

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 306**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2007 PCT/IB2007/001312**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2007 WO07135542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2007 E 07734620 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2040753**

54 Título: **Inhibidores de progastrina en el tratamiento del cáncer de colon**

30 Prioridad:

22.05.2006 EP 06290823

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

15.10.2019

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE -CNRS- (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HOLLANDE, FRÉDÉRIC;
JOUBERT, DOMINIQUE;
JAY, PHILIPPE;
PANNEQUIN, JULIE;
DELAUNAY, NATHALIE y
BOURGAUX, JEAN-FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 727 306 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

Inhibidores de progastrina en el tratamiento del cáncer de colon.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento y la prevención de cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa y metástasis.

10 **Antecedentes de la invención**

La tumorigénesis del colon humano implica en el 66% de los casos mutaciones somáticas del gen supresor de tumores adenomatous polyposis coli (APC) o en el gen de beta-catenina (valor medio calculado a partir del siguiente listado de referencias: (Conlin *et al.*, 2005; De Filippo *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2003; Luchtenborg *et al.*, 2005; Mikami *et al.*, 2006; Morin *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1992; Rowan *et al.*, 2000; Segditsas y Tomlinson, 2006; Shitoh *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2002; Sparks *et al.*, 1998; Suraweera *et al.*, 2006; Takayama *et al.*, 2001)). Estas mutaciones son consideradas como un suceso temprano de la carcinogénesis colorrectal que aparece en pacientes con cáncer colorrectal esporádico. Las mutaciones germinales en el gen *apc* también son responsables de la poliposis coli familiar, un síndrome hereditario asociado con un riesgo elevado de cáncer intestinal. Estas mutaciones dan como resultado una regulación defectuosa del conjunto citoplásmico de la proteína de uniones adherentes beta-catenina, dando como resultado una activación constitutiva de la ruta transcripcional mediada por Tcf-4. Esta activación constitutiva da como resultado un nivel elevado de transcripción de los genes diana de Tcf4, tales como c-myc o ciclina D1. Otra diana potencial de esta ruta es el gen GAST, que codifica la prohormona progastrina.

Se mostró que la transcripción de este gen está incrementada tras la activación del complejo de beta-catenina/Tcf4 *in vitro* (Koh *et al.*, 2000).

Un papel para la progastrina en la carcinogénesis del colon se sugirió por primera vez hace alrededor de 15 años, cuando se detectó progastrina en extractos de tumor colorrectal (Finley *et al.*, 1993; Kochman *et al.*, 1992; Nemeth *et al.*, 1993), y cuando se mostró que los niveles plasmáticos de progastrina eran elevados en alrededor de 75% de los pacientes que poseían un tumor colorrectal, mientras que eran indetectables en los controles (Ciccotosto *et al.*, 1995; Konturek *et al.*, 2002; Siddheshwar *et al.*, 2001; Van Solinge *et al.*, 1993). Sobre la base de estas observaciones, se ha investigado tanto *in vitro* como *in vivo* la teoría de que la progastrina podría estar implicada en la tumorigénesis del colon. Los estudios comenzaron en primer lugar mostrando que la gastrina extendida con glicina (uno de los productos de la maduración de progastrina) tuvo un efecto positivo sobre la proliferación (Hollande *et al.*, 1997; Koh *et al.*, 1999; Litvak *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1994; Stepan *et al.*, 1999). Mientras tanto, se mostró que la sobreexpresión de progastrina en el hígado, en el que no se puede producir la maduración en péptidos más pequeños, induce mitogénesis en el epitelio intestinal (Wang *et al.*, 1996). Estos mismos ratones transgénicos se usaron para demostrar que la sobreexpresión de progastrina induce una susceptibilidad a carcinogénesis inducida por azoximetano (Singh *et al.*, 2000). Sin embargo, esta observación se cuestionó cuando se mostró que la genorreducción del gen de gastrina también indujo la misma susceptibilidad a carcinogénesis (Cobb *et al.*, 2002). Sin embargo, los efectos proliferativos de progastrina se demostraron adicionalmente *in vitro* en la estirpe celular intestinal de rata IEC6 (Brown *et al.*, 2003), e *in vivo* en un modelo de ratón transgénico que presenta sobreexpresión intestinal de progastrina bajo el control del promotor fabp (Cobb *et al.*, 2004). Sin embargo, una desventaja importante de este modelo de ratón es que la progastrina se sobreexpresa en las células diferenciadas del epitelio intestinal, y no en las proliferativas. En 2003 y en 2005, Ottewell *et al* proporcionaron datos sobre el hecho de que la progastrina estimula la mitosis epitelial colónica murina tras el daño del ADN, y sobre el hecho de que los restos de 26 aminoácidos COOH terminales de la progastrina son suficientes para la estimulación de la mitosis en epitelio colónico murino *in vivo* (Ottewell *et al.*, 2005; Ottewell *et al.*, 2003).

