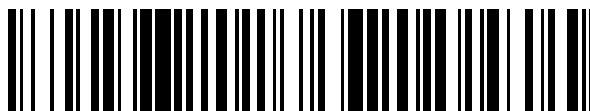


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 652**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11	(2006.01) C07K 14/635	(2006.01)
A61K 31/713	(2006.01) C12P 21/08	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)	
A61K 49/16	(2006.01)	
A61K 51/10	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
C07K 16/26	(2006.01)	
C12N 15/12	(2006.01)	
C12N 15/16	(2006.01)	
C12N 5/16	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2008** **E 08783388 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016** **EP 2190990**

54 Título: **PTHrP, sus isoformas y antagonistas de la misma en el diagnóstico y tratamiento de una enfermedad**

30 Prioridad:

17.08.2007 US 889969

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

08.07.2016

73 Titular/es:

**BIOCHROM PHARMA INC. (100.0%)
597 COTE ST-ANTOINE ROAD
WESTMOUNT, QC H3Y 2K5, CA**

72 Inventor/es:

**KREMER, RICHARD y
HUANG, DAO CHAO**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 576 652 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

PTHrP, sus isoformas y antagonistas de la misma en el diagnóstico y tratamiento de una enfermedad

5 0003 Campo de la invención

[0001] 0004 La presente invención se refiere a la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), isoformas de la misma y los antagonistas de la misma en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, en particular el cáncer.

10 0005 Antecedentes de la invención

[0002] 0006 Se sabe que los tumores surgen a partir de células normales a través de una serie de transformaciones graduales. La activación de moléculas de señalización y, en particular, las vías relacionadas con el factor de crecimiento podría conducir a la transformación maligna de las células normales. La mortalidad por cáncer puede estar relacionada con la capacidad de los tumores para sufrir una diseminación metastásica. La diseminación de los tumores desde el sitio original y la capacidad de los mismos para alojarse en tejidos específicos probablemente implica múltiples pasos a medida que los tumores progresan de una manera no invasiva a un estado invasivo.

[0003] 0007 La PTHrP fue identificada inicialmente como un mediador de la hipercalcemia asociada a malignidad debido a la fuerte homología de secuencia de la PTHrP en su extremo amino o N-terminal con el extremo amino terminal de la hormona paratiroidea (PTH). Se ha demostrado que la mayoría de los pacientes con cáncer avanzado e hipercalcemia tienen niveles circulantes elevados de PTHrP con o sin metástasis óseas osteolíticas asociadas.

[0004] 0008 La PTHrP está asociada con la gran mayoría de los tumores malignos en el contexto de la hipercalcemia incluyendo cáncer de mama, colon, piel, renal y pulmonar, así como tumores malignos hematológicos, tales como linfomas, leucemias y mielomas múltiples. Aún más significativo, en la ausencia de hipercalcemia y de elevación de los niveles circulantes de PTHrP, la expresión de PTHrP en estos tejidos tumorales se ha demostrado que es elevada. Además, varios estudios indican que la PTHrP puede ser un indicador de pronóstico en pacientes con cáncer y se correlaciona con el proceso metastásico en varios tipos de cáncer incluyendo cáncer de mama, de próstata y cáncer de colon. Varios estudios sugieren que la PTHrP estimula la invasión *in vitro* y las metástasis óseas *in vivo*. El mecanismo subyacente a la estimulación por la PTHrP de las metástasis óseas se cree que es indirecto mediante la activación de la resorción ósea osteoclástica y la liberación de factores de crecimiento locales dentro del microambiente óseo, lo que a su vez estimula el crecimiento de las células tumorales dentro del hueso. El objetivo principal para el tratamiento de las metástasis óseas en pacientes utiliza actualmente los agentes que reducen la actividad osteoclástica, tales como la clase de agentes conocidos como bisfosfonatos. Por lo tanto, la inhibición de la PTHrP se ha identificado como una diana potencial para inhibir la actividad osteoclástica en el hueso mediante la reducción de la producción de PTHrP de células tumorales dentro del hueso. Los anticuerpos monoclonales ("Acn") dirigidos al extremo N-terminal de la PTHrP se han utilizado con éxito en la reducción de las metástasis óseas osteolíticas en ratones desnudos trasplantados con la línea celular humana MDAMB231. Se han generado anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos al extremo N-terminal de la PTHrP y se ha demostrado que son eficaces en modelos de hipercalcemia y metástasis ósea en ratones desnudos. Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos en pacientes con metástasis ósea osteolítica con anticuerpos monoclonales humanizados anti-PTHrP dirigidos al extremo N-terminal.

[0005] 0009 Además de su efecto indirecto en el proceso metastásico óseo, varios estudios sugieren que la PTHrP puede afectar directamente al crecimiento y las capacidades invasivas de las células tumorales. La mayoría de estos estudios se realizaron *in vitro* y tienden a indicar que la PTHrP estimula la invasión y la migración en diferentes líneas celulares incluyendo las de cáncer de mama, de próstata y melanoma. Los datos *in vivo*, aparte de los estudios sobre metástasis óseas, son muy limitadas. Un estudio indica que la PTHrP puede ser responsable del crecimiento de los cánceres renales y que el crecimiento y la metástasis tal vez se reduce por la administración de un anticuerpo dirigido al extremo N-terminal de la PTHrP en ratones desnudos trasplantados con una línea celular de cáncer renal humano.

[0006] 0010 Debido a que la actividad similar a la PTH de la PTHrP parece estar dentro de la porción N-terminal de la molécula, los estudios han utilizado fragmentos N-terminales para los estudios *in vitro* e *in vivo*, en particular para los estudios del receptor de la PTH/PTHrP tipo 1 que puede ser activado tanto por PTH como por PTHrP 1-34. Este receptor cuenta con 7 dominios transmembrana ligados a proteínas G y pertenece a los receptores acoplados a la proteína G (GPCR). La unión al ligando tiene como resultado la activación tanto de la adenilato ciclasa (vía AMPc) como de la fosfolipasa C (PLC). Se ha clonado otro receptor de PTH (Tipo-2) que se activa mediante un ligando diferente llamado TIP y que se encuentra principalmente en el sistema nervioso central, mientras que el receptor de la PTHrP Tipo-1 se expresa de forma ubicua en la mayoría de los tejidos. Además, tanto el receptor de la PTHrP Tipo-1 como de la PTHrP se expresan simultáneamente en la mayoría de los carcinomas de mama y esta co-expresión predice una supervivencia desfavorable.

[0007] 0011 La estructura del gen de la PTHrP humana es mucho más complejo que el de la PTH que abarca más de veinte (20) kilobases (kb) de ADN genómico y el corte y empalme alternativo del ARNm del mismo da lugar a tres isoformas de ciento treinta y nueve aminoácidos (139), ciento cuarenta y un aminoácidos (141) y ciento setenta y tres aminoácidos (173). Hay una fuerte homología de secuencia entre especies, pero no se ha descrito el corte y empalme alternativo en especies inferiores, excepto para el gen canino. Los genes de ratón, rata, conejo, bovino y de pollo sólo podrán dar lugar a la isoforma compuesta de ciento treinta y nueve (139) aminoácidos. Existe una considerable divergencia entre especies en el extremo C-terminal de la PTHrP más allá de aminoácido 111. La forma larga, PTHrP1-173 puede ser única para los seres humanos, pero su función es actualmente desconocida, aunque se ha sugerido que desempeña un papel en el crecimiento del cartílago. Los anticuerpos dirigidos al extremo N-terminal de la PTHrP generalmente reconocen todas las isoformas de PTHrP.

[0008] 0012 Sin embargo, a pesar de los muchos años de investigación en este área, queda por definir el papel de la PTHrP y, en particular, de sus isoformas en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, en particular el cáncer, metástasis tumoral, metástasis ósea osteolítica e hipercalcemia.

0013 Sumario de la invención

[0009] 0016 La presente invención se refiere a anticuerpos dirigidos a una porción C-terminal de la PTHrP que consiste en los residuos de aminoácidos 151 a 169 de la PTHrP1-173. Un aspecto no de acuerdo con la presente invención son los anticuerpos dirigidos contra una porción C-terminal de la PTHrP, preferiblemente los restos de aminoácidos 140 a 173, utilizados en combinación con anticuerpos dirigidos a una porción N-terminal de la PTHrP, preferiblemente los residuos de aminoácidos 1 a 33, para desarrollar inmunoensayos específicos para la detección de una o más isoformas, isoformas específicas o fragmentos de PTHrP, incluyendo, pero sin limitarse a, ensayos de sándwich como IRMA, ELISA y ensayos de quimioluminiscencia. Los inmunoensayos se pueden utilizar para detectar específicamente una o más isoformas o isoformas específicas, específicamente PTHrP1-173, o sus fragmentos antes y después del tratamiento. Los inmunoensayos también se pueden utilizar como indicadores pronósticos en una variedad de cánceres que expresan una o más isoformas, isoformas específicas, específicamente la isoforma PTHrP1-173, o fragmentos de la misma

[0010] 0017 Otra realización de la presente invención es determinar qué tumores expresan una o más isoformas, específicamente la isoforma PTHrP1-173 o fragmentos de la misma con el fin de mejorar el tratamiento.

[0011] 0018 La presente invención divulga la transformación de células inmortalizadas en células tumorigénicas usando una o más isoformas de la PTHrP, específicamente la isoforma 1-173, el efecto de una o más isoformas de la PTHrP, específicamente la isoforma 1-173, sobre el crecimiento celular y la metástasis, la reducción del crecimiento tumoral y las metástasis tras el bloqueo/interrupción de la producción de una o más isoformas de la PTHrP, específicamente la isoforma 1-173.

[0012] 0019 La presente invención divulga métodos y tecnología de imágenes para detectar una o más isoformas de la PTHrP o isoformas específicas, preferiblemente la PTHrP1-173 o sus fragmentos.

[0013] 0020 La presente invención divulga un método para inhibir el crecimiento, metástasis y la invasión de las células tumorales mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo, una cantidad que elimina o reduce la carga tumoral del paciente) de anticuerpos de la presente invención, preferiblemente anticuerpos monoclonales humanizados o completamente humanos que se unen a una o más isoformas de la PTHrP o isoformas específicas, específicamente la PTHrP1-173 o sus fragmentos. Los Acm de la presente invención, preferiblemente Acm humanizados o completamente humanos, pueden administrarse por vía parenteral en un vehículo adecuado, ya sea por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o en el propio tumor.

[0014] 0021 Una realización no de acuerdo con la presente invención está dirigida al ARNsi y a construcciones de ARNsi para su uso en la modulación del nivel de actividad de una o más isoformas de la PTHrP o isoformas específicas, preferiblemente la PTHrP1-173, en una célula. Una realización no de acuerdo con la presente invención se refiere al ARNsi y construcciones de ARNsi para modular, bloquear o atenuar (por ejemplo silenciar) la expresión de una o más isoformas de la PTHrP o isoformas específicas, preferiblemente la PTHrP1-173.

[0015] 0022 La presente invención divulga los métodos de antagonizar una o más isoformas de la PTHrP, preferiblemente la isoforma PTHrP1-173 incluyendo el uso de anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, utilizando la terapia génica con antagonistas contra isoformas de la PTHrP, específicamente la isoforma PTHrP1-173 o de su receptor y/o moléculas de señalización, fragmentos peptídicos de la PTHrP, preferiblemente fragmentos peptídicos derivados del C-terminal de la PTHrP1-173.

[0016] 0023 Una opción adicional se refiere a derivados inmunoquímicos de los Acm de la presente invención incluyendo, pero sin limitarse a (a) anticuerpos monoclonales marcados (por ejemplo, marcados radiactivamente, marcados con enzimas o fluorocromo) de la presente invención, preferiblemente Acm humanizados o completamente humanos, para diagnosticar o detectar tumores y la extensión del tumor (por ejemplo, metástasis)

usando tecnologías de imagen conocidas; y (b) conjugados de inmunotoxina de los Acm de la presente invención, preferiblemente Acm humanizados o completamente humanos, donde los Acm de la presente invención se conjugan con un residuo citotóxico, radiactivo o marcado radiactivamente conocido (por ejemplo, radioinmunoterapia) para la inactivación terapéutica.

5

[0017] 0024 Otras realizaciones de la presente invención se refieren a un anticuerpo aislado que se une específicamente con una porción C-terminal de la isoforma PTHrP1-173 como se reivindica, en el que el anticuerpo puede estar unido a un agente de diagnóstico o terapéutico.

10 **[0018]** 0025 Una opción adicional se refiere a métodos para producir un anticuerpo, que comprende: a) administrar un antígeno polipéptido a un animal hospedador, preferiblemente un ratón, para inducir la producción de anticuerpos contra el antígeno polipéptido en el animal hospedador, en el que el polipéptido es una porción C-terminal de la PTHrP que consiste en los residuos de aminoácidos 151 a 169 de la PTHrP1-173; b) controlar el título de anticuerpos producidos por la administración del antígeno peptídico en el animal hospedador; c) extraer los
15 antisueros producidos en el animal hospedador y d) aislar y seleccionar al menos un anticuerpo a partir de los antisueros.

[0019] 0026 La presente invención divulga métodos para tratar el crecimiento, la metástasis o la invasión de células de cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad
20 eficaz de un anticuerpo aislado que se une específicamente a una porción C-terminal de la PTHrP, específicamente a los residuos de aminoácidos 151 a 169 de la PTHrP1-173.

[0020] 0027 La presente invención divulga un método para el diagnóstico de la actividad de la enfermedad o de la diseminación metastásica de las células cancerosas, preferiblemente antes del desarrollo de la hipercalcemia,
25 comprendiendo el método administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado que se une específicamente a una parte C-terminal de la PTHrP, específicamente a los residuos de aminoácidos 151 a 169 de la PTHrP1-173. En una realización preferida, las células cancerosas se pueden seleccionar de cualquier grupo que expresa una o más isoformas de la PTHrP, pero preferiblemente el grupo
30 consiste en cánceres epiteliales como el de mama, pulmón, próstata, colon, páncreas, ovario y de células escamosas, así como melanoma.

[0021] 0028 Un aspecto no de acuerdo con la presente invención se refiere a un método de modulación de la expresión de una o más isoformas de la PTHrP, preferiblemente la PTHrP1-173, mediante la administración de un ARNsi que hibrida con una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más isoformas de la PTHrP humana,
35 preferiblemente la PTHrP1-173.

[0022] 0029 Un aspecto adicional no de acuerdo con la presente invención se refiere a una composición de ARNsi que comprende una molécula de ARNsi que hibrida con una molécula de ácido nucleico que codifica todas las isoformas de la PTHrP humana, preferiblemente la PTHrP1-173, más preferiblemente los residuos de aminoácidos
40 140-146 de la región C-terminal de la PTHrP.

[0023] 0030 Un aspecto adicional no de acuerdo con la presente invención se refiere a un método para inhibir la expresión de la PTHrP en un paciente que comprende la administración al paciente de moléculas de ARNsi que hibridan con una molécula de ácido nucleico que codifica la PTHrP humana en el paciente, efectuando de este modo
45 la inhibición.

[0024] 0031 Un aspecto adicional no de acuerdo con la presente invención se refiere a un hibridoma depositado en la IDAC con el Número de Acceso 150807-02.

50 **[0025]** 0032 Un aspecto adicional no de acuerdo con la presente invención se refiere a un hibridoma depositado en la IDAC con el Número de Acceso 150807-01.

[0026] 0033 Un aspecto adicional no de acuerdo con la presente invención se refiere a un hibridoma depositado en la IDAC con el Número de Acceso 150807-03.

55

[0027] 0034 Un aspecto adicional no de acuerdo con la presente invención se refiere a un hibridoma depositado en la IDAC con el Número de Acceso 060808-01.

60 **[0028]** 0035 Un aspecto adicional no de acuerdo con la presente invención se refiere a un hibridoma depositado en la IDAC con el Número de Acceso 060808-02

0036 Breve descripción de los dibujos

[0029] 0037 Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la presente invención deben ser evidentes
65 a partir de la siguiente descripción cuando se consideran conjuntamente con los dibujos adjuntos. La patente o la

solicitud de patente contiene al menos un dibujo ejecutado en color.

0038 La Tabla 1 muestra la producción de PTHrP en diferentes líneas celulares de la presente invención antes y después de la transfección de los vectores de expresión que expresan isoformas específicas de la PTHrP.

0039 Las Figuras 1(A) a (C) muestran el efecto de la sobreexpresión de isoformas de la PTHrP en las células HPK1A sobre la morfología celular (B), el crecimiento celular (A) y el crecimiento en agar blando (C). El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre la línea celular HPK1A/p173 y, o bien HPK1A/p141, HPK1A/Vector o HPK1A de tipo silvestre ($p \leq 0,01$).

0040 Las Figuras 2(A) y (B) muestran tumores subcutáneos extirpados en ratones desnudos trasplantados con la línea celular HPK1A/p173 y HPK1A/p141 que sobreexpresa la PTHrP (A) y la velocidad de crecimiento del tumor en ratones desnudos trasplantados con las líneas celulares HPK1A/p173 y HPK1A/p141 (B).

0041 Las Figuras 3 (A) a (C) muestran la estructura del gen de la PTHrP (A); la expresión de las tres isoformas (PTHrP1-139, PTHrP1-141 y PTHrP1-173) por RT-PCR en las líneas celulares de cáncer humano HPK1Aras, A375 y MDA-MB-435 (B) y la presencia del receptor de PTH/PTHrP (C).

0042 Las Figuras 4 (A) a (D) son fotografías que muestran el efecto de la sobreexpresión de la PTHrP de las diferentes isoformas sobre la morfología celular en diferentes líneas celulares: (A) células de los túbulos proximales renales humanas inmortalizadas R-67; (B) células Cos-7; (C) línea celular de cáncer de próstata humano PC-3 y (D) células de melanoma A375;

0043 La Figura 5 es una tabla que muestra la caracterización de la subclase de los anticuerpos anti-PTHrP de la presente invención frente a las diferentes isoformas;

0044 La Figura 6 es un gráfico que muestra la medición de la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos de la presente invención mediante ELISA;

0045 La Figura 7 es una transferencia Western que demuestra el reconocimiento específico de antígenos por los anticuerpos monoclonales de la presente invención.

0046 Las Figuras 8(A) y (B) muestran la inmunohistoquímica de las células de cáncer de próstata PC-3 en cultivo de tejidos *in vitro* (A) y de cortes de tejido de metástasis de células de melanoma A375 en los ganglios linfáticos *in vivo* (B). Las células o tejidos se inmunotifieron con anticuerpos monoclonales de la presente invención dirigidos a cualquiera de PTHrP1-33 o PTHrP140-173.

0047 La Figura 9 es una tabla que muestra la inhibición de las metástasis en sitios diferentes en ratones desnudos trasplantados con células A375 en las que se había bloqueado la PTHrP (DKO-/-) en comparación con animales trasplantados con células de tipo silvestre (WT+/+). La Figura 9 muestra las metástasis a varios órganos de las células de melanoma A375 (+/+) WT (tipo silvestre) y bloqueadas (DKO-/-) trasplantadas en ratones nu/nu. Las células (1×10^5) se inocularon en el ventrículo cardiaco izquierdo. En el sacrificio, cada órgano se examinó macroscópicamente y microscópicamente en cuanto a la afectación metastásica. Se muestra el número de animales identificados positivamente con metástasis en órganos diferentes respecto al número total de animales. Había 14 ratones por grupo.

0048 Las Figuras 10(A) y (B) muestran los resultados de la inhibición de la PTHrP de las tres isoformas por recombinación homóloga en ratones dobles bloqueados (DKO-/-) en las células de melanoma humano A375 sobre el crecimiento celular y la invasión *in vitro*. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las células A375 DKO (-/-) y A375 WT (+/+) ($p \leq 0,01$).

0049 Las Figuras 11(A) a (I) muestran el efecto de la inhibición de la PTHrP de las tres isoformas en células de melanoma humano A375 sobre el bienestar animal ((A, WT+/+) y ((C, DKO-/-)), la invasión del ganglio linfático ((B, WT+/+) y (D, DKO-/-)), la metástasis ósea por imágenes de fluorescencia ((E) y (F)), sobre la supervivencia de los animales mediante análisis de Kaplan Meier (G), peso del animal (H) y concentraciones circulantes de calcio (I). El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre la diseminación metastásica, la supervivencia, el peso y los niveles circulantes de calcio de los animales A375 DKO (-/-) y A375 WT (+/+) ($p \leq 0,01$).

0050 Las Figuras 12(A) a (C) muestran el efecto de la actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales sobre el crecimiento celular y la invasión de las células A375. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las células de tipo silvestre A375 tratadas con vehículo (control WT, IgG) y las células tratadas con los diversos Acm ($p \leq 0,01$).

0051 Las Figuras 13(A) y (B) muestran el efecto de la actividad neutralizante del ARNsi frente a todas las

isoformas de la PTHrP sobre el crecimiento celular y la invasión de las células A375. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las células A375 tratadas con ARNsi de control (Vector) y células A375 tratadas con ARNsi 1-22 ($p \leq 0,01$).

0052 Las Figuras 14(A) a (D) muestran el efecto de los anticuerpos monoclonales de la presente invención *in vivo* sobre el crecimiento tumoral en ratones desnudos trasplantados con células A375 por vía subcutánea. (A) crecimiento del tumor, (B) fotografías de los tumores extirpados, (C) peso del tumor en el sacrificio y (D) tinción H y E de un tumor extirpado. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre el tamaño del tumor o el peso de los animales tratados con vehículo de control y los animales tratados con los diferentes Acm ($p \leq 0,01$).

0053 Las Figuras 15(A) y (B) muestran el efecto de los anticuerpos monoclonales de la presente invención *in vivo* (A) sobre las metástasis macroscópicamente visibles en ratones desnudos 4 meses después del trasplante con células A375 por vía intracardiaca (B) sobre la supervivencia mediante el análisis de Kaplan-Meier.

0054 La Figura 16 es una tabla que muestra la recurrencia de la diseminación metastásica después de la suspensión de los anticuerpos monoclonales en animales inyectados con células A375 en el ventrículo cardíaco izquierdo.

0055 Las Figuras 17(A) y (B) muestran el efecto de la actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales de la presente invención sobre el crecimiento celular y la invasión de células de cáncer de mama humano MDA-MB435. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento celular y la invasión entre las células MDA-MB-435 tratadas con vehículo de control y las células tratadas con los diversos Acm ($p \leq 0,01$).

0056 Las Figuras 18(A) a (D) muestran el efecto de los anticuerpos monoclonales de la presente invención *in vivo* en ratones desnudos trasplantados con la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-435 sobre el crecimiento del tumor (A) y las metástasis en el pulmón ((C) y (D)). (B) Tinción H y E de un tumor de mama extirpado. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con vehículo de control y los animales tratados con Acm M45 o M18 en el crecimiento tumoral y las metástasis ($p \leq 0,01$).

0057 Las Figuras 19(A) a (D) muestran el efecto de la actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales de la presente invención y el ARNsi sobre el crecimiento celular (A) y la invasión ((B), (C), (D)) de células de cáncer de próstata PC-3 que sobreexpresan las diversas isoformas de la PTHrP. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las células PC-3 tratadas con vehículo de control (control WT) y las células PC-3 tratadas con los Acm indicados o con ARNsi 1-22 en el crecimiento celular y la invasión ($p \leq 0,01$).

0058 Las Figuras 20(A) y (B) muestran el efecto de la actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales de la presente invención (A) y ARNsi específicos contra cada isoforma de la PTHrP (B) de la presente invención sobre el crecimiento celular de las células HPK1Aras y en queratinocitos inmortalizados HPK1A control y queratinocitos humanos normales (NHK). El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre células HPK1Aras tratadas con vehículo de control (control WT) y las células HPK1Aras tratadas con diversos Acm o entre células HPK1Aras tratadas con ARNsi de control y las células tratadas con HPK1Aras tratadas con ARNsi específicos ($p \leq 0,01$).

0059 Las Figuras 21(A) y (B) muestran los resultados del bloqueo de la PTHrP sobre las células epiteliales mamarias del modelo de progresión del tumor mamario PyVmt: controles de tipo silvestre (PyVMT-PTHrPflox/flox-Cre- y PyVMT-PTHrP+/+Cre+), animales heterocigotos (PyVMT-PTHrP+/flox-Cre+) y homocigotos (PyVMT-PTHrPflox/flox-Cre+). (A) Crecimiento del tumor con el tiempo y peso del tumor en el momento del sacrificio. (B) Análisis de Kaplan Meier de la aparición de tumores. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre los animales PyVmt control y los animales homocigotos y heterocigotos y $p \leq 0,01$ indica una diferencia estadísticamente significativa entre los animales homocigotos y heterocigotos ($p \leq 0,01$).

0060 Descripción detallada de la invención

[0030] 0061 En esta divulgación, se utilizan una serie de términos y abreviaturas. Se proporcionan las siguientes definiciones de los términos y abreviaturas.

[0031] 0062 En la presente memoria, un experto en la técnica relevante generalmente puede entender que la expresión "proteína relacionada con la hormona paratiroidea" o su abreviatura "PTHrP" se refiere a la proteína PTHrP o a una de sus isoformas, individual o colectivamente o cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico, el ácido nucleico que codifica la PTHrP. En referencia a una de las diversas isoformas de acuerdo con la presente invención, se puede hacer referencia a la isoforma mediante la abreviatura PTHrP seguido por el número de

residuos de aminoácidos proporcionadas en esa isoforma. Por ejemplo, la isoforma que comprende 173 residuos de aminoácidos puede ser referida como PTHrP1-173.

[0032] 0063 En la presente memoria, un experto en la técnica relevante puede generalmente comprender que la expresión “que comprende”, significa generalmente la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes indicados a los que se hace referencia en las reivindicaciones, pero que no excluye la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos.

[0033] 0064 En la presente memoria, un experto en la técnica relevante puede generalmente comprender el término “tratamiento” para referirse en general a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados. Los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, la prevención o profilaxis, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución de la extensión de una enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, prevención de la extensión de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

[0034] 0065 En la presente memoria, una persona experta en la técnica relevante puede entender generalmente que la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un sujeto en necesidad de tratamiento. En el caso de las realizaciones de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz puede incluir, pero no se limita a, una cantidad que elimina o reduce los efectos de la enfermedad, tales como por ejemplo, la carga tumoral, en un sujeto.

[0035] 0066 En la presente memoria, un experto en la técnica relevante generalmente puede entender que el término “secuencia de aminoácidos” se refiere a una secuencia de aminoácidos de una molécula de proteína de origen natural o no natural. “Secuencia de aminoácidos” y términos similares, tales como “polipéptido” o “proteína”, no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos completa, nativa asociada con la molécula de proteína citada. Las secuencias de aminoácidos pueden ser referidas por tener un extremo amino (N) terminal y un extremo carboxilo (C) terminal. Los aminoácidos individuales en un péptido o polipéptido pueden ser referidos por sus “residuos” y dichos residuos se numeran secuencialmente a partir del extremo N-terminal y en sentido creciente hacia el C-terminal. Los aminoácidos situados generalmente próximos al extremo N-terminal se denominan en general como los aminoácidos N-terminales, mientras que los situados generalmente próximos al extremo C-terminal se denominan como aminoácidos C-terminales. Se entenderá por un experto en la técnica relevante que la referencia a residuos de aminoácidos, ya sea como residuos de aminoácidos N-terminal o C-terminal puede variar dependiendo de la proteína. Se entenderá por un experto en la técnica relevante en general, que la porción N-terminal de la PTHrP se extiende generalmente a partir de los residuos de aminoácidos 1 a 36, el centro o la parte intermedia se extiende generalmente desde el residuo de aminoácido 37 a 106 y la porción C-terminal generalmente comienza en el residuo de aminoácido 107 hasta el final de la cadena de aminoácidos.

[0036] 0067 En la presente memoria, un experto en la técnica relevante generalmente puede comprender que las expresiones “molécula de ácido nucleico que codifica”, “secuencia de ADN que codifica”, “secuencia de ARN que codifica”, “secuencia de ARNm que codifica”, “un oligonucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que codifica un gen”, “polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen”, “ADN que codifica”, “ARN que codifica” y terminología similar para referirse en general al orden o la secuencia de los nucleótidos a lo largo de una cadena sencilla o doble de ácido nucleico que comprende la región de codificación de un gen o, en otras palabras, la secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico. El orden de estos nucleótidos determina el orden de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica. La región codificante puede estar presente en un ADNc, ADN genómico, o en forma de ARN. El oligonucleótido o polinucleótido puede ser de cadena sencilla (por ejemplo, la hebra sentido) o de doble cadena (por ejemplo, cadenas antisentido y sentido). Los elementos de control adecuados tales como potenciadores/promotores, uniones de corte y empalme, señales de poliadenilación, etc., pueden ser colocados en estrecha proximidad a la región codificante del gen si es necesario para permitir la iniciación adecuada de la transcripción y/o el procesamiento correcto del transcrito de ARN primario. Como alternativa, la región codificante utilizada en los vectores de expresión puede contener potenciadores/promotores endógenos, uniones de empalme, secuencias intermedias, señales de poliadenilación, etc., o una combinación de ambos elementos de control endógenos y exógenos.

[0037] 0068 Una persona experta en la técnica relevante entenderá que se dice que las moléculas de ácido nucleico tienen “extremos 5'” y “extremos 3'” porque los mononucleótidos están unidos a través de un enlace fosfodiéster para constituir oligonucleótidos o polinucleótidos de una manera tal que el 5' fosfato de un anillo de pentosa de un mononucleótido está unido al oxígeno 3' de su vecino en una dirección. Por lo tanto, se ha referencia a un extremo de un oligonucleótido o polinucleótido, como el “extremo 5'” si su fosfato 5' no está unido al oxígeno 3' de un anillo pentosa de un mononucleótido precedente y como el “extremo 3'” si su oxígeno 3' no está unido a un fosfato 5' de un anillo pentosa de un mononucleótido posterior. En una molécula de ácido nucleico lineal o circular, se hace referencia a los elementos discretos como elementos situados “en sentido 5'” o “en sentido 3'”. Como una molécula de ADN existe generalmente en una doble hélice, se dice que la molécula de ADN tiene una cadena

“sentido” y una cadena “antisentido”. La cadena sentido y la cadena antisentido se dice que son inversamente complementarias porque el extremo 3' de la cadena sentido puede hibridar con el extremo 5' de la cadena antisentido y el extremo 5' de la cadena antisentido puede hibridar con el extremo 3' de la cadena sentido. La cadena “sentido” de la molécula de ADN se copia generalmente en un ARN mensajero (ARNm) durante la transcripción. El ARNm producido durante la transcripción tiene, por lo tanto, la misma secuencia que la cadena sentido mediante la transcripción de la cadena antisentido, de modo que la proteína eventual puede estar basada en la versión sentido de la molécula de ADN. El término “cadena antisentido” se usa en referencia a una cadena de ácido nucleico que es complementaria a la cadena “sentido”. La designación (-) (es decir, “negativa”) se utiliza a veces en referencia a la cadena antisentido y la designación (+) (es decir, “positiva”) a veces se usa en referencia a la cadena sentido.

[0038] 0069 En la presente memoria, un experto en la técnica relevante puede entender generalmente que el término “antisentido” se puede utilizar también en referencia a las secuencias de ARN que son complementarias a una secuencia de ARN específica (por ejemplo, ARNm). El ARN antisentido puede ser producido por cualquier método, incluyendo la síntesis mediante corte y empalme del gen o genes de interés en una orientación inversa a un promotor viral que permite la síntesis de una molécula de ARN que es una copia de la cadena antisentido (por ejemplo, basado en la transcripción de la cadena sentido o codificante). Una vez introducida, la cadena transcrita se combina con el ARNm natural producido para formar moléculas de doble cadena ARN/ARN. Estas moléculas de doble cadena ARN/ARN pueden interferir entonces con la posterior transcripción del ARNm o su traducción.

[0039] 0070 En la presente memoria, un experto en la técnica relevante puede entender generalmente que los términos “complementario” o “complementariedad” se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia 5'-"A-G-T-3'" es complementaria a la secuencia 3'-"T-C-A-5'". La complementariedad puede ser “parcial”, en la que sólo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se emparejan de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases bien conocidas o puede ser una complementariedad “completa” o “total” entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los métodos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

[0040] 0071 En la presente memoria, el término “homología” se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Las secuencias de nucleótidos homólogas también incluyen, pero no se limitan a, variaciones alélicas y mutaciones de las secuencias de nucleótidos de origen natural presentadas en la presente memoria. Tal como se aplica a los polipéptidos, la expresión “homología sustancial” en la presente memoria significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT usando las puntuaciones de huecos por defecto, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, identidad de secuencia de 99 por ciento). Las secuencias de aminoácidos pueden diferir en sustituciones de aminoácidos conservadoras. Un experto en la técnica relevante va a entender que el término “sustituciones de aminoácidos conservadoras” se refiere a la capacidad de intercambio general entre residuos que tienen cadenas laterales químicamente similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas pueden comprender glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas con hidroxilo pueden comprender serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida pueden comprender asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas pueden comprender fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas pueden comprender lisina, arginina, e histidina y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre puede comprender cisteína y metionina.

[0041] 0072 Un experto en la técnica relevante puede entender en general que un gen puede producir múltiples especies de ARN que se generan por un transcrito diferente, o como alternativa, corte y empalme del transcrito de ARN primario. Cuando estas múltiples especies de ARN se transcriben en los polipéptidos, los polipéptidos transcritos se denominan “isoformas”. Los ADNc que son variantes de corte y empalme del mismo gen pueden contener regiones de homología de secuencia (que representan la presencia del mismo exón o porción del mismo exón en ambos ADNc) y/o pueden contener regiones de no homología. Si los dos ADNc contienen regiones de homología de secuencia, tales ADNc pueden hibridar ambos con una sonda derivada de todo el gen o de porciones del gen que contiene las secuencias encontradas en ambos ADNc. Las isoformas pueden expresarse en diferentes tejidos del mismo organismo como resultado de, por ejemplo, el corte y empalme alternativo del ARN. En otra alternativa, las isoformas pueden codificarse por diferentes genes.

[0042] 0073 En la presente memoria, el término “hibridación” o “hibrida” se usa en referencia al apareamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ve afectada por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones involucradas, el T_m del híbrido formado y la relación G:C dentro de los ácidos nucleicos. Un experto en la técnica relevante entiende que las condiciones de rigurosidad pueden alterarse

para afectar a la hibridación (véase, por ejemplo, Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization [1985] and Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY [1989], que se incorpora en la presente memoria por referencia).

5 **[0043]** 0074 El término “fragmento” como se usa en la presente memoria en referencia a secuencias de aminoácidos de cadena única se refiere a un polipéptido que puede tener una porción amino (N) terminal y/o una porción carboxi (C) terminal eliminadas en comparación con la proteína nativa, pero en la que la secuencia de aminoácidos restante del fragmento es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa. Se entenderá por un experto en la técnica relevante que el término “fragmento” también puede referirse a una porción de una
10 molécula de proteína de cadena múltiple (por ejemplo, fragmento de anticuerpo)

[0044] 0075 La expresión “de origen natural” o “nativo” en la presente memoria tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la
15 naturaleza y que no ha sido modificada es de origen natural.

[0045] 0076 En la presente memoria, el término “cebador” se refiere a un oligonucleótido, independientemente de si se produce de forma natural como en una digestión por restricción purificada o si se produce sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce
20 (es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados) la síntesis de un producto de extensión cebador que es complementario con una cadena de ácido nucleico. El cebador es preferiblemente de cadena sencilla para una máxima eficiencia en la amplificación, pero puede ser como alternativa de doble cadena. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para separar sus cadenas antes de ser utilizado para preparar los productos de extensión. Preferiblemente, el cebador es un
25 oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en la presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores pueden depender de muchos factores, incluyendo la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método. En una reacción de amplificación, el cebador que ceba en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos se denomina cebador directo, mientras que el cebador que ceba desde el extremo 3' se denomina generalmente cebador inverso.

30 **[0046]** 0077 En la presente memoria, el término “sonda” se puede referir a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), ya sea de origen natural como en una digestión por restricción purificada o producido sintéticamente, de forma recombinante o mediante amplificación por PCR, que es capaz de hibridar con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser de cadena sencilla o de doble cadena. Las sondas son útiles en la
35 detección, identificación y aislamiento de secuencias de genes particulares. También puede ser entendido por un experto en la técnica relevante que una “sonda” utilizada en la presente invención también puede ser una molécula de proteína (por ejemplo, anticuerpo). Puede entenderse, además, que la sonda se puede marcar con cualquier “molécula informadora”, de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo, pero sin limitarse a, la enzima (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes,
40 radiactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema de detección o etiqueta particular. El término “etiquetado” como se usa en la presente memoria (por ejemplo, cuando una molécula ha sido “etiquetados”) también puede ser entendida por un experto en la técnica relevante como que está vinculada a una molécula informadora.

45 **[0047]** 0078 En la presente memoria, el término “diana” se refiere a una estructura, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico o molécula de proteína, para ser identificada, detectada, caracterizada o amplificada. Por lo tanto, se busca que la “diana” se seleccione de otras estructuras.

[0048] 0079 En la presente memoria, la expresión “reacción en cadena de la polimerasa” (“PCR”) se refiere al
50 método descrito por primera vez en los documentos US-4.683.195, US-4.683.202 y US-4.965.188 que describen un método para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación. Este proceso para amplificar la secuencia diana consiste en introducir un gran exceso de dos cebadores oligonucleótidos a la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido de una secuencia precisa de ciclos térmicos en la presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son
55 complementarios a sus respectivas cadenas de la secuencia diana de doble cadena. Para efectuar la amplificación, la mezcla se desnaturaliza y los cebadores a continuación se hibridan con sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Tras la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa a fin de formar un nuevo par de cadenas complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridación del cebador y extensión con polimerasa pueden repetirse muchas veces (es decir, la desnaturalización, la hibridación y la extensión constituyen
60 un “ciclo”, no puede haber numerosos “ciclos”) para obtener una alta concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina por las posiciones relativas de los cebadores entre sí y, por lo tanto, esta longitud es un parámetro controlable. En virtud del aspecto repetitivo del proceso, el método se conoce como la “reacción en cadena de la polimerasa” (en lo sucesivo “PCR”). Debido a que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se convierten en las
65 secuencias predominantes (en términos de concentración) en la mezcla, se dice que son “amplificados por PCR”. La

reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) como se usa en la presente memoria se refiere a la amplificación de un trozo definido de un ácido ribonucleico (ARN) como su ADN complementario utilizando la transcriptasa inversa antes de someterse a una reacción de PCR. (Por ejemplo, en particular, los segmentos amplificados creados por el proceso de PCR en sí son, ellos mismos, moldes eficientes para posteriores amplificaciones por PCR).

[0049] 0080 En la presente memoria, las expresiones “producto de PCR”, “fragmento de PCR”, “PCR amplificada” y “producto de amplificación” se refieren a la mezcla resultante de compuestos después de que se han completado dos o más ciclos de las etapas de PCR de desnaturalización, hibridación y extensión. Estos términos abarcan el caso en el que ha habido amplificación de uno o más segmentos de una o más secuencias diana.

[0050] 0081 En la presente memoria, el término “reactivos de amplificación” se refiere a aquellos reactivos (desoxirribonucleótidos trifosfato, tampón, etc.), necesarios para la amplificación excepto los cebadores, molde de ácido nucleico y la enzima de amplificación. Generalmente, los reactivos de amplificación junto con otros componentes de la reacción se colocan y están contenidos en un recipiente de reacción (tubo de ensayo, micropocillo, etc.).

[0051] 0082 En la presente memoria, las expresiones “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales cortan el ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

[0052] 0083 En la presente memoria, la expresión “molécula de ADN recombinante” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula de ADN que está compuesta de segmentos de ADN unidos entre sí por medio de técnicas de biología molecular.

[0053] 0084 En la presente memoria, un experto en la técnica relevante va a entender la expresión “ARN de interferencia pequeño” o “ARNsi” como una clase de moléculas de ARN implicadas en la vía de la interferencia con el ARN (ARNi), donde el ARNsi interfiere con la expresión de productos génicos específicos. Los oligonucleótidos de doble cadena sintéticos se pueden clonar en vectores de ARNsi de una manera bien conocida en la técnica. Los vectores de ARNsi se transfectan a continuación en un hospedador para expresar el producto ARNsi.

[0054] 0085 El término “aislado” cuando se usa en relación a un ácido nucleico o péptido, como en “un oligonucleótido aislado”, “polinucleótido aislado” o “polipéptido aislado”, se refiere a una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos que se identifica y se separa de al menos un contaminante con el que está asociado normalmente en su fuente natural. Los compuestos aislados están presentes en una forma o configuración que es diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, los compuestos no aislados, tales como ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos, se encuentran en el estado en que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula hospedadora en la proximidad de los genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con otros numerosos ARNm que codifican una multitud de proteínas.

[0055] 0086 En la presente memoria, el término “porción” cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos se refiere a fragmentos de esa secuencia.

[0056] 0087 En la presente memoria, la expresión “región codificante” cuando se usa en referencia a secuencias de genes se refiere a las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos que se encuentran en el polipéptido naciente como resultado de la traducción de una molécula de ARNm. La región de codificación está limitada, en eucariotas, en el lado 5' por el triplete de nucleótidos “ATG” que codifica la metionina iniciadora y en el lado 3' por uno de los tres tripletes, que especifican los codones de parada (es decir, TAA, TAG, TGA).

[0057] 0088 En la presente memoria, el término “purificado” o “purificar” se refiere a la eliminación de contaminantes de una muestra. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PTHrP se purifican mediante la eliminación de proteínas que no son de inmunoglobulina contaminantes; también se purifican por la eliminación de la inmunoglobulina que no se une a la PTHrP. La eliminación de las proteínas no inmunoglobulinas y/o la eliminación de las inmunoglobulinas que no se unen a la PTHrP tiene como resultado un aumento en el porcentaje de inmunoglobulinas que reaccionan con PTHrP en la muestra.

[0058] 0089 La expresión “proteína recombinante” o “polipéptido recombinante” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula de proteína que se expresa a partir de una molécula de ADN recombinante.

[0059] 0090 Se usan numerosas técnicas que son bien conocidas en la técnica para detectar de anticuerpos en asociación con la presente invención. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a RIA (radioinmunoensayos), ELISA (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas), inmunoensayos “sándwich”, ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos

in situ (por ejemplo, usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisótopos, por ejemplo), transferencias Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación, etc.), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.

5

[0060] 0091 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “transferencia Western” se refiere al análisis de proteína(s) (o polipéptidos) inmovilizados sobre un soporte tal como nitrocelulosa o una membrana. Las proteínas se analizan en geles de acrilamida para separar las proteínas, seguido de la transferencia de la proteína desde el gel a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o una membrana de nylon. Las proteínas inmovilizadas se exponen a

10 continuación a los anticuerpos con reactividad contra un antígeno de interés. La unión de los anticuerpos puede detectarse por varios métodos, incluyendo el uso de anticuerpos radiomarcados, anticuerpos unidos a enzimas, etc.

[0061] 0092 En la presente memoria, la expresión “recombinación homóloga” se refiere a las técnicas que utilizan el proceso de reordenamiento físico del ADN que implica la alineación de secuencias homólogas, entrecruzamiento entre las hebras de ADN alineadas a fin de producir un intercambio de material entre las hebras. La recombinación homóloga se utiliza para bloquear la función del gen o crear mutantes de delección. Los métodos para la recombinación homóloga son bien conocidos y, por ejemplo, se describen en la patente US-5.614.396, incorporada en la presente memoria por referencia.

15

[0062] 0093 La expresión “determinante antigénico”, como se usa en la presente memoria se refiere a aquella porción de un antígeno que hace contacto con un anticuerpo (es decir, un epítopo). Cuando se usa una proteína o un fragmento de una proteína para inmunizar un animal hospedador, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región o estructura tridimensional dada en la proteína; estas regiones o estructuras se denominan como determinantes antigénicos. Un determinante antigénico

25 puede competir con el antígeno intacto (es decir, el “inmunógeno” utilizado para provocar la respuesta inmunitaria) por la unión a un anticuerpo.

[0063] 0094 El término “transgén” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un gen extraño, heterólogo o a un gen autólogo que se introduce en una célula, línea celular u organismo. El término “gen extraño”

30 se refiere a cualquier ácido nucleico (por ejemplo, secuencia genética) que se introduce por medio de manipulaciones experimentales y puede incluir un gen autólogo. El término “gen autólogo” puede abarcar variantes (por ejemplo, polimorfismos o mutantes) del gen de origen natural.

[0064] 0095 En la presente memoria, el término “vector” se usa en referencia a moléculas de ácido nucleico que

35 transfieren segmento(s) de ADN de una célula a otra.

[0065] 0096 La expresión “vector de expresión” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante que contiene una secuencia diana de ácido nucleico deseada y secuencias de ácido nucleico apropiadas necesarias para la expresión del ácido nucleico o de la secuencia de

40 aminoácidos en un hospedador. Las secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la expresión en procariotas incluyen generalmente un promotor, un operador (opcional) y un sitio de unión al ribosoma, a menudo junto con otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de terminación y poliadenilación.

[0066] 0097 En la presente memoria, el término “hospedador” o “célula hospedadora” se refiere a cualquier célula eucariota o procariota (por ejemplo, células bacterianas tales como E. coli, células de levadura, células de mamífero, células de ave, células de anfibio, células vegetales, células de peces y células de insectos), independientemente de si se localizan *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden estar localizadas en un animal transgénico.

50

[0067] 0098 El término “transfección” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la introducción de ADN extraño en células eucarióticas. La transfección puede llevarse a cabo por una variedad de medios conocidos en la técnica, incluyendo la coprecipitación fosfato de calcio-ADN, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de

55 protoplastos, infección retroviral, y biolística.

[0068] 0099 El término “muestra” como se usa en la presente memoria se utiliza en su sentido más amplio. Una muestra sospechosa de contener una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos puede comprender una célula, cromosomas aislados a partir de una célula (por ejemplo una extensión de cromosomas en metafase), ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido), ARN (en solución o unido a un soporte sólido), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido) y similares. Una muestra sospechosa de contener una proteína puede comprender una célula, una porción de un tejido, un extracto que contiene una o más proteínas y similares.

60

[0069] 00100 En la presente memoria, el término “respuesta”, se refiere a la generación de una señal detectable

65 cuando se utiliza en referencia a un ensayo u otro resultado (por ejemplo, acumulación de una molécula

informadora, aumento en la concentración de iones, acumulación de un producto químico detectable (por ejemplo, anticuerpo)).

[0070] 00101 En la presente memoria, el término “antagonista” se refiere a o describe una molécula que es capaz de, directa o indirectamente, contrarrestar, reducir o inhibir sustancialmente la actividad biológica o la activación de la PTHrP o de sus isoformas. Además de los anticuerpos monoclonales, el antagonista puede incluir péptidos de una secuencia parcial de la PTHrP o una de sus isoformas, preferiblemente la PTHrP1-173 y, en particular, un antagonista competitivo de la PTHrP1-173 y su receptor. Además, el antagonista de la PTHrP puede ser un compuesto no peptídico que disminuye la actividad de la PTHrP. El antagonista de la PTHrP también puede ser un compuesto que inhibe la señalización de la PTHrP o la señalización de una de sus isoformas. El antagonista de la PTHrP también puede ser un compuesto que inhibe el receptor de la PTHrP específico de PTHrP1-173. El antagonista de la PTHrP también puede ser un compuesto que reduce la expresión de la PTHrP1-173 o de su receptor. Una persona experta en la técnica relevante puede entender que un compuesto de este tipo puede incluir, por ejemplo, una molécula que podría unirse al ARNm de la PTHrP diana o al gen o receptor de la PTHrP. Por ejemplo, tales compuestos pueden incluir ARNs o un oligonucleótido antisentido o un compuesto específico o factor de inhibición del ARNm de la PTHrP1-173. Por ejemplo, se sabe que la PTH7-34 o la PTHrP7-34 han sido utilizados como antagonistas de péptidos pequeños para bloquear la acción de la PTH o la PTHrP. Los péptidos derivados de la PTHrP1-173 se pueden utilizar como un antagonista de la PTHrP1-173 y/o de su receptor. La expresión “antagonista de la PTHrP” puede ser entendida en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto que disminuye los efectos biológicos de la PTHrP o de una de sus isoformas. Además de los anticuerpos monoclonales de la presente invención, el antagonista puede incluir péptidos de una secuencia parcial de la PTHrP y, en particular, un antagonista competitivo de la PTHrP1-173. Además, el antagonista de la PTHrP puede ser un compuesto no peptídico que disminuye la actividad de la PTHrP. Tales compuestos pueden ser un ARNs o un oligonucleótido antisentido o un factor específico que inhibe el ARNm de la PTHrP1-173 o su receptor.

[0071] 00102 En la presente memoria, el término “anticuerpo” o “Ac” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales individuales anti-PTHrP (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y de neutralización o bloqueo) y composiciones de anticuerpos anti-PTHrP con especificidad poliepitópica. “Anticuerpo” como se usa en la presente memoria incluye moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo intactas, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (es decir, anticuerpos biespecíficos formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos) y fragmentos de inmunoglobulina o anticuerpo (tales como Fab, F(ab')₂ o Fv), siempre que presenten cualquiera de las propiedades agonistas o antagonistas deseadas descritas en la presente memoria. Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra un antígeno específico, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de los mismos. Aunque la invención se ha demostrado utilizando Acm de ratón como realizaciones preferidas, la invención no es tan limitada. Tales Acm están dentro del alcance de esta invención. Una persona experta en la técnica relevante entenderá que los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos quiméricos, híbridos, “humanizados” o completamente humanos, siempre que presenten la actividad o propiedades biológicas deseadas. Los Acm humanizados o completamente humanos, ya sea utilizando hibridomas humanos o “anticuerpos diméricos” u otro método adecuado puede ser un método preferible para el uso terapéutico humano. Se entenderá por un experto en la técnica relevante que existen técnicas conocidas para la creación de anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos. Como la mayoría de los Acm disponibles son de origen no humano, son naturalmente antigénicos en humanos y, por lo tanto, pueden dar lugar a una respuesta inmunitaria indeseable. Se entenderá por un experto en la técnica relevante que las técnicas para disminuir cualquier respuesta inmunitaria no deseable se denomina genéricamente “humanización”.

[0072] 00103 Los anticuerpos son generalmente proteínas o polipéptidos que exhiben especificidad de unión a un antígeno específico. Los anticuerpos nativos son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Generalmente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene regularmente espaciados puentes disulfuro. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basado en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente.

[0073] 00104 Los anticuerpos, en particular de la subclase IgM, pueden inhibir el crecimiento tumoral indirectamente por mediación de la citotoxicidad a través de una función de focalización: estos Acm pertenecen a una subclase o isotipo que cuando se unen formando un complejo con el receptor activa el complemento del suero y/o median en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Tales anticuerpos pueden ser usados para inducir la lisis mediante el complemento natural y para interactuar con ADCC sobre células normalmente presentes. La capacidad de los anticuerpos para mediar la lisis de las células tumorales de un paciente se puede probar *in vitro* mediante la adición del anticuerpo a las células tumorales del paciente cultivadas *in vitro*. A continuación, el suero del propio paciente se puede utilizar como fuente de complemento para ensayar la citolisis de las células tumorales *in vitro*. Esos anticuerpos, incluyendo anticuerpos de la presente invención, tales como, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a PTHrP-173, que exhiben el nivel más alto de citolisis (a través de la activación del complemento o ADCC) *in vitro* se pueden administrar a continuación al paciente para la ablación terapéutica.

[0074] 00105 La selección de una subclase de anticuerpos seleccionados con fines terapéuticos dependerá de la expresión de isoformas específicas de la PTHrP en, sobre o por un tumor. Por ejemplo, si el tumor expresa altos niveles de la isoforma PTHrP-173 en comparación con los tejidos normales, una IgM contra esta isoforma puede ser preferible para inducir la citolisis tumor. Sin embargo, si la isoforma PTHrP-173 se expresa a niveles más bajos, puede ser preferible usar un IgG contra esta isoforma que sea más pequeña y, por lo tanto, más accesible para penetrar en el tumor y también menos citotóxica para las células normales.

[0075] 00106 En la presente memoria, "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0076] 00107 En la presente memoria, el término "dominio variable" describe ciertas porciones de anticuerpos que difieren en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye habitualmente de manera uniforme a través de los dominios variables de los anticuerpos. Por lo general se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad ("RDC") o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones marco ("RM"). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones RM, adoptando en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres RDC, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las RDC de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones RM y, con las RDC de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

[0077] 00108 En la presente memoria, la expresión "anticuerpo monoclonal" o "Acm" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en menor cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antígeno. Además, en comparación con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.

[0078] 00109 El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular.

[0079] 00110 Un experto en la técnica relevante entenderá que en la presente memoria se contemplan modificaciones de los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser modificados conjugando, etiquetando o marcando a través de métodos conocidos en la técnica, los anticuerpos a cualquier agente de diagnóstico o terapéutico conocido, incluyendo sin limitarse a agentes citotóxicos (por ejemplo, conjugados de inmunotoxina), profármacos, fármacos (por ejemplo, sustancias farmacéuticamente activas) u otras moléculas efectoras que son eficaces en el tratamiento de la enfermedad, así como moléculas informadoras conocidas. Tales anticuerpos modificados, también referidos como derivados inmunoquímicos de los mismos incluyen, pero sin limitarse a (a) anticuerpos monoclonales marcados (por ejemplo, compuesto radiomarcado, marcado con enzima, fluorocromo o quimioluminiscente), preferiblemente Acm humanizados o completamente humanos, para diagnosticar o detectar tumores y la extensión del tumor (por ejemplo metástasis) utilizando tecnologías de imágenes conocidas; y (b) conjugados de inmunotoxina de los Acm de la presente invención, preferiblemente Acm humanizados o completamente humanos, donde los Acm están conjugados con residuos citotóxicos, radiactivos, marcados radiactivamente, profármacos o fármacos conocidos (por ejemplo, radioinmunoterapia). Se entenderá por un experto en la técnica relevante que la expresión "agente citotóxico", "citotoxinas" o "citotóxico" en la presente memoria se

refieren en general a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de las células e incluye, pero sin limitarse a, isótopos radiactivos, agentes quimioterapéuticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos. También se comprenderá por una persona experta en la técnica relevante

5 que el término “profármaco” tal como se utiliza en esta solicitud se refiere generalmente a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxico para las células diana en comparación con la sustancia farmacéuticamente activa y es capaz de ser activado o convertido en la sustancia más farmacéuticamente activa.

- 10 **[0080]** 00111 En la presente memoria, “hibridoma” se refiere a líneas celulares que han sido diseñadas para producir un anticuerpo monoclonal, tal como el producido por el método del hibridoma descrito por primero vez por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado, generalmente se inmuniza con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que pueden unirse específicamente al agente inmunizante. Los linfocitos se fusionan con una línea celular immortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para
- 15 formar una célula de hibridoma. Véase, por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103 o Hardy RR et al. In Handbook of Experimental Immunology (DM Weir Ed) Blackwell Scientific p13.1. Las líneas celulares immortalizadas son usualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Por lo general, se emplean líneas
- 20 celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden ser cultivadas en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células immortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente puede incluir hipoxantina, aminopterina y timidina (“medio HAT”), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en
- 25 HGPRT.

- [0081]** 00112 El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan a continuación, puede someterse a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por
- 30 inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem. 107: 220 (1980). Es ventajoso identificar anticuerpos que tienen un alto grado de especificidad y una alta afinidad de unión por el antígeno diana.

- 35 **[0082]** 00113 Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecer mediante métodos estándar (Goding, 1986). Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden ser cultivadas *in vivo* como ascitis en un mamífero.

- 40 **[0083]** 00114 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

- 45 **[0084]** 00115 Una persona experta en la técnica relevante puede entender que los anticuerpos monoclonales de la presente invención también se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente US-4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de
- 50 oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego son transfectados en células hospedadoras, tales como las células de simio COS, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también se puede modificar, por
- 55 ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente US- 4.816.567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina. Tal polipéptido no inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación con el
- 60 antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

- [0085]** 00116 En la presente memoria, el término “bloquear” y “atenuar” se refieren en general a eliminar funcionalmente la expresión de un producto génico o reducir la reducción del mismo para determinar la función de los productos génicos. Un experto en la técnica relevante puede entender que la expresión eliminar funcionalmente
- 65 la expresión puede referirse a eliminar por completo la expresión del mismo o reducir la expresión del mismo más

allá de un límite detectable. El término “animal bloqueado”, como se usa en la presente memoria puede entenderse como que se refiere en general a un animal transgénico en el que se inserta una secuencia de polinucleótidos transgén (es decir, un gen o un ADNc) que el animal no tiene de forma natural en su genoma para reducir, eliminar o de otra manera “bloquear” la producción y/o la expresión del producto del gen endógeno. La expresión doble

5 bloqueo puede entenderse en el sentido de un “bloqueo”, donde ambos alelos del gen de interés han sido bloqueados. Tales animales son útiles para el estudio *in vivo*, ensayo y validación de, entre otros, la función del producto codificado por la secuencia de polinucleótidos. Puede entenderse generalmente por una persona experta en la técnica relevante que “atenuar” puede referirse a la inhibición a través de métodos de ARNsi empleados *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, líneas celulares).

10 **[0086]** 00117 Un experto en la técnica relevante entenderá que las composiciones, incluyendo, pero sin limitarse a anticuerpos y ARNsi, pueden formularse en composiciones farmacéuticas para la administración en un modo que es habitual para la administración de dichos materiales usando la química y metodologías de formulación farmacéutica convencionales, todas las cuales son de fácil acceso para un experto en la técnica relevante. Un experto en la

15 técnica relevante también entenderá que tales composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más excipientes, vehículos, estabilizantes u otros compuestos farmacéuticamente inactivos, tales como, pero sin limitarse a, agentes humectantes o agentes emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden ser incluidas en las mismas. Una discusión minuciosa de excipientes, vehículos y sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack

20 Pub. Co. N. J. 1991). Tales composiciones farmacéuticas pueden prepararse como preparaciones inyectables u orales. Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar por inyección, incluyendo, pero sin limitarse a la inyección, intramuscular, intravenosa, subcutánea, peritoneal, transdérmica o nasal. Las dosis terapéuticamente eficaces pueden variar según el peso corporal y el momento y duración de la administración serán determinadas por los protocolos de investigación clínica específicos.

25 **[0087]** 00118 La descripción que sigue, y las realizaciones descritas en la misma, se proporcionan a modo de ilustración de un ejemplo o ejemplos, de realizaciones particulares de los principios y aspectos de la presente invención. Estos ejemplos se proporcionan para fines de explicación, y no de limitación, de los principios y de la invención. En la descripción, las partes similares están marcadas a lo largo de la memoria descriptiva y los dibujos

30 con los mismos números de referencia respectivos.

[0088] 00119 La presente invención divulga el diagnóstico, tratamiento e inhibición del crecimiento del tumor y su progresión a sitios de metástasis a través de la inhibición de la producción o la señalización de una o más isoformas de la PTHrP, preferiblemente la isoforma PTHrP1-173, como un tratamiento para la enfermedad, incluyendo varios

35 tipos de cánceres. Más preferiblemente, la presente invención divulga los métodos de inhibición del receptor y/o de sus vías de señalización activadas por la isoforma específica PTHrP1-173. La invención divulga la técnica de imagen *in vivo* y la focalización terapéutica de los tumores y sitios metastásicos que expresan una o más isoformas de la PTHrP, preferiblemente la isoforma específica PTHrP1-173, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos a una o más isoformas de la PTHrP, preferiblemente la isoforma específica PTHrP1-173, estando dichos anticuerpos

40 monoclonales preferiblemente etiquetados o marcados con un agente de diagnóstico (por ejemplo, una molécula informadora) o un agente terapéutico (por ejemplo, agente citotóxico, profármaco o fármaco). La invención divulga la detección de isoformas de la PTHrP como indicadores de la actividad de la enfermedad o la diseminación metastásica, preferiblemente antes del desarrollo de hipercalcemia, o como indicadores de pronóstico de posibles tratamientos. La divulgación puede ser aplicable a muchos estados patológicos, incluyendo, pero sin limitarse a

45 varios tipos de cáncer (incluyendo cánceres epiteliales como el de mama, pulmón, colon, de páncreas, de ovario, de próstata y de células escamosas de varios tipos de cáncer (incluyendo cánceres epiteliales como el de mama, pulmón, colon, de páncreas, de ovario, de próstata y de células escamosas de varios tipos, así como melanoma) que expresan estas isoformas, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos.

50 **[0089]** 00120 La inhibición de la PTHrP y sus isoformas se ensayó *in vitro* e *in vivo* en una variedad de modelos de cáncer humano incluyendo cáncer de mama, melanoma, cáncer epidermoide, cáncer de próstata como se describe en la presente memoria. Los métodos de la presente invención se dirigen al bloqueo de la producción/actividad de la PTHrP a través de un antagonista de una o más isoformas de la PTHrP, preferiblemente la isoforma específica PTHrP1-173. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, la recombinación homóloga (doble bloqueo), bloqueo de

55 ARNsi e incluyen tales antagonistas como los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la misma, así como fragmentos de péptidos que podrían unirse a los receptores y bloquear la actividad de una o más isoformas de la PTHrP, preferiblemente la isoforma específica PTHrP1-173.

00121 Ejemplos

00122 Ejemplo 1

00123 Producción, preparación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-PTHrP1-33, 140-173 y 151-169

[0090] 00124 Los anticuerpos monoclonales de ratón se produjeron a partir de hibridomas mediante fusión celular entre células de mieloma y células de bazo productoras de anticuerpos derivadas de ratones inmunizados con antígenos derivados de la PTHrP y de sus isoformas. Los antígenos que se eligieron fueron únicos para la isoforma PTHrP1-173 (derivados de fragmentos C-terminal) o comunes a todas las isoformas de PTHrP humana (derivados de fragmentos N-terminal).

00125 Preparación de antígenos

[0091] 00126 De acuerdo con la presente invención, los antígenos usados para la inmunización incluyen PTHrP151-169 humana ("hPTHrP151-169"). Los siguientes péptidos también se pueden utilizar pero no son de acuerdo con la presente invención: (a) PTHrP140-173 humana ("hPTHrP140-173") y (b) PTHrP1-33 humana ("hPTHrP1-33"). Se entenderá que el antígeno hPTHrP140-173 es un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos en la posición del aminoácido N.º 140 a 173 de la isoforma PTHrP1-173 y de manera similar el antígeno hPTHrP151-169 es un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos en la posición de aminoácido N.º 151 a 169 de la isoforma PTHrP1-173. Se entenderá que el antígeno hPTHrP1-33 es un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos en la posición de aminoácidos N.º 1 a 33 de la PTHrP, que es común a las tres de las isoformas humanas. Por lo tanto, un experto en la técnica pertinente, entenderá que los antígenos hPTHrP140-173 y hPTHrP151-169 son específicos para la isoforma PTHrP1-173. Cualquier anticuerpo producido contra estos antígenos basado en los protocolos descritos a continuación fueron dirigidos a epítopos en la isoforma PTHrP1-173. Por otra parte, una persona experta en la técnica relevante entenderá que el antígeno hPTHrP1-33 es común a las tres isoformas hPTHrP. Como tal, cualquier anticuerpo producido contra los antígenos hPTHrP1-33 basado en los protocolos descritos a continuación fueron dirigidos a epítopos en las tres de las isoformas humanas de la PTHrP.

25 00127 Inmunización y recogida de células productoras de anticuerpos

[0092] 00128 Las hPTHrP1-33, hPTHrP140-173 y hPTHrP151-169 humanas sintéticas fueron adquiridas de Sheldon Biotechnology Centre (Universidad McGill, Montreal). Los antígenos hPTHrP140-173, hPTHrP151-169 y hPTHrP1-33 se mezclaron con adyuvante completo de Freund 50 % (v/v) antes de la inyección en ratones como se describe a continuación.

[0093] 00129 Se inyectaron ratones hembra BALB/c de 5-6 semanas de edad por vía intraperitoneal con 25 µg de uno de los antígenos hPTHrP140-173, hPTHrP151-169 o hPTHrP1-33 emulsionados con adyuvante completo de Freund 50 % (v/v). Los ratones recibieron una dosis de refuerzo del antígeno relevante en adyuvante incompleto de Freund 50 % (v/v), concretamente el antígeno previamente inyectado en los ratones 13 a 15 días después de la primera inyección del antígeno hPTHrP relevante. Una semana después de la inyección de refuerzo del antígeno hPTHrP, se recogieron sueros de los ratones inmunizados por sangrado de la cola para determinar la presencia de anticuerpos contra el antígeno usado para inmunizar a ese ratón particular usando ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas). Los ratones productores de anticuerpos contra cada uno de los antígenos hPTHrP140-173, hPTHrP151-169 o hPTHrP1-33 se inyectaron con otros 25 µg del antígeno hPTHrP correspondiente o relevante. Tres días después de la inmunización final, las células de bazo se recogieron de los ratones que recibieron la inmunización final.

00130 Fusión celular

[0094] 00131 Los anticuerpos monoclonales se prepararon de acuerdo con el método de Hardy RR et al. In Handbook of Experimental Immunology (DM Weir Ed) Blackwell Scientific p13.1. Los bazos se extirparon quirúrgicamente y las células del bazo de los animales productores de anticuerpos inmunizados con uno de los antígenos hPTHrP140-173, hPTHrP151-169 o hPTHrP1-33 fueron aisladas por métodos conocidos y lavadas suavemente utilizando RPMI-1640 libre de suero a 37 °C. Los linfocitos de bazo aislados se mezclaron a continuación con células de mieloma Sp2 o FO (ambas de ATCC, Rockville, MD) y se fusionaron utilizando polietilenglicol 1500 50 % (Merck, Darmstadt, Alemania) de acuerdo con métodos conocidos. Las células de fusiones resultantes fueron cultivadas en placas de cultivo de tejidos pre-cultivadas de 96 pocillos (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) (Immunolon, Dynex, VA, EE.UU.) con los linfocitos de bazo de ratón normales en un medio de selección de hibridoma que consiste en RPMI suplementado con FBS 20 %, mezcla antibiótica-antimicótica y 1X medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (Gibco BRL) a 37 °C en presencia de CO₂ 5 %. Los días 4 y 8 de la incubación, el medio HAT se reemplazó con medio HAT fresco.

00132 Selección y clonación de hibridomas que secretan Acm

[0095] 00133 Tras la fusión de linfocitos de bazo y de células de mieloma, se seleccionaron hibridomas que secretan anticuerpos y se cultivaron usando crecimiento selectivo y, a continuación, se cribaron mediante dilución limitada. Los sobrenadantes de los cultivos de células del hibridoma se cribaron en cuanto a anticuerpos específicos para uno de los tres antígenos utilizados, concretamente, PTHrP140-173, hPTHrP151-169 o hPTHrP1-33 después de 13 a 15 días de cultivo utilizando placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (VWR, Mississauga, ON

) previamente revestidos con los péptidos correspondientes por ELISA usando un anticuerpo secundario de cabra anti-IgM+IgG+IgA (H+L) de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Southern Biotech, Birmingham, AL) y sustrato de peroxidasa ABTS (KPL Inc, Gaithersburg, MD). Los hibridomas seleccionados se clonaron dos veces usando dilución limitante. Los clones de hibridoma positivos se propagaron primero en placas de 24 pocillos y al
5 llegar a la confluencia se transfirieron a matraces T75 después de una segunda prueba de ELISA.

00134 Recogida de anticuerpos monoclonales

[0096] 00135 Los hibridomas identificados como productores de los anticuerpos deseados se adaptaron a medio
10 celular BD a través de la adición progresiva de cantidades del medio celular BD al medio celular existente hasta que las células se transfirieron posteriormente a un matraz Celine (BD Biosciences, San Diego, CA) y se cultivaron en medio celular BD para producir anticuerpos monoclonales (Acm) en el sobrenadante celular. El sobrenadante se centrifugó a 2000 g durante 5 min para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se filtró a través de filtros de 0,22-0,45 µm para eliminar más restos celulares, se dividió en alícuotas y se mantuvo a 4 °C. La purificación por
15 afinidad de los Acm se realizó usando una columna de proteína G Sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe, Quebec, Canadá) y se cuantificó usando un kit de ensayo de proteínas (Pierce, IL, EE.UU.). Los anticuerpos purificados se concentraron a 1-5 mg/ml, se dializaron frente a PBS y se almacenaron a -70 °C. La isotipificación de los Acm se determinó usando un kit de isotipificación comercial (BioRad, EE.UU.).

[0097] 00136 Como se muestra en la Figura 5, se obtuvieron los siguientes clones de hibridoma. Los hibridomas N.º 158 y N.º M45 produjeron anticuerpos monoclonales (Acm158 y AcmM45) que presentan una fuerte capacidad de unión a hPTHrP1-33, un fragmento N-terminal de la PTHrP. Los hibridomas N.º 104 y N.º M18 produjeron anticuerpos monoclonales (Acm104 y AcmM18) que presentan una fuerte capacidad de unión a PTHrP 140-173, un fragmento C-terminal de la PTHrP. El hibridoma N.º 6 produjo anticuerpos monoclonales (Acm6) que presentan una
25 fuerte capacidad de unión a PTHrP 151-169, un fragmento C-terminal.

[0098] 00137 Los hibridomas N.º 104, M18 y 6 produjeron anticuerpos monoclonales Acm104, AcmM18 y Acm6 respectivamente y se han depositado en la Autoridad Internacional de Depósito de Canadá (IDAC) y se han concedido los números de acceso 150807-02, 150807-03 y 150807-01, respectivamente. Los hibridomas N.º M45 y
30 158 produjeron anticuerpos monoclonales AcmM45 y Acm158 respectivamente, y se han depositado en la IDAC y se han concedido los números de acceso. 060808-01 y 060808-02, respectivamente.

[0099] 00138 Una persona experta en la técnica relevante puede entender que los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener usando la formación de ascitis y otro cultivo celular convencional o métodos de biología
35 molecular conocidos en la técnica. En el método de formación de ascitis, los hibridomas se inoculan por vía intraperitoneal en ratones desnudos BALB/c hembras y las ascitis se recogieron después de 1-4 semanas.

00139 Subclases de anticuerpos monoclonales

[0100] 00140 La subtipificación del anticuerpo monoclonal se determinó usando un kit de isotipificación comercial (Bio-Rad, EE.UU.). La caracterización de las subclases de los anticuerpos monoclonales contra PTHrP1-33, PTHrP140-173 y PTHrP151-169 en la Figura. 5. Como se ve en la Figura. 5, se muestra una tabla que representa la
40 caracterización de las subclases de anticuerpos anti-PTHrP contra las diferentes isoformas. Como se muestra en la Figura 5, se identificaron tres anticuerpos monoclonales específicos para la isoforma PTHrP1-173; (i) Acm04; (ii) AcmM18; y (iii) Acm6. El anticuerpo monoclonal de la presente invención comprende IgG3 para Acm158 (véase la Figura 5) y los anticuerpos monoclonales no de acuerdo con la presente invención comprenden las siguientes subclases: (i) IgM kappa para AcmM18 y AcmM45; (ii) IgG2b kappa para Acm104 y (iii) IgG1 kappa para Acm6. La especificidad de estos anticuerpos monoclonales se probó posteriormente usando ELISA, transferencias de Western e inmunohistoquímica como se describe en mayor detalle a continuación.
50

00141 Evaluación de la unión al antígeno y de la actividad de neutralización de los anticuerpos monoclonales

00142 Determinación de la concentración de anticuerpos

[0101] 00143 La concentración del anticuerpo purificado se determinó por ELISA. Se utilizó el ensayo ELISA para determinar la concentración de cada anticuerpo monoclonal como sigue. Se inmovilizaron 100 µl de uno de los antígenos hPTHrP1-33, hPTHrP140-173 o hPTHrP151-169 preparados a una concentración de 5 µg/ml a cada pocillo de una placa de 96 pocillos para ELISA. Después de bloquear con 200 µl de un tampón de dilución (BSA 1
60 %), se usaron como patrones concentraciones conocidas del correspondiente anticuerpo monoclonal purificado (mediante purificación por afinidad usando una columna de proteína G Sefarosa como se describió anteriormente). Para determinar la concentración de anticuerpos monoclonales en las preparaciones posteriores se añadió un sobrenadante diluido por etapas de anticuerpo monoclonal a cada pocillo seguido de la adición de un anticuerpo anti-IgG (M) de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y 100 µl de solución de sustrato después
65 de lo cual se mide la absorbancia a 405 nm. Se determinó la concentración de anticuerpo monoclonal de cada

anticuerpo específico frente a las preparaciones de patrones de cada anticuerpo monoclonal purificado específico.

00144 Determinación de la actividad de unión al antígeno

5 **[0102]** 00145 Las placas de ELISA para la determinación de la capacidad de unión al antígeno se preparan como sigue. Uno de los antígenos hPTHrP1-33, hPTHrP140-173 o hPTHrP151-169 preparadas a una concentración de 1-10 µg/ml se inmovilizaron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos para ELISA. Después de bloquear con 200 µl de un tampón de dilución (BSA 1 %), se añadió un sobrenadante diluido por etapas de anticuerpo monoclonal a cada pocillo seguido de la adición de un anticuerpo anti-IgG (M) de ratón conjugado con peroxidasa de rábano
10 picante (HRP) y 100 µl de solución de sustrato después de lo cual se mide la absorbancia a 405 nm. La Figura 6 muestra la interacción específica antígeno/anticuerpo mediante ELISA. Como se describe en mayor detalle en la presente memoria, se vio que los Acm de la presente invención inducidos contra los antígenos específicos eran altamente específicos para cada antígeno y no se observó reactividad cruzada entre los anticuerpos y los otros antígenos. El reconocimiento específico de los antígenos con los anticuerpos monoclonales también se demostró
15 mediante análisis de transferencia Western (ver Fig. 7). La Figura 7 muestra una transferencia Western que demuestra el reconocimiento específico del antígeno por el anticuerpo monoclonal de la presente invención. El Acm104 se dirige contra y reconoce la PTHrP140-173; el Acm104 es altamente específico para la isoforma PTHrP1-173 como se ve en la Figura 7 y no se observó reactividad cruzada con las isoformas PTHrP1-139 o PTHrP1-141. Las Figuras 8 (A) y (B) muestran la inmunohistoquímica de las células de cáncer de próstata PC3 en cultivo de
20 tejidos *in vitro* (véase la Figura 8 (A)) y los cortes de tejido de metástasis de células de melanoma A375 a los ganglios linfáticos *in vivo* (Véase la Figura 8 (B)). Como se muestra en la Figura 8(A), las células se inmunotifieron con el anticuerpo monoclonal de la presente invención dirigido a PTHrP1-33 (Acm158) o PTHrP140-173 (Acm104), que no es parte de la presente invención. Obsérvese que sólo PC3 transfectadas establemente con una construcción de la presente invención que expresa PTHrP1-173 (PC3/P173) fueron reconocidas por Acm104
25 mientras que las células PC3 que sobreexpresan cualquier isoforma fueron reconocidas por Acm158.

00146 Ejemplo 2

00147 Modelo de melanoma metastásico humano en ratón

30 **[0103]** 00148 La incidencia de melanoma ha aumentado de forma constante durante las últimas décadas (Hall HI et al J Am Acad Dermatol (1999) 40, 35) y la supervivencia de los pacientes una vez que las células del melanoma han invadido la membrana basal es extremadamente mala (Shields JD et al Br J Cancer (2004) 90 693). Los tratamientos para el melanoma en esta etapa tan son muy limitadas y la respuesta no es satisfactoria. La presente
35 invención implica el uso de un modelo de melanoma humano (A375) en el que se sobreexpresa la PTHrP (El Abdaimi et al Am J Physiol (2000) 279, C1230) para proporcionar un tratamiento para el melanoma. A375 es conocida por producir las tres isoformas de la PTHrP. Varios antagonistas de la presente invención se ensayaron respecto a este modelo.

40 **[0104]** 00149 Como se muestra en las Figuras 9 a 11, cuando se utilizan antagonistas de la presente invención para dirigirse a las tres isoformas, se observaba una reducción notable en el crecimiento del tumor y de la metástasis *in vivo* (véase las Figuras 9 y 11) y la invasión *in vitro* (Fig. 10).

[0105] 00150 La Figura 9 describe el número de animales que desarrollaron metástasis en un sitio específico
45 respecto al número total de animales trasplantados con células A375 en el ventrículo cardiaco izquierdo en el momento del sacrificio. En los animales trasplantados con células A375 con PTHrP bloqueada (A 375 DKO-/-), se observó una sorprendente reducción de la diseminación metastásica de más del 50 % en todos los sitios excepto el hueso donde la reducción fue de sólo el 20 %. Sin embargo, cuando se analizaron las lesiones óseas metastásicas en un momento anterior mediante imagen con fluorescencia (de células A375 marcadas con GFP) utilizando el
50 instrumento eXplore Optix, se observó una notable reducción en la incidencia de las lesiones metastásicas en los puntos temporales anteriores (9 y 14 días después de la implantación del tumor) en animales A375 DKO-/- (Véase la Figura 11(E) y (F)).

[0106] 00151 La reducción de las metástasis a los ganglios linfáticos se demuestra claramente en la autopsia en
55 animales A375 DKO-/- (véase la Figura 11(D). Obsérvese la única lesión detectada por imágenes de fluorescencia) en comparación con los animales tipo silvestre A375 WT+/+ en los que son visibles macroscópicamente múltiples metástasis en los ganglios linfáticos, como se muestra en la Figura 11(B). El bienestar animal y el mantenimiento del peso también se conservan en animales A375 DKO-/- en comparación con los animales tipo silvestre A375 WT+/+ (como se muestra en la Figura 11(A), (C) y (H)). Obsérvese también que las concentraciones circulantes de calcio se
60 mantenían dentro de lo normal en animales A375 DKO-/-, aunque aumentaban con el tiempo en los animales tipo silvestre A375 WT+/+ (véase la Figura 11(I)).

[0107] 00152 En ambos modelos, la metástasis puede ser visualizada después de la implantación de las células tumorales transfectadas de manera estable con la proteína fluorescente verde (GFP). Como se muestra en la Figura
65 11(E), la adquisición de imágenes *in vivo* de la metástasis ósea se puede hacer con el instrumento eXplore Optix

(GE/ART). Esta tecnología permite la detección temprana de metástasis óseas antes de las lesiones visibles en las radiografías y se puede utilizar para controlar fácilmente la progresión de la metástasis ósea, así como otros sitios metastásicos durante la intervención terapéutica, tal como el anticuerpo monoclonal de la presente invención. Una imagen de fluorescencia típica de las lesiones metastásicas óseas se muestra en la Figura 11 (E) y demuestra una inhibición de la metástasis ósea en animales implantados con células A375 DKO-/-, en comparación con los animales A375 de tipo silvestre WT+/+.

[0108] 00153 Además, la supervivencia de los animales se prolongó significativamente tras el bloqueo de la PTHrP en animales trasplantados con células tumorales A375 (véase la Figura 11(G)). El efecto de la inhibición de la PTHrP de las tres isoformas mediante recombinación homóloga (DKO-/-) en células humanas de melanoma A375 muestra un aumento de la supervivencia de los animales mediante análisis de Kaplan Meier. Esta ventaja de supervivencia se demuestra en ratones trasplantados en el ventrículo izquierdo con células A375 bloqueadas (DKO-/-) en comparación con animales trasplantados con células de tipo silvestre (WT+/+) (véase la Figura 11(G)).

[0109] 00154 Las Figuras 10(A) y (B) muestran los resultados de la inhibición de la PTHrP de las tres isoformas mediante recombinación homóloga (doble bloqueo, DKO-/-) para alterar ambos alelos del gen de la PTHrP en células de melanoma humano A375. A continuación se determinó el crecimiento celular (véase la Figura 10(A)) y la invasión *in vitro* (Véase la Figura 10(B)). Como se muestra en las Figuras 10(A) y (B), hay una inhibición del crecimiento celular y de la invasión en células A375 bloqueadas (DKO-/-) en comparación con las células de tipo silvestre (WT+/+) transfectadas con el vector solo ($p \leq 0,001$).

[0110] 00155 En los experimentos posteriores, se comparó la eficacia de un anticuerpo monoclonal dirigido al extremo N-terminal de la PTHrP (y, por lo tanto, que reconoce todas las isoformas) del anticuerpo monoclonal específico dirigido al extremo C-terminal específico contra la isoforma PTHrP-173. La eficacia de estos anticuerpos sobre el crecimiento celular y la invasión *in vitro* era similar (véase la Figura 12).

[0111] 00156 La Figura 12 muestra el efecto de la actividad neutralizante del anticuerpo monoclonal de la presente invención sobre el crecimiento celular y la invasión de las células A375. La Figura 12(A) muestra la determinación de la concentración óptima de Acm, mientras que la Figura 12(B) muestra el efecto de los diversos Acm sobre el crecimiento celular. La Figura 12(C) muestra el efecto de los diversos Acm sobre la invasión. Además, la atenuación *in vitro* de todas las isoformas de la PTHrP por ARNsi no de acuerdo con la presente invención reproducía todos los efectos observados con los anticuerpos monoclonales, como se muestra en la Figura 13. La Figura 13 muestra el efecto de la actividad neutralizante del ARNsi contra todas las isoformas de PTHrP sobre el crecimiento celular y la invasión de las células A375. Como se muestra en la Figura 13(A), se proporciona el crecimiento de las células tumorales o de la velocidad con el tiempo, mientras que la Figura 13(B) muestra la invasión a través de Matrigel. Obsérvese la inhibición significativa con la atenuación con ARNsi del crecimiento y la invasión ($p \leq 0,01$).

[0112] 00157 La línea celular de melanoma amelanótico A375 humano (ATCC) fue trasplantada en ratones desnudos y se examinó la eficacia terapéutica de los anticuerpos monoclonales sobre el crecimiento tumoral y la metástasis. Estas células humanas pueden ser trasplantadas por vía subcutánea para examinar el crecimiento del tumor o en el ventrículo cardíaco izquierdo para examinar la metástasis. Las metástasis en varios órganos, como los pulmones, el hígado, los huesos, el corazón y los ganglios linfáticos se desarrollan rápidamente en el plazo de 5 semanas post-trasplante del tumor y los animales invariablemente mueren al cabo de 7-8 semanas.

[0113] 00158 La eficacia terapéutica de los anticuerpos monoclonales sobre el crecimiento tumoral después de la implantación de las células tumorales por vía subcutánea se ensayó en ratones desnudos atímicos hembra (BALB/c-nu/nu, Charles River) de 4-5 semanas de edad. Se suspendieron 1×10^5 células A375 de melanoma en 100 μ l de PBS y se implantaron subcutáneamente en ratones nu/nu hembras (Charles River, St. Constant, QC). El tratamiento se inició 1 día después de la inoculación de células usando 100 μ g de anticuerpos inyectados por vía subcutánea cada 2 días durante 5 semanas. Los animales de control fueron inyectados con 100 μ g de IgM o IgG natural (Sigma) cada 2 días durante 5 semanas. La tasa de crecimiento del tumor primario se determinó mediante la representación de las medias de dos diámetros ortogonales de los tumores, medidas a intervalos de 5 días. Las medidas tridimensionales del tumor se realizaron utilizando calibres FST (Switzerland). Se midieron el eje largo del diámetro del tumor (L) y la media del ancho del eje medio (W) para calcular el volumen del tumor (V) utilizando la siguiente fórmula:

[0114] 00159

$$V = \frac{4}{3} \pi \times \frac{L}{2} \left(\frac{W}{2} \right)^2$$

60

[0115] 00160 Las curvas de crecimiento se generaron representando el volumen medio del tumor de los ratones. El tratamiento de estos animales con anticuerpos monoclonales dirigidos a una porción N-terminal o a una porción C-terminal retrasó significativamente la aparición y la progresión del tumor (véase las Figuras 14(A) a (C)). Como se

ve en las Figuras 14(A) a (C), se muestra el efecto del anticuerpo monoclonal de la presente invención *in vivo* sobre el crecimiento tumoral en ratones desnudos trasplantados con células A375 por vía subcutánea. (A) Volumen del tumor a lo largo del tiempo. (B) Fotografías de los tumores extirpados en el sacrificio. (C) Peso del tumor (media $\pm$ EEM) de los tumores que se muestran en (B). (D) Tinción con hematoxilina y eosina ("H y E") de un tumor (vehículo solo) extirpado en el sacrificio. El Acm M18 (dirigido contra PTHrP140-173) y el Acm158 (dirigido contra PTHrP1-33) mostraban el mayor efecto con una reducción de más del 75 % del crecimiento del tumor y el peso en comparación con los controles (véase las Figuras 14(A), (B) y (C)). Los otros Acm (Acm104, Acm6 y AcmM45) redujeron el crecimiento del tumor en un 30-40 %. La Figura 14(D) muestra la tinción H y E de células de melanoma A375 típicas de un tumor extirpado en el sacrificio.

[0116] 00161 El efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la diseminación metastásica de las células tumorales se examinó después de la inyección intracardiaca de células A375. La inyección intracardiaca de células de melanoma humano A375 se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito previamente en la técnica relevante (Sasaki et al, Cancer Res (1995) 55, 3551). Se suspendieron 5×10^5 células A375 en 0,1 ml de PBS y después se inyectaron en el ventrículo cardiaco izquierdo de ratones desnudos hembra (BALB/C nu/nu), usando una aguja de calibre 27 con anestesia. Los animales fueron controlados cada 5 días durante un máximo de 50 semanas para determinar el crecimiento del tumor y el estado de salud general. El tratamiento con anticuerpo como se ha señalado en la presente memoria se inició 1 día después de la inoculación de células. Se inyectaron 100 μ g de anticuerpos por vía subcutánea, cada 3 días durante un máximo de 20 semanas. Los animales de control fueron inyectados con 100 μ g de IgG o IgM natural (por ejemplo, IgM o IgG que no deriva de un animal inmunizado con las isoformas de la PTHrP) cada 3 días durante un máximo de 20 semanas. Los anticuerpos IgG e IgM naturales de ratón de control se obtuvieron de Sigma (St. Louis, Missouri, EE.UU.) y se desalaron con columnas Centricon (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.) antes de su uso. Otros animales de control fueron inyectados con sobrenadante de cultivos de células de hibridoma derivadas de ratones no inmunizados.

[0117] 00162 Cuando se sacrificaron los animales, se analizó el tamaño de las lesiones y el número de tumores en el hígado, pulmones, huesos, ganglios linfáticos, corazón, bazo, páncreas y riñón. La supervivencia de los animales se determinó mediante análisis de Kaplan Meyer, bien conocido en la técnica.

[0118] 00163 La administración de anticuerpos monoclonales no de acuerdo con la presente invención dio como resultado la inhibición de las metástasis (véase la Figura 15A) y la ventaja de la supervivencia (véase la Figura 15B). Como se ve en las Figuras 15(A) y (B), se proporciona el efecto de los anticuerpos monoclonales no de acuerdo con la presente invención *in vivo* sobre las metástasis (macroscópica) en ratones desnudos trasplantados con células A375 por la ruta intra-cardiaca (véase la Figura 15(A)) y sobre la supervivencia mediante análisis de Kaplan Meier (véase la Figura 15(B)). Obsérvese la ventaja en cuanto a la supervivencia de los ratones tratados con Acm M45 (contra PTHrP1-33) o Acm M18 (contra PTHrP140-173). El 100 % de los animales tratados con vehículo/control murieron al cabo de los 2 meses después a la implantación de células tumorales mientras que más del 30 % de los animales tratados con Acm no de acuerdo con la presente invención seguían con vida a los 4 meses después del trasplante de las células tumorales (véase la Figura 15(B)). La autopsia de los animales tratados hasta 4 meses con anticuerpos monoclonales no de acuerdo con la presente invención mostraba signos macroscópicos de metástasis en 30 % de los animales tratados con M45 y en 18 % de los animales tratados con M18 (ver Figura 15(A)). Aproximadamente el 15 % de los animales tratados con anticuerpos monoclonales no de acuerdo con la presente invención no mostró deterioro de la salud aparente durante un período de hasta 8 meses después del trasplante de tumor. La interrupción del tratamiento con anticuerpos (4 meses después de la implantación de las células tumorales) en este grupo dio lugar a la recurrencia de la diseminación metastásica en el 50 % de los animales inyectados con Acm M45 mientras que el 0 % de los animales inyectados con Acm M18 no mostró ningún signo de enfermedad ni de diseminación metastásica en el momento de la autopsia en los animales inyectados en el ventrículo cardiaco izquierdo (véase la Figura 16). La Figura 16 es una tabla que representa la recurrencia de la diseminación metastásica después de la interrupción de los anticuerpos monoclonales no de acuerdo con la presente invención en los animales inyectados con células A375 en el ventrículo cardiaco izquierdo.

[0119] 00164 Estos resultados muestran que los anticuerpos monoclonales de la presente invención son útiles para el tratamiento del melanoma y sus complicaciones metastásicas. Además, la eficacia terapéutica del anticuerpo monoclonal contra hPTHrP140-173, no de acuerdo con la presente invención, era por lo menos equivalente al anticuerpo monoclonal dirigido contra hPTHrP1-33, no de acuerdo con la presente invención, lo que indica que la inhibición de la isoforma 1-173 de la PTHrP puede ser suficiente para obtener el efecto deseado.

[0120] 00165 La eficacia *in vitro* de los anticuerpos monoclonales sobre el crecimiento celular y la invasión de las células A375 también se demostró (véase la Figura 12). Los anticuerpos monoclonales Acm M45 y Acm M18 mostraron la inhibición más fuerte sobre el crecimiento celular, observándose una inhibición completa a lo largo del tiempo de examen. Los anticuerpos monoclonales Acm 158, Acm 104 y Acm 6 redujeron el crecimiento celular en aproximadamente un 60 % en comparación con los controles (véase la Figura 12(b)). Todos los Acm ensayados redujeron la invasión a través de Matrigel en más del 50 % (véase la Figura 12 (C)).

00166 Ejemplo 3**00167 Modelo de cáncer de mama metastásico humano en ratón**

- 5 **[0121]** 00168 El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres (CDC Oficina de prensa (2003)). Hay varios tipos de cáncer de mama (Harris JR et al. Diseases of the breast third edition Philadelphia PA Lippincott/Williams & Wilkins (2004) p 971)), el más común es el que tiene su origen en las células epiteliales mamarias (MEC). La PTHrP es detectada por inmunorreactividad en la mayoría de los tumores de mama resecados con cirugía (Southby J et al, Cancer Res (1990) 50,7710). Sin embargo, la detección de la PTHrP en la sangre con
- 10 inmunoensayos específicos para una región N-terminal (que incluye los aminoácidos 1 a 34) o una región media (que incluye los aminoácidos 37 a 106) sólo detectó la molécula en estadios avanzados de cáncer de mama asociados con hipercalcemia pero no en la sangre de pacientes sin hipercalcemia (Grill V et al J Clin Endocrinol Metab (1991) 73,1309; Bundred NJ et al (1991) Br Med J 303,1506). La inhibición *in vitro* de la PTHrP mediante ARNsi o anticuerpos monoclonales dio como resultado tanto la inhibición del crecimiento como la inhibición de la
- 15 invasión (véase las Figuras 17(A) y (B)). Como se ve en la Figura 17, existe un efecto de la actividad neutralizante del anticuerpo monoclonal de la presente invención sobre el crecimiento celular (véase la Figura 17(A)) y la invasión de células de cáncer de mama humano MDA-MB-435 (véase la Figura 17 (B)). Obsérvese el fuerte efecto inhibitor del Acm M45 y del Acm M18 sobre el crecimiento celular ($p \leq 0,01$). No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los anticuerpos monoclonales de la subclase específica (IgG o IgM) dirigidos a
- 20 los anticuerpos de extremo C-terminal y N-terminal. Obsérvese la inhibición completa del crecimiento celular con los Acm de isotipo IgM dirigidos o bien contra el extremo N-terminal (Acm M45) o el extremo C-terminal (Acm M18) de la PTHrP. Los Acm de isotipo IgG dirigidos contra PTHrP1-33 (Acm 158), PTHrP140-173 (Acm 104) o PTHrP151-169 (Acm 6) tuvieron un efecto inhibitor del crecimiento menor pero similar de aproximadamente el 30 % en comparación con los controles (ver Figura 17 (A)). Sin embargo, todos los Acm mostraban un efecto inhibitorio
- 25 similar sobre la invasión, como se muestra en la Figura 17(B). Los anticuerpos que reconocen específicamente PTHrP1-173 pero no reconocen las otras isoformas inhiben fuertemente el crecimiento y la invasión de células de cáncer de mama humano. No se observó ningún efecto sobre el crecimiento de las células ni ningún efecto citotóxico en células epiteliales mamarias humanas normales primarias tratadas con los anticuerpos monoclonales.
- 30 **[0122]** 00169 En la presente invención, se utilizaron el anticuerpo monoclonal específico para el C-terminal de la isoforma PTHrP1-173 (M18) o el dirigido contra todas las isoformas (M45) en ratones desnudos trasplantados con la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-435 (Figuras 18(A) a (D) y se demostró la inhibición del crecimiento y la diseminación metastásica del cáncer de mama. Las Figuras 18(A), (C) y (D) proporcionan el efecto de los anticuerpos monoclonales *in vivo* en ratones desnudos trasplantados con la línea celular de cáncer de mama
- 35 humano MDA-MB-435 sobre el crecimiento tumoral y las metástasis en el pulmón. (A) Volumen del tumor. (B) Tinción con hematoxilina y eosina ("H y E") de un tumor extirpado en el sacrificio. (C) Porcentaje de animales con metástasis en el pulmón en el sacrificio. (D) Tinción H y E tinción de pulmones de los animales tratados con vehículo y animales tratados con los Acm. Se muestra un pulmón normal como comparación. T indica la localización del tumor (metástasis).
- 40 **[0123]** 00170 La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-435 fue trasplantada en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos y se examinó la eficacia terapéutica de los anticuerpos monoclonales sobre el crecimiento tumoral y la metástasis. Cuando estas células tumorales se trasplantan en la almohadilla de grasa mamaria, se puede examinar el crecimiento tumoral y las metástasis en el pulmón. El crecimiento del tumor en
- 45 animales no tratados alcanza 1,5-2,0 cm³ aproximadamente 6 semanas después del trasplante del tumor. En esta etapa > 80 % de los animales desarrollan metástasis en el pulmón. En este ejemplo, la eficacia terapéutica de los anticuerpos monoclonales Acm M45 y Acm M18 fue ensayada en ratones desnudos atímicos hembra de 4-5 semanas (BALB/C-nu/nu, Charles River). Se inocularon 1 x 10⁶ células MDA-MB-435 suspendidas en 100 µl de PBS en la almohadilla de grasa mamaria del flanco derecho expuesta quirúrgicamente bajo visión directa a través de un
- 50 microscopio de disección. El tratamiento se inició 1 día después de la inoculación de las células usando 100 µg de anticuerpos inyectados por vía subcutánea cada dos días durante 6 semanas. Los animales de control fueron inyectados con 100 µg de IgM natural o sobrenadante de hibridomas de animales no inmunizados. La tasa de crecimiento del tumor primario se determinó mediante la representación de las medias de dos diámetros ortogonales del tumor medido en intervalos de 5 días.
- 55 **[0124]** 00171 La administración de anticuerpos monoclonales no de acuerdo con la presente invención tuvo como resultado una reducción significativa del crecimiento tumoral (véase la Figura 18(A)) y la inhibición de metástasis de pulmón (véase las Figuras 18(C) y (D)). El crecimiento tumoral se inhibió en aproximadamente un 50 %, con el Acm anti-PTHrP1-33 (Acm M45) o anti-PTHrP140-173 (Acm M18) en comparación con los animales control (véase la
- 60 Figura 18(A)). Además, había aproximadamente una reducción del 70 % en el número de animales identificados positivamente con metástasis de pulmón en el sacrificio en animales tratados con Acm no de acuerdo con la presente invención (véase la Figura 18(C)). El tamaño de las metástasis también se redujo significativamente en los animales tratados con Acm (véase la Figura 10 (D)). La Figura 10(B) muestra la histología típica de un tumor extirpado en la autopsia. Estos resultados muestran que los anticuerpos monoclonales no de acuerdo con la
- 65 presente invención son útiles para el tratamiento del cáncer de mama y sus complicaciones metastásicas. La

eficacia terapéutica del anticuerpo monoclonal contra PTHrP 140-173 fue equivalente al anticuerpo monoclonal dirigido contra PTHrP1-33, lo que indica que la inhibición de la isoforma de PTHrP1-173 es suficiente para obtener el efecto deseado.

5 00172 Ejemplo 4

00173 Modelo *in vitro* de cáncer de próstata

[0125] 00174 El cáncer de próstata es el tipo de cáncer más frecuente en los hombres (CDC oficina de prensa (2003)). Con frecuencia se extiende a los huesos, donde se desarrollan lesiones osteoblásticas en contraste con las lesiones osteolíticas observadas en el cáncer de mama (Roodman D. N Engl J Med (2004) 350,1655). La PTHrP se expresa en la mayoría de los tejidos de cáncer de próstata (Deftos LJ Cancer (2000) 88, 3002), pero se desconoce su papel en la progresión y la metástasis del cáncer de próstata. La atenuación de la PTHrP *in vitro* se consigue mediante la tecnología del ARNsi en dos líneas celulares de cáncer de próstata humano y se ha demostrado una fuerte inhibición del crecimiento y la invasión celular (Figuras 19(A) a (D)). La Figura 19 muestra un gráfico que representa el efecto de la actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales (Acm 158, Acm M45, Acm 104 y Acm M18) y el ARNsi sobre el crecimiento celular y la invasión de las células PC-3 que sobreexpresan las diversas isoformas de la PTHrP. Se muestra en la Figura 19(A) el efecto de los diversos anticuerpos monoclonales y el ARNsi, siendo el anticuerpo monoclonal específico de la hPTHrP151-169 de conformidad con la presente invención, sobre el crecimiento celular de las líneas celulares transfectadas con el vector solo o con el vector que contiene las isoformas específicas. Las Figuras 19(B), (C) y (D) muestran el efecto del Acm 158 y del Acm 104 o del ARNsi sobre la invasión a través de Matrigel. En las células PC-3 transfectadas con el vector solo se logró una inhibición moderada del crecimiento (25 %) con cualquiera de los Acm IgM dirigidos a PTHrP140-173 (Acm M18) o PTHrP1-33 (Acm M45). Se observó un fuerte efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular en las líneas celulares que sobreexpresan cualquiera de las isoformas (PC3/p139, PC3/p141, PC3/p173) cuando se tratan con el Acm dirigido al extremo N-terminal (Acm 158 y Acm M45). Por el contrario, los Acm dirigidos contra PTHrP140-173 (Acm 104 y Acm M18) eran sólo eficaces en la línea celular que sobreexpresa la PTHrP1-173 (PC-3/P173). La atenuación mediante ARNsi de todas las isoformas utilizando ARNsi-22 fue igualmente eficaz en todas las líneas celulares que sobreexpresan cualquiera de las isoformas que reducen el crecimiento celular en aproximadamente 40 %. Además los Acm dirigidos a la región C-terminal de la PTHrP (Acm 104 y Acm M18) reproducían todos los efectos de la inhibición de la PTHrP observados con el ARNsi (ARNsi1-22) y similares al efecto observado con el anticuerpo N-terminal contra PTHrP (Acm 158 y Acm M45) (véase las Figuras 19(B) a (E)).

00175 Ejemplo 5

00176 Modelo *in vitro* de cáncer de piel de células escamosas

[0126] 00177 El cáncer de piel es la forma más frecuente de cáncer en los Estados Unidos. Cada año se diagnostican más de 1 millón de cánceres de piel (Base de datos SEER del Instituto Nacional del Cáncer (2007). El carcinoma de células escamosas es la segunda forma más frecuente de cáncer de piel con más de 250.000 casos diagnosticados cada año en los Estados Unidos (Christenson LJ et al JAMA (2005) 294 681). El cáncer de células escamosas de la piel en los seres humanos se debe a la transformación de los queratinocitos humanos normales. Se utilizó un modelo bien conocido de progresión tumoral en el que los queratinocitos humanos normales se immortalizan con el virus del papiloma humano 16 ("HPV16") para dar lugar a la línea de células HPK1A no tumorigénica y posteriormente transformada en células de cáncer por la sobreexpresión de un oncogén H-Ras activado para dar lugar a células HPK1A_{ras} que se convierten en un tumor escamoso clásica. Se ha demostrado un aumento gradual en la producción de PTHrP asociada con la transformación maligna en el modelo de progresión tumoral en queratinocitos.

[0127] 00178 Este modelo de progresión tumoral en queratinocitos se utilizó para analizar las consecuencias de la sobreexpresión de PTHrP en células immortalizadas HPV16 HPK1A. Se cultivaron células HPK1A en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS 10 %). Las células subconfluentes (70 %) fueron transfectadas durante la noche con 2 microgramos de un vector de expresión que codifica para cualquiera de la secuencia de aminoácidos de las isoformas PTHrP1-139, 1-141 o 1-173 o con un vector vacío de control (pcDNA3).

[0128] 00179 La eficacia *in vitro* del anticuerpo monoclonal de la presente invención sobre el crecimiento celular se demostró en la línea celular HPK1A_{ras} con una inhibición completa (y signos de citotoxicidad) y una eficacia similar observada con el N-terminal (Acm M45) o C-terminal (Acm M18) de la subclase IgM. Los Acm de la subclase IgG contra hPTHrP1-33 (Acm 158), hPTHrP140-173 (Acm 104) y hPTHrP151-169 (Acm 6) inhibieron el crecimiento celular en aproximadamente un 40 %, sin signos de citotoxicidad (véase la Figura 20(A) panel izquierdo). La Figura 20(A) (panel derecho) muestra un gráfico que representa el efecto de la actividad neutralizante de los Acm específicos contra las diversas isoformas sobre el crecimiento celular de la línea celular HPK1A immortalizada no tumorigénica y los queratinocitos humanos normales (NHK) primarios (Clonetics, CA). No se observó ningún efecto inhibitorio de los Acm sobre el crecimiento celular (ni signos de citotoxicidad) con la línea celular parental (HPK1A) ni

con los NHK.

[0129] 00180 La Figura 20(B) muestra el efecto del ARNsi, no de acuerdo con la presente invención contra las isoformas específicas de la PTHrP sobre la producción de PTHrP. El ARNsi dirigido contra todas las isoformas (ARNsi1-22) inhibe la producción de PTHrP en más de un 90 % a los 4 días y ese ARNsi dirigido específicamente contra cada isoforma PTHrP-139 (ARNsi1-139), PTHrP1-141 (ARNsi1-141) y PTHrP1-173 (ARNsi1-173) inhibe la PTHrP en aproximadamente el 30 %. Cada isoforma también está sujeta a la atenuación por ARNsi como se ve en la Figura 20(B), concretamente PTHrP-139 (ARNsi1-139), PTHrP1-141 (ARNsi1-141) y PTHrP1-173 (ARNsi1-173). Como se puede ver en la Figura 20(B), el efecto acumulativo de la inhibición del ARNsi de cada isoforma (ARNsi1-139 + ARNsi1-141 + ARNsi1-173) es aproximadamente equivalente al efecto de la inhibición total usando ARNsi1-22, que reconoce todas las isoformas.

0018 Construcciones de ARNsi

[0130] 00182 ARNsi1-22: Para inhibir la PTHrP total mediante ARNsi a través de la experimentación de la atenuación, las secuencias seleccionadas para las cadenas sentido y antisentido de la PTHrP, fueron las siguientes: sentido 5'-CACCA GCT GTG TCT GAA CAT CAG CTC C TTC AAG AGA G GAG CTG ATG TTC AGA CAC AGC-3'; antisentido 5'-AAAA GCT GTG TCT GAA CAT CAG CTC C TCT CTT GAA G GAG CTG ATG TTC AGA CAC AGC T-3'. Esta secuencia de oligonucleótidos se derivó en base a la secuencia de la región N-terminal de los residuos de aminoácidos 1-7 de la hPTHrP (Ala Val Ser Glu Su Gln Leu).

[0131] 00183 ARNsi1-139: Para inhibir la isoforma PTHrP 1-139, las secuencias seleccionadas para las cadenas sentido y antisentido de la PTHrP, fueron las siguientes: sentido 5'-CACCA TAA CAG GCT TCT CTG GCC CGT A TTC AAG AGA T ACG GGC CAG AGA AGC CTG TTA-3'; antisentido 5'-AAAA TAA CAG GCT TCT CTG GCC CGT A TCT CTT GAA T ACG GGC CAG AGA AGC CTG TTA T-3'. Esta secuencia de oligonucleótidos se derivó en base a la secuencia del extremo 3' no traducida de la hPTHrP 1-139 (5'-CACCA TAA CAG GCT TCT CTG GCC CGT A) en el exón VII.

[0132] 00184 ARNsi1-141: Para inhibir la isoforma PTHrP 1-141, las secuencias seleccionadas para las cadenas sentido y antisentido de la PTHrP, fueron las siguientes: sentido 5'-CACCA AGG CAT TGA AAT TTT CAG CAG A TTC AAG AGA T CTG CTG AAA ATT TCA ATG CCT-3'; antisentido 5'-AAAA AGG CAT TGA AAT TTT CAG CAG A TCT CTT GAA T CTG CTG AAA ATT TCA ATG CCT T-3'. Esta secuencia de oligonucleótidos fue derivada en base a los aminoácidos 140-141 (Arg His) y la secuencia del extremo 3' no traducida de la hPTHrP 1-141 (5'-CACCA AGG CAT TGA AAT TTT CAG CAG A) en el exón IX.

[0133] 00185 ARNsi1-173: Para inhibir la isoforma PTHrP1-173, las secuencias seleccionadas para las 5'-CACCA ACA GCA CTT CTG TGG GGT TTG A TTC AAG AGA T CAA ACC CCA CAG AAG TGC TGT-3'; antisentido 5'-AAAA ACA GCA CTT CTG TGG GGT TTG A TCT CTT GAA T CAA ACC CCA CAG AAG TGC TGT T-3'. Esta secuencia de oligonucleótidos se deriva en base a la secuencia de la región C-terminal de la hPTHrP1-173 (aminoácidos 140 a 146 Thr Ala Leu Leu Trp Gly Leu).

[0134] 00186 Las secuencias de oligonucleótidos en las construcciones de ARNsi no de acuerdo con la presente invención no tienen homología con ninguna secuencia génica obtenida con los datos de GenBank utilizando el programa BLAST (GenBank). Los oligonucleótidos sintéticos de las secuencias indicadas anteriormente fueron sintetizados por Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON) e hibridados para generar un oligonucleótido corto de doble cadena y se clonaron en el vector pENTR™/ H1/TO usando el kit BLOCK-iT™ inducible H1 RNAi Entry Vector Kit (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las construcciones de ARNsi anti-hPTHrP se secuenciaron antes de su uso (Sheldon Biotechnology Centre, McGill University, Montreal, Canadá). Las células se transfectaron de forma transitoria durante la noche con 2 µg de la construcción del plásmido ARNsi anti-PTHrP o con el vector pENTR™/ H1/TO solo utilizando 10 µl de LipofectAMINE (Gibco BRL, Burlington, ON, Canadá) en DMEM libre de suero. A continuación, el medio se sustituyó por DMEM suplementado con FBS al 10 %. A continuación se evaluó el crecimiento celular y la invasión de las células A375, PC-3 y HPK1Aras transfectadas (ver Figuras 13, 19 y 20)

00187 Expresión de la PTHrP

[0135] 00188 Los vectores de expresión de PTHrP se construyeron como sigue.

[0136] 00189 Se aisló ARNm poli (A)⁺ con el kit de purificación del ARNm Quick Prep Micro de acuerdo con el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canadá). Después de la precipitación, el ARNm se disolvió en agua tratada con DEPC y se sometió a tratamiento con ADNasa I. Se usó como molde 2 µg de ARNm poli(A)⁺ aislado de células para la síntesis de la primera cadena por el método del cebador aleatorio usando la transcriptasa inversa, Superscript™ RT (200 U/µl) (GIBCO BRL, Burlington, ON) en la presencia de 1 mM de cada dNTP, 20 unidades de inhibidor de ARNasa (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canadá) y 1 x tampón de reacción durante 2 horas a 37 °C. Los ADNc se amplificaron por PCR (30 ciclos de 92 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72

°C, 1 min) usando ADN polimerasa HOT TUB (3,0 U/μl) (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canadá) en presencia de 1 mM de cada dNTP, MgCl₂ 2,5 mM, 1 x tampón de reacción y 500 ng de cebador. Se utilizaron los siguientes cebadores de oligonucleótidos (Sheldon Biotechnology Center de la Universidad McGill, Montreal) para amplificar el fragmento de ADNc de 546, 550 y 846 pb correspondiente a las 3 isoformas del ADNc de la PTHrP humana como se ha señalado en la presente memoria (véase la Figura 3(A)):

- (i) directo N-38: 5' AGACGATGCAGCGGAGACTGGTTCA 3';
- (ii) inverso C139: 5' CCAGAGAAGCCTGTTACCGTGAATCG 3';
- (iii) inverso C141: 5' GGTCTCTGC'TGAAAATTTCAATGCC 3' y
- (iv) inverso C 173: 5' GCAGGATAGGTCATTCACTGTGCTC 3'

15 **[0137]** 00194 Se utilizaron los siguientes cebadores de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de ADNc de 1780 pb correspondiente al ADNc del receptor de la PTH/PTHrP humana tipo 1 basado en su secuencia publicada.

- (i) directo PRIN: 5' ATGGGGACCGCCCGGATC 3' y

20 (ii) inverso PRIC: 5' TCACATGACTGTCTCCCACTC 3'

[0138] 00197 Los productos de RT-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1,5 %, utilizando ADN de 1 kb (GIBCO BRL, Burlington, ON) como el marcador de peso molecular. La secuencia de nucleótidos de los productos de PCR se determinó mediante secuenciación automática (Sheldon Biotechnology Center en la Universidad McGill, Montreal).

[0139] 00198 Los productos de PCR fueron clonados a continuación en el vector pCRII utilizando un kit de clonación TA (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON). Las tres isoformas del ADNc de la PTHrP se insertaron a continuación el sitio de la endonucleasa de restricción *EcoRI* restricción del vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON) con el fin de ser expresadas por el promotor CMV y se observó que las secuencias sometidas a secuenciación eran idénticas a las secuencias del ADNc de la PTHrP humana publicadas (Yasuda et al 1988 y la biblioteca de datos GenBank J04710).

[0140] 00199 La secuencia que codifica la PTHrP1-173 también se fusionó con la proteína fluorescente verde (GFP) usando sitios de la endonucleasa de restricción *EcoRI/BamHI* en el vector pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA) con el propósito de la detección *in vitro* e *in vivo* de la expresión del producto proteico en las células tumorales utilizando la detección o imagen con fluorescencia. La GFP se clonó en dirección 3' de la PTHrP y, por lo tanto, se coexpresó en las células que pueden expresar la isoforma PTHrP particular.

[0141] 00200 Las células HPK1A que fueron transfectadas establemente con el vector de expresión pcDNA3 que contiene el ADNc para la isoforma PTHrP1-173 se denominan HPK1A/p173. Las células HPK1A que fueron transfectadas establemente con el vector de expresión pcDNA3 que contiene el ADNc para la isoforma PTHrP 1-141 se denominan HPK1A/p141. Las células HPK1A que fueron transfectadas establemente con el vector de expresión pcDNA3 que contiene el ADNc para la isoforma PTHrP 1-139 se denominan HPK1A/P139.

[0142] 00201 En las células transfectadas de forma estable HPK1A/p173, HPK1A/p141, HPK1A/p139, se demostraron cambios en la morfología de las células inmortalizadas HPV16 tras la sobreexpresión de las distintas isoformas. Las Figuras 1(A) a 1(C) muestran el efecto de la sobreexpresión de las isoformas PTHrP1-141 y 1-173 en células HPK1A sobre el crecimiento celular (Figura 1(A)), sobre la morfología celular (Figura 1(B)) y sobre el crecimiento en agar blando (Fig. 1(C)). La sobreexpresión de la isoforma PTHrP1-173 en HPK1A/p173 tuvo como resultado el alargamiento y crecimiento en múltiples capas de estas células (véase la Figura 1(B)). Hubo un aumento en la velocidad de crecimiento, la morfología celular y el crecimiento independiente del anclaje en las células transfectadas con PTHrP1-173 (HPK1A/p173) ($p \leq 0,01$). También se muestra en las Figuras 1(A) a 1(C) que la sobreexpresión de PTHrP1-141 (HPK1A/p141) o la transfección de vector solo (HPK1A/Vector) no afectó a la morfología de las células HPK1A que permanecían idénticas a las células HPK1A de tipo silvestre (HPK1A) (véase la Figura 1(B)). Las células HPK1A sobreexpresan PTHrP1-173 (HPK1A/p173), pero ni 1-141 (HPK1A/p141) ni las células de control (HPK1A/vector y HPK1A de tipo silvestre) formaron colonias en agar blando (véase la Figura 1(C)).

[0143] 00202 La línea celular HPK1A/p173 se trasplantó subcutáneamente en ratones desnudos y se observaron signos de crecimiento tumoral que no se ve con los ratones desnudos trasplantados con la línea celular HPK1A control o HPK1A que sobreexpresa PTHrP1-141 (HPK1A/p141) (véase las Figuras 2(A) y 2(B)). La Figura 2 (A) es una fotografía que muestra lesiones subcutáneas extirpadas en ratones desnudos trasplantados con las líneas celulares que sobreexpresan PTHrP HPK1A/p173 y HPK1A/p141, líneas celulares de control HPK1A (HPK1A de tipo silvestre y HPK1A que expresan el vector solo), así como los tumores de control positivos de ratón trasplantado con

células HPK1A_{ras}. Como se muestra en la Figura 2(B), se proporciona la velocidad de crecimiento del tumor en ratones desnudos trasplantados con las mismas líneas de células, en las que sólo las células HPK1A transfectadas con PTHrP1-173 (HPK1A/p173) desarrollaron un tumor en ratones desnudos similares a los ratones trasplantados con la línea celular maligna HPK1A_{ras}. Los ratones trasplantados con células HPK1A_{ras} se utilizaron como

5 controles positivos (véase la Figura 2(A)). 5/5 (100 %) de los ratones trasplantados con la línea celular transformada HPK1A (HPK1A/p173) o las células HPK1A_{ras} desarrollaron tumores al cabo de 4 semanas, mientras que ninguno de los ratones trasplantados con la línea celular parental (HPK1A) desarrollaron tumores (las pequeñas lesiones extirpadas mostradas eran fibróticas sin evidencia de células tumorales). El análisis del cariotipo de las células HPK1A/p173 transformadas confirmó su origen celular.

10 **[0144]** 00203 La morfología *in vitro* y el comportamiento *in vivo* de estas células transformadas eran similares a las de las células HPK1A transformadas con el oncogén H-*ras* (HPK1A_{ras}) (Rhim JS et al Oncogene (1989) 4, 1403), lo que indica que la sobreexpresión de la isoforma PTHrP1-173 tiene propiedades oncogénicas. Significativamente, sólo la sobreexpresión de PTHrP1-173, pero no de la isoforma (PTHrP1-141) dio lugar a la transformación celular *in*

15 *vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo* (véase las Figuras 1 y 2).

[0145] 00204 Se he demostrado que las tres isoformas se expresan en la línea de células HPK1A_{ras} transformadas, así como otras líneas celulares malignas humanas como se demuestra por RT-PCR (Figura 3(A) a 3(D)). Como se ve en la Figura 3, se muestra la expresión de las tres isoformas (PTHrP1-139, PTHrP1-141, PTHrP1-

20 173) por RT-PCR en las líneas celulares de cáncer humano HPK1A_{ras}, A375 y MDA-MB-435. La Figura 3(A) proporciona la posición de los cebadores utilizados para la RT-PCR mientras que la Figura 3(B) muestra los resultados de la expresión por RT-PCR de las tres isoformas en las líneas celulares indicadas. La Figura 3(C) proporciona la expresión por RT-PCR del receptor de la PTH/PTHrP tipo 1. Esto demuestra que tanto el receptor como su ligando(s) son co-expresados en las mismas líneas celulares.

25 **[0146]** 00205 Como se ve en las Figuras 4(A) a (D), se proporciona el efecto sobre la morfología celular de la sobreexpresión de las isoformas de la PTHrP en otras líneas celulares, incluyendo la línea celular de cáncer de próstata PC3, células Cos7, células de melanoma humano A375 y línea celular de los túbulos renales proximales humanos inmortalizada R67. La Figura 4(A) proporciona células de la línea celular de los túbulos renales proximales

30 humanos inmortalizada R67. La Figura 4(B) proporciona células de riñón de mono verde africano transformadas con SV40A (células Cos-7). La Figura 4(C) proporciona células de cáncer de próstata humano PC-3. La Figura 4(D) proporciona células de melanoma humano A375. El panel inferior muestra células A375 que co-expresan GFP y las diversas isoformas (véase la Figura 4(E)).

35 **[0147]** 00206 Como se muestra en las Figuras 4(A) a (C), sólo la sobreexpresión estable de la isoforma PTHrP1-173 indujo cambios morfológicos pero no las células transfectadas con el vector solo ni las isoformas PTHrP1-139 ni 1-141. La sobreexpresión de PTHrP1-173 aumentó la invasión *in vitro* como se evaluó mediante el ensayo de Matrigel realizado como se ha señalado en la presente memoria. Se utilizaron cámaras de cultivo celular transpocillo de 24 pocillos Costar recubiertas con Matrigel divididas con una membrana de policarbonato libre de

40 polivinilpirrolidona de 8,0 µm de poro (Coming Inc. Corning, NY). Se ha demostrado que estas cámaras permiten la invasión de células de melanoma humano. La membrana de la cámara se recubrió con una mezcla de componentes de la membrana basal de Matrigel (Matrigel, 30 µg/ml) (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA), se incubó durante 48 h a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar y UV y se almacenó a 4 °C. La membrana recubierta se rehidrató con 0,2 ml de DMEM libre de suero durante 2 h. Para examinar la quimiotaxis, la solución de

45 rehidratación fue eliminada y se añadieron 700 µl de DMEM que contiene FBS al 10 % a cada pocillo de la placa. Las células se trataron con tripsina, se lavaron dos veces con DMEM libre de suero y 5 x 10⁴ células se resuspendieron en 0,5 ml de DMEM libre de suero, se depositaron sobre la cámara superior y se incubaron a 37 °C durante 24 h, CO₂ al 5 % en un incubador de cultivo de tejidos humidificado. A continuación, se retiró el medio y las células restantes en el lado superior de la membrana se rasparon con un aplicador de punta de algodón y se lavó

50 dos veces con PBS. Las células invasoras que migraron al lado inferior y aquellas que crecen bajo la superficie inferior de la membrana se fijaron con una solución que contiene glutaraldehído 0,5 %, paraformaldehído 2 % y tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 30 min, se tiñeron con solución de Azul Tol y se montaron en portaobjetos de vidrio. Se contaron bajo el microscopio diez campos al azar por membrana (Nikon, Eclipse TE300, Japan; Digital Camera C4742-98, LUDL Electronic Products LTD, Hawthorne, NY) para determinar el número medio de células

55 invasoras. Los datos se expresaron como la media (± EEM) del número de células que llegan a la superficie inferior de la membrana en tres experimentos independientes (véase las Figuras 12, 13 y 17).

[0148] 00207 El análisis de la producción de PTHrP en los medios condicionados recogidos de diferentes líneas de células se realizó utilizando un ensayo inmunoradiométrico de la PTHrP (DSL-8100, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas) dirigidos contra la PTHrP1-86. Este tiene una sensibilidad de 0,3 pmol/l (3,0 pg/ml). El

60 medio acondicionado se recogió a intervalos de tiempo, se centrifugó para eliminar los restos y se almacenó a -80 °C hasta el ensayo. Se usó DMEM no condicionado, medio FBS al 10 % como blanco y se restó de todos los valores. Antes de la transfección con las isoformas de la PTHrP, las líneas celulares produjeron niveles variables de PTHrP, observándose el nivel más alto en células A375 y el más bajo en células PC3 y HPK1A. Las células

65 transfectadas produjeron invariablemente altos niveles de PTHrP como se muestra en la Tabla 1.

00208 Ejemplo 6**00209 Modelo de bloqueo condicional.**

5 **[0149]** 00210 Se desarrolló un modelo de bloqueo condicional en el que el gen PTHrP fue específicamente eliminado en las células epiteliales mamarias. En este modelo, se utilizó el sistema de recombinación Cre/LoxP para alterar la función PTHrP en el epitelio mamario de un modelo de ratón transgénico de cáncer de mama humano (PyVMT). En este modelo, la hiperplasia se produce a las 4-5 semanas, el adenocarcinoma a las 7-8 semanas y la metástasis pulmonar a las 12-13 semanas en 100 % de los animales. Los ratones portadores de un alelo PTHrP

10 condicional en el que el cuarto exón codificante estaba flanqueado por sitios de recombinación LoxP se retrocruzó en un fondo de FVB. Estos ratones se cruzaron primero con el modelo de tumor mamario PyVMT y luego con una cepa transgénica distinta que expresa Cre en el epitelio mamario (MMTV/Cre) en ambos casos en un fondo FVB. La escisión dirigida del alelo PTHrP se confirmó utilizando enfoques moleculares e histológicos. La eliminación de PTHrP en animales FVB normales no interfirió con la excrecencia ductal mamaria. La eliminación de PTHrP en

15 animales PyVMT retrasó significativamente la aparición de tumores, demostrado por análisis de Kaplan Meier (véase la Figura 21(A)). A la edad de 50 días, el 50 % de los animales de control (PyVMT-PTHrP^{flox/flox}-Cre⁻ y PyVMT-PTHrP^{+/+}-Cre⁺) tenían un tumor palpable en comparación con la edad de 67 días ($p < 0,005$) en los animales heterocigotos (PyVMT-PTHrP^{+/flox}-Cre⁺) y 78 días ($p < 0,001$) en los animales homocigotos (PyVMT-PTHrP^{flox/flox}-Cre⁺). Además el crecimiento tumoral se redujo significativamente con el tiempo con una reducción

20 significativa observada tanto en animales PyVMT^{flox/+}-Cre⁺ como PyVMT-PTHrP^{flox/flox}-Cre⁺ en todos los puntos temporales (Figura 21(A) y (B)). El peso del tumor en el sacrificio se redujo significativamente en animales homocigotos (67 ± 5 % $p < 0,001$) y heterocigotos (48 ± 8 % $p < 0,005$) (véase la Figura 21(A) y (B)). Por último, la diseminación metastásica a los pulmones en el sacrificio se observó en 14/14 animales control, 0/13 animales homocigotos y 6/14 animales heterocigotos. El análisis molecular e inmunohistoquímico de los tejidos tumorales

25 reveló una inhibición del 80 % de los marcadores de la progresión del tumor, incluyendo la ciclina D1, Neu/Erb2 y Ki67 en animales PyVMT-PTHrP^{flox/flox}-Cre⁺ homocigotos y una reducción del 40 % en animales PyVMT-PTHrP^{flox/+}-Cre⁺ heterocigotos.

00211 Referencias

- 30 **[0150]**
- 00212 Bagi C. Skeletal complications of malignancy - Third North American Symposium. IDrugs (2002) 5:553-556.
- 35 00213 Birch MA et al. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP) receptor expression and mitogenic responses in human breast cancer cell lines. Br J Cancer (1995) 72:90-5.
- 00214 Bouizar Z et al. Polymerase chain reaction analysis of parathyroid hormone-related protein gene expression in breast cancer patients and occurrence of bone metastases. Cancer Res (1993) 53:5076-8.
- 40 00215 Bundred et al. Parathyroid hormone related protein and hypercalcemia in breast cancer. Br Med J (1991) 303:1506-1509.
- 00216 Budayr AA et al. Increased serum levels of a parathyroid hormone-like protein in malignancy-associated hypercalcemia. Ann Intern Med (1989) 111:807-812.
- 45 00217 Campos RV et al. Differential expression of RNA transcripts encoding unique carboxy-terminal sequences of human parathyroid hormone-related peptide. Mol. Endocrinol (1994) 8:1656-66.
- 50 00215 Carron JA et al. PTHrP and the PTH/PTHrP receptor are co-expressed in human breast and colon tumors. Br J Cancer (1997) 76:1095-8.
- 00219 Christenson LJ et al. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. JAMA (2005) 294:681-690.
- 55 00220 Deftos LJ. Prostate carcinoma. Production of bioactive factors. Second North American Symposium on Skeletal Complications of Malignancy (1999).
- 00221 Diel IG et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. N Engl J Med (1998) 339:357-363.
- 60 00222 Fahn HJ et al. The incidence and prognostic significance of humoral hypercalcemia in renal cell carcinomas, J Urol (1991) 145:248-250.
- 65

- 00223 Grill V et al. Parathyroid hormone-related protein: elevated levels in both humoral hypercalcemia of malignancy and in hypercalcemia complicating metastatic breast cancer. Clin Endocrinol Metab (1991) 73:1309-1315.
- 5 00224 Grone A et al. Cloning and sequencing of the 3' region of the canine parathyroid hormone-related protein gene and analysis of alternative mRNA splicing in two canine carcinomas. Dornest. Anim. Endocrinol. (2002) 22(3):169-77.
- 10 00225 Gallwitz WE et al. Guanosine nucleotides inhibit different syndromes of PTHrP excess caused by human cancers in vivo. J. Clin. Invest (2002) 110:1559-72.
- 00226 Guise TA et al. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. J. Clin. Invest. (1996) 98:1544-49.
- 15 00227 Hall H1 et al. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. J. Am. Acad. Dermatol. (1999) 40:35-42.
- 00228 Hanahan D et al. The hallmarks of cancer. Cell (2000) 100:57-70.
- 20 00229 Harris JR et al. Diseases of the breast. Third edition. Philadelphia PA.Lippincot/Williams & Wilkins(2004) p971.
- 00230 Hortobagyi GN et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. N Engl J Med (1996)335:1785-1791.
- 25 00231 Insogna KL et al. Native and a synthetic analogue of the malignancy-associated parathyroid hormone-like protein have in vitro transforming growth factor-like properties. J Clin Invest (1989) 83:1057-1060.
- 30 00232 Iwamura M et al. Parathyroid hormone-related protein is an independent prognostic factor for renal cell carcinoma. Cancer (1999) 86:1028-1034.
- 00233 Kao PC et al. Parathyroid hormone-related peptide in plasma of patients with hypercalcemia and malignancy lesions. Mayo Clin Proc (1990) 65:1399-1407.
- 35 00234 Kissin MW et al. Parathyroid hormone related protein in breast cancer of widely varying prognostic. Eur J Surg Oncol (1993) 19:134-142.
- 00235 Kremer R et al. Parathyroid hormone related peptide in hematologic malignancies Am J Med (1996) 100:406-411.
- 40 00236 Kumari R et al. Nuclear targeting of a midregion PTHrP fragment is necessary for stimulating growth in breast cancer cells. Int J Cancer (2006) 119:49-59.
- 00237 Lauth M et al. Non-melanoma skin cancer, pathogenesis and mechanisms.Drug Discovery Today: Disease Mechanisms (2004) 1:267-72.
- 45 00238 Li J, Karaplis A, Siegel P, Papavasiliou V, Muller W, Kremer R. Conditional ablation of parathyroid hormone related peptide (hPTHrP) in mammary epithelial cells inhibits breast cancer progression, 29th Annual Meeting of the ASBMR, J Bone Miner Res 2007; 22S1: #1295,
- 50 00239 Liapis H et al. Expression of parathyroidlike protein in normal, proliferative and neoplastic human breast tissues. Am J Pathol (1993) 143:1169-78.
- 00240 Lichtman SS. Treatment of bone metastases - bisphosphonates and suture directions. 34th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology,
- 55 00241 Linforth R et al. Coexpression of parathyroid hormone related protein and its receptor in early breast cancer predicts poor patient survival. Clin Cancer Res (2002) 8:3172-3177.
- 60 00242 Manenti G et al. A cancer modifier role for parathyroid hormone-related protein. Oncogene (2000) 19:5324-28.
- 00243 Nishigaki Y et al. Increased serum and urinary levels of a parathyroid hormone-related protein COOH terminus in non-small cell lung cancer patients. Clin Cancer Res (1999) 5:1473-81.
- 65

- 00244 Nshibara M et al. Clinicopathological implications of parathyroid hormone-related protein in human colorectal tumors. *J Pathol* (1999) 187:217-222.
- 5 00245 Percherstorfer M et al. Parathyroid hormone-related protein and life expectancy in hypercalcemic cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* (1994) 76:1268-1270.
- 00246 Powell GJ et al. Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites. *Cancer Res* (1991) 51:3059-3061.
- 10 00247 Ralston S et al. Hypercalcaemia and metastatic bone disease: is there a causal link? *Lancet* (1982) 2:903-905.
- 00248 Ratcliffe WA et al. Immunoreactivity of plasma parathyrin-related peptide: three region specific radioimmunoassay and a two-site immunoradiometric assay compared. *Clin Chem* (1991) 37:1781-1787.
- 15 00249 Rhim JS et al. Neoplastic transformations of human keratinocytes by polybrene-induced DNA-mediated transfer of an activated oncogene. *Oncogene* (1989) 4:1403-1409,
- 20 00250 Rhim JS et al. Evidence for the multistep value of in vitro humans epithelial cell carcinogenesis. *Cancer Res.* (1990) 50:5653.
- 00251 Richard V et al. Quantitative evaluation of alternative promoter usage and 3' splice variants for parathyroid hormone-related protein by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem* (2003) 49:1398-1402.
- 25 00252 Roodman D. Mechanism of bone metastasis. *Engl. J. Med.* (2004) 350:1655-1664.
- 00253 Saito H et al. Humanized monoclonal antibody against parathyroid hormone-related protein suppresses osteolytic bone metastasis of human breast cancer cells derived from MDA-MB-231. *Anticancer Res* (2005) 25:3817-23.
- 30 00254 San Miguel JF et al. Prognostic factors and classification in multiple myeloma. *Br J Cancer* (1989) 59:113-118.
- 35 00255 Sato K et al. Treatment of malignancy-associated hypercalcemia and cachexia with humanized anti-parathyroid hormone-related protein antibody. *Semin Oncol* (2003) 30:167-173.
- 00256 Sellers RS et al. Alternative splicing of parathyroid hormone-related protein mRNA: expression and stability. *J Mol Endocrinol* (2004) 33:227-241.
- 40 00257 Shen X et al. Increased cell survival, migration invasion, and Akt expression overexpressing LoVo cancer cell lines. *Regul. Pept* (2007) Jan 10; 172:6526.
- 00258 Shen X et al. PTH-related protein enhances LoVo colon cancer cell proliferation, adh integrin expression. *Regul. Pept.* (2005) 125:17-27.
- 45 00259 Shen X et al. PTH-related protein enhances MCF-7 breast cancer cell adhesion, migr invasion via an intracrine pathway. *Exp. Cell Res.* (2004) 294:420-33.
- 50 00260 Shen X et al. PTH-related protein modulates PC-3 prostate cancer cell adhesion an subunit profile. *Mol. Cell Endocrinol.* (2003) 199:165-77.
- 00261 Shields JD et al. Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *British Journal of Cancer* (2004) 90:693-700.
- 55 00262 Southby J et al. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer. *Cancer Res* (1990) 50:7710-7716.
- 00263 Talon I et al. Antitumor effect of Parathyroid hormone-related protein neutralizing antibody in human renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* (2006) 27:73-83.
- 60 00264 Terkeltaub R et al. Parathyroid hormone-related proteins is abundant in osteoarthritis cartilage, and the parathyroid hormone-related protein 1-173 isoform is selectively induced by transforming growth factor beta in articular chondrocytes and suppresses generation of extracellular inorganic pyrophosphate. *Arthritis Rheum.* (1998) 41:2152-64.
- 65

00265 Truong UN et al. Parathyroid hormone related peptide (hPTHrP) is a prognostic indicator in hypercalcemic cancer patients with skeletal or extra skeletal metastasis. J Bone Miner Res (1999) 14;S189.

- 5 00266 Won C et al, Hypercalcemia in head and neck carcinoma. Incidence and prognosis. Cancer (1983) 52:2261-2263.

00267 Yoshida A et al. Significance of the parathyroid hormone-related protein expression in breast carcinoma. Breast Cancer (2000) 7:215-20.

- 10 00268 Aunque los aspectos preferidos de la presente invención se han descrito en detalle, se pueden hacer diversas modificaciones, alteraciones y cambios sin apartarse del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

- 15 Tabla 1. Producción de PTHrP en las diferentes líneas celulares antes y después de la transfección de las diversas isoformas.

Células	Producción de PTHrP* (pg/ml)
PC3/Vector	80±20
PC3/p139	23000±3000
PC3/p141	24000±3000
PC3/p173	25000±3500
Queratinocitos (NHK)	20±5
HPK1A/Vector	25±5
HPK1A/p141	14000±1500
HPK1A/p173	17000±2100
HPK1Aras	2300±310
A375/Vector	6000±500
A375/p139-GFP	25000±3000
A375/p141-GFP	25000±3000
A375/p173-GFP	25000±3000

*, Se usó un ensayo inmunoradiométrico (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas) específico para PTHrP1-86 (capaz de reconocer todas las isoformas) con una sensibilidad de 0,3 pmol/l (3,0 pg/ml) para medir los niveles de PTHrP en medios condicionados. Se usaron medios no condicionados (DMEM, FBS 10 %) como blanco y restaron de todos los valores.

0-1	Formulario PCT/RO/134 (SAFE) Indicaciones relativas al depósito de un microorganismo o de otro material biológico (PCT Regla 13bis)	
0-1-1	Preparado usando	PCT-SAFE [EASY mode] Versión 3.51.029.204 MT/FOP 20080701/0.20.5.12
0-2	Solicitud internacional N.º	PCT/CA 2008/0014778
0-3	Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	272476.00002
1	Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción:	
1-1	página	7
1-2	línea	14
1-3	Identificación del depósito	
1-3-1	Nombre de la institución de depósito	NMLHC National Microbiology Laboratory, Health Canada
1-3-2	Dirección de la institución de depósito	Federal Laboratories for Health Canada, Room H5190, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canada R3E, 3R2
1-3-3	Fecha de depósito	15 de agosto de 2007 (15.08.2007)
1-3-4	N.º de acceso	NMLHC 150807-02

1-5	Estados designados para los que se facilitan las indicaciones	Todos los designados
2	Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción:	
2-1	página	7
2-2	línea	16
2-3	Identificación del depósito	
2-3-1	Nombre de la institución de depósito	NMLHC National Microbiology Laboratory, Health Canada
2-3-2	Dirección de la institución de depósito	Federal Laboratories for Health Canada, Room H5190, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canada R3E, 3R2
2-3-3	Fecha de depósito	15 de agosto de 2007 (15.08.2007)
2-3-4	N.º de acceso	NMLHC 150807-01
2-5	Estados designados para los que se facilitan las indicaciones	Todos los designados
3	Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción:	
3-1	página	7
3-2	línea	18
3-3	Identificación del depósito	
3-3-1	Nombre de la institución de depósito	NMLHC National Microbiology Laboratory, Health Canada
3-3-2	Dirección de la institución de depósito	Federal Laboratories for Health Canada, Room H5190, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canada R3E, 3R2
3-3-3	Fecha de depósito	15 de agosto de 2007 (15.08.2007)
3-3-4	N.º de acceso	NMLHC 150807-03
3-5	Estados designados para los que se facilitan las indicaciones	Todos los designados
4	Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción:	
4-1	página	7
4-2	línea	20
4-3	Identificación del depósito	
4-3-1	Nombre de la institución de depósito	NMLHC National Microbiology Laboratory, Health Canada
4-3-2	Dirección de la institución de depósito	Federal Laboratories for Health Canada, Room H5190, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canada R3E, 3R2
4-3-3	Fecha de depósito	6 de agosto de 2008 (06.08.2008)
4-3-4	N.º de acceso	NMLHC 060808-01
4-5	Estados designados para los que se facilitan las indicaciones	Todos los designados
5	Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción:	
5-1	página	7
5-2	línea	22
5-3	Identificación del depósito	
5-3-1	Nombre de la institución de depósito	NMLHC National Microbiology Laboratory, Health Canada
5-3-2	Dirección de la institución de depósito	Federal Laboratories for Health Canada, Room H5190, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canada R3E, 3R2
5-3-3	Fecha de depósito	6 de agosto de 2008 (06.08.2008)
5-3-4	N.º de acceso	NMLHC 060808-02

5-5	Estados designados para los que se facilitan las indicaciones	Todos los designados
-----	---	----------------------

RESERVADO A LA OFICINA RECEPTORA

0-4	Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional	Sí
0-4-1	Funcionario autorizado	Veronique Chabaneau

5 RESERVADO A LA OFICINA INTERNACIONAL

0-5	Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el:	
0-5-1	Funcionario autorizado	

LISTADO DE SECUENCIAS

10 [0151]

<110> Kremer, Richard
Huang, Dao Chao

<120> PTHrP, sus isoformas y antagonistas de la misma en el diagnóstico y tratamiento de una enfermedad

<130> 272476/00001

<140> 11/889.969

<141> 17-08-2007

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1 <211> 58

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de oligonucleótidos basándose en la secuencia de la región N-terminal de los residuos de los aminoácidos 1 a 7 de la hPTHrP

<400> 1

caccagctgt gctgaacat cagctcttc aagaggag ctaggttca gacacagc 58

<210> 2

<211> 58

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de oligonucleótidos basándose en la secuencia de la región N-terminal de los residuos de los aminoácidos 1 a 7 de la hPTHrP

<400> 2

aaaagctgtg tctgaacatc agctctctc ttgaaggagc tgatgttcag acacagct 58

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región N-terminal de los residuos de los aminoácidos 1 a 7 de la hPTHrP

5 <400> 3

Ala Val Ser Glu His Gln Leu
 1 5

<210> 4
 <211> 58
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de oligonucleótidos basándose en la secuencia del extremo 3' no traducida de la hPTHrP 1-139 en el exón VII

15 <400> 4

caccataaca ggcttctctg gcccgatc aagagatacg gccagagaa gcctgtta 58

<210> 5
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de oligonucleótidos basándose en la secuencia del extremo 3' no traducida de la hPTHrP 1-139 en el exón VII

<400> 5

aaaataacag gcttctctgg ccgctatc ttgaatacgg gccagagaag cctgttat 58

<210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Extremo 3' no traducida de la hPTHrP 1-139 en el exón VII

30 <400> 6

caccataaca ggcttctctg gcccgta 27

<210> 7
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de oligonucleótidos basándose en los aminoácidos 140-141 y en la secuencia del extremo 3' no traducida de la hPTHrP 1-141 en el exón IX

<400> 7

caccaaggca ttgaaattt cagcagatc aagagatctg ctgaaaattt caatgcct 58

<210> 8
 <211> 58
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de oligonucleótidos basándose en los aminoácidos 140-141 y en la secuencia del extremo 3' no traducida de la hPTHrP 1-141 en el exón IX

<400> 8
 aaaaaggcat tgaaatttc agcagatcgc ttgaatcgc tgaaaatttc aatgcctt 58

5 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Extremo 3' no traducida de la hPTHrP 1-141 en el exón IX

<400> 9
 caccaaggca ttgaaatttt cagcaga 27

<210> 10
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de oligonucleótidos basándose en la secuencia de la región C terminal de la hPTHrP1-173

<400> 10
 caccaacagc actctgtgg ggttgatgc aagagatcaa accccacaga agtgctgt 58

<210> 11 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de oligonucleótidos basándose en la secuencia de la región C terminal de la hPTHrP1-173

<400> 11
 aaaaacagca cttctgtggg gtttgatcgc ttgaatcaaa cccacagaa gtgctgtt 58

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Aminoácidos 140-146 de la hPTHrP

30 <400> 12

Thr Ala Leu Leu Trp Gly Leu
 1 5

<210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 13
 agacgatgca gcggagactg gttca 25

 <210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Cebador PCR

 <400> 14
 ccagagaagc ctgtaccgt gaatcg 26

 <210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador PCR

 <400> 15
 ggtctctgct gaaaattca atgcc 25

 <210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador PCR

 <400> 16
 gcaggatagg tcattcactg tgctc 25

 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador PCR

 <400> 17 18
 atggggaccg cccggatc 18

 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador PCR
 35
 <400> 18 71
 tcacatgact gtctccact c 21

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado capaz de unirse a un epítipo de una porción C-terminal de una isoforma PTHrP1-173, la porción C-terminal consistiendo en los residuos aminoacídicos 151 a 169.
- 5 2. Un anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la isoforma PTHrP1-173 es la isoforma PTHrP1-173 humana.
3. Un anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es monoclonal.
- 10 4. Uso de una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo de una porción C-terminal de una isoforma PTHrP1-173 para el diagnóstico *in vitro* de un cáncer, consistiendo la porción C-terminal en los residuos aminoacídicos 151 a 169.
- 15 5. Uso de una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo de una porción C-terminal de una isoforma PTHrP1-173 para inhibir la actividad de la isoforma PTHrP1-173 *in vitro*, la porción C-terminal consistiendo en los residuos aminoacídicos 151 a 169.

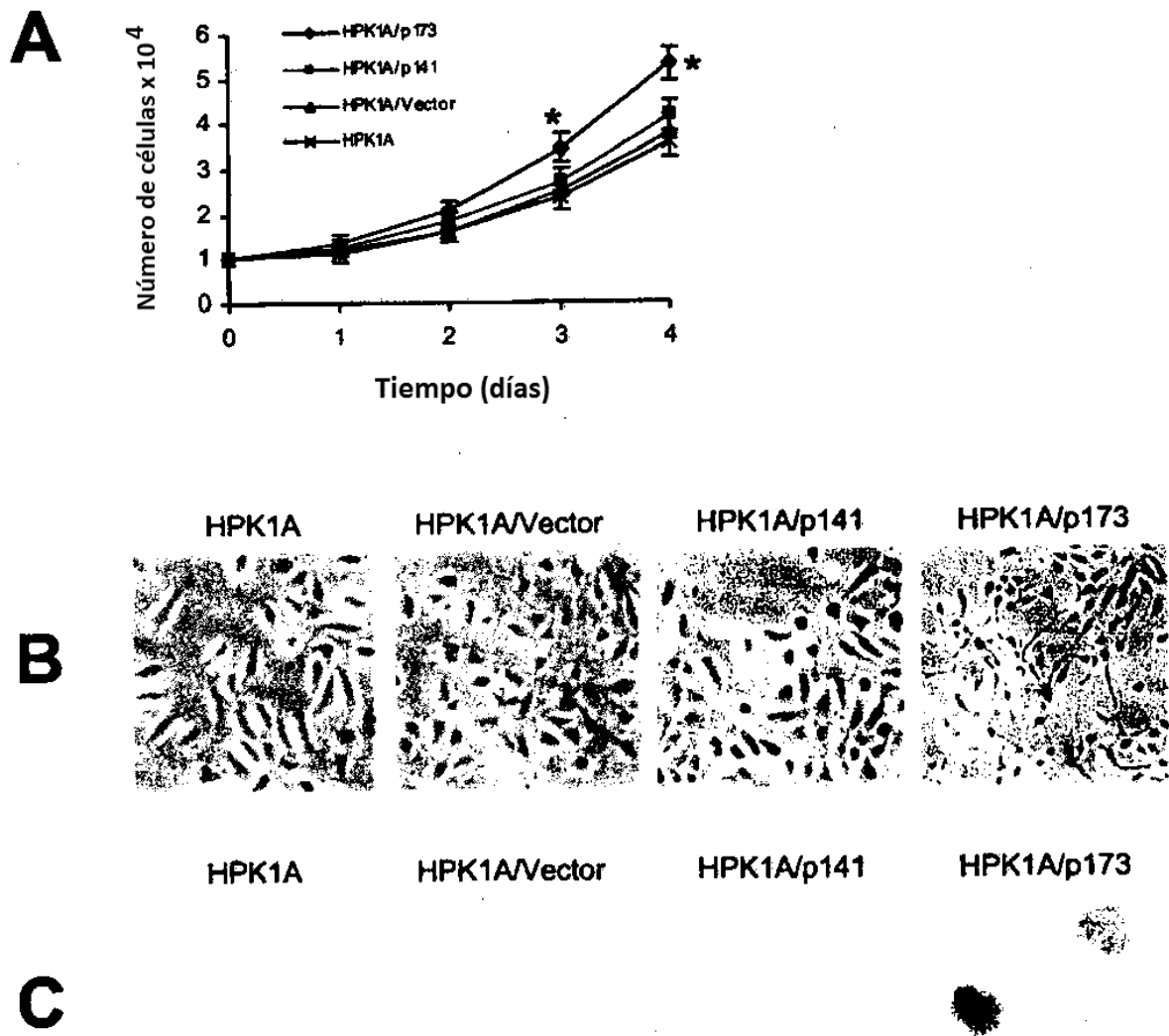
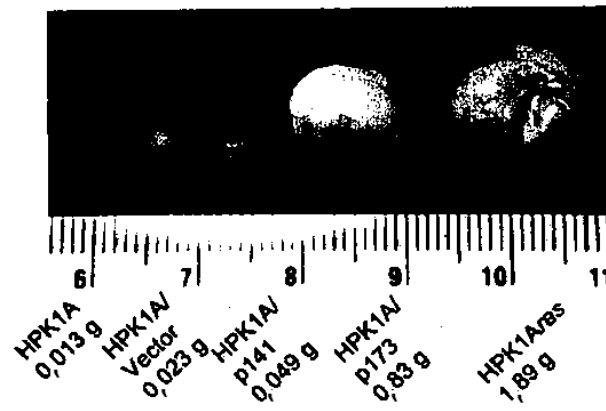


FIGURA 1

A



B

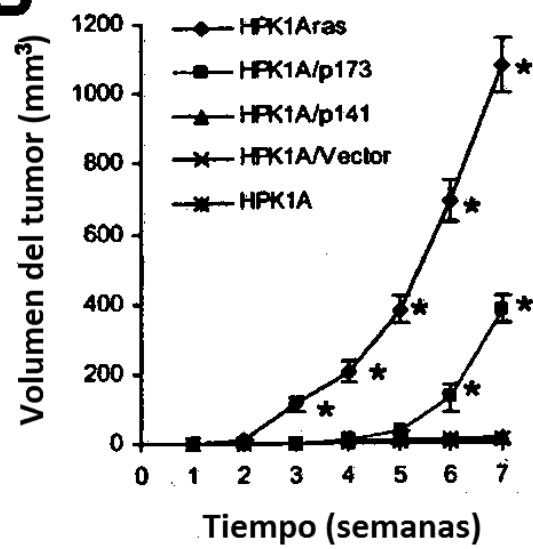
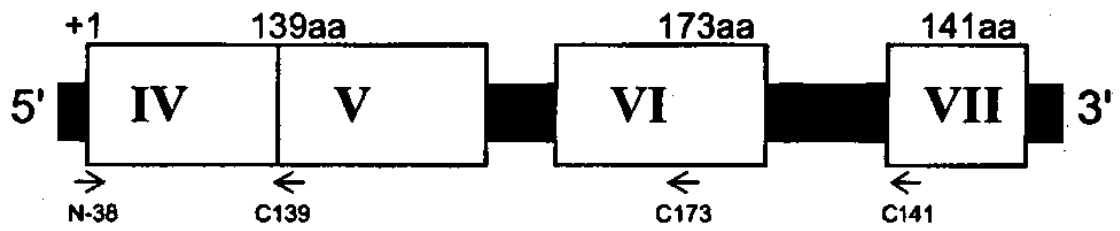


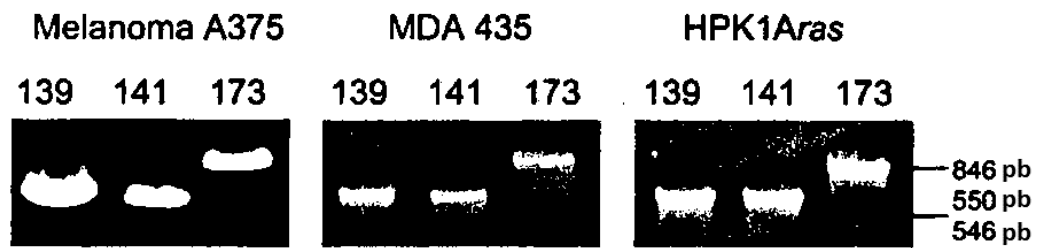
FIGURA 2

A



B

Isoformas de la PTHrP



C



FIGURA 3

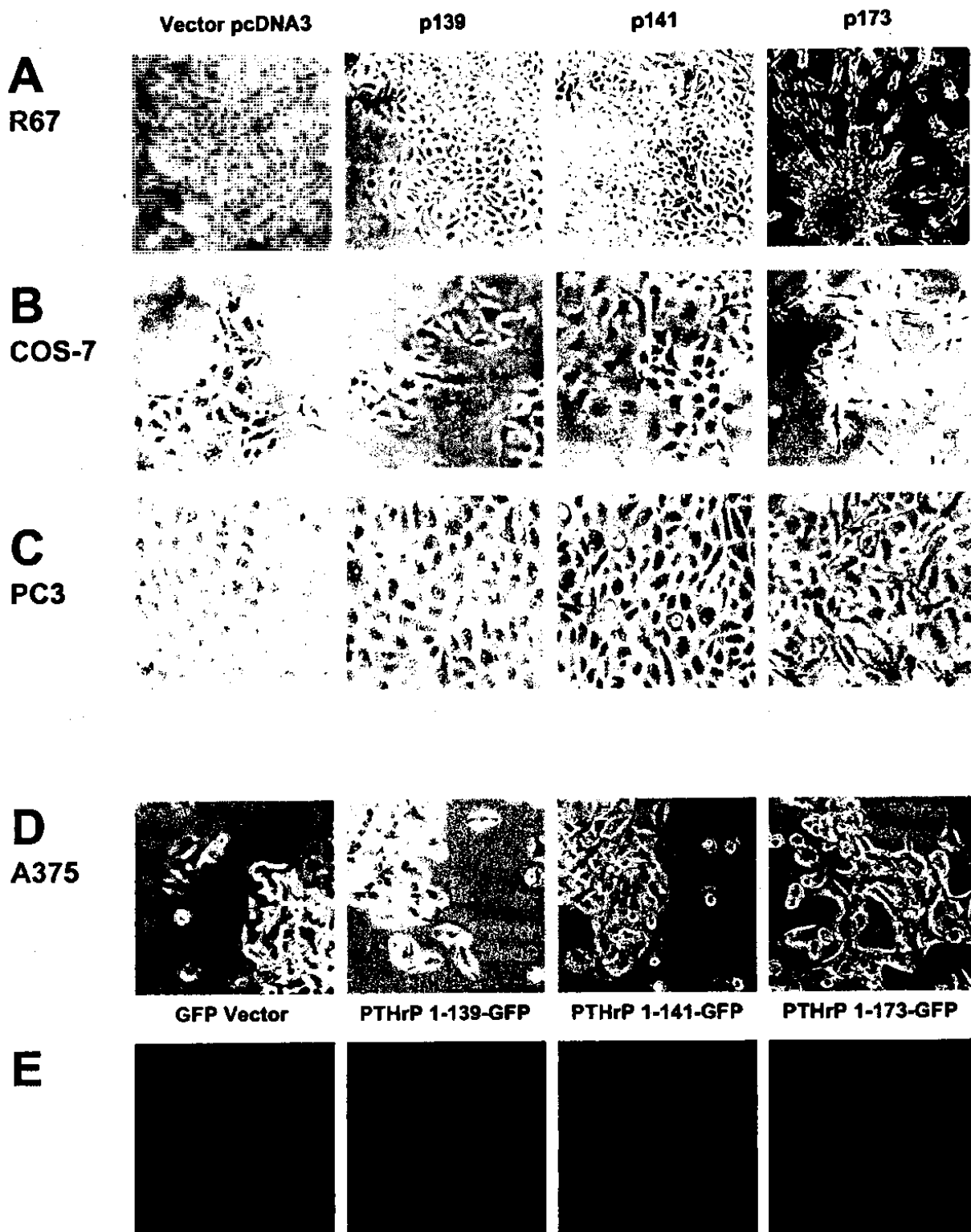


FIGURA 4

Figura 5. Caracterización de anticuerpos monoclonales.

Antígeno PTHrP	Clon de Acm	Subclase de isotipo	Aplicación		
			ELISA	IHC	WB
1-33	158	IgG3	+	+	+
	M45	IgMk	+	n.d	n.d
140-173	104	IgG2bk	+	+	+
	M18	IgMk	+	n.d	n.d
151-169	6	IgG1k	+	+	n.d

ELISA: ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas

IHC: inmunohistoquímica

WB: transferencia Western

n.d: no determinado

Anticuerpos monoclonales

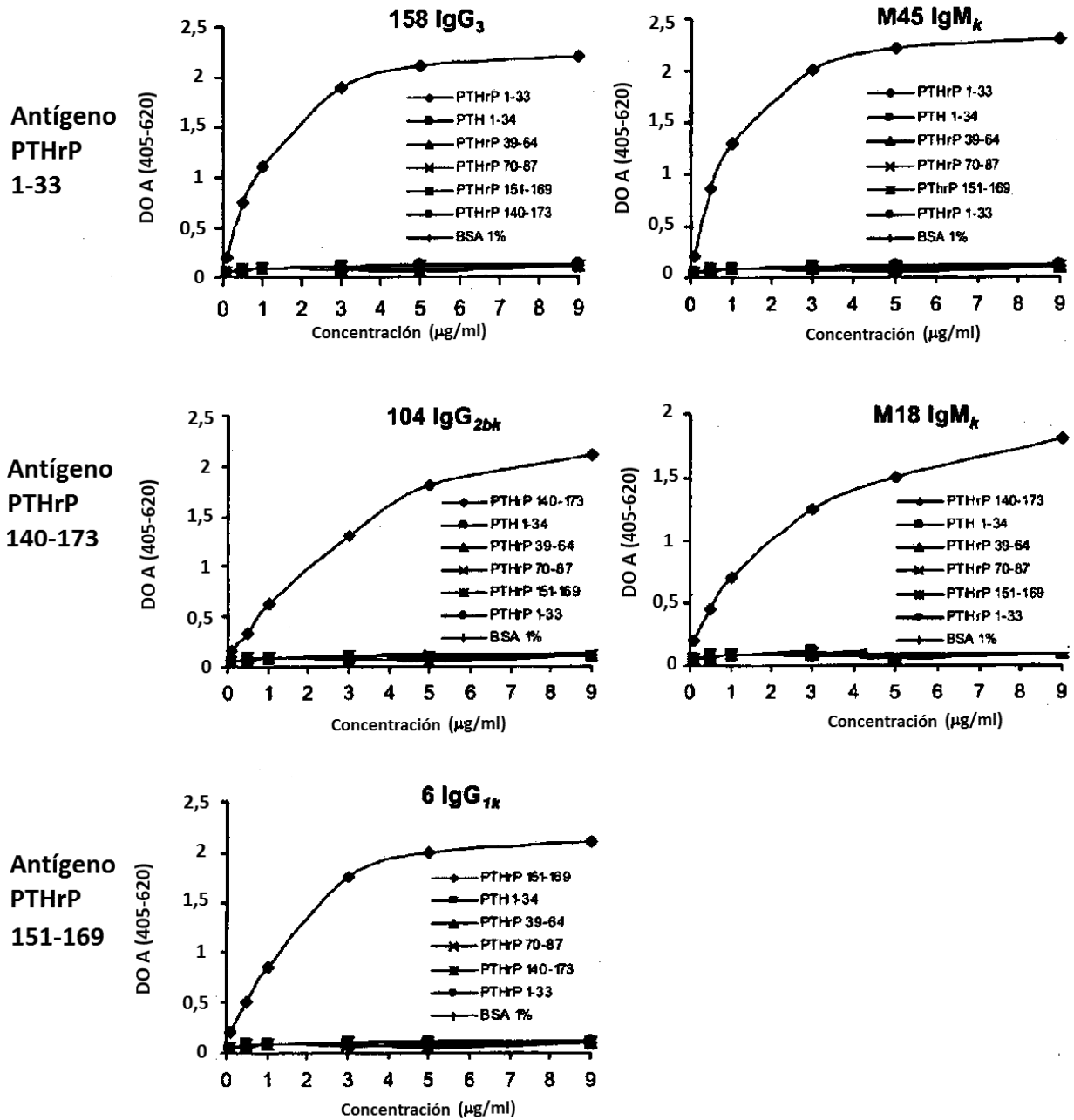


FIGURA 6

Análisis de transferencia Western

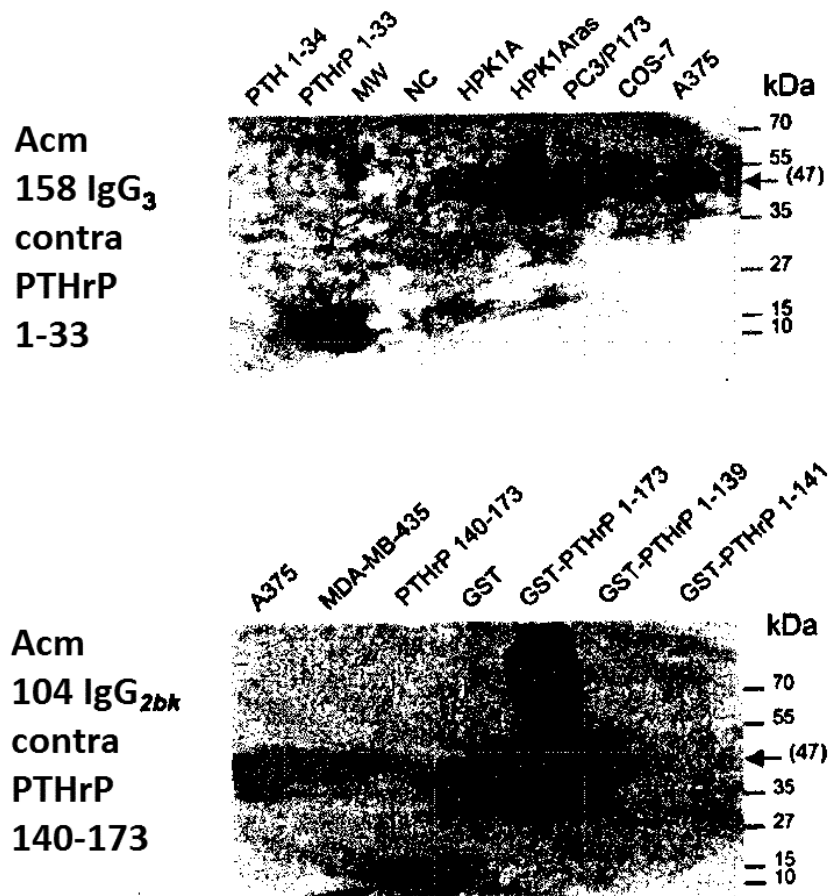


FIGURA 7

A

Anticuerpos monoclonales

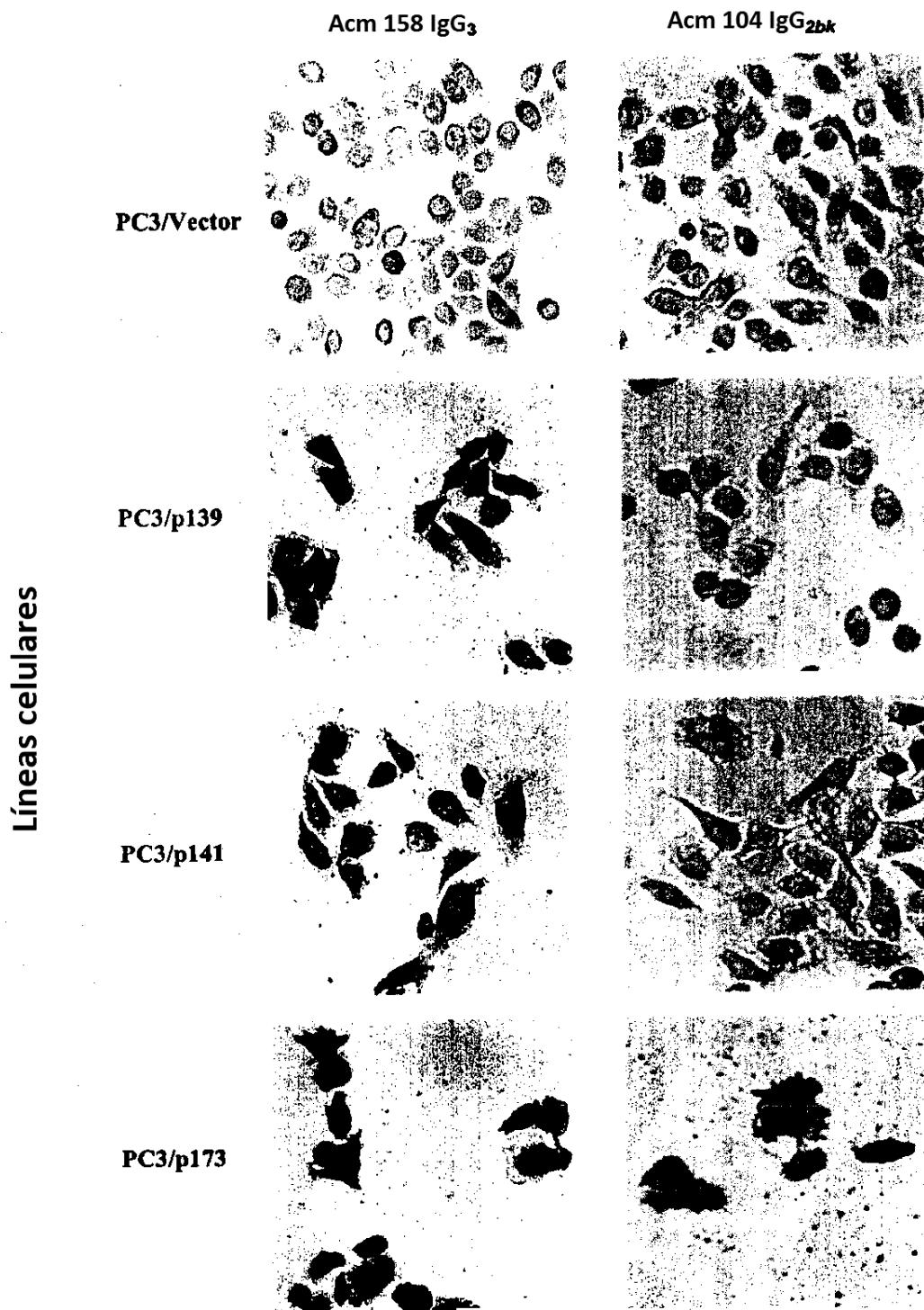


FIGURA 8 (1/2)

B

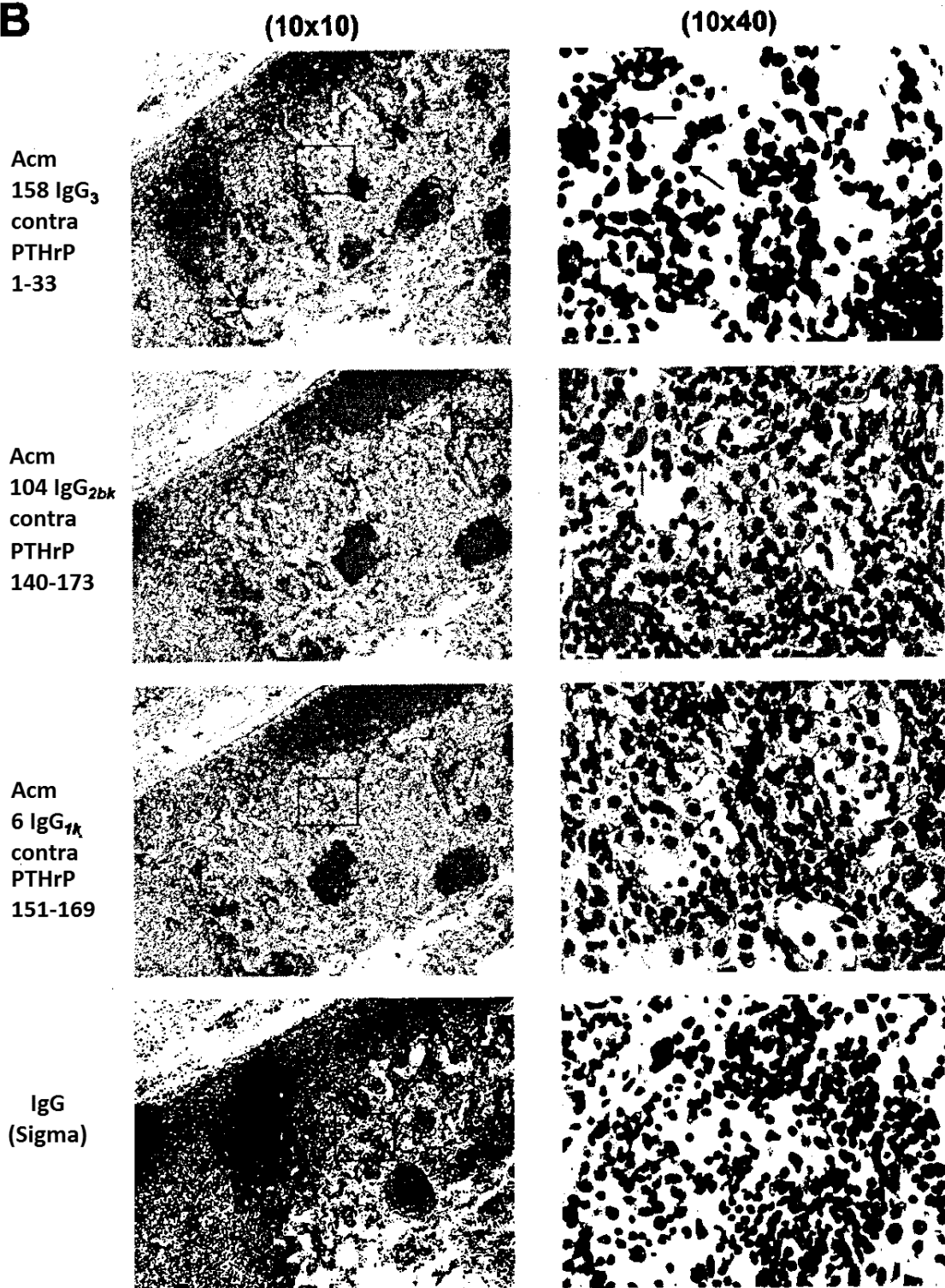
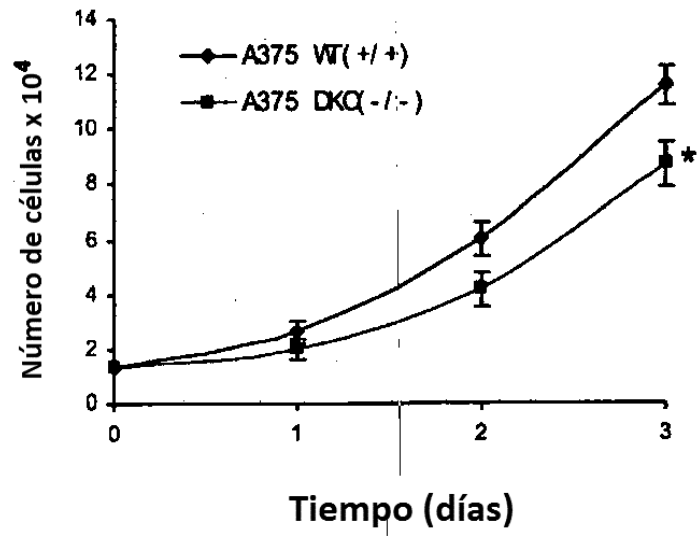


FIGURA 8 (2/2)

Figura 9.

Sitio metastásico	Pulmón	Hígado	Riñón	Páncreas	Músculo cardíaco	Intra- ventricular	Ganglio linfático	Hueso
WT (+/+) A375	12/14	12/14	7/14	6/14	7/14	0/14	10/14	12/14
DKO (-/-) A375	6/14	5/14	0/14	0/14	0/14	5/14	5/14	10/14

A



B

Invasión de Matrigel 3-D (24 h)
(Membrana inferior Corning Costar)

A375 WT(+/+)



A375 DKO(-/-)

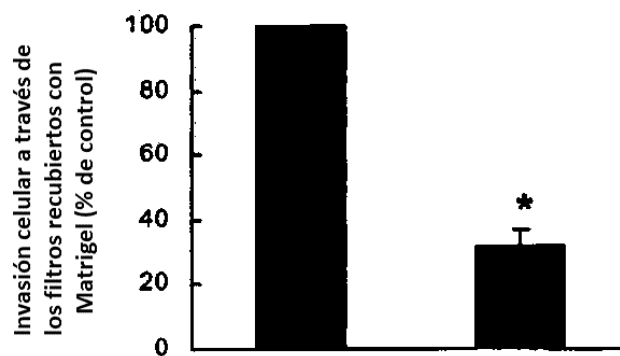
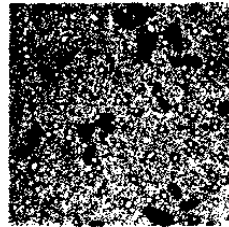


FIGURA 10

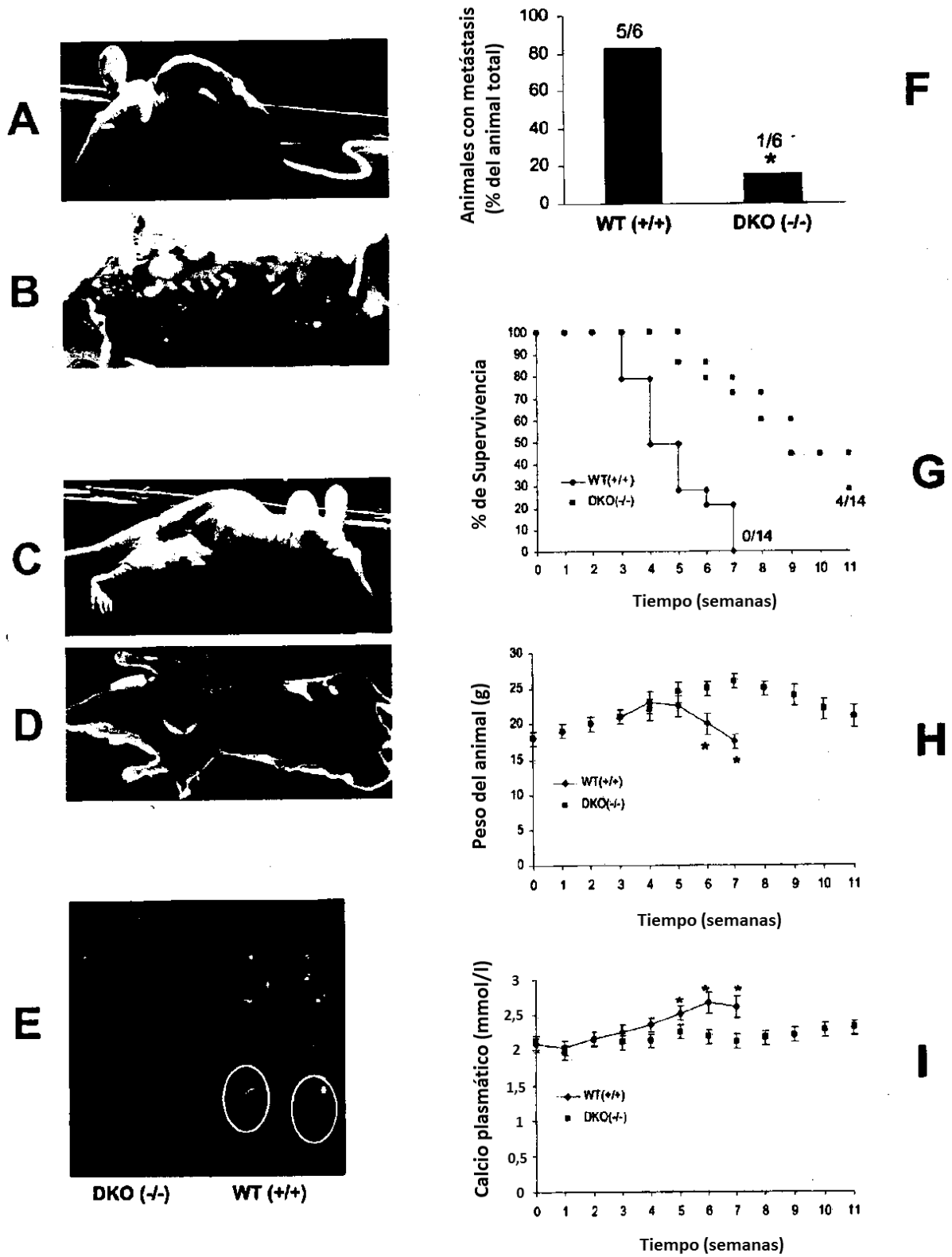


FIGURA 11

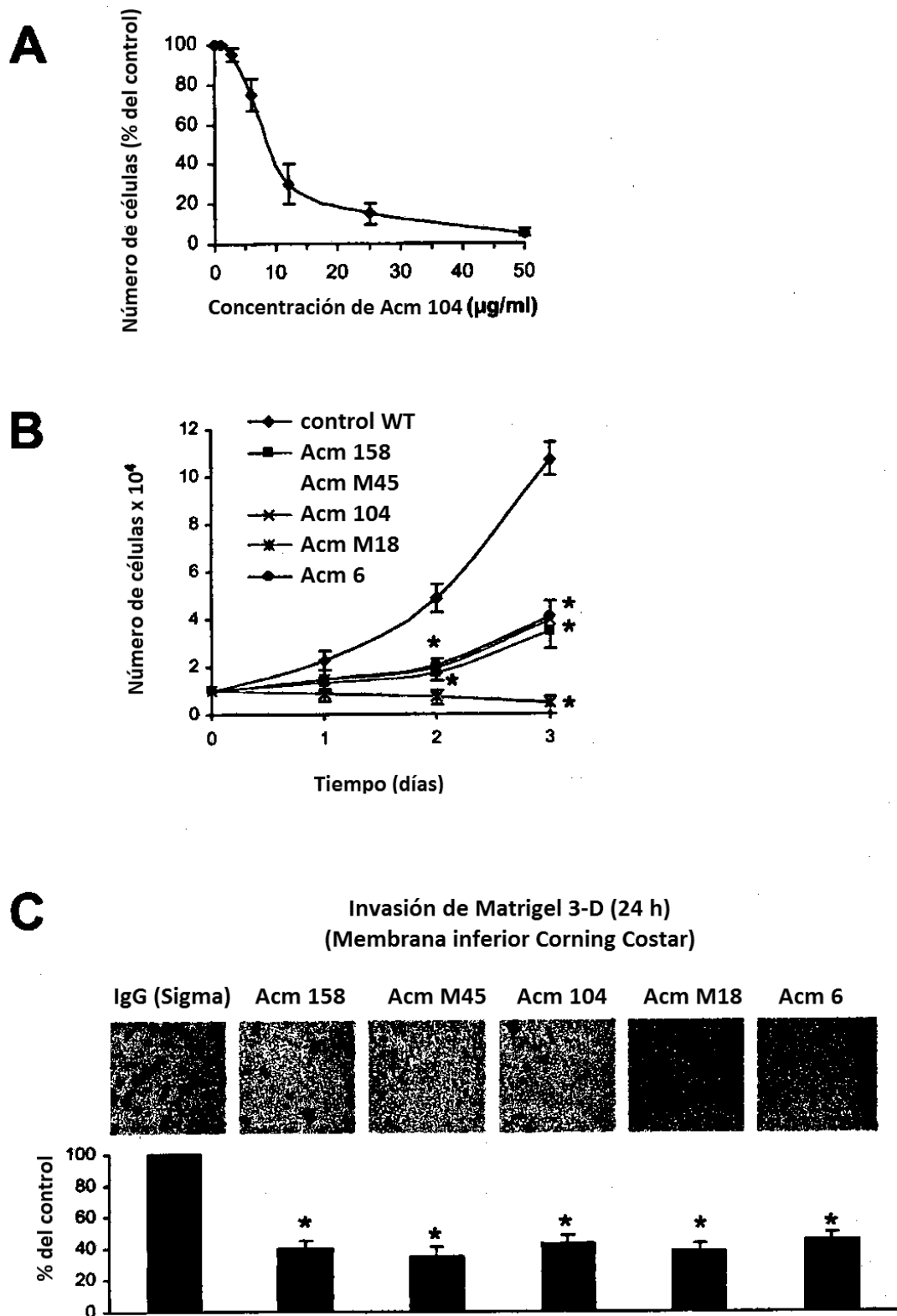
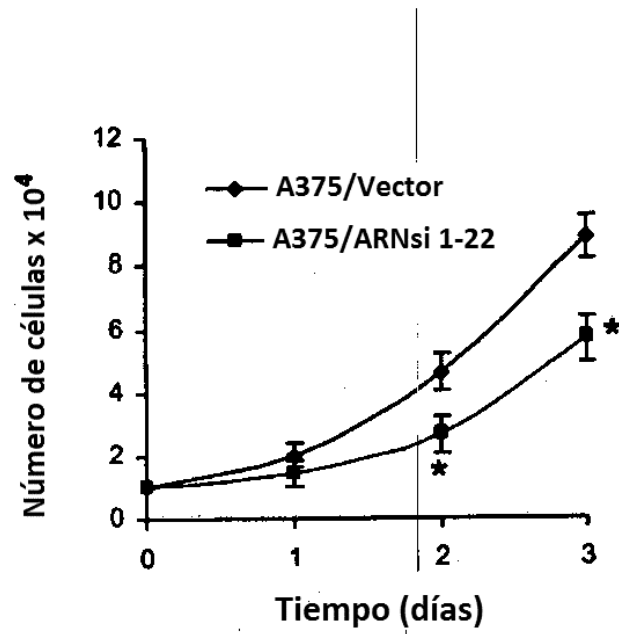


FIGURA 12

A



B

Invasión de Matrigel 3-D (24 h)
(Membrana inferior Corning Costar)

A375/Vector

A375/ARNsi 1-22

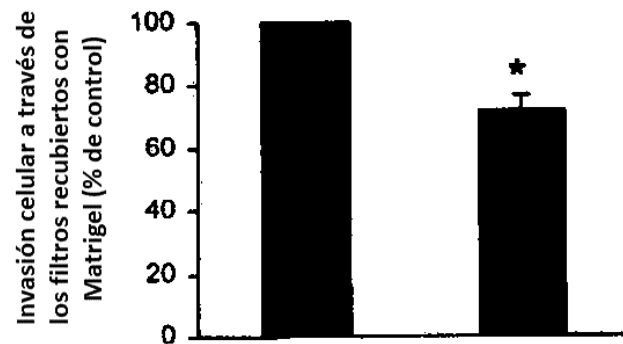
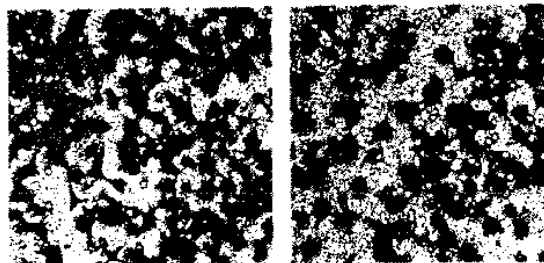


FIGURA 13

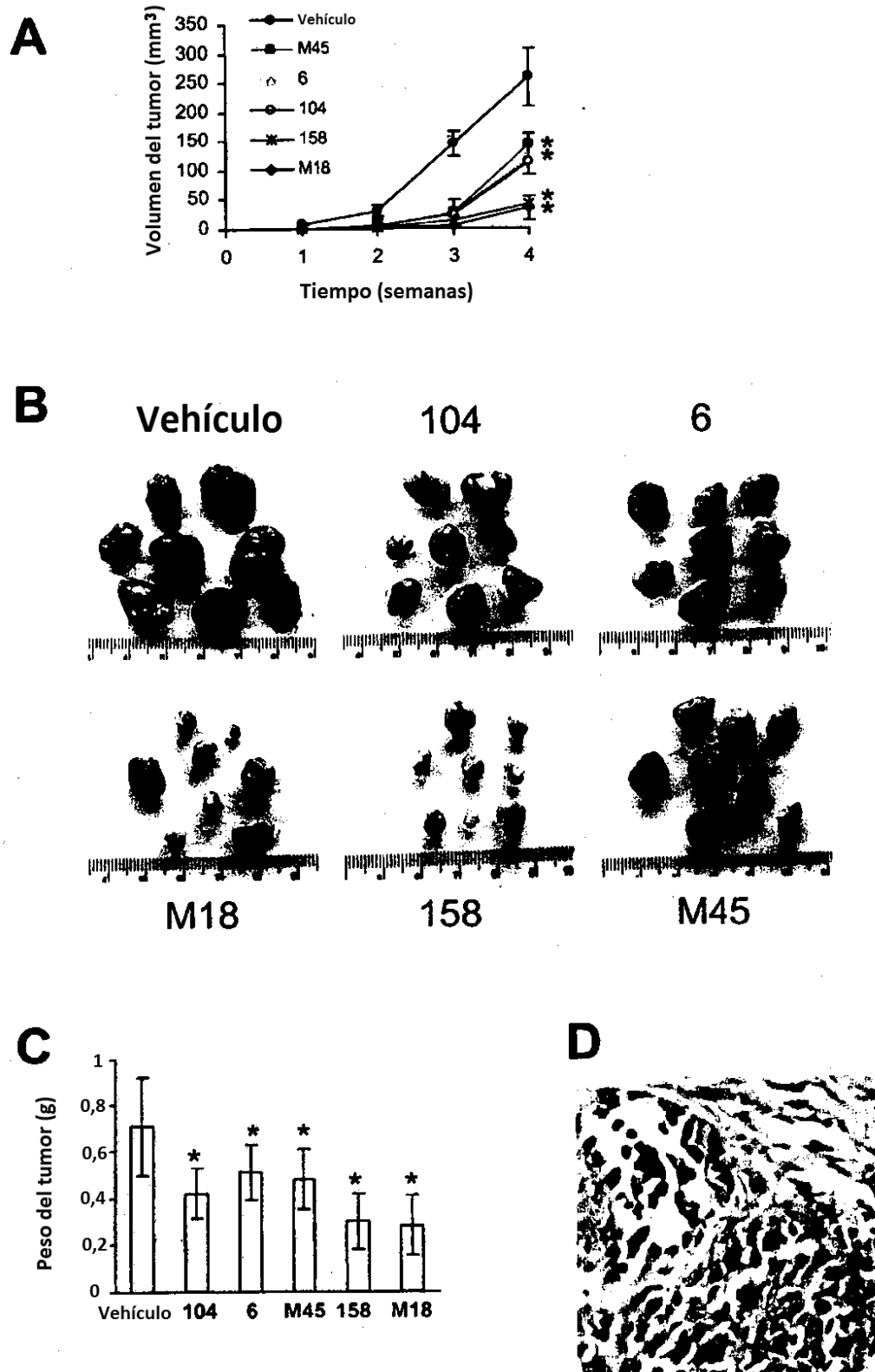


FIGURA 14

A

Metástasis macroscópicamente visibles en la autopsia 4 meses después de la inyección intracardíaca de células A375

	Hallazgos en la autopsia (metástasis)
M45 (Acm específico de la PTHrP 1-33)	3/10 (30%)
M18 (Acm específico de la PTHrP 140-173)	2/11 (18%)

B

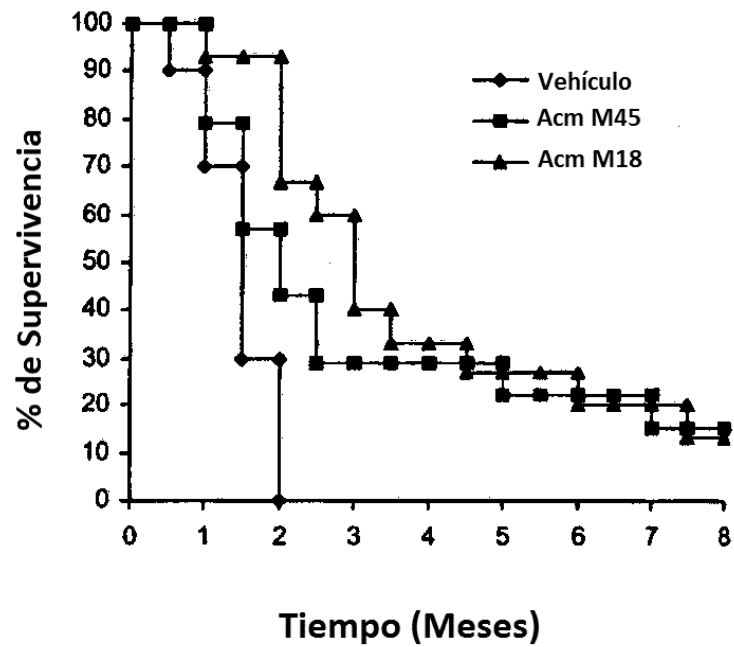


FIGURA 15

Figura 16. Recurrencia de la diseminación metastásica 4 meses (a los 8 meses de edad) tras la suspensión del tratamiento con anticuerpos monoclonales en ratones nu/nu trasplantados con células A375 en el ventrículo izquierdo

	Número de animales vivos (a los 7-8 meses)	Hallazgos de la autopsia (metástasis)
M45 (Acm específico de la PTHrP 1-33)	4/14 (28%)	2/4* (50%)
M18 (Acm específico de la PTHrP 140-173)	4/15 (27%)	0/4° (0%)

*** , 1 animal con tumor renal, 1 animal con tumor hepático;**

° , Sin signos de diseminación metastásica en todos los órganos examinados.

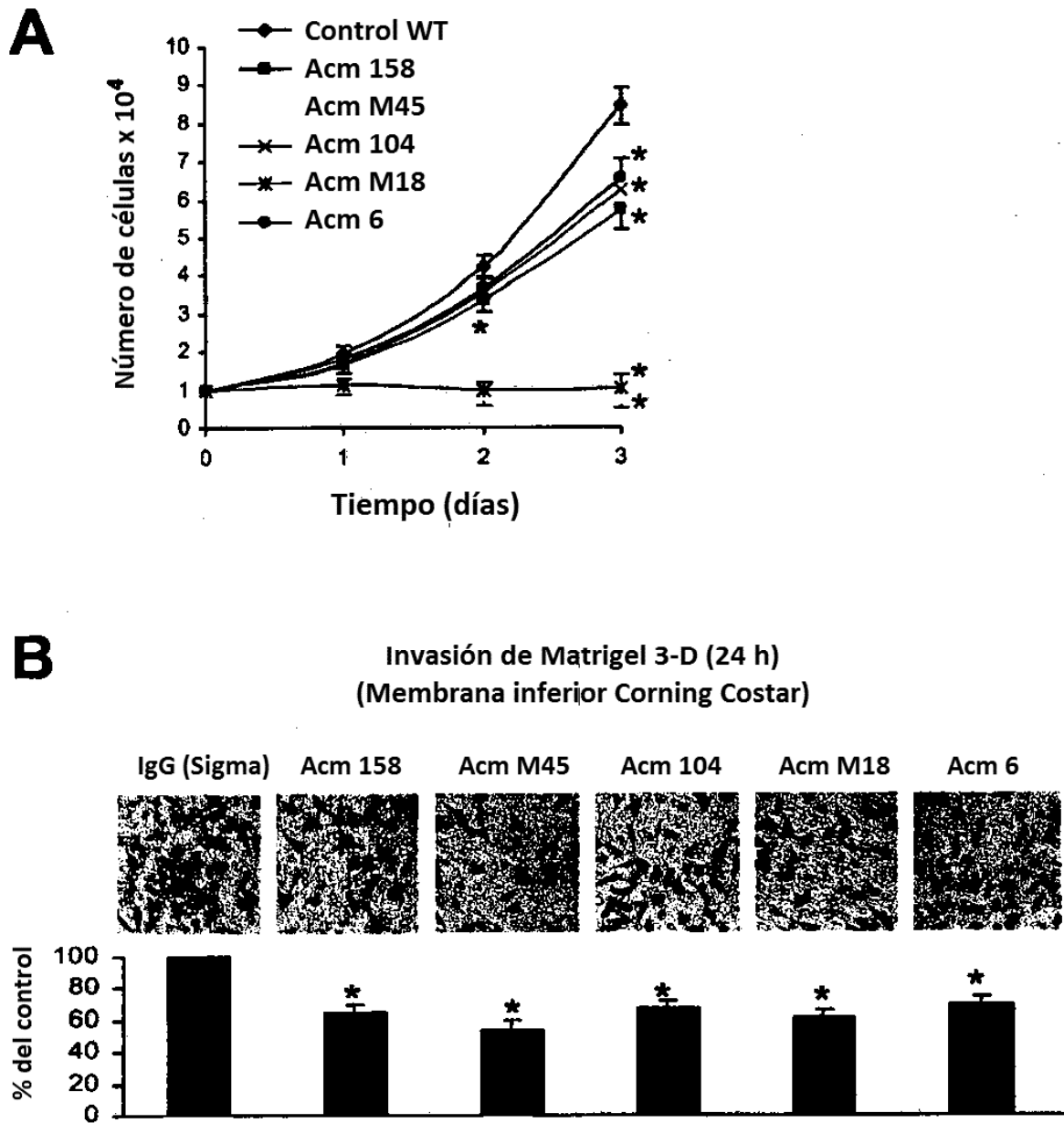


FIGURA 17

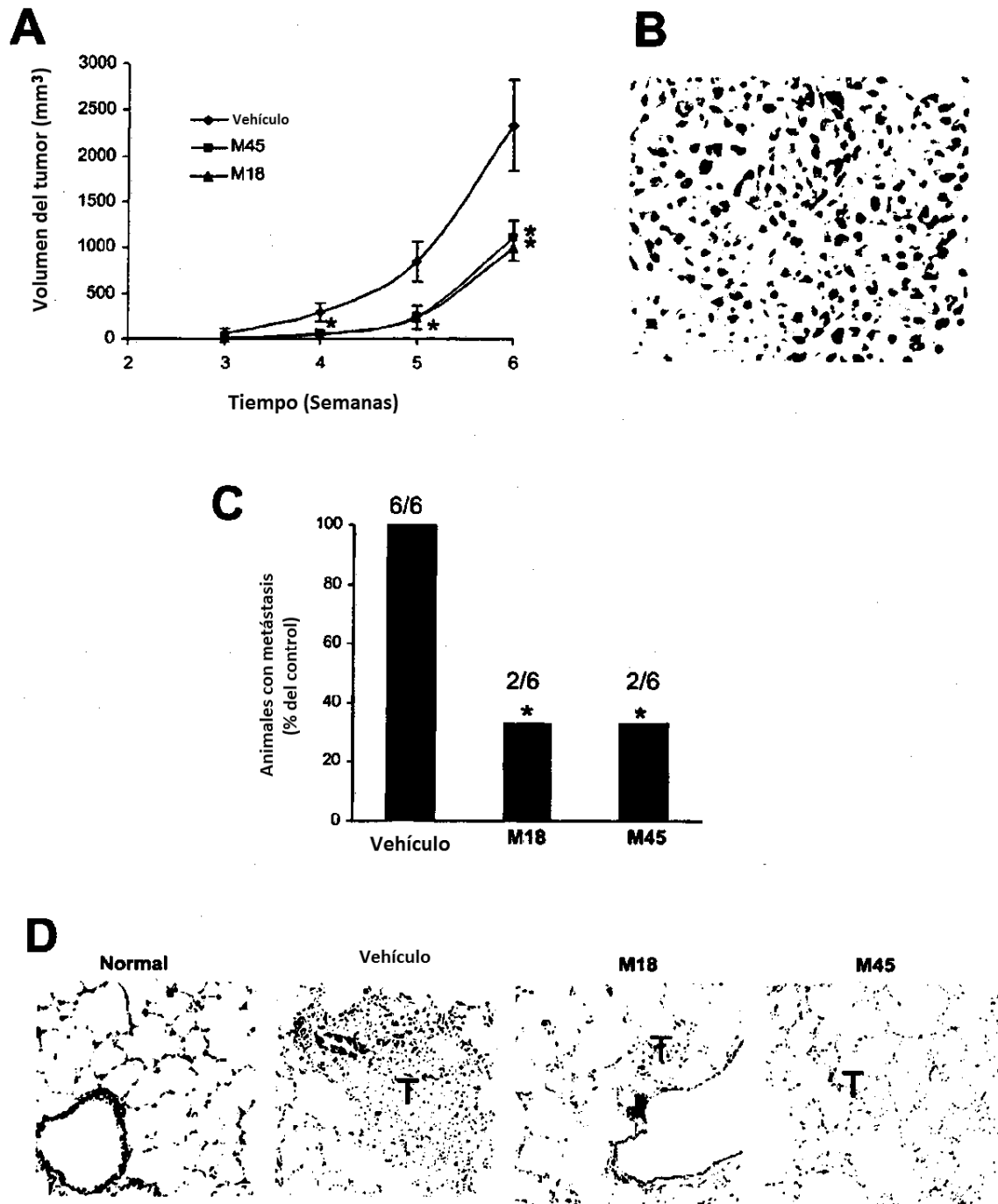


FIGURA 18

A

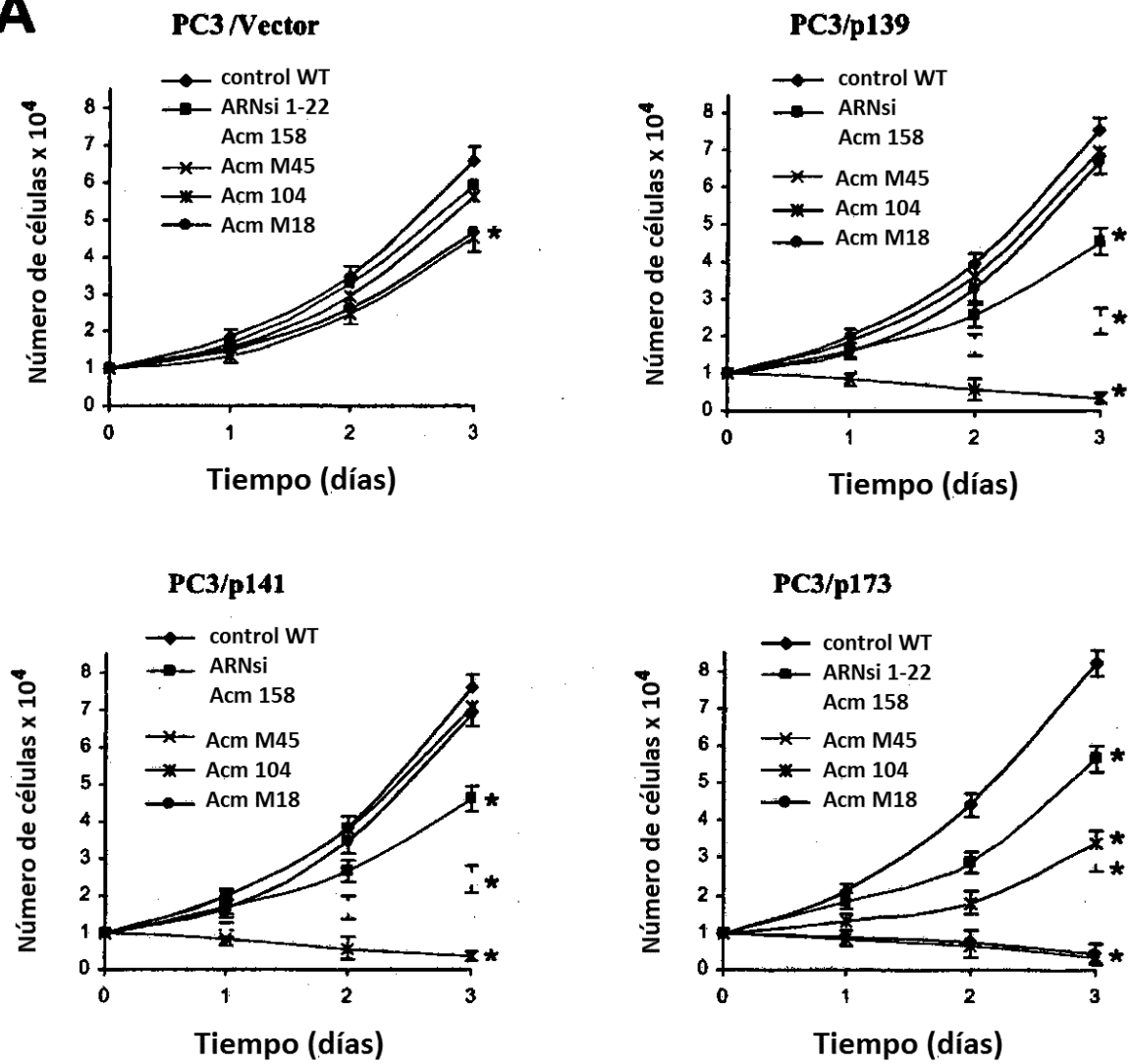


FIGURA 19 (1/2)

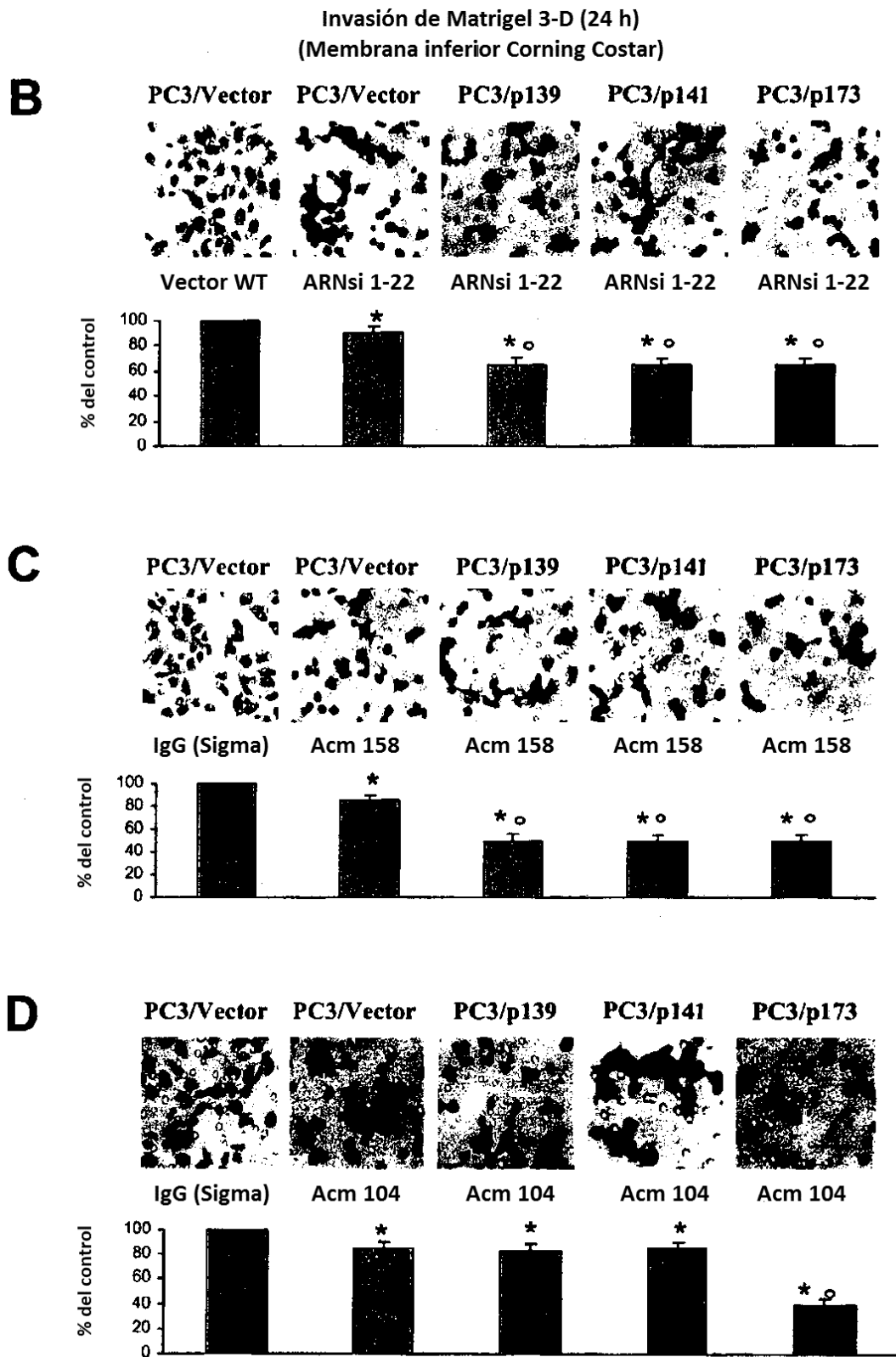


FIGURA 19 (2/2)

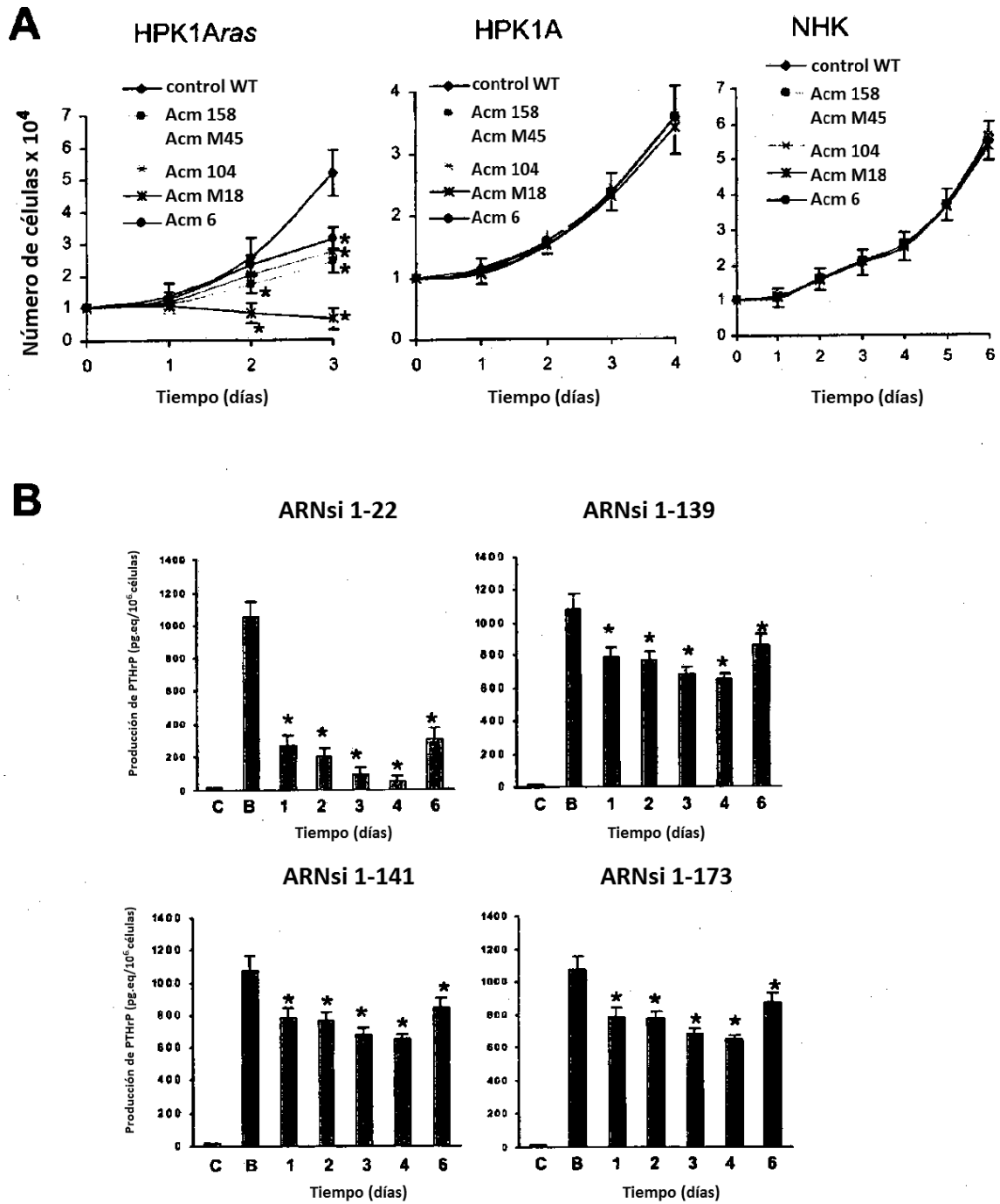
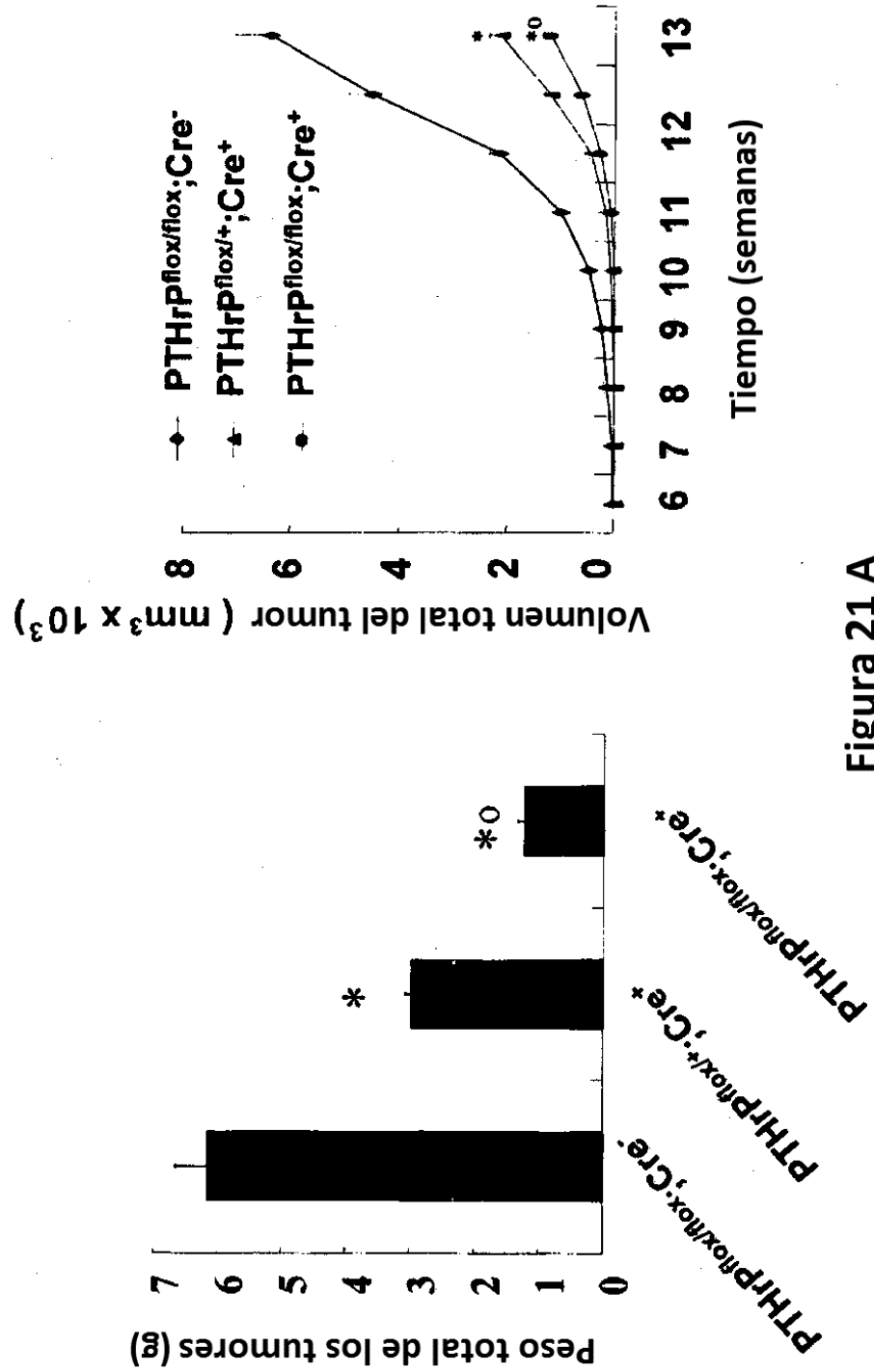


FIGURA 20

Análisis del crecimiento tumoral a lo largo del tiempo y peso del tumor al sacrificio (13 semanas) en ratones control, heterocigotos y homocigotos



Análisis de Kaplan-Meier de la aparición del tumor en ratones control, heterocigotos y homocigotos

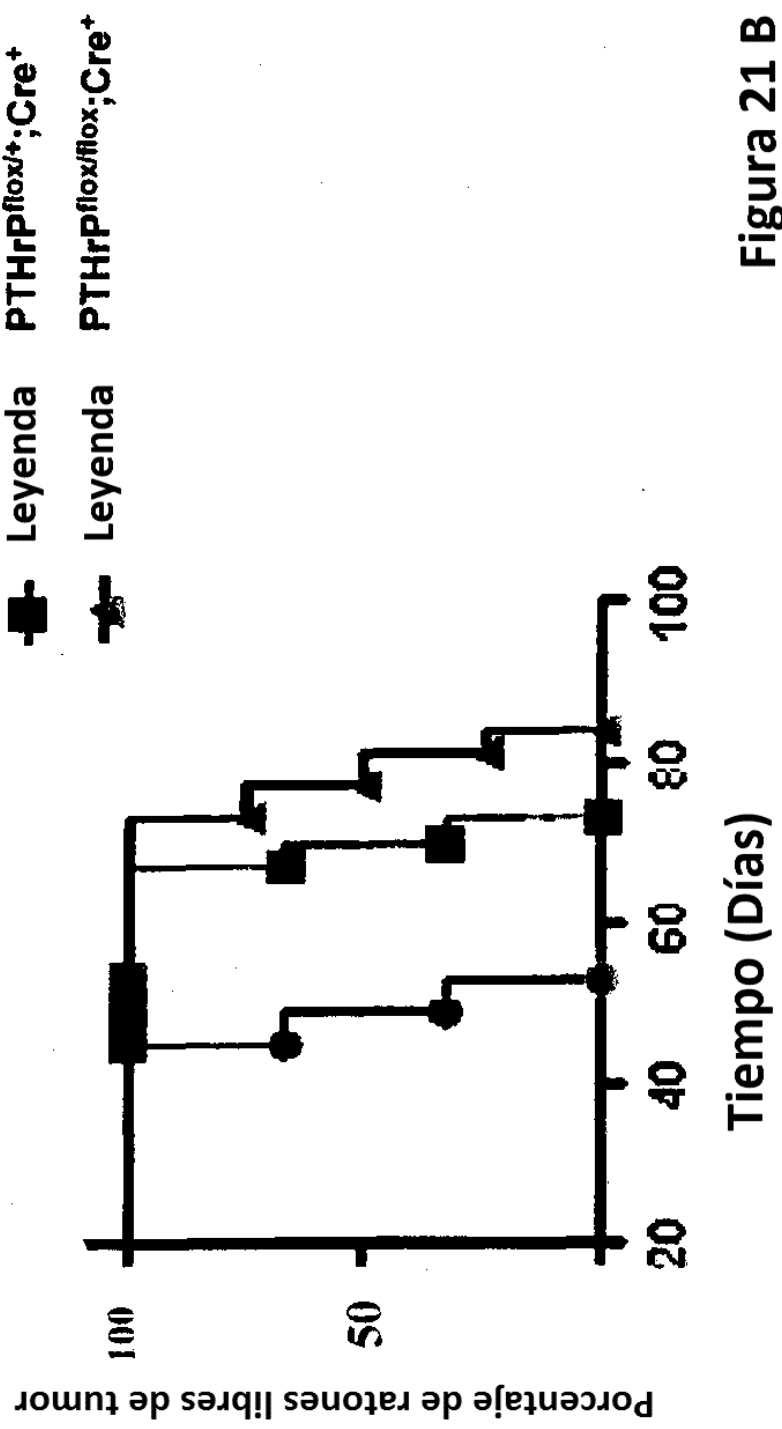


Figura 21 B

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 4683195 A [0048]
- US 4683202 A [0048]
- US 4965188 A [0048]
- US 5614396 A [0061]
- US 4816567 A [0084]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- ANDERSON ; YOUNG. Quantitative Filter Hybridization. *Nucleic Acid Hybridization*, 1985 [0042]
- SAMBROOK et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0042]
- KOHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0080]
- GODING. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, 1986, 59-103 [0080]
- HARDY RR et al. Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific, 13.1 [0080] [0094]
- the Scatchard analysis of Munson and Pollard. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107 (220 [0081]
- MORRISON. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0084]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Pub. Co. N.J, 1991 [0086]
- HALL HI et al. *J Am Acad Dermatol*, 1999, vol. 40, 35 [0103]
- SHIELDS JD et al. *Br J Cancer*, 2004, vol. 90, 693 [0103]
- EL ABDAIMI et al. *Am J Physiol*, 2000, vol. 279, C1230 [0103]
- SASAKI et al. *Cancer Res*, 1995, vol. 55, 3551 [0116]
- HARRIS JR et al. Diseases of the breast. Lippincott/Williams & Wilkins, 2004, 971 [0121]
- SOUTHBY J et al. *Cancer Res*, 1990, vol. 50, 7710 [0121]
- GRILL V et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, vol. 73, 1309 [0121]
- BUNDRED NJ et al. *Br Med J*, 1991, vol. 303, 1506 [0121]
- ROODMAN D. *N Engl J Med*, 2004, vol. 350, 1655 [0125]
- DEFTOS LJ. *Cancer*, 2000, vol. 88, 3002 [0125]
- CHRISTENSON LJ et al. *JAMA*, 2005, vol. 294, 681 [0126]
- BAGI C. Skeletal complications of malignancy - Third North American Symposium. *IDrugs*, 2002, vol. 5, 553-556 [0150]
- BIRCH MA et al. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP) receptor expression and mitogenic responses in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer*, 1995, vol. 72, 90-5 [0150]
- BOUIZAR Z et al. Polymerase chain reaction analysis of parathyroid hormone-related protein gene expression in breast cancer patients and occurrence of bone metastases. *Cancer Res*, 1993, vol. 53, 5076-8 [0150]
- BUNDRED et al. Parathyroid hormone related protein and hypercalcemia in breast cancer. *Br Med J*, 1991, vol. 303, 1506-1509 [0150]
- BUDAYR AA et al. Increased serum levels of a parathyroid hormone-like protein in malignancy-associated hypercalcemia. *Ann Intern Med*, 1989, vol. 111, 807-812 [0150]
- CAMPOS RV et al. Differential expression of RNA transcripts encoding unique carboxy-terminal sequences of human parathyroid hormone-related peptide. *Mol. Endocrinol*, 1994, vol. 8, 1656-66 [0150]
- CARRON JA et al. PTHrP and the PTH/PTHrP receptor are co-expressed in human breast and colon tumors. *Br J Cancer*, 1997, vol. 76, 1095-8 [0150]
- CHRISTENSON LJ et al. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA*, 2005, vol. 294, 681-690 [0150]
- DEFTOS LJ. Prostate carcinoma. Production of bioactive factors. *Second North American Symposium on Skeletal Complications of Malignancy*, 1999 [0150]
- DIEL IG et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med*, 1998, vol. 339, 357-363 [0150]
- FAHN HJ et al. The incidence and prognostic significance of humoral hypercalcemia in renal cell carcinomas. *J Urol*, 1991, vol. 145, 248-250 [0150]
- GRILL V et al. Parathyroid hormone-related protein: elevated levels in both humoral hypercalcemia of malignancy and in hypercalcemia complicating metastatic breast cancer. *Clin Endocrinol Metab*, 1991, vol. 73, 1309-1315 [0150]

- **GRONE A et al.** Cloning and sequencing of the 3' region of the canine parathyroid hormone-related protein gene and analysis of alternative mRNA splicing in two canine carcinomas. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2002, vol. 22 (3), 169-77 [0150]
- **GALLWITZ WE et al.** Guanosine nucleotides inhibit different syndromes of PTHrP excess caused by human cancers in vivo. *J. Clin. Invest.*, 2002, vol. 110, 1559-72 [0150]
- **GUISE TA et al.** Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J. Clin. Invest.*, 1996, vol. 98, 1544-49 [0150]
- **HALL H1 et al.** Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1999, vol. 40, 35-42 [0150]
- **HANAHAN D et al.** The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, vol. 100, 57-70 [0150]
- **HARRIS JR et al.** Diseases of the breast. PA. Lippincott/Williams & Wilkins, 2004, 971 [0150]
- **HORTOBAGYI GN et al.** Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. *N Engl J Med*, 1996, vol. 335, 1785-1791 [0150]
- **INSOGNA KL et al.** Native and a synthetic analogue of the malignancy-associated parathyroid hormone-like protein have in vitro transforming growth factor-like properties. *J Clin Invest*, 1989, vol. 83, 1057-1060 [0150]
- **IWAMURA M et al.** Parathyroid hormone-related protein is an independent prognostic factor for renal cell carcinoma. *Cancer*, 1999, vol. 86, 1028-1034 [0150]
- **KAO PC et al.** Parathyroid hormone-related peptide in plasma of patients with hypercalcemia and malignancy lesions. *Mayo Clin Proc.*, 1990, vol. 65, 1399-1407 [0150]
- **KISSIN MW et al.** Parathyroid hormone related protein in breast cancer of widely varying prognostic. *Eur J Surg Oncol*, 1993, vol. 19, 134-142 [0150]
- **KREMER R et al.** Parathyroid hormone related peptide in hematologic malignancies. *Am J Med*, 1996, vol. 100, 406-411 [0150]
- **KUMARI R et al.** Nuclear targeting of a midregion PTHrP fragment is necessary for stimulating growth in breast cancer cells. *Int J Cancer*, 2006, vol. 119, 49-59 [0150]
- **LAUTH M et al.** Non-melanoma skin cancer, pathogenesis and mechanisms. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2004, vol. 1, 267-72 [0150]
- **LI J ; KARAPLIS A ; SIEGEL P ; PAPAVALIOU V ; MULLER W ; KREMER R.** Conditional ablation of parathyroid hormone related peptide (hPTHrP) in mammary epithelial cells inhibits breast cancer progression. *29th Annual Meeting of the ASBMR, J Bone Miner Res*, 2007 [0150]
- **LIAPIS H et al.** Expression of parathyroidlike protein in normal, proliferative and neoplastic human breast tissues. *Am J Pathol*, 1993, vol. 143, 1169-78 [0150]
- **LICHTMAN SS.** Treatment of bone metastases - bisphosphonates and suture directions. *34th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology* [0150]
- **LINFORTH R et al.** Coexpression of parathyroid hormone related protein and its receptor in early breast cancer predicts poor patient survival. *Clin Cancer Res*, 2002, vol. 8, 3172-3177 [0150]
- **MANENTI G et al.** A cancer modifier role for parathyroid hormone-related protein. *Oncogene*, 2000, vol. 19, 5324-28 [0150]
- **NISHIGAKI Y et al.** Increased serum and urinary levels of a parathyroid hormone-related protein COOH terminus in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*, 1999, vol. 5, 1473-81 [0150]
- **NSHIBARA M et al.** Clinicopathological implications of parathyroid hormone-related protein in human colorectal tumors. *J Pathol*, 1999, vol. 187, 217-222 [0150]
- **PERCHERSTORFER M et al.** Parathyroid hormone-related protein and life expectancy in hypercalcemic cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, vol. 76, 1268-1270 [0150]
- **POWELL GJ et al.** Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites. *Cancer Res*, 1991, vol. 51, 3059-3061 [0150]
- **RALSTON S et al.** Hypercalcaemia and metastatic bone disease: is there a causal link?. *Lancet*, 1982, vol. 2, 903-905 [0150]
- **RATCLIFFE WA et al.** Immunoreactivity of plasma parathyrin-related peptide: three region specific radioimmunoassay and a two-site immunoradiometric assay compared. *Clin Chem*, 1991, vol. 37, 1781-1787 [0150]
- **RHIM JS et al.** Neoplastic transformations of human keratinocytes by polybrominated DNA-mediated transfer of an activated oncogene. *Oncogene*, 1989, vol. 4, 1403-1409 [0150]
- **RHIM JS et al.** Evidence for the multistep value of in vitro humans epithelial cell carcinogenesis. *Cancer Res.*, 1990, vol. 50, 5653 [0150]
- **RICHARD V et al.** Quantitative evaluation of alternative promoter usage and 3' splice variants for parathyroid hormone-related protein by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem*, 2003, vol. 49, 1398-1402 [0150]
- **ROODMAN D.** Mechanism of bone metastasis. *N.Engl.J.Med.*, 2004, vol. 350, 1655-1664 [0150]
- **SAITO H et al.** Humanized monoclonal antibody against parathyroid hormone-related protein suppresses osteolytic bone metastasis of human breast cancer cells derived from MDA-MB-231. *Anticancer Res*, 2005, vol. 25, 3817-23 [0150]
- **SAN MIGUEL JF et al.** Prognostic factors and classification in multiple myeloma. *Br J Cancer*, 1989, vol. 59, 113-118 [0150]

- **SATO K et al.** Treatment of malignancy-associated hypercalcemia and cachexia with humanized anti-parathyroid hormone-related protein antibody. *Semin Oncol*, 2003, vol. 30, 167-173 [0150]
- 5 • **SELLERS RS et al.** Alternative splicing of parathyroid hormone-related protein mRNA: expression and stability. *J Mol Endocrinol*, 2004, vol. 33, 227-241 [0150]
- 10 • **SHEN X et al.** Increased cell survival, migration invasion, and Akt expression overexpressing LoVo cancer cell lines. *Regul. Pept*, January 2007, vol. 10, 17276526 [0150]
- 15 • **SHEN X et al.** PTH-related protein enhances LoVo colon cancer cell proliferation, adh integrin expression. *Regul. Pept.*, 2005, vol. 125, 17-27 [0150]
- **SHEN X et al.** PTH-related protein enhances MCF-7 breast cancer cell adhesion, migr invasion via an intracrine pathway. *Exp. Cell Res.*, 2004, vol. 294, 420-33 [0150]
- 20 • **SHEN X et al.** PTH-related protein modulates PC-3 prostate cancer cell adhesion an subunit profile. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2003, vol. 199, 165-77 [0150]
- 25 • **SHIELDS JD et al.** Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *British Journal of Cancer*, 2004, vol. 90, 693-700 [0150]
- **SOUTHBY J et al.** Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer. *Cancer Res*, 1990, vol. 50, 7710-7716 [0150]
- **TALON I et al.** Antitumor effect of Parathyroid hormone-related protein neutralizing antibody in human renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, 2006, vol. 27, 73-83 [0150]
- **TERKELTAUB R et al.** Parathyroid hormone-related proteins is abundant in osteoarthritis cartilage, and the parathyroid hormone-related protein 1-173 isoform is selectively induced by transforming growth factor beta in articular chondrocytes and suppresses generation of extracellular inorganic pyrophosphate. *Arthritis Rheum*, 1998, vol. 41, 2152-64 [0150]
- **TRUONG UN et al.** Parathyroid hormone related peptide (hPTHrP) is a prognostic indicator in hypercalcemic cancer patients with skeletal or extra skeletal metastasis. *J Bone Miner Res*, 1999, vol. 14, 189 [0150]
- **WON C et al.** Hypercalcemia in head and neck carcinoma. Incidence and prognosis. *Cancer*, 1983, vol. 52, 2261-2263 [0150]
- **YOSHIDA A et al.** Significance of the parathyroid hormone-related protein expression in breast carcinoma. *Breast Cancer*, 2000, vol. 7, 215-20 [0150]

30