GenBank NT-004441.5), un miembro de la familia de proteínas de corfirina/rica en prolina pequeña implicada en la organización estructural de envolturas celulares córneas. Otro gen del clon ST6 es un supuesto nuevo gen (número de acceso GenBank 6599139) con función desconocida.

Los niveles de la proteína Cav-1 se analizaron en células MCF10A parentales para ensayar si los niveles de expresión de Cav-1 estaban disminuidos en las células con genes de cav-1 atrapados. Se analizaron cuatro clones celulares (ST1, 3,4 y 6) descritos anteriormente, y MCF10A-Ha-ras, (células MCF10A transformadas con un mutante Ha-ras). Comparados con los niveles en células MCF10A parentales, los niveles de la proteína Cav-1 eran aproximadamente 2 veces más bajos en todas las células transformadas, como se demuestra mediante análisis de transferencia de Western (Figura 4). Estos datos son coherentes con la expresión de Cav-1 que disminuye solo cuando un alelo funcional del gen de cav-1 es funcional en células ST1 y ST3. Esto indica que la haploinsuficiencia de Cav-1 creada por el "atrapamiento génico" conduce a la transformación estimulada por E2. Estos datos también indican que la regulación negativa de Cav-1 está también implicada en la transformación resultante de la alteración de otros genes en células ST4 y ST6.

Para determinar el mecanismo mediante el cual la haploinsuficiencia de Cav-1 conduce al crecimiento y a la

transformación celular estimulada por estrógenos, se examinaron los niveles de expresión de RE- $\alpha$  y RE- $\beta$  en las células transformadas descritas anteriormente. Se descubrió que los cuatro clones de células transformadas expresaban RE- $\alpha$  a un nivel comparable al de las células transformadas con Ha-ras, mientras que las células MCF10A parentales y las células HBL-100, otra línea celular epitelial mamaria normal, expresaron niveles indetectables de RE- $\alpha$  (Figura 5). La expresión de RE- $\beta$  fue sin ningún cambio en todas las células ensayadas (Figura 5). Estos datos indican que la expresión de RE- $\alpha$  se activó y que la señalización estrogénica en estas células transformadas es responsable del crecimiento celular estimulado por estrógenos en agar blando. Se ha observado antes que tanto la expresión de RE- $\alpha$  como la señalización estrogénica están activadas en células transformadas con Ha-ras (Shekhar *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 13: 907 (1998) y Shekhar *et al.*, *Am. J. of Pathol.*, 152: 1129 (1998)). Los resultados presentes indican que la ruta Ras/MAPK está implicada en la regulación de la expresión de RE- $\alpha$  y en la señalización estrogénica positiva.

La activación de la ruta MAPK en estas células transformadas se analizó examinando los niveles de fosforilación de ERK1/2 usando anticuerpos fosfoespecíficos. Se descubrió que la ERK1/2 está altamente y constitutivamente fosforilada en todas las células transformadas pero no en las células MCF10A (Figura 6).

Considerados en su conjunto, estos datos indican que la ruta Cav-1/Ras/MAPK está implicada en la activación de la expresión de RE- $\alpha$  durante el desarrollo de cáncer de mama humano y coopera con la ruta de señalización estrogénica para estimular la proliferación de células transformadas.

## Ejemplo 2

### Identificación, clonación, expresión y caracterización de una isoforma del receptor estrogénico alfa (RE- $\alpha$ 36)

A lo largo del trabajo descrito anteriormente, regularmente se observaron tres bandas de proteínas (66 kDa, 46 kDa y 36 kDa) en los análisis de transferencia de Western realizados usando el anticuerpo anti-RE- $\alpha$  de rata (clon H222) de Research Diagnostic, INC. El anticuerpo H222 reconoce el dominio de unión a ligando del RE- $\alpha$ . Para excluir la posibilidad de que las bandas de proteína de 46 kDa y 36 kDa eran los productos de degradación del RE- $\alpha$ 66, como se sugirió en un informe previo (Abbondanza *et al.*, *Steroids*, 58: 4 (1993)), las células se sometieron a lisis en placas de cultivo usando un tampón que contenía urea 8 M y se sometieron a ensayo de transferencia Western. Rápidamente, se observaron tres bandas distintas en células ST1 y ST3, Cav-1 haploinsuficientes, y en células MCF7 de cáncer de mama (Figura 7). Estos resultados indican la existencia de isoformas del RE- $\alpha$  que comparten un epítipo similar que reconoce el anticuerpo H222.

A través de una investigación bibliográfica, se descubrió que, una isoforma de 46 kDa del RE- $\alpha$  que se había clonado, actuaba como un inhibidor negativo-dominante de transactivación mediada por el dominio AF-1 del RE- $\alpha$ 66 (Flouriot *et al.*, *EMBO J.*, 19: 4688 (2000)). Una investigación continua identificó un clon de una biblioteca de ADNc de endometrio humano normal (número de clon RZPD: DKFZp686N23123) que contenía un ADNc de 5,4 kb. Este clon de ADNc aloja una fase de lectura abierta de 310 aminoácidos que teóricamente puede producir una proteína con un peso molecular esperado de 35,7 kDa. La secuencia de ADNc de la fase de lectura abierta se empareja al 100 % con la secuencia de ADN de los exones 2 a 6 del gen del RE- $\alpha$ 66. La región no traducida 5' (5'UTR) del ADNc mostró una homología del 100 % con la secuencia de ADN del primer intrón del gen del RE- $\alpha$ 66 de 734 a 907 (el primer par de bases de los 34.233 pb del primer intrón del gen del RE- $\alpha$ 66 se denominó 1). Por tanto, se determinó que el transcrito del RE- $\alpha$ 36 se inicia a partir de un promotor previamente no identificado en el primer intrón del gen del RE- $\alpha$ 66.

Un exón nuevo, no codificante, pequeño, de 734 a 907 del primer intrón del gen del RE- $\alpha$ 66 se denominó "exón 1'". Después, el exón 1' se cortó y empalmó directamente en el exón 2 del gen del RE- $\alpha$ 66 y continúa desde el exón 2 hasta el exón 6 del gen del RE- $\alpha$ 66. Después, el exón 6 se corta y empalma hasta un exón localizado 64.141 pb aguas abajo del gen del RE- $\alpha$ 66 (número de acceso a GeneBank AY425004, véase la Tabla 1). La secuencia de ADNc que codifica los últimos 27 aminoácidos y los 4.293 pb de la región no traducida 3' se emparejó al 100 % con una secuencia continua de la secuencia genómica del clon RP1-1304 en el cromosoma 6q24.2-25.3 (número de acceso a GeneBank AL078582), indicando que la secuencia de ADNc restante de esta nueva isoforma del RE- $\alpha$  se transcribía desde un exón de 4.374 pb localizado aguas abajo del gen del RE- $\alpha$ 66 previamente indicado. Este exón se denomina por tanto exón 9 para reflejar el exón extra más allá de los ocho exones previos indicados (Figura 8). Todos estos sucesos de corte y empalme se confirman por la identificación de donantes y aceptores perfectos de corte y empalme en las uniones de corte y empalme. La proteína del RE- $\alpha$ 36 puede producirse a partir de una secuencia Kozak perfecta localizada en segundo exón, el mismo codón de inicio usado para producir el RE- $\alpha$ 46 (Flouriot *et al.*, *EMBO J.*, 19: 4688 (2000)). El RE- $\alpha$ 36 se diferencia del RE- $\alpha$ 66 por carecer de ambos dominios de activación transcripcionales, AF-1 y AF-2, pero conserva la dimerización, la unión al ADN y los dominios de unión parcial a ligando. También posee un dominio extra de 27 aminoácidos, exclusivo, que reemplaza los últimos 138 aminoácidos codificados por el exón 7 y 8 del RE- $\alpha$ 66 (Figura 1). Aquí, en el presente documento, a esta nueva isoforma del RE- $\alpha$  se la denomina RE- $\alpha$ 36.

La fase de lectura abierta que codifica al RE- $\alpha$ 36 se obtuvo usando la PCR del ADNc de Marathon Ready preparado

a partir de ARN de placenta humana (Clonotech) de acuerdo con el procedimiento descrito por el fabricante. Los pares de cebadores de la PCR se designaron de acuerdo con la secuencia de ADNc de DKFZp686N23123. El cebador 5' es 5'-CGGAATTCCGAAGGGAAGTATGGCTATGGAATCC-3' (SEC ID N°: 23) con un sitio EcoRI en el extremo, y el cebador 3' es 5'-CGGGATCCAGAGGCTTTAGACACGAGGAAAC-3' (SEC ID N°: 24) con un sitio BamHI en el extremo. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % y, se observó un fragmento de ADN esperado de 1,1 kb (Figura 9). El fragmento de ADN se purificó, se sometió a digestión con EcoRI y BamHI, se clonó en un vector pBluescript (pBS- RE- $\alpha$ 36) y se secuenció por completo. La secuencia mostró una identidad del 100 % con el clon de ADNc DKFZp686N23123, indicando que el RE- $\alpha$ 36 es una isoforma de origen natural de RE- $\alpha$  que puede clonarse a partir de otra fuente. En la Figura 10 se muestra la secuencia de aminoácidos prevista codificada por la fase de lectura abierta.

Se realizaron ensayos de transfección transitoria en células 293 de riñón embrionario humano usando vectores de expresión que contenían el RE- $\alpha$ 66, el RE- $\alpha$ 46 y el RE- $\alpha$ 36 para ensayar si el ADNc clonado produciría la proteína RE- $\alpha$ 36. Extractos de células completas de estas células transfectadas y células MCF7 se sometieron a análisis de transferencia de Western con el anticuerpo monoclonal H222 suscitado contra el dominio de unión a ligando del RE- $\alpha$  (Abbondanza *et al.*, Steroids, 58: 4 (1993)). Se produjo una proteína de 36 kDa que reconoció el anticuerpo H222 en células transfectadas con el vector que contenía RE- $\alpha$ 36 (Figura 11). El tamaño de esta proteína y su imposibilidad de reaccionar con el anticuerpo H226 dirigido contra el dominio B del RE- $\alpha$ 66, y con el anticuerpo HC 20 que reconoce el extremo C del RE- $\alpha$ 66, indican que la isoforma del RE- $\alpha$  carece tanto del extremo N como del extremo C del RE- $\alpha$ 66, dando como resultado un RE- $\alpha$  que carece tanto del dominio AF-1 como del dominio AF-2.

Se realizó una serie de búsquedas informatizadas sobre la proteína RE- $\alpha$ 36. Los algoritmos FindMod y SCANPROSITE predijeron tres sitios de miristoilación en el RE- $\alpha$ 36, lo que sugería que este podía localizarse en la membrana periférica. Esto coincidía con el algoritmo k de vecinos más próximos (PSPORT II) que predice que el 21,7 %, 34,8 %, 17,4 % y 26 % del RE- $\alpha$ 36 se localiza en el núcleo, citoplasma, mitocondria y fracciones de membrana, respectivamente. Esto es similar a la predicción del RE- $\alpha$ 46 (26,1 %, 30,4 %, 17,4 % y 26,1 %, respectivamente). En cambio, el 73,9 %, 8,7 %, 0,1 % y 17,3 % del RE- $\alpha$ 66 lleva predicciones comparativas. Por tanto, la compartimentalización diferencial del RE- $\alpha$ 66, RE- $\alpha$ 46 y RE- $\alpha$ 36 indica que el sitio funcional y la función principal de cada receptor pueden ser diferentes.

También se realizó una búsqueda informatizada en la supuesta región flanqueante 5' del gen que codifica el RE- $\alpha$ 36 que se localiza en el primer intrón del gen del RE- $\alpha$ 66. Se descubrió la secuencia de reconocimiento de la proteína de unión a TATA (TBP, *TATA Binding Protein*) aguas arriba del sitio de inicio del ADNc y diversos sitios de unión a Sp1, NF- $\kappa$ B y Ap1 en la región flanqueante 5' (Figura 12). Se identificó un sitio de elemento de respuesta estrogénica (ERE) medio perfecto en la región 5' aguas arriba del RE- $\alpha$ 36, indicando que el RE- $\alpha$ 36 se somete a regulación transcripcional mediada por E2.

### Ejemplo 3

El RE- $\alpha$ 36 media la señalización estrogénica iniciada en la membrana y se expresa en cáncer de mama negativo al RE

### Métodos

Cultivo celular, establecimiento de líneas celulares estables y marcaje de membranas con E2-BSA-FITC. Las células MCF10A se obtuvieron en el Karmanos Cancer Institute en Detroit, MI, y las células 293 de riñón embrionario humano y todas las células de cáncer de mama se obtuvieron en la ATCC. Todas las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5 % en medio de cultivo tisular apropiado. Para establecer células estables que expresasen el RE- $\alpha$ 36 recombinante, las células HEK293 se sembraron en placas a una densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células por disco de 60 mm y se transfectaron 24 horas después con el vector de expresión que contenía RE- $\alpha$ 36 conducido por el promotor del citomegalovirus (CMV) usando el reactivo de transfección FuGene6 (Roche Molecular Biochemicals). El vector de expresión con RE- $\alpha$ 36 se construyó clonando un fragmento de ADNc del RE- $\alpha$ 36 con *EcoRI-BamHI* de 1,1 kb a partir del pBS-RE- $\alpha$ 36 en los sitios *EcoRI* y *BamHI* del vector de expresión de mamífero pCB6+. También se transfectó un vector vacío en las células que servían como controles. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células volvieron a sembrarse en placas y se seleccionaron con 500  $\mu$ g/ml de G418 (Invitrogen) durante dos semanas. La población no clonada resultante de células resistentes a G418 se expandió para generar células usadas para análisis posterior. Para marcar la superficie celular de células estables que expresaban el RE- $\alpha$ 36 recombinante, las células se marcaron a 4 °C durante 15 minutos con BSA marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1  $\mu$ M unido covalentemente a E2 $\beta$ -hemisuccinato (Sigma), se fijaron en paraformaldehído al 4 % recién preparado y se montaron con solución de montaje que contenía DAPI para la evaluación microscópica.

Estimulación celular con estrógenos y antiestrógenos y ensayo MTT. Antes del tratamiento, las células se cultivaron en medio sin rojo fenol con suero de ternero fetal tratado con carbón vegetal recubierto con dextrina al 2,5 % durante 48-72 horas y después se lavaron con PBS y se colocaron en medio asérico, sin rojo fenol, reciente, que contenía 0,1 µg/ml de BSA y 5 µg/ml de insulina, durante 12 horas. La estimulación de células quiescentes se realizó a 37 °C en medio asérico durante un periodo de tiempo diferente. Los diferentes estrógenos y antiestrógenos se adquirieron en Steraloids Inc. El BSA-E2β se obtuvo en Sigma.

Para los ensayos con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), se añadieron células en suspensión a cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos para dar una concentración final de  $1 \times 10^3$  células/pocillo, y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub>. Los medios que contenían E2β 10 nM, 10 nM de Tamoxifeno o 4OH-Tamoxifeno o UO126 7,2 nM (Calbiochem) se añadieron a cada pocillo durante 48 horas. El ensayo con MTT se realizó con el Kit de Ensayo de Proliferación Celular de una Solución Acuosa de CellTiter96 (Bio Rad) según recomendación del fabricante. Se usó un lector de microplaca (Promega) para medir la absorbancia a 490 nm.

Ensayo de fraccionamiento celular. El fraccionamiento celular se realizó como describen Márquez *et al.* (Oncogene, 20, 5420-5430 (2001)).

Análisis de transferencia de Western, inmunofluorescencia indirecta y anticuerpos. Para el análisis de transferencia de Western, las células se alteraron con tampón RIPA, se hirvieron en tampón de carga con gel y se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10 %. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore). El filtro se exploró con diversos anticuerpos y se visualizó con anticuerpos secundarios apropiados conjugados con HRP (Santa Cruz Biotechnology) y reactivos ECL (Perkin Elmer Life Sciences).

El anticuerpo contra ERK1/2 (K-23) se adquirió en Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos usados para analizar la activación de la ruta MAP quinasa incluyeron las formas fosforiladas de Mek1 y ERK1/2, y se adquirieron en Cell Signaling Technology. El anticuerpo anti-R-α de rata (H222) se adquirió en Research Diagnostic Inc. Los anticuerpos de COPB (Y-20), mSin3A (AK-11) y la 5' nucleotidasa (H-300) se adquirieron en Santa Cruz biotechnology Inc. El D4-GDI (clon 97A1015) se obtuvo en Upstate Biotechnology.

El anticuerpo anti-RE-α36 policlonal se suscitó en conejo contra el antígeno peptídico sintetizado de acuerdo con los últimos 15 aminoácidos en la región C terminal del RE-α33 que son exclusivos para el RE-α36 (Alpha Diagnostic Inc.). Para purificar el anticuerpo, se usó una columna de afinidad del péptido sintetizado usado para suscitarse el anticuerpo. La especificidad del anticuerpo también se había ensayado en células HEK293 transfectadas con el vector de expresión que expresaba el RE-α36, que no expresa el RE-α36 endógeno. El ensayo de inmunofluorescencia mostró que se detectaban señales inmunorreactivas del anticuerpo anti-RE-α36 solo en transfectantes transitorios con vectores que expresaban el RE-α36 pero no en transfectantes que expresaban un RE-α36 mutante que carecía del extremo C, lo que sugiere que el anticuerpo RE-α36 es altamente específico.

Ensayo de transfección de ADN y luciferasa. Para los ensayos de transfección transitoria, células HEK293 subsembradas en discos de 6 pocillos crecieron hasta una confluencia del 60-70 % en medio sin rojo fenol más suero de ternero fetal sin esteroides al 2,5 %. Las células se lavaron y se transfectaron transitoriamente con 5 µg totales de plásmidos (2 µg del plásmido indicador 2 X ERE-tk-Luc junto con 1,5 µg del vector de expresión pSG5, 1,5 µg de pSG hREα66 o 1,5 µg de pSG hREβ en solitario o con 1,5 µg del vector de expresión RE-α36) con reactivo FuGene6 (Roche Molecular Biochemicals). Se usó un plásmido indicador que contenía dos ERE (secuencia de -331 a -289 del gen A2 de Vitellogenina de pollo) colocado aguas arriba del promotor de la timidina quinasa (2 X ERE-tk-Luc, obtenido a través del Dr. Katarine Pettersson, Karolinska Institute, Suecia). Los vectores de expresión que contenían RE-α66 y β también se obtuvieron a través del Dr. Katarine Pettersson. El vector de expresión del RE-α46 se obtuvo a través del Dr. Zafar Nawaz (Creighton University Medical Center, Omaha, Nebraska). Las células se trataron con o sin E2 (10 nM) durante 12 horas antes de ensayar la actividad luciferasa. Los ensayos de luciferasa se realizaron usando el kit de Ensayo de Luciferasa de Promega. Los valores corresponden al promedio ± desviación típica de más de tres experimentos de transfección distintos.

Análisis de extracción de ARN y transferencia de Northern. El ARN celular total se aisló usando Trizol (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Diez µg de ARN total se separaron por electroforesis en gel de formamida/formaldehído al 1,2 % y se transfirieron a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech). Las transferencias se prehibridaron durante 1 hora y se hibridaron durante 2 horas en solución Quick-Hybridization (Amersham Pharmacia Biotech) a 65 °C. Las sondas incluyeron un fragmento de ADNc de 410 pb desde la región 3' no traducida del RE-α36 que es exclusiva para el RE-α36, y una sonda de ADN de β actina de BD Clonetech. Las sondas de ADN se marcaron con <sup>32</sup>P dCTP y un kit de marcaje de ADN Rediprime II (Amersham Biotech). Las transferencias se autoradiografiaron usando exploraciones de intensificación a -70 °C durante una noche. Las mismas membranas se separaron y volvieron a explorarse con una sonda de ADN de β actina marcada para confirmar la misma carga.

Especímenes de cáncer de mama y ensayo inmunohistoquímico. Especímenes de cáncer de mama humano incluidos en parafina se obtuvieron en el Departamento de Patología, del Hospital Sir Run Run Shaw, Hangzhou P. R. China. La tinción inmunohistoquímica se realizó usando el kit UltraSensitive™ S-P (Maixin-Bio, China) según las instrucciones del fabricante, con un anticuerpo específico contra el RE- $\alpha$ 66 (LabVision Corporation, USA) y con el anticuerpo específico contra el RE- $\alpha$ 36 como anticuerpo primario, respectivamente.

## Resultados

Para confirmar adicionalmente que el RE- $\alpha$ 36 es una isoforma de origen natural del RE- $\alpha$ 66, se realizó análisis de transferencia de Northern de ARN total procedente de una línea celular epitelial mamaria normal, MCF10A, y células de cáncer de mama positivas y negativas al RE (es decir, positivas y negativas al RE- $\alpha$ 66). Se sintetizó una sonda de ADN usando el método RT-PCR, con los pares cebadores diseñados de acuerdo con la región no traducida 3' del RE- $\alpha$ 36 que es única para el RE- $\alpha$ 36 (5' GCAAAGAAGAGAATCCTGAACTTGCATCCT (SEC ID N°: 26) y 5' TTAGTCAGGTATTTAATAACTAGGAATTG (SEC ID N°: 27)). El análisis de transferencia de Northern mostró que solo se identificaba un ARNm, con un tamaño estimado de 5,6 kb, en células MCF7 de cáncer de mama, positivas al RE (es decir positivas al RE- $\alpha$ 66) pero no en células MCF10A (Figura 13). Sorprendentemente, el RE- $\alpha$ 36 también se expresó en células MDA-MB-231, una línea celular conocida de cáncer de mama negativa al RE (es decir, negativa al RE- $\alpha$ 66) (Fig. 13). Estos datos indican que los transcritos con el tamaño previsto del ARNm del RE- $\alpha$ 36 se expresan en células de cáncer de mama, e incluso en células de cáncer de mama que carecen del RE- $\alpha$ 66.

El RE- $\alpha$ 36 inhibe actividades de transactivación del RE- $\alpha$ 66 y - $\beta$  con ligando y sin ligando. Primero se ensayó si el RE- $\alpha$ 36, que carecía tanto del dominio AF-1 como del dominio AF-2, conservaba cualquier actividad transcripcional. Se realizaron ensayos de transfección transitoria en células HEK293 usando una construcción indicadora que expresaba luciferasa que contenía dos elementos de respuesta estrogénica (ERE) dispuestos aguas arriba del promotor de la timidina quinasa (2 X ERE-tk-Luc). Se seleccionó la línea celular HEK293 dado que previamente se indicó que el dominio AF-1 y -2 del RE- $\alpha$ 66 funcionaban igual de bien en células HEK293 (Denger *et al.*, Mol. Endocrinol., 15, 2064-2077 (2001)). Como se muestra en la Fig. 14, se descubrió que el RE- $\alpha$ 36 no presentaba actividad transcripcional intrínseca en presencia o en ausencia de E2 $\beta$ , coherente con el hallazgo de que el RE- $\alpha$ 36 carecía de los dos dominios de activación de la transcripción. Después se evaluó la función reguladora del RE- $\alpha$ 36 en actividades de transactivación transcripcionales mediadas por los dominios AF-1 y 2 del RE- $\alpha$ 66. La coexpresión del RE- $\alpha$ 36 inhibió fuertemente la actividad de transactivación del RE- $\alpha$ 66 en presencia y en ausencia de E2 $\beta$  (Fig. 14), lo que sugería que el RE- $\alpha$ 36 inhibía las actividades de transactivación mediadas por los dominios AF-1 y AF-2 del RE- $\alpha$ 66. Además, el RE- $\alpha$ 36 también inhibió las actividades de transactivación del RE- $\beta$  dependientes e independientes de ligando (Fig. 14).

El RE- $\alpha$ 36 media la ruta de señalización estrogénica iniciada en la membrana. Informes previos han indicado que E2 $\beta$  estimula una rápida activación de la ruta MAPK/ERK (Razandi *et al.*, Mol. Endocrinol., 13, 307-319 (1999), Watters *et al.*, Endocrinol., 138, 4030-4033 (1997), y Migliaccio *et al.*, EMBO J., 15, 1292-1300 (1996)). Para determinar si el RE- $\alpha$ 36 estaba implicado en esta ruta de señalización, se establecieron células estables que expresaban el RE- $\alpha$ 36 exógeno en células HEK293 que no expresaban el RE- $\alpha$  endógeno. Células HEK293 transfectadas con RE- $\alpha$ 36 por completo se incubaron con BSA-E2 $\beta$  conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (E2 $\beta$ -BSA-FITC) que es impermeable a la membrana. La superficie celular de las células transfectadas con RE- $\alpha$ 36 se marcó fuertemente con el E2 $\beta$ -BSA-FITC mientras que las células de control transfectadas con el vector vacío no se marcaron con E2 $\beta$ -BSA-FITC. Se prepararon lisados celulares de células quiescentes que se trataron o no con E2 $\beta$  (10 nM) durante diversos periodos de tiempo. La activación de ERK se midió por inmunotransferencia usando anticuerpos dependientes e independientes del estado de fosforilación. A los 5 minutos, se observó un aumento de 10 veces en la fosforilación de ERK1/2 que duró aproximadamente 45 minutos, en las células transfectadas con el vector de expresión con RE- $\alpha$ 36 pero no en las células de control transfectadas con el vector vacío (Fig. 15a y 15b). Sin embargo, el suero (20 % durante 10 minutos) pudo activar a ERK1/2 en estas células de control (Fig. 15b), lo que indicaba que no había un defecto global de la ruta de señalización MAPK en estas células. Además, Mek1, la quinasa que fosforila y activa a ERK1/2, también se activa en respuesta a E2 $\beta$  en células transfectadas con RE- $\alpha$ 36 (Fig. 15a). Para proporcionar pruebas adicionales de la activación de ERK1/2 mediante una señalización estrogénica iniciada en la membrana, también se trataron células transfectadas con RE- $\alpha$ 36 con E2 $\beta$ -BSA, una forma de E2 $\beta$  impermeable a la membrana. También se observó una fuerte activación de la fosforilación de ERK1/2 en células tratadas con E2 $\beta$ -BSA (Figura 15a).

El RE- $\alpha$ 36 media la activación de la ruta de señalización de MAPK estimulada por diferentes estrógenos y antiestrógenos. También se trataron células transfectadas con RE- $\alpha$ 36 durante 10 minutos con estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2 $\beta$ ), 17 $\alpha$ -estradiol (E2 $\alpha$ ), estriol (E3) o estetrol (E4) y se descubrió que todos estos estrógenos, excepto E1, activaban la fosforilación de ERK1/2 a un nivel muy similar, lo que sugería que el RE- $\alpha$ 36 puede reconocer a estos estrógenos a un nivel similar (Fig. 15c). Después, en el experimento, se incluyeron los antiestrógenos, incluyendo Tamoxifeno, 4OH-Tamoxifeno, ICI-182.780, para ensayar si la señalización estrogénica mediada por el RE- $\alpha$ 36 es sensible a antiestrógenos. El Tamoxifeno, 4OH-Tamoxifeno y el antiestrógeno puro ICI-182, 780 no

5 bloquearon la activación de ERK1/2 mediada por el RE- $\alpha$ 36. Por el contrario, los efectos son incluso más fuertes en comparación con los efectos mediados solo por E2 $\beta$  (Fig. 15c). Cuando las células transfectadas con el RE- $\alpha$ 36 se trataron solo con Tamoxifeno 1  $\mu$ M, se observó una concentración que podía estabilizar tanto el RE- $\alpha$ 66 como el  $\beta$ , una fuerte y persistente activación de ERK1/2 que duró más que de ocho horas (Fig. 15d). Sin embargo, el tamoxifeno a la misma concentración, no tuvo efecto en las células 293 de control transfectadas con vector de expresión vacío.

10 El RE- $\alpha$ 36 media la proliferación celular estimulada por E2. Para determinar adicionalmente si la ruta MAPK activada por estrógenos mediada por RE- $\alpha$ 36 puede conducir a la señalización transcripcional en el núcleo celular, se examinó la capacidad de la señalización estrogénica iniciada en la membrana para activar el factor de transcripción Elk, un efector aguas abajo de la ruta de señalización MAPK/ERK. Se transfectaron transitoriamente células 293 que expresaban el RE- $\alpha$ 36 con el factor de transcripción quimérico GAL-Elk sensible a ERK, que consta del dominio de unión al ADN del factor de transcripción de levadura GAL4 fusionado con el dominio de transactivación sensible a ERK del Elk1 humano, y se midió su actividad *in vivo* sobre la expresión de un gen indicador de unión a GAL4 en presencia de E2 $\beta$ . El gen indicador fue 5 X Gal4-LUC, un plásmido indicador de luciferasa que contenía cinco sitios de unión al ADN de Gal4. Se usó un vector de expresión  $\beta$ -galactosidasa de bacterias para controlar la eficacia de la transfección. Después de la transfección, el cultivo celular se mantuvo en medio sin estrógenos durante 36 horas antes de añadir E2 $\beta$  (10 nM) durante 12 horas. Las actividades luciferasa con desviación típica son representativas de más de tres experimentos realizados por duplicado. El tratamiento con estrógenos de células transfectadas con RE- $\alpha$ 36 indujo un aumento de aproximadamente dos veces de la transactivación mediada por la proteína de fusión Elk/Gal4 del indicador mientras que E2 $\beta$  no tuvo efecto sobre la actividad de transcripción de la proteína de fusión Elk/Gal4 en las células de control transfectadas con el vector vacío (Fig. 16a).

25 A continuación se abordó si el RE- $\alpha$ 36 podía mediar la proliferación celular estimulada por estrógenos. La proliferación de las células transfectadas con RE- $\alpha$ 36 y de las células de control, en presencia y en ausencia de E2 $\beta$ , se evaluó mediante el ensayo con MTT. La proliferación de las células transfectadas con RE- $\alpha$ 36 se estimuló por tratamiento con E2 $\beta$  mientras que E2 $\beta$  no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de las células de control transfectadas con el vector de expresión vacío (Fig. 16b). La inclusión de los antiestrógenos, incluyendo Tamoxifeno y 4OH-Tamoxifeno, no bloqueó el crecimiento celular estimulado por E2 $\beta$  (Fig. 16b). El Tamoxifeno o 4OH-Tamoxifeno solo estimuló fuertemente el crecimiento de las células transfectadas con RE- $\alpha$ 36. Sin embargo, el inhibidor específico de la ruta MAPK, UO126, inhibió fuertemente el crecimiento celular estimulado con E2 $\beta$ . Estos datos sugieren que la señalización estrogénica en membrana mediada por RE- $\alpha$ 36 estimula el crecimiento celular a través de la activación de la ruta de señalización MAPK/ERK. Los datos también sugieren que los antiestrógenos también estimulan el crecimiento celular a través del RE- $\alpha$ 36.

35 El RE- $\alpha$ 36 es predominantemente un receptor estrogénico basado en membrana. Para caracterizar adicionalmente el RE- $\alpha$ 36, se desarrolló con éxito un anticuerpo policlonal anti-RE- $\alpha$ 36 suscitado contra los 15 aminoácidos en la región C terminal del RE- $\alpha$ 36 que es única para el RE- $\alpha$ 36. Para purificar el anticuerpo, se usó una columna de afinidad de péptidos sintetizados para suscitar el anticuerpo. El análisis de transferencia de Western de proteínas preparadas a partir de células epiteliales mamarias normales y de líneas celulares de cáncer de mama establecidas usando este anticuerpo demostró una sola banda de proteína con un peso molecular de 37 kDa en algunas células de cáncer de mama pero no en células epiteliales mamarias normales (Fig. 17a). El RE- $\alpha$ 36 se expresó en células MDA-MB-231, MDA-MB436 y HB3396, tres líneas celulares de cáncer de mama bien conocidas negativas al RE- $\alpha$ 66 y también se expresó en células MCF7 de cáncer de mama positivas al RE- $\alpha$ 66 pero no en T47D (Fig. 17a), coherente con nuestros datos de transferencia de Northern de que el RE- $\alpha$ 36 se expresa en células de cáncer de mama negativas al RE- $\alpha$ 36. Para evaluar adicionalmente la posibilidad de que el RE- $\alpha$ 36 se exprese en células de cáncer de mama negativas al RE- $\alpha$ 66, un ensayo de inmunofluorescencia indirecto y de microscopia confocal en células MDA-MB-231 permeabilizadas, usando el anticuerpo anti-RE- $\alpha$ 36 específico, mostró que el RE- $\alpha$ 36 se expresa en la membrana plasmática, en el citoplasma y en el núcleo de las células MDA-MB-231 de cáncer de mama negativas al RE- $\alpha$ 66.

55 Para evaluar adicionalmente la compartimentalización del RE- $\alpha$ 36 en células, se realizó el ensayo de fraccionamiento subcelular para asilar núcleos, membranas plasmáticas y citosol de células HEK293 transfectadas con RE- $\alpha$ 36. El RE- $\alpha$ 36 se identificó por inmunodetección de las diferentes fracciones. Se localizó un alto porcentaje de RE- $\alpha$ 36 (~50 %) en la membrana plasmática y un bajo porcentaje del mismo en el citosol (~40 %) y en el núcleo (~10 %). Para excluir la contaminación cruzada de diferentes fracciones, se examinó la pureza de la fracción por análisis de transferencia de Western con diferentes proteínas marcadoras incluyendo mSin3A (núcleo), inhibidor de disociación GDP (citosol), 5' nucleotidasa (membrana plasmática) y  $\beta$  COP (Golgi). Estos resultados confirmaron que no había contaminación entre las diferentes fracciones. Este experimento establece que el RE- $\alpha$ 36 es predominantemente un receptor estrogénico basado en membrana (Fig. 17b).

60 El RE- $\alpha$ 36 se expresa en especímenes de cáncer de mama negativos al RE- $\alpha$ 66. Para determinar adicionalmente la importancia del RE- $\alpha$ 36 contra el cáncer de mama humano, se examinaron los patrones de expresión del RE- $\alpha$ 36 en

5 especímenes de cáncer de mama humano con un ensayo inmunohistoquímico usando el anticuerpo específico anti-RE- $\alpha$ 36. Análisis realizados *in situ* de tejido de mama humano mostraron la regulación positiva del RE- $\alpha$ 36 en cáncer de mama. Las células que fueron positivas para la proteína RE se tiñeron de color marrón, y los núcleos se tiñeron de color azul con hematoxilina. Entre 35 casos de especímenes de cáncer de mama examinados, 21 de ellos (60 %) mostraron tinción positiva para el RE- $\alpha$ 36 y 21 de ellos (60 %) mostraron tinción positiva para el RE- $\alpha$ 66 (Tabla 2). Coherente con nuestros análisis de transferencia de Northern y Western, 11 de los 14 (78 %) especímenes de cáncer de mama que mostraron tinción negativa para el RE- $\alpha$ 66 mostraron tinción positiva para el RE- $\alpha$ 36, lo que indica que la mayoría de los cánceres de mama negativos al RE (es decir, negativos al RE- $\alpha$ 66) aún expresan el RE- $\alpha$ 36. La tinción *in situ* del RE- $\alpha$ 36 en una sección de tejido normal encontrada en un carcinoma ductal humano, mostró expresión del RE- $\alpha$ 36 solo en células epiteliales lumbinales y principalmente localizado en el citoplasma y en la membrana plasmática. Secciones tumorales eran de carcinoma ductal infiltrante humano y de carcinoma ductal invasivo. Los 21 casos de especímenes positivos al RE- $\alpha$ 36 presentaron patrones de inmunotinción al RE- $\alpha$ 36 predominantemente fuera del núcleo de la célula, contrario a la tinción principalmente nuclear del RE- $\alpha$ 66. Al igual que el RE- $\alpha$ 66, algunas células epiteliales lumbinales en tejido normal adyacente también mostraron tinción positiva al RE- $\alpha$ 36. Estos resultados demuestran que al igual que el RE- $\alpha$ 66, el RE- $\alpha$ 36 se expresa en dos tercios del cáncer de mama humano examinado, y sugiere que el RE- $\alpha$ 36 puede estar implicado en el desarrollo de cáncer de mama negativo al RE- $\alpha$ 66.

10

15

Tabla 2. Expresión del RE- $\alpha$ 36 y 66: supervivencia de inmunotinción en cáncer de mama humano

Caso N°	RE- $\alpha$ 66	RE- $\alpha$ 36
04-06108D	+++	+
04-06278G	+++	+
03-19482D	+++	++
03-13610E	+++	+
01-09182B	++	+
02-17950B	++	+
02-07748H	++	+
01-13537G	++	+
00-0319D	++	+/-
03-04069G	+	+/-
00-02787D	-H-	-
02-18513F	++	-
04-08474J	++	-
02-01265M	++	-
03-07870E	+	-
02-04206F	++	-
02-12985F	+++	-
03-08862G	++	-

Caso N°	RE- $\alpha$ 66	RE- $\alpha$ 36
02-09537B	+++	
03-22792D	++	
04-10881D	+	
03-10071F	**	++
03-22971M	"	+
01-08119U		+/-
02-02018D	-	+
02-04567E	-	+
04-07055E	-	+
03-05946C	-	+
03-225861	-	+
01-02877A	-	+
01-17570C	-	+/-
00-08489G	-	+/-
00-02202F	-	-
98-03898D	-	-
03-04898B	-	-

5

En este estudio, se ha identificado, clonado y caracterizado, una nueva variante del RE- $\alpha$ , el RE- $\alpha$ 36. Esta isoforma del RE- $\alpha$  es el producto de un transcrito iniciado a partir de un promotor previo no identificado en el primer intrón del gen del RE- $\alpha$ 66. La supuesta región promotora del RE- $\alpha$ 36 contiene una secuencia de reconocimiento de proteína de unión a TATA (TBP) aguas arriba del sitio de inicio del ADNc del RE- $\alpha$ 36, y varios sitios de unión a Sp1, NF- $\kappa$ B y Ap1 (Fig. 12). Se clonó la región flanqueante 5' del RE- $\alpha$ 36 y se confirmó que poseía fuerte actividad promotora. Además, se identificó un sitio ERE medio perfecto en la región flanqueante 5' del RE- $\alpha$ 36, lo que sugiere que el RE- $\alpha$ 36 se somete a regulación transcripcional mediada por el RE.

10

La proteína RE- $\alpha$ 36 es idéntica a la proteína RE- $\alpha$ 66 codificada por los exones 2-6 del gen del RE- $\alpha$ 66. Esta isoforma está desprovista de los dominios previamente identificados que tienen sitios de transactivación, AF-1 y -2. De hecho, análisis de actividad de transactivación del RE- $\alpha$ 36 demostraron que el RE- $\alpha$ 36 carece de actividad

transcripcional intrínseca. Sin embargo, el RE- $\alpha$ 36 suprime eficazmente los sitios de transactivación mediados por los dominios AF-1 y -2 del RE- $\alpha$ 66 y  $\beta$  con ligando y sin ligando, lo que indica que el RE- $\alpha$ 36 es un fuerte inhibidor de la señalización estrogénica genómica. Este hallazgo compara el informe previo de que el RE- $\alpha$ 46, que carece del dominio AF-1, funciona como un poderoso competidor para suprimir la actividad de AF-1 del RE- $\alpha$ 66.

5 La presencia de un RE basado en la membrana plasmática que desencadena una rápida señalización estrogénica, se discutió durante mucho tiempo, dado que la identidad molecular de este receptor no se había establecido. Previamente, Razandi, usando un ensayo de transfección, indicó que, tanto el RE- $\alpha$ 66 como el  $\beta$ , podían iniciar la  
10 señalización estrogénica en membrana, aunque solamente un porcentaje muy pequeño del mismo se expresaba en la superficie celular (Razandi *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, 13, 307-319 (1999)), lo que sugería que estos RE pueden estar implicados en la señalización estrogénica iniciada en la membrana, además de sus funciones adicionales en la señalización estrogénica genómica. Recientemente, se localizó la isoforma de 46 kDa del RE- $\alpha$  en la superficie celular y se descubrió que mediaba la fosforilación eNOS estimulada por estrógeno (Li *et al.*, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 4807-4812 (2003)). Aquí, se demostró que otra variante del RE- $\alpha$ , el RE- $\alpha$ 36, se localizaba  
15 predominantemente en la membrana plasmática y mediaba la activación de la ruta MAPK/ERK inducida por la señalización estrogénica iniciada en la membrana. Además, dado que el RE- $\alpha$ 36 carece totalmente de actividad de transactivación intrínseca y solo actúa como un regulador de la señalización estrogénica genómica, el RE- $\alpha$ 36 puede actuar principalmente como un receptor estrogénico basado en membrana para mediar la señalización estrogénica iniciada en la membrana. Previamente, se ha indicado que algunas de las acciones rápidas mediadas por E2 $\beta$  se  
20 producen en neuronas de ratones RE- $\alpha$  genosuprimidos ( $\alpha$ ERKO) y estas acciones no están bloqueadas por ICI 182,780 (Gu *et al.*, *Endocrinology*, 140, 660-666 (1999)), lo que sugiere la existencia de más de una ruta de señalización estrogénica iniciada en la membrana. En este documento, se demuestra que, los antiestrógenos no bloqueaban la activación de MAPK/ERK mediada por el RE- $\alpha$ 36, lo que sugiere que el RE- $\alpha$ 36 está implicado en la ruta de señalización insensible a antiestrógenos previamente descrita. Dado que se crearon ratones  $\alpha$ ERKO mediante una alteración insercional del primer exón codificante del gen del RE- $\alpha$ 36 de ratón (el exón que se salta en la generación de transcritos del RE- $\alpha$ 36), es probable que la producción del homólogo de ratón del RE- $\alpha$ 36 permanezca normal en estos ratones genosuprimidos. Por tanto, el RE- $\alpha$ 36 puede contribuir a los efectos estrogénicos restantes observados en estos ratones. Recientemente, Toran-Allerand *et al.* (*J. Neuroscience* 22, 8391-8401 (2002)) indicaron la existencia de un nuevo receptor estrogénico asociado a la membrana plasmática (RE-X) con un peso molecular estimado de 63-65 kDa. El RE-X muestra algunas similitudes con el RE- $\alpha$ 36, tales como reaccionar con anticuerpos contra el dominio de unión a ligando del RE- $\alpha$ 66 y responder igualmente bien  
30 contra E2 $\alpha$  y  $\beta$ . Sin embargo, la identidad molecular de estos dos receptores está a la espera de la clonación y secuenciación del RE-X.

35 También se ha demostrado que el RE- $\alpha$ 36 promueve la activación iniciada en membrana de la ruta MAPK/ERK que conduce a la proliferación celular estimulada por estrógenos. Por tanto, el RE- $\alpha$ 36, que está desprovisto de actividad de transcripción intrínseca, es suficiente para promover el crecimiento celular estimulado por estrógenos, lo que apoya el informe previo de que un mutante transcripcionalmente inactivo del RE- $\alpha$ 66 induce la síntesis de ADN. Estos datos en conjunto sugieren que las actividades transcripcionales del RE pueden no ser necesarias para  
40 promover el crecimiento celular estimulado por estrógenos. Sorprendentemente, también se observó que antiestrógenos, tales como Tamoxifeno, activan fuertemente la señalización MAPK/ERK y estimulan el crecimiento celular durante el periodo del experimento (48 horas). Este hallazgo concuerda bien con la idea de que el Tamoxifeno actúa como agonista y antagonista de la señalización estrogénica y sugiere que el RE- $\alpha$ 36 también puede estar implicado en la señalización antiestrogénica iniciada en la membrana.

45 Se sabe bien que las células de cáncer de mama con un fenotipo RE- $\alpha$ 66 positivo (cáncer de mama positivo al RE) están más diferenciadas y tienen un potencial metastásico inferior en comparación con los tumores negativos al RE- $\alpha$  (McGuire, W. L. *Prognostic factors in primary breast cancer. Cancer Surv.* 5, 527-536 (1986)). Esto resulta interesante, ya que el RE- $\alpha$ 36 se expresa no solo en el subconjunto de cánceres de mama positivos al RE- $\alpha$ 66 sino  
50 también en la mayoría de los cánceres de mama negativos al RE- $\alpha$ 66 examinados. Corroborando estos resultados, se ha indicado que la señalización estrogénica induce una rápida activación de la ruta PI3K/Akt en células MDA-MB-231 que podría no bloquearse por antagonistas estrogénicos (Tsai *et al.*, *Cancer Res.* 61, 8390-8392 (2001)), lo que se explicó como señalización estrogénica a través de una ruta independiente al RE. También se ha demostrado que la alta concentración de Tamoxifeno induce a la apoptosis en células MDA-MB-231 (Mandleker *et al.*, *Apoptosis* 6, 469-477 (2001)). Estos datos sugieren contundentemente que el cáncer de mama negativo al RE- $\alpha$ 66 puede conservar aún los efectos estrogénicos o antiestrogénicos mediados por la señalización iniciada en la membrana.

El RE- $\alpha$ 36 también posee un dominio de unión a ligando exclusivo, reemplazando las 5 últimas hélices (hélices 8-12) de las 12 hélices en el RE- $\alpha$ 66 con un dominio exclusivo de 27 aminoácidos, que puede cambiar la especificidad de  
60 unión a ligando y la afinidad del RE- $\alpha$ 36. De hecho, se descubrió que el RE- $\alpha$ 36 suscitaba una señalización iniciada en membrana igualmente en respuesta a E2 $\alpha$  y  $\beta$ , E3 y E4. Por tanto, el RE- $\alpha$ 36 parece poseer un espectro de unión a ligando mucho más amplio que el RE- $\alpha$ 66, lo que hace que el RE- $\alpha$ 36 sea posiblemente un mediador más fuerte de señalización mitogénica. Análisis posteriores de la especificidad de unión a ligando y afinidad del RE- $\alpha$ 36

ayudaran a diseñar antiestrógenos específicos para el RE- $\alpha$ 36 que pueden usarse para tratar cáncer de mama negativo al RE- $\alpha$ 36 (es decir negativo al RE- $\alpha$ 66).

Ejemplo 4

5

El E2 $\beta$  promueve el crecimiento de células MDA-MB-231 negativas al RE- $\alpha$ 66 en agar blando.

10 Para determinar el crecimiento independiente de anclaje en agar blando, en presencia y en ausencia de E2 $\beta$  y tamoxifeno juntos o separados, se suspendieron quinientas células MDA-MB-231 en 3 ml de agar al 3,5 % (p/vol) que contenía medio DMEM/F12 sin rojo fenol más suero de ternero fetal sin E2 al 10 %. Después, las células se superpusieron sobre un agar al 0,7 % (p/vol) que contenía medio DMEM/F12 sin rojo fenol más suero de ternero fetal sin E2 al 10 % en cinco copias de discos de 60 mm. Las células sobre agar blando se cubrieron con medio más suero de ternero fetal sin E2 al 10 % con o sin E2 $\beta$  1 nM, o combinado con tamoxifeno 1 nM. Después de tres semanas, las colonias se puntuaron usando un microscopio invertido. Como se observa en la Figura 18, se observó que el tratamiento con E2 promovió fuertemente el crecimiento independiente de anclaje de células MDA-MB-231 negativas al RE- $\alpha$ 66 en agar blando, mientras que el antiestrógeno tamoxifeno inhibió el efecto de E2 $\beta$ , lo que indica que las células MDA-MB-231 negativas al RE- $\alpha$ 66 conservan sensibilidad a la señalización estrogénica presumiblemente a través del RE- $\alpha$ 36.

20 Ejemplo 5

E2 $\beta$  induce la señalización estrogénica iniciada en membrana en células MDA-MB-231 negativas al RE- $\alpha$ 66.

25 Para determinar si E2 $\beta$  induce la señalización estrogénica iniciada en membrana en células MDA-MB-231 negativas al RE- $\alpha$ 66, células MDA-MB-231 privadas de suero se trataron con E2 $\beta$  1 nm durante distintos periodos de tiempo. Para el análisis de transferencia de Western, las células se alteraron con tampón RIPA, se sometieron a ebullición en tampón de carga con gel y se separaron en un gel de SPS-PAGE al 10 %. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore). El filtro se exploró con anticuerpo contra ERK1/2 (K-23) (Santa Cruz Biotechnology) o anticuerpo usado contra la forma fosforilada de ERK1/2 (Cell Signaling Technology). Como se observa en la Fig. 19, el tratamiento de células MDA-MB-231 con estradiol-17 $\beta$  (E2 $\beta$ ) induce una rápida fosforilación de ERK1/2. Estos datos sugieren contundentemente que el E2 $\beta$  estimula la activación de la ruta MAPK en células MDA-MB-231 negativas al RE- $\alpha$ 66.

30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 1, o a un fragmento inmunogénico de la SEC ID N°: 1 que comprende al menos siete aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 1.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 15 5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo está unido covalentemente a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico y un marcador detectable.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el compuesto es un agente quimioterapéutico.
7. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el compuesto es un marcador detectable.
- 20 8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que el marcador detectable es un marcador fluorescente.
9. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une específicamente a una secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N°: 1.
- 25 10. Una composición que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1.
11. La composición de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 12. Un método para preparar un anticuerpo que comprende administrar a un animal no humano un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 1, o un fragmento inmunogénico que comprende al menos siete aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 1, y aislar el anticuerpo del animal, en donde el anticuerpo aislado se une específicamente a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 1.
- 35 13. El método de la reivindicación 12, en el que el polipéptido o el fragmento inmunogénico que comprende al menos siete aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 1 está unido covalentemente a un polipéptido vehículo.
- 40 14. El método de la reivindicación 12, en el que el aislamiento comprende obtener del animal una célula que produce el anticuerpo, comprendiendo adicionalmente el método preparar un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales usando la célula.
- 45 15. Un anticuerpo policlonal aislado mediante un método de la reivindicación 12.
16. Un anticuerpo monoclonal aislado mediante un método de la reivindicación 14.
- 50 17. Una célula aislada que comprende una región codificante exógena, en la que la región codificante codifica un primer polipéptido que comprende la SEC ID N°: 20 o un segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95 % con la SEC ID N°: 20, en la que el segundo polipéptido se une a estrógeno o a tamoxifeno, a 4-OH-tamoxifeno o a ICI-182, 780.
- 55 18. Una célula aislada que expresa un polipéptido exógeno a partir de una región codificante, en la que el polipéptido exógeno comprende:  
la SEC ID N°: 20, o  
una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95 % con la SEC ID N°: 20 que se une a estrógeno o a tamoxifeno, a 4-OH-tamoxifeno o a ICI-182, 780.
- 60 19. La célula aislada de la reivindicación 18, en la que la región codificante está unida operativamente a un promotor constitutivo.
20. La célula aislada de las reivindicaciones 17 o 18, en donde la célula es una célula eucariota.
21. La célula aislada de las reivindicaciones 17 o 18, en donde la célula es una célula procariota.
- 65 22. Un método para identificar un agente que se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 20, comprendiendo el método:

combinar *ex vivo* un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 1 y un agente en un ensayo de unión competitiva;

detectar la formación de un complejo entre el agente y el polipéptido; y

determinar la capacidad del agente para unirse preferentemente a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 1.

23. El método de la reivindicación 22, que comprende adicionalmente determinar si el agente se une a un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 18.

24. El método de la reivindicación 22, que comprende adicionalmente determinar si el agente inhibe la actividad RE- $\alpha$ 36 del polipéptido, en el que la actividad de RE- $\alpha$ 36 comprende unión a estrógeno, unión a tamoxifeno, a 4-OH-tamoxifeno o a ICI-182, 780, aumentando la fosforilación de ERK 1/2, o aumentando la fosforilación de Mek 1/2.

25. Un método para detectar *ex vivo* un polipéptido que comprende:

determinar si una célula expresa un polipéptido que tiene un peso molecular de 36 kDa, medido después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS) y que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 20 o una secuencia con una identidad del 95 % con la misma.

26. Un método para detectar *ex vivo* un polipéptido que comprende:

determinar si una célula expresa un polipéptido que tiene un peso molecular de 36 kDa, medido después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS) y que comprende la secuencia de aminoácidos 13-27 de la SEC ID N°: 1.

27. El método de las reivindicaciones 25 o 26, en el que la célula es una célula tumoral.

28. El método de la reivindicación 27, en el que el tumor es un tumor mamario.

29. El método de la reivindicación 25, en el que la determinación de si la célula expresa el polipéptido comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo que se une específicamente a una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N°: 1, o a un fragmento inmunogénico que comprende al menos siete aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 1.

30. El método de la reivindicación 29, en el que el anticuerpo está unido covalentemente a un marcador detectable.

31. El método de la reivindicación 30, en el que el marcador detectable es un marcador fluorescente.

32. El método de la reivindicación 25 en el que la determinación de si la célula expresa el polipéptido comprende amplificar un polinucleótido de ARNm para formar polinucleótidos amplificados, en el que la amplificación comprende poner en contacto los polinucleótidos obtenidos de la célula con un par de cebadores que amplificarán un polinucleótido de ARNm que comprende la SEC ID N°: 22 o la SEC ID N°: 25, o la combinación de las mismas, en donde la presencia de polinucleótidos amplificados indica que la célula expresa el polipéptido.

33. El método de la reivindicación 32, en el que un cebador del par de cebadores se selecciona de nucleótidos de la SEC ID N°: 22, nucleótidos complementarios a nucleótidos de la SEC ID N°: 25, o la combinación de los mismos, y en el que cada cebador tiene al menos 15 nucleótidos.

34. Un método *ex vivo* para inhibir la fosforilación de ERK 1/2 o de Mek 1/2 en una célula, comprendiendo el método:

poner en contacto una célula que expresa un polipéptido que tiene un peso molecular de 36 kDa, medido después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS), se une a estrógeno, y comprende una secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N°: 1, con el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9 en una cantidad eficaz para inhibir la unión entre el estrógeno y la SEC ID N°: 20.

35. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer relacionado con estrógenos en un sujeto en donde el anticuerpo inhibe la unión entre el estrógeno y la SEC ID N°: 20 en una célula que expresa un polipéptido que tiene un peso molecular de 36 kDa, medido después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS), se une a estrógeno y comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N°: 1.

36. Un compuesto para su uso en el tratamiento de un cáncer relacionado con estrógenos en un sujeto, en donde el compuesto comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, inhibe la unión entre el estrógeno y la SEC ID N°: 20 en una célula que expresa un polipéptido que tiene un peso molecular de 36 kDa, medido

después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS), se une a estrógeno y comprende la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N°: 1.

- 5 37. Un polipéptido aislado que consta de la secuencia de aminoácidos representada por los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N°: 1, o los aminoácidos 13-27 de la SEC ID N°: 1 modificados por sustitución o delección de uno o más aminoácidos contiguos o no contiguos siempre que el polipéptido modificado sea capaz de estimular la producción de anticuerpos que se unan a los restos 13-27 de la SEC ID N°: 1.
- 10 38. Un polipéptido aislado que consta de los aminoácidos 1-27 de la SEC ID N°: 1, o los aminoácidos 1-27 de la SEC ID N°: 1 modificados por sustitución o delección de uno o más aminoácidos contiguos o no contiguos siempre que el polipéptido modificado sea capaz de estimular la producción de anticuerpos que se unan a los restos 1-27 de la SEC ID N°: 1.
- 15 39. Un fragmento inmunogénico de la SEC ID N°: 1 que comprende al menos siete aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 1.
40. Un kit que comprende un anticuerpo aislado de la reivindicación 1 y material de envasado.
- 20 41. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en medicina.
42. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 en la fabricación de un agente de diagnóstico para su uso en diagnósticos para diferenciar cáncer positivo a estrógenos y negativo a estrógenos.
- 25 43. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en diagnósticos para diferenciar cáncer positivo a estrógenos y negativo a estrógenos.
44. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es un fragmento de anticuerpo.
- 30 45. Un polipéptido que comprende:  
 el polipéptido aislado de las reivindicaciones 37 o 38; y  
 un polipéptido vehículo unido covalentemente.
- 35 46. Una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 37, 38 o 44.
47. El uso de la reivindicación 35 en donde el cáncer comprende cáncer de mama.
48. El compuesto para el uso de la reivindicación 36 en donde el cáncer comprende cáncer de mama.
- 40 49. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 en la fabricación de un agente de diagnóstico para diagnosticar en un sujeto cáncer positivo a estrógenos o negativo a estrógenos detectando un polipéptido que tiene un peso molecular de 36 kDa, medido después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS) y que se une a estrógeno o a tamoxifeno, a 4-OH-tamoxifeno o a ICI-182, 780.
- 45 50. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como agente de diagnóstico para diagnosticar en un sujeto un cáncer positivo a estrógenos o negativo a estrógenos, detectando un polipéptido que tiene un peso molecular de 36 kDa, medido después de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS) y que se une a estrógeno o a tamoxifeno, a 4-OH-tamoxifeno o a ICI-182, 780.
- 50

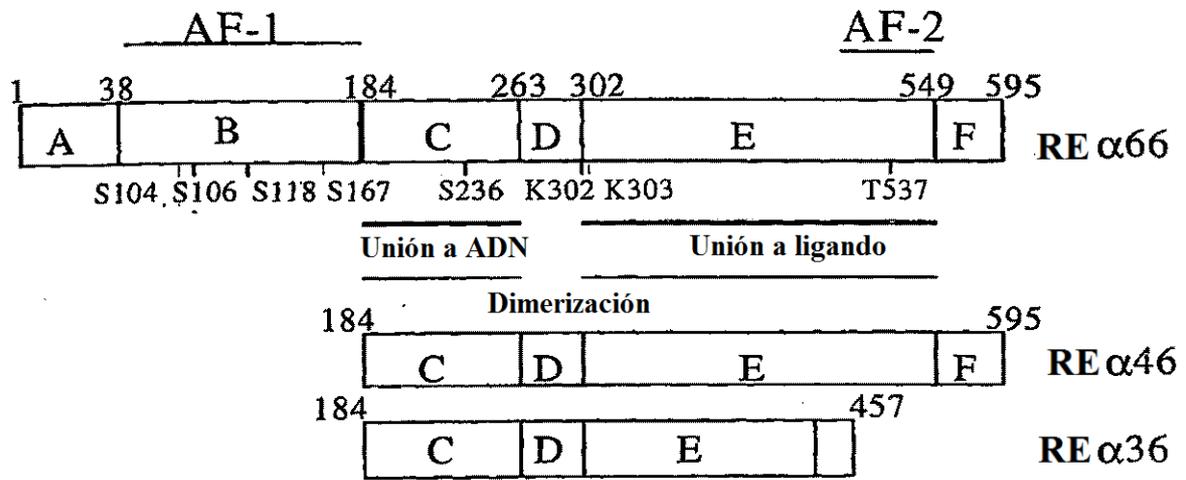


Fig. 1

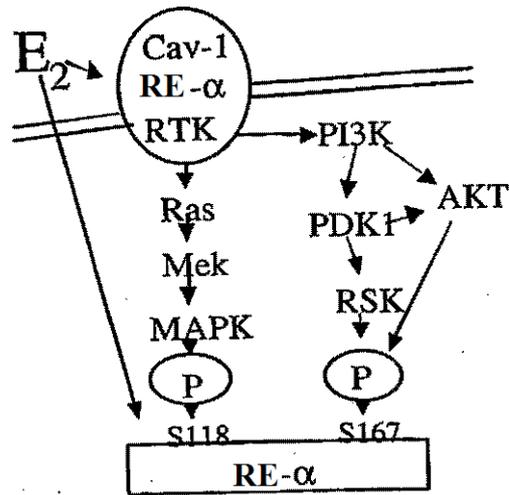


Fig. 2

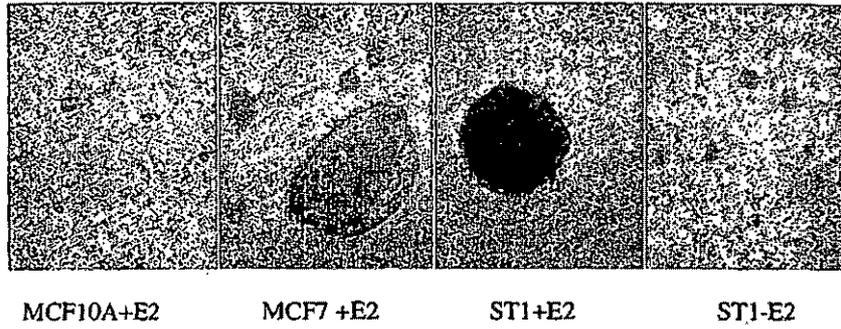


Fig. 3

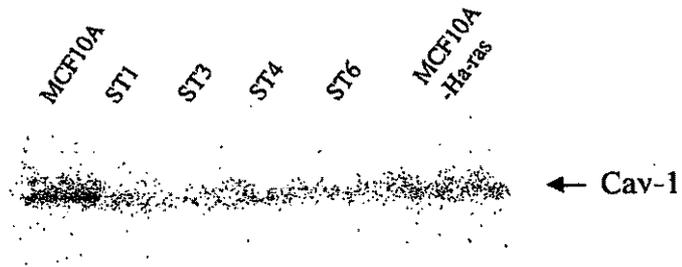


Fig. 4

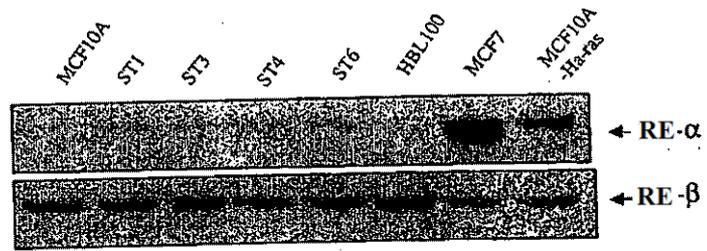


Fig. 5

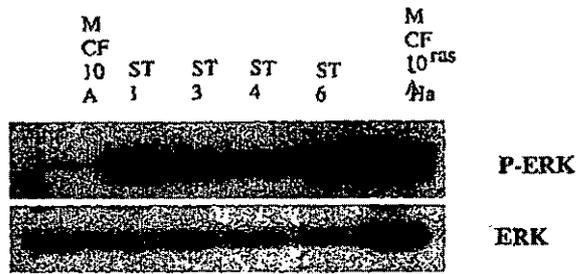


Fig. 6

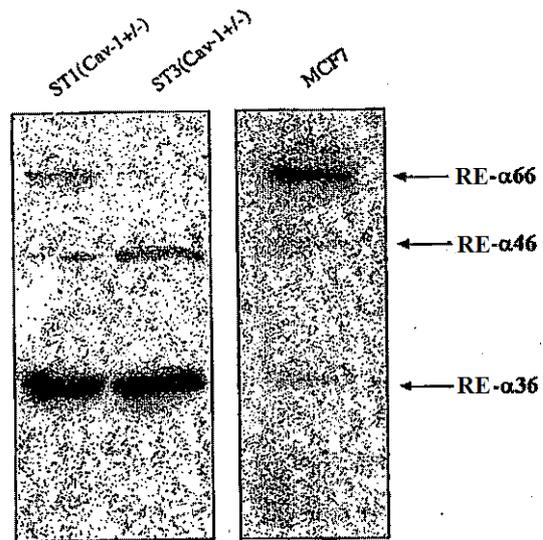


Fig. 7

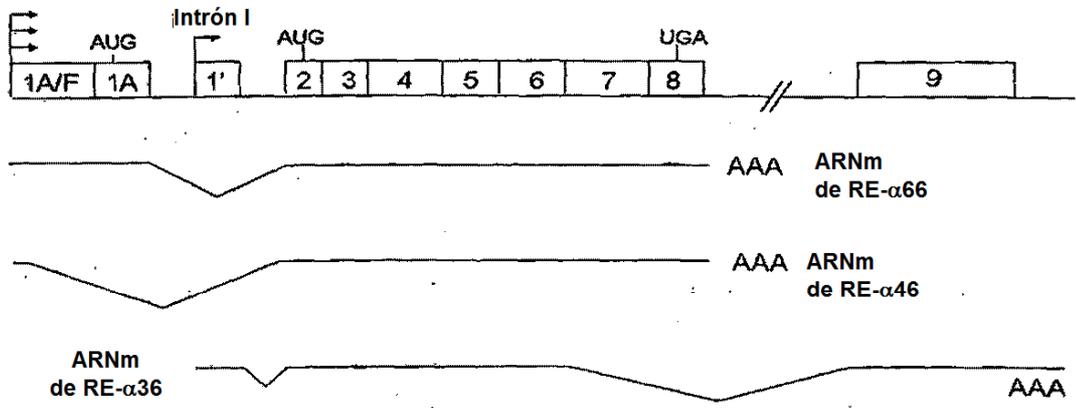


Fig. 8

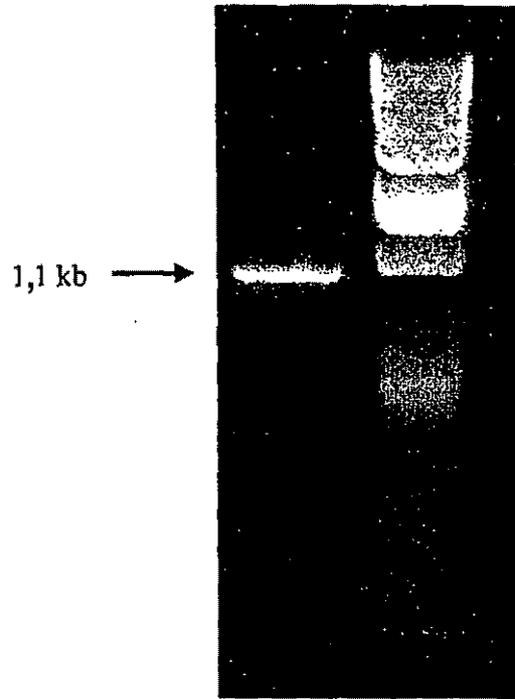


Fig. 9

1 MAMESAKETRYCAVCNDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMC PATNQCTIDKNR  
61 RKSCQACRLRKCYEVGMMKGGIRKDRRGGMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMRAANLW  
121 PSPLMIKRSKNSLALS LTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTTRPFSEASMMGLLTLNLADRE  
181 LVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLLDRN  
241 QGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLKSILLNSGISHVEAKKRILNLHPK  
301 IFGNKWFP RV

Figura 10

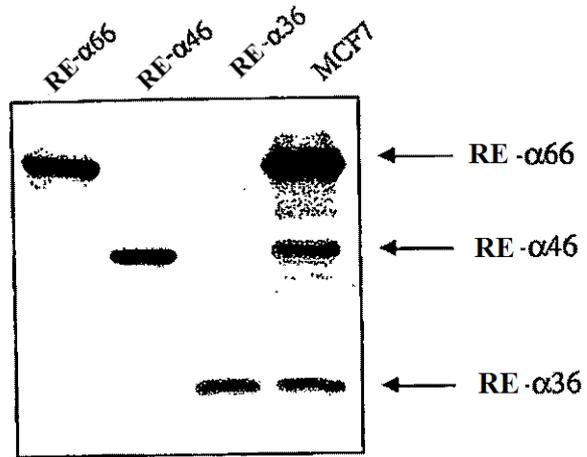


Fig. 11

GGTACCCGCGCCCGCGCCGCCCCTCGGGGTGGCCGCGCCGCCCCGGCAGGAGGGAGGGAGGG  
 Sp1 AP-2 Krox-20 Sp1  
AGGGAGGGAGAAGGGAGAGCCTAGGGAGCTGCGGGAGCCGCGGGACGCGCGACCCGAGGGT  
 Sp1 Sp1 Ahr  
GCGCGCAGGGAGCCCCGGGGCGCGGCCAGCCCCGGGGTTCTGCGTGCAGCCCCGCGCTGC  
 WT1  
GTTCAGAGTCAAGTTCTCTCGCCGGGCAGCTGAAAAAACGTACTCTCCACCCACTTACCGTCCG  
 YY1 c-Fos  
TGCGAGAGGCAGACCCGAAAGCCCGGGCTTCCTAACAAAACACACGTTGGAAAACCAGACAAAG  
 NF-kappaB  
CAGCAGTTATTTGTGGGGGAAAACACCTCCAGGCAAATAAACACGGGGCGCTTGAGTCACTTG  
 GR NF-kappaB GATA-1 AP-1 c-Jun AP-1 ER c-Fos  
GGAAGGTCTCGCTCTTGGCATTAAAGTTGGGGGTGTTTGAGTTAGCAGAGCTCAGCAGAGTTT  
 NF-kappa  
TATTTATCCCTTTTAATGTTTTGTTAATGTGCTCCCCAAATTTCTTTCATCTAGACTATTTGATTG  
 TBP  
GAAATATGTCAGCTATGATGATGACTTTCTGGGAAGCGATTCCCTGTCACCCGCTTTCCCCTCCTC  
CCCACCCACGTCCTGGGGCTTTAGAGAGCGATTGGGAGTTGAATGGGTCTGATTTCCGAGTTA  
GCTGGCTGAGTCCGCGCTGGAGCGGATTGCTGGCATGTGACTTCTGACAGCCGGAAATTTGTAG  
 ADNc  
GTGTCCCGCAGTTTAAACAAGCCATATGGAAGCACAAAGTGCTTAAAAA

Fig. 12a

Figura 12b

ctggatctcacatgtagaagcaaagaagagaatccigaactgcatcctaaaatattggaaacaagtggttccctgt  
 gtctaaagcctctggtcatalaaggcctcacagatcctgcagatcatcaaatccgtgtgtggacgtggggacatttgttt  
 tgaggcagttacatgaccatgggcaagtggttctctctggccitcagtttctcatttgaatgattcaatgggtt  
 gccitaaagtgtcttaagaaggataggatagctaccacaaaacttggatcaaatitcttcaaacatccttccccga  
 cttaaaatgatccctggcaaccaactcaacaccctagctagatgagttataacagagtgactgaagagagctccca  
 caattcctagttatfaaacctgactaatttccattaggagacatttaagaactttagtatgggaagattacatata  
 taattgatagtacaatctgacagagctgaatagctcctgtttgcaactgttaaitctttgtcaattaggtcaaat  
 caagatcaaaacaagggtgccattgacctgttccctgagaaaaatggcaaacattgaatcataaatcatgacag  
 ccaaaaaatatttaggataatgacccccatcttggcaagtgaagaaaactgaaggccagagagactaattacttg  
 cccattttgataaaaatgacacattacagaatgtggactcctatgttggagtctgttgaaggacatggcacattaa  
 cagcatcagagcatttttataaaaatitagtcatgacttcaatgctgaagaacgccaagctaggaagaagta  
 tgggctgagatggggacagagagaacacacaatattcagtgactgtccgtgcagctggctgccctgaaaataccgaac  
 latccactgggaaaatgccctgtccccttgggtaattaccagagtttcaacatgcccaagctgccctatctcaggggg  
 aactgttctagcgttttagtatacaagaagctaatggtcccagggaagggttatttttaatttagctactgtgcta  
 aaaatcacctaagttctagagcttgggaaattcataagggaagaacaaggcaacttgttactaccactggta  
 tctcctctgttcttattacatacatggatgccagtttagattgtttatataaggaaaatfaaatgtgtgagcctct  
 taaggaaatcatcaatacagatatacagatagttctgtccagcaaaaaacgtgcttatttctacaagtaaatitaa  
 tttttttctcacttccctcactccttcaaatlccaggtaaatagctgccagggagtgttctctctgtcccaaaa  
 tacttagacaattgctgggataaggagaatggcaggggaggtagtggctaaaaacacaccttcaaaagaaagtgtgta  
 ggacacacaattgtgagaagtctgaatgccatgcacatagggtatgactcacttgaatattgttataatcaaggaaat  
 gaaaatgagtaatttctgtcatgcatattaaagccaatgagaagaacttcaatttatttggacttttggct  
 aacactggcaglatgaacagaitttttgcagaaacatctagattgtccgtgatctgatcctgcccttatgtgtctt  
 gtcttgaaccagtggttctggatatagggtcaggagacaagttccagaatcaagttaggaccagggtcttctt  
 tttccaaaccaaacattcttgcataactcctaaactacctgaggcagcctgtgttggcctcagcttcaaacallgitta  
 aaggcttctaccatcaatggccttcagcagagtggtacgggtaaacggggtagggtctggagtcagggggagacctgggt  
 tcaaatctacatcttaccctcaatccccagtgcttctataaattgggaatagccatgcatgggattctt  
 gtgagggttaaatgaggtaaaacacatacaatgcttagcatgtatacaaltaagcactaaataaltgaacacattagt  
 actaatgaatgtagcagccttactattatctgataatgatacaagggtgtgccgactatacccttaggggtt  
 gctggatcggccttctctcgggaaaacataactgatttataatagtgcttcaagcatgtataaatlctcaaac  
 tgcctgtcttgcctagaacaccagggaaggcctacctcaaatagcaacagagaacctatcggagcctaccctaca  
 gcttcttggggcacgggtgagcaatctgccttagaggggagaggctctgtgctgaggctcittgaatgcttgaataa  
 atagatcccagalaatgaaaagactcaaaacaaaltctacaagaaactgagtagtattatagtgaggccctagtgt  
 catgcaaaaaacccccactgcccttgccttaaatgtatctgattaacttgaatacatttfaalaggggcttttccc  
 tcttcagtggttggccagtcatttgcacttctcattcactttagtctctgtaagaagggtccagagacctaagg  
 tgeccaaggcaatttgcatttacaattcaagctttagaatgaagtcataatgtctacatccggactacagtgcaaa  
 ttattccttgccttgcgtggaaattggagtgaatcttctagctgtcaattcaactcagttgcagtagtgtttgaag  
 aattaatggcgataagggttagaaaatttaagcaaacgtagggaaaaagtagcactagaccatcataagcatttgcct  
 tgaagcatgcttcaaatgtgtttaaaccicaaataacagtcacaaataggttattatgaatgtatgcacagatttt  
 atgttctaatttaagaagttctaggagctcctgtaacgatttagggaatctctagattctgatatactgcaagct  
 ttaaatgtaggaatcacaattgaaltattttagggcccaggcctaaalttagtaggttgcaglacctattggcatc  
 aatcatatgtaggtttaaactgtatgaagatacagaatcaccacatcaaatcaattgaaatgtaacaggcta  
 gtataatataacatctgactttaaacaacaacaagaacaaatgagtaactcctcccctcaaacataatagtcagtt  
 ctccaactcagctcttctcctcaggaagaatgctatcaaaaattccattgcagactgctggaacaacalt  
 ctaaacatttatgcttctgcaataaccttccaatttgcctggaccagtgcaagattaacacagagatctcaagictc

aatgtaaaggaaacaccacgacagcctggactgtgggtgaagttcattctccccagcagactctgcctttcattctcggg  
gttgggtgtgccccaaacagaggtaccgacggtaacgaagccaagaatgttcaaccacaacctgtctgtgaaggtgttg  
gatgacglttgccattcaggtgaagattattatgttccagtcccacctgagtagcaaagtgaacactgtgctgaatgct  
cagaaagatgtaataaaccgtgctggacagagcagagctgaaaggcgccttgcgagtgtcgtagtgagaatgtggctgt  
cccagctgcaaagccctgttaggagcatgaggaagcacttgcctgccaagaacgatgccttcgacatttcaaaaga  
tctatgtggctgtctgaaacaatgcggagagcagatagacgcaatattgggaaccaaagagtactgctgttggcgttg  
catcataacataagcgttccccctctcgtcactatcattgtatcaaccaaagaactgalctctggatcctcgaag  
gaatgctgtggggatacttctatctctgttcattggtacatcagcaatttggggaaaagatggactatataacacaat  
gatctgcctaaaagaactgtctacttatagggggctgagcaaaccttagagcatctgcggatgctcgtcattatctt  
caaaagtcccaagagttttctccatactttattatgctattttgttaggctagaaaaaaaaaaaaactcataaaatt  
gtcttcaaaccaaaccaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 12b (parte 2)

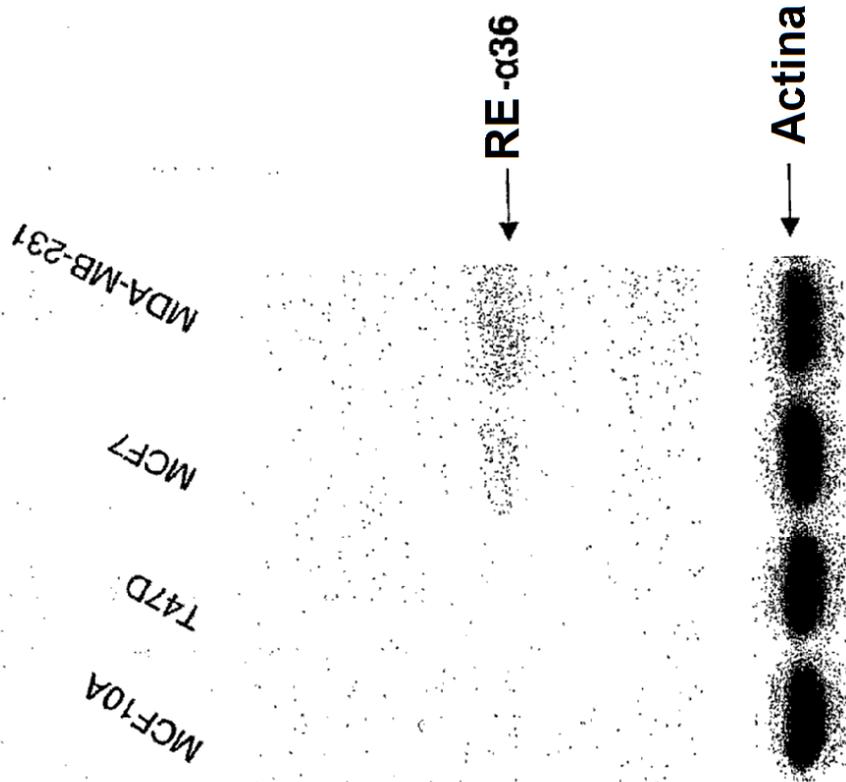


Figura 13

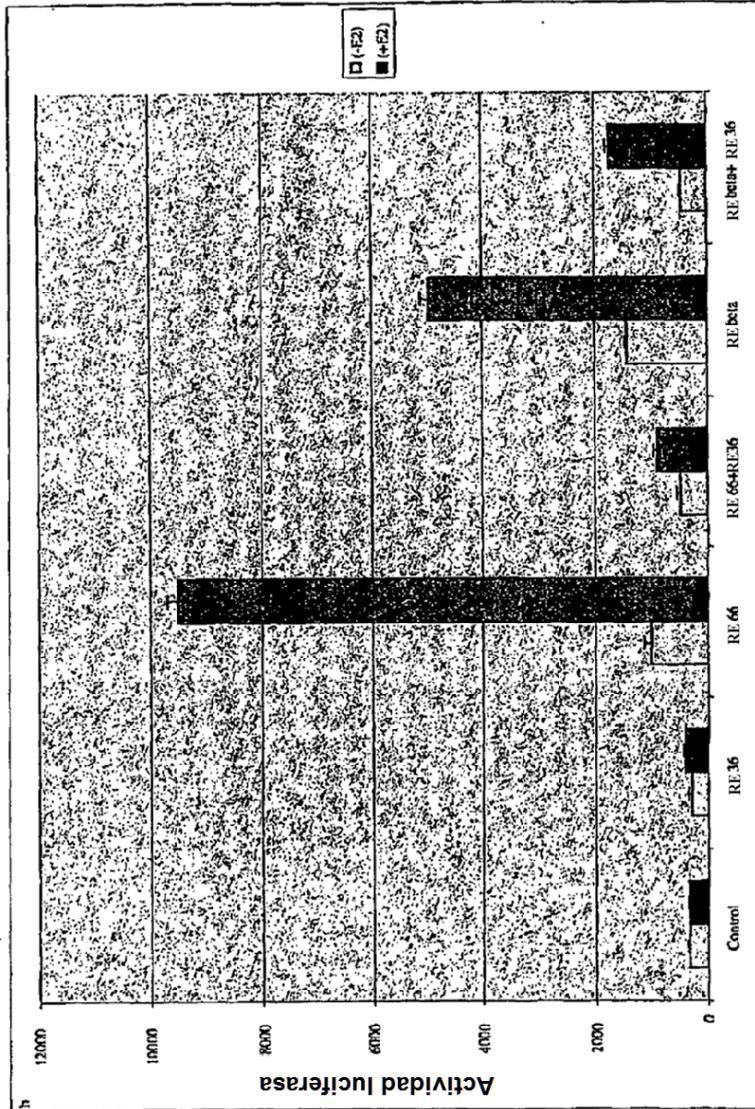


Figura 14

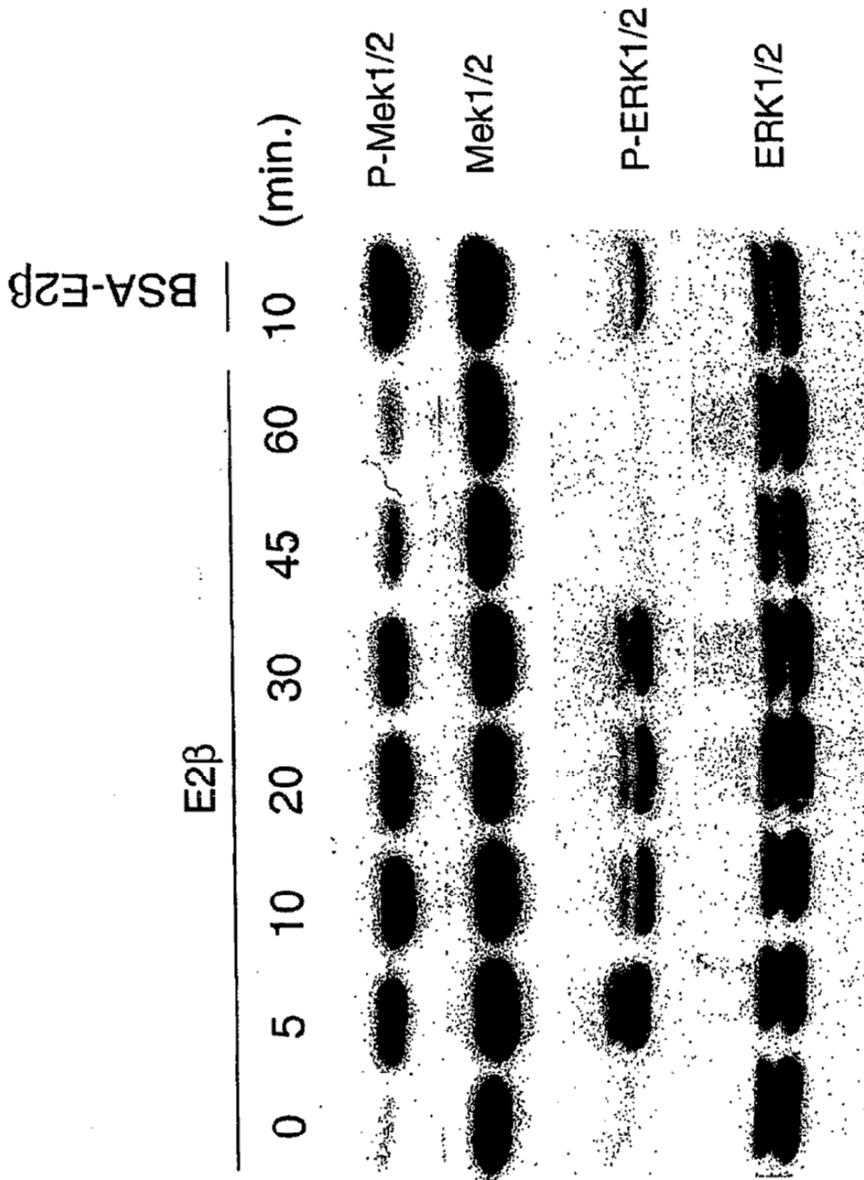


Figura 15a

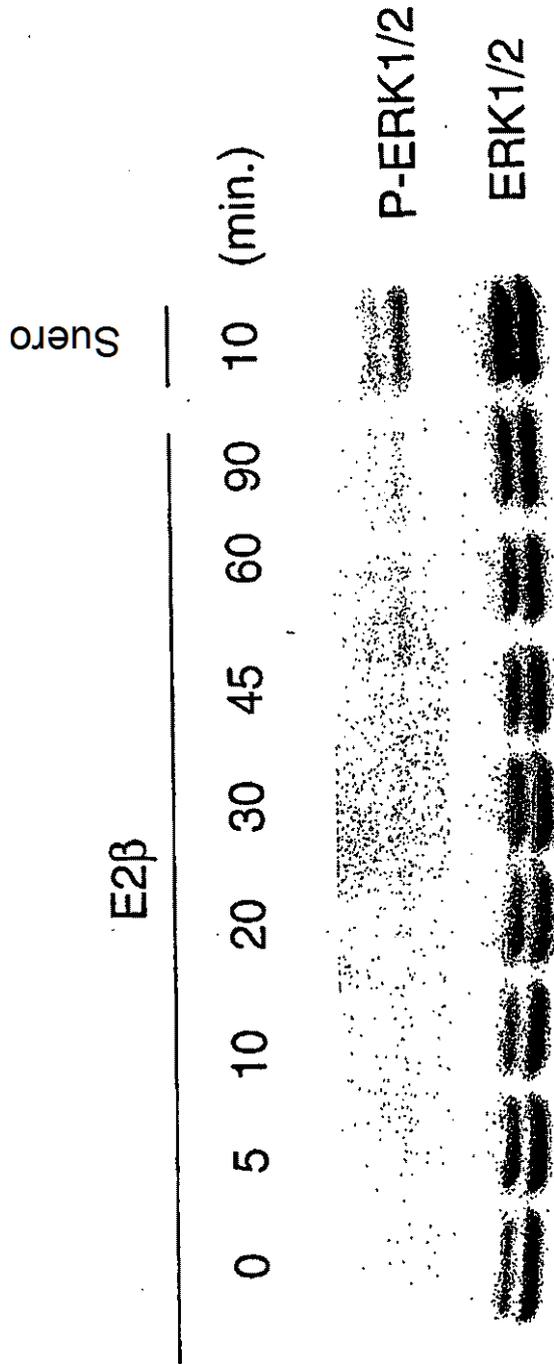


Figura 15b

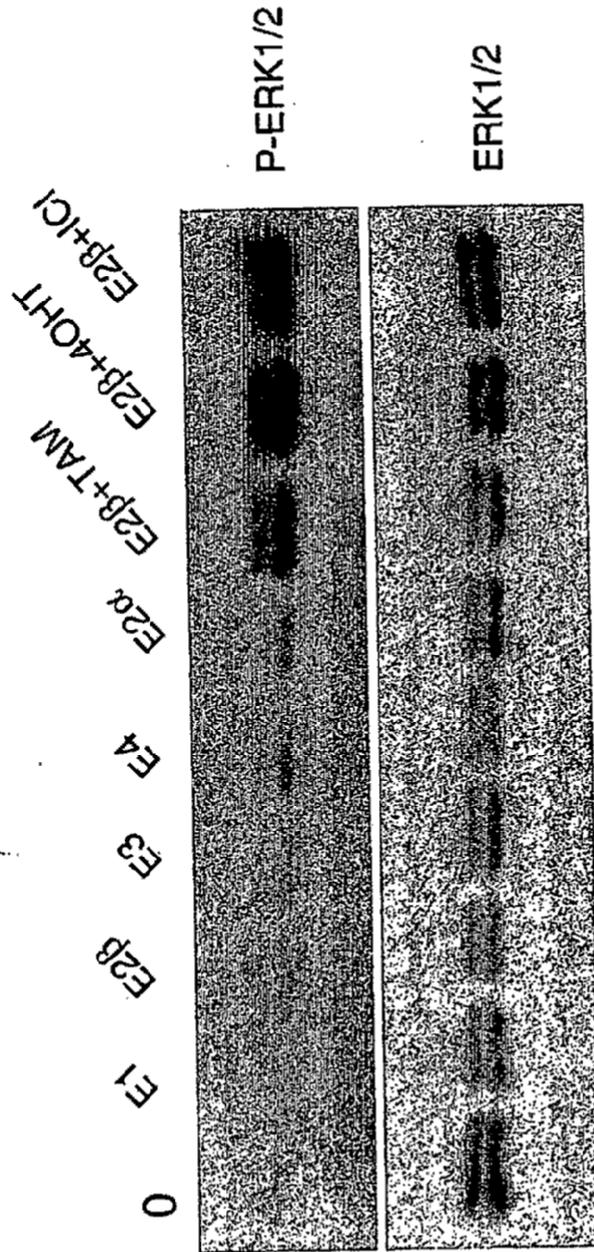


Figura 15c

36-293

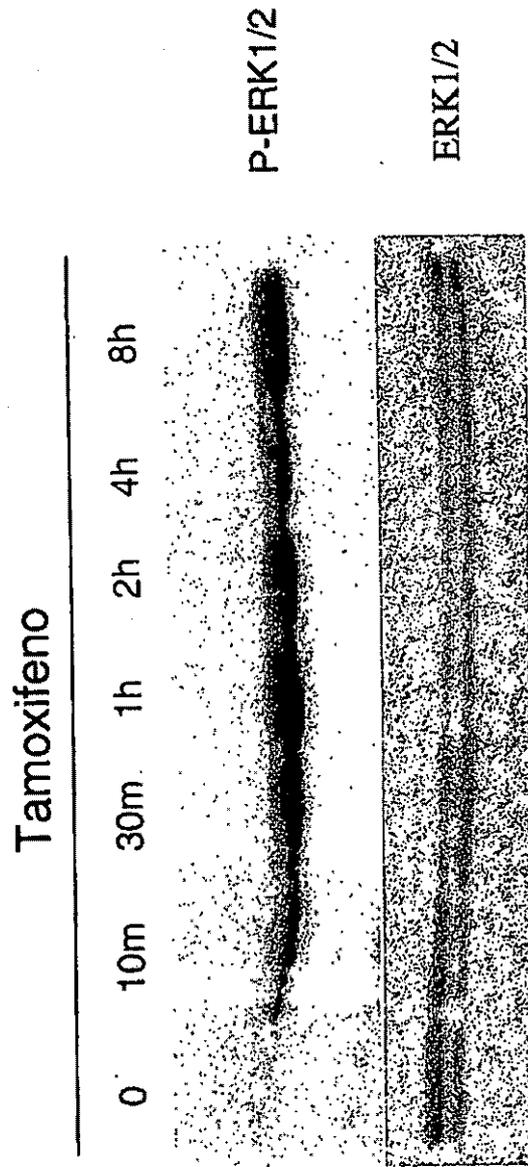
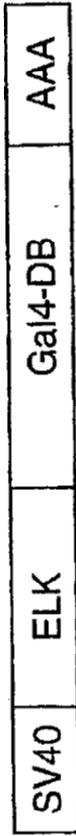


Figura 15d

Vector de expresión:



Plásmido indicador:

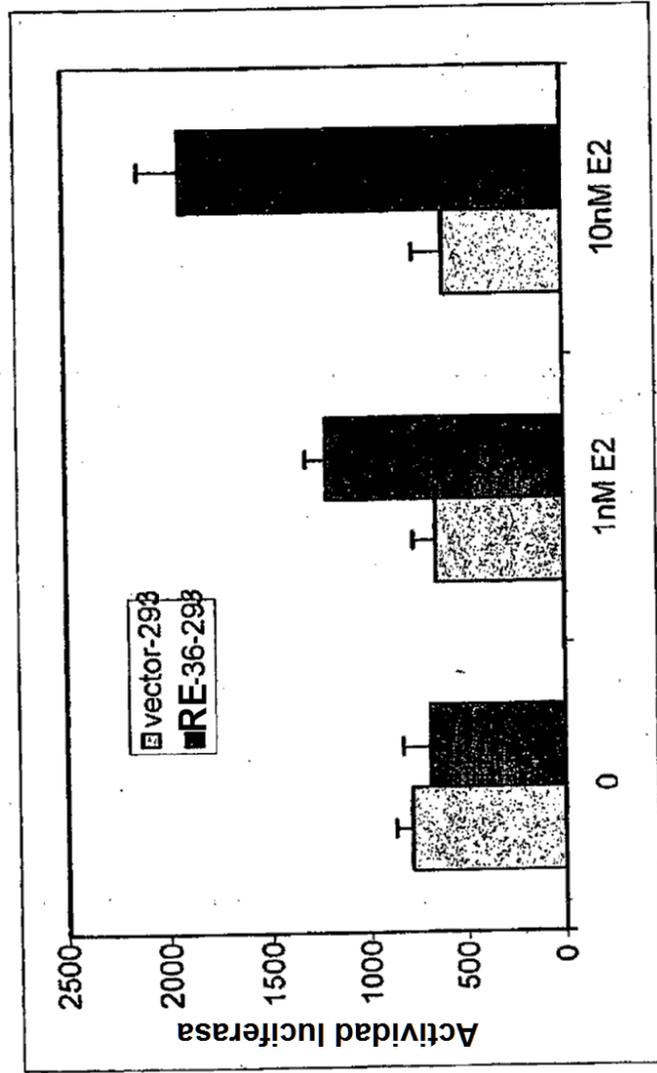


Figura 16a

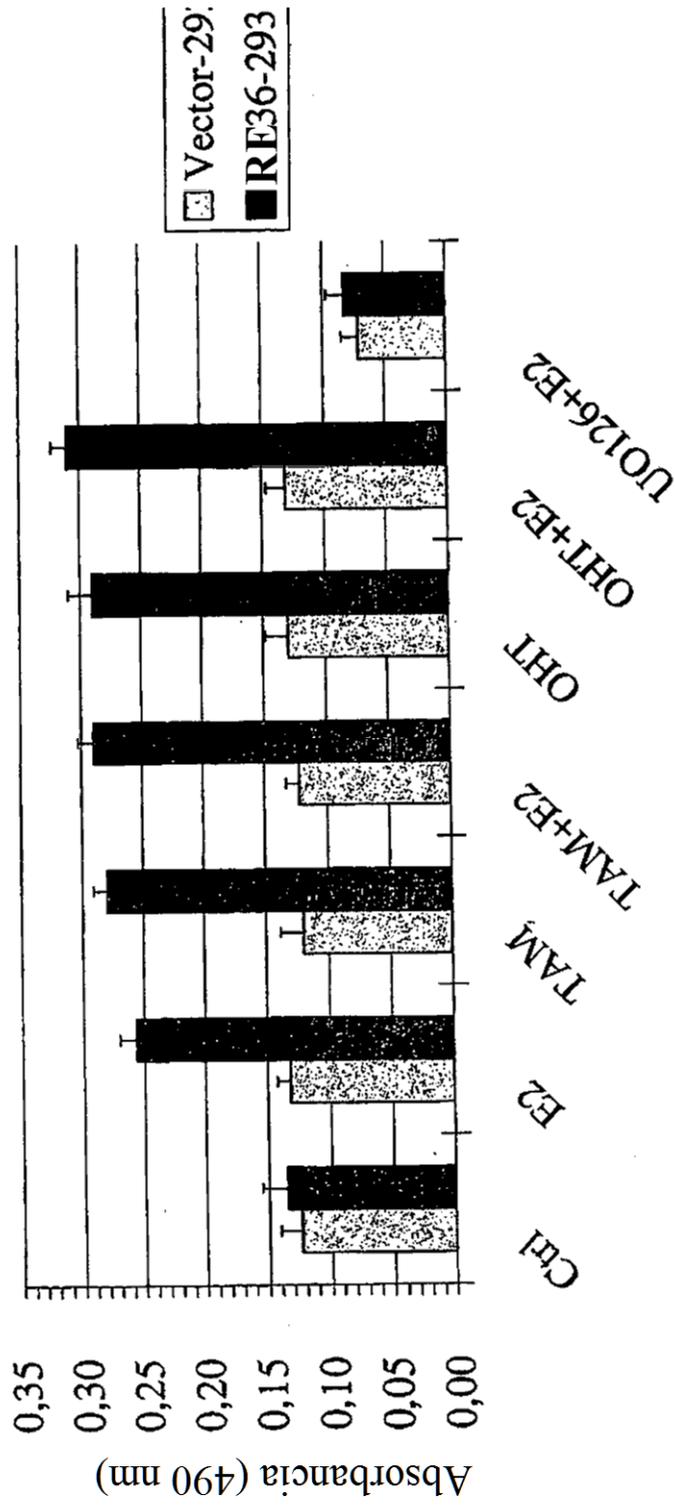


Figura 16b

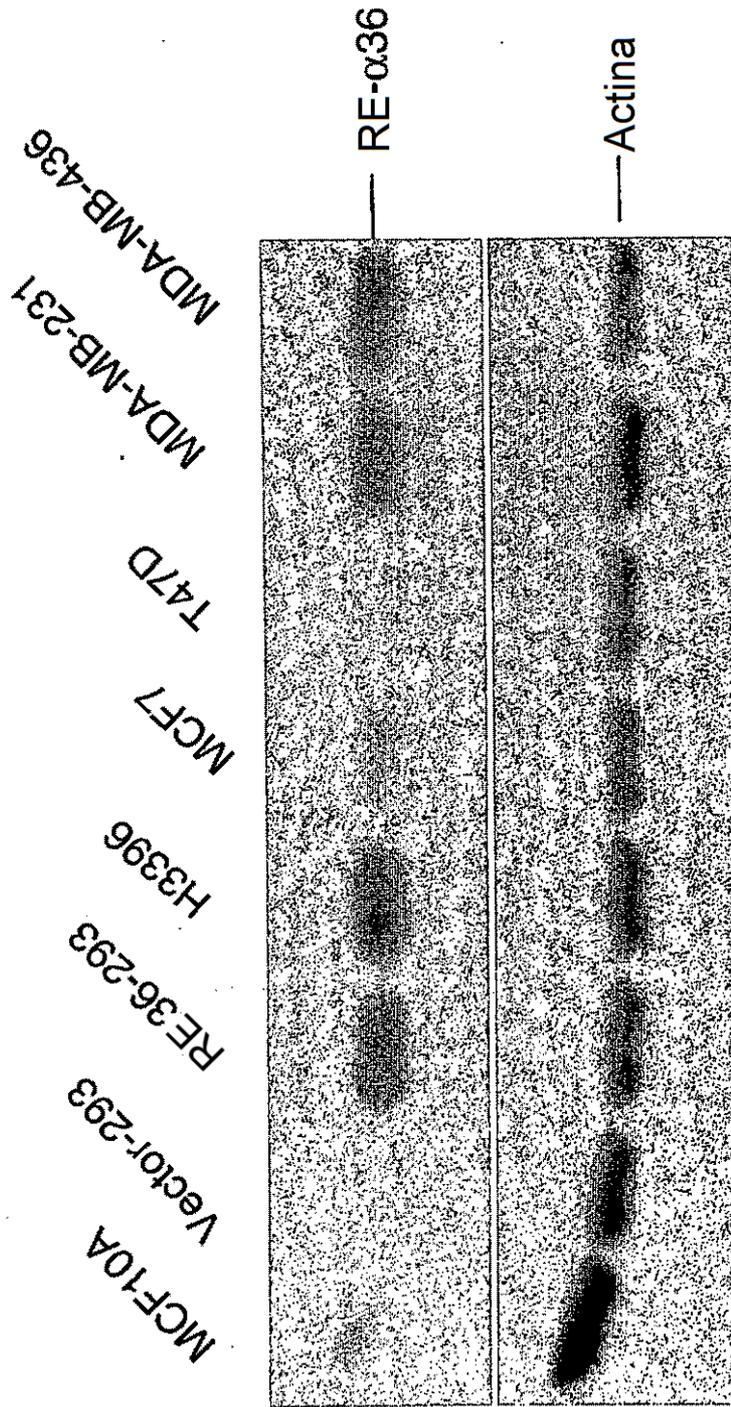


Figura 17a

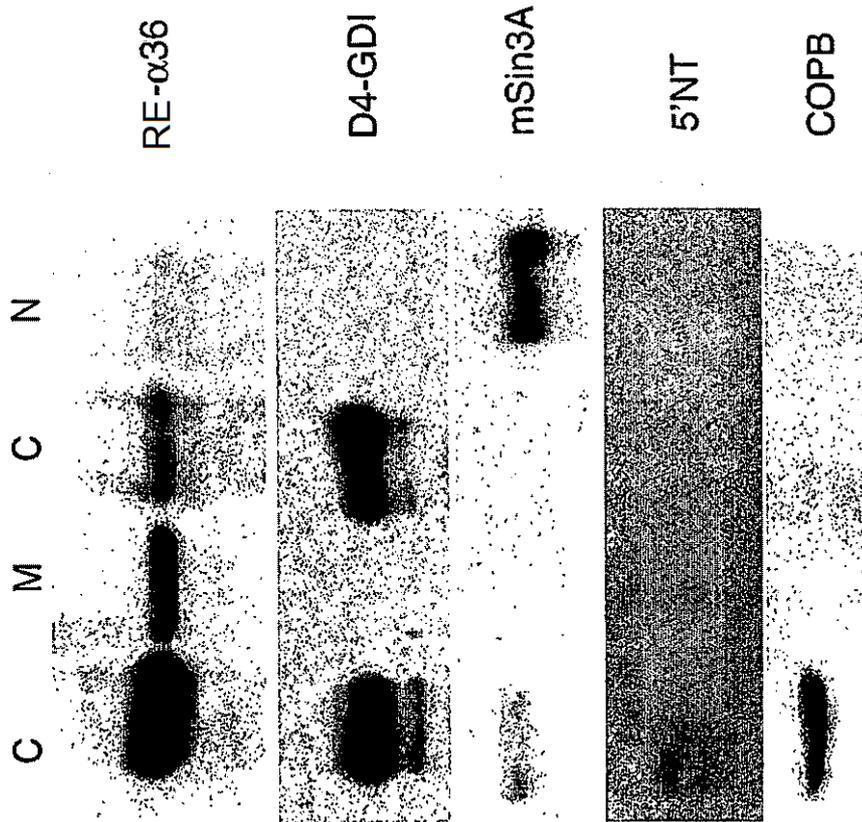


Figura 17b

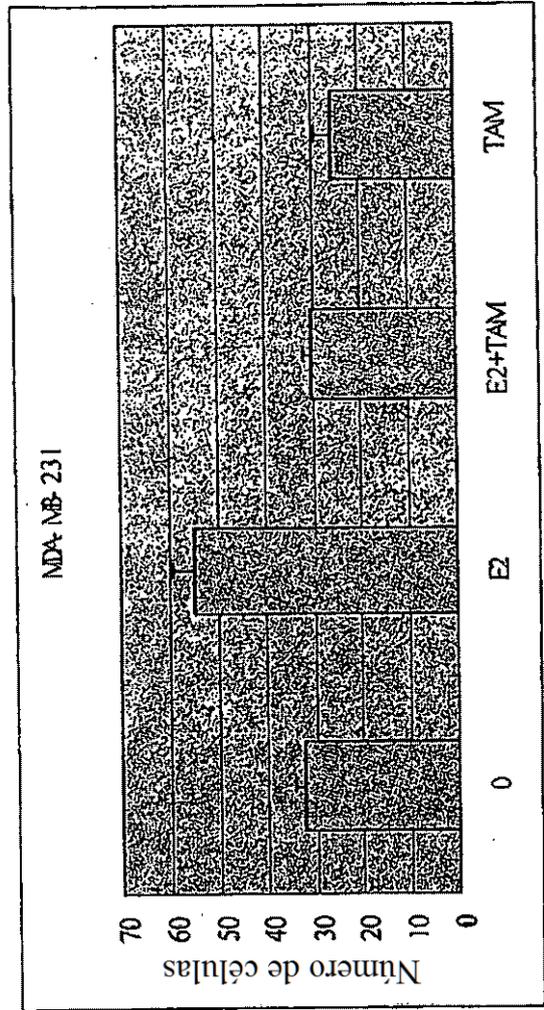


Figura 18

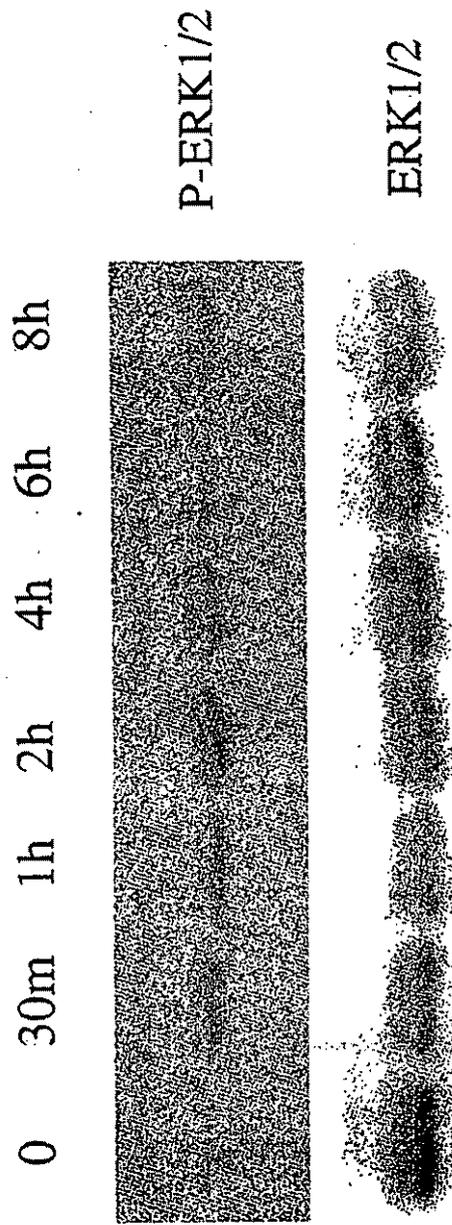


Figura 19.