Sobre la base de estos datos que proceden mayoritariamente de los experimentos de sobreexpresión, la progastrina fue aceptada como un "factor de crecimiento" en células epiteliales intestinales. Por el contrario, solamente tres estudios han intentado agotar células *in vitro* y uno *in vivo*. *In vitro*, 2 estirpes celulares productoras de progastrina se transfectaron con un antisentido del gen de gastrina, y se mostró que se disminuyó la formación de colonias así como la implantación tumoral en ratones atímicos (Singh *et al.*, 1996). Sin embargo, de forma importante, no se demostró a qué producto del gen de gastrina se atribuyeron estos efectos bloqueantes. Un estudio más reciente demostró que el agotamiento de progastrina permitió la restauración de uniones adherentes y firmes estables en células epiteliales intestinales, relacionando la progastrina con la activación de la migración (Hollande *et al.*, 2003). Finalmente, el último estudio *in vitro* se centró en el papel de la gastrina 17 extendida con glicina, un producto de maduración de la progastrina, puesto que las células usadas en ese trabajo segregan grandes cantidades de este péptido pero muy poca progastrina (Hollande *et al.*, 1997). *In vivo*, los ratones KO, como se menciona anteriormente, fueron más susceptibles a la tumorigénesis.

De forma importante, los únicos dos estudios que dieron a conocer una conexión entre el complejo de beta-catenina/Tcf4 y la familia de péptidos de la gastrina demostraron *in vitro* solamente que la activación de la ruta

transcripcional de Tcf4 (Koh *et al.*, 2000), particularmente en correlación con Ras (Chakladar *et al.*, 2005), conduce a la activación del promotor del gen de gastrina y a una mayor transcripción del gen. Por el contrario, antes de los datos proporcionados en la presente memoria, nada se conocía con respecto a la naturaleza real del péptido derivado del gen de gastrina segregado en el colon con la activación anormal de la ruta de beta-catenina/Tcf4, ningún informe mencionó la posibilidad de invertir la activación de esta ruta a través de un bloqueo de la función de progastrina, y no se ha establecido ninguna correlación en pacientes con cáncer colorrectal humano entre aquellos que presentan una activación de esta ruta en su tumor y aquellos que tienen expresión elevada del gen de gastrina. En consecuencia, parece que ningún dato previo proporcionó las pruebas científicas suficientes para mostrar que el agotamiento de progastrina podría invertir la tumorigénesis colorrectal inducida por la activación constitutiva de beta-catenina/Tcf4. Tales datos se proporcionan a continuación.

Gastrina y progastrina

La gastrina es una hormona peptídica del intestino clásica, que se identificó originalmente como un estimulante de la secreción de ácido gástrico. Es producida principalmente por las células G del antro gástrico y, en un grado variable, en el intestino delgado superior, con cantidades mucho menores en el colon y en el páncreas. A lo largo de años recientes, ha habido un interés creciente en el papel de la familia de péptidos de la gastrina en la carcinogénesis colorrectal. En particular, se acumulan pruebas de que las formas precursoras de gastrina (progastrina y gastrina extendida con glicina), que se pensó previamente que eran inactivas, desempeñan un papel en el desarrollo de cáncer colorrectal (ver comentarios anteriores). La gastrina aparece en diversas formas moleculares. Las gastrinas terminalmente amidadas de COOH humanas, G17 y G34, se generan a partir de una molécula precursora de 101 aminoácidos, la preprogastrina, mediante modificaciones postraduccionales. La preprogastrina se transloca cotraduccionalmente en el retículo endoplasmático, en el que el péptido señal se escinde rápidamente para dar lugar a la progastrina. La progastrina es escindida subsiguientemente por prohormona convertasas y por carboxipeptidasa E para dar lugar a un péptido con un resto de glicina COOH-terminal, a saber, G34-Gly, y una escisión adicional genera el péptido G17-Gly. G34-Gly se puede convertir en el péptido terminalmente amidado de COOH G34 mediante peptidil alfa-amidante monooxigenasa, y se puede escindir de forma similar para generar G17. G17 o Gamide es la forma antral predominante de las gastrina, comprendiendo generalmente los precursores no amidados (progastrina, gastrina extendida con glicina) menos del 10% del péptido segregado total en seres humanos. Sin embargo, en ciertas situaciones clínicas en las que el procesamiento está alterado, se segrega una mayor proporción de gastrina no amidada. Por ejemplo, las concentraciones tisulares y plasmáticas de progastrina son elevadas en algunos pacientes con carcinoma colorrectal, como se menciona anteriormente (Ciccotosto *et al.*, 1995; Konturek *et al.*, 2002; Siddheshwar *et al.*, 2001; Van Solinge *et al.*, 1993).

En el documento WO 99/19353, se sugiere un método de tratamiento de una afección asociada con hiperactividad de estimulación autocrina de proliferación de células de la mucosa gastrointestinal. El método comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antagonista de la unión de progastrina a receptores intracelulares de gastrina/CCK-C u otros receptores de progastrina, a un mamífero que necesite de tal tratamiento.

La patente US nº 6.165.990 describe métodos para el tratamiento de cáncer de colon. La expresión de gastrina por los cánceres de colon es inhibida mediante el uso de la expresión de gastrina antisentido.

En el documento WO 2004/089976 A, se describen métodos y composiciones para el tratamiento de afecciones asociadas con niveles elevados de gastrina no amidada. En un aspecto, el método comprende la etapa de administrar, a un mamífero que necesite de tal tratamiento, una cantidad eficaz de un compuesto que tiene la capacidad para inhibir la unión de iones férricos a uno cualquiera o más de gastrina 17 extendida con glicina, progastrina o péptidos derivados de progastrina, pero que no inhibe la actividad de gastrina amidada, y de ese modo inhibir la actividad de gastrinas no amidadas. El dato se proporciona para apoyar la reivindicación de que la capacidad para inhibir la unión de iones férricos a gastrina 17 extendida con glicina no reduce su actividad biológica, pero no se proporciona ningún dato con respecto a los efectos sobre la actividad biológica de progastrina.

El documento WO 2006/032980 A tiene como objeto proteger moléculas que se unen a progastrina que se unen selectivamente a progastrina, en el que la molécula no se une a gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly), o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly), en particularmente anticuerpos monoclonales selectivos para progastrina, e hibridomas que los producen. Se describe un método para cuantificar los niveles de progastrina en fluidos biológicos usando los anticuerpos mencionados anteriormente, pero esta reivindicación no está apoyada por ningún dato con respecto a la capacidad de estos anticuerpos para detectar selectivamente progastrina en cualquier fluido biológico. También se describe un método de prevención o tratamiento de una enfermedad o afección promovida por gastrina que comprende la administración de anticuerpos, pero sin datos para apoyar la reivindicación de que estos anticuerpos demuestran cualquier actividad selectiva para alterar la actividad biológica de progastrina. Este documento solamente proporciona métodos para establecer la especificidad de tales anticuerpos.

Hasta la fecha, las vías eficaces y específicas para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, metástasis y poliposis adenomatosa son escasas. Por lo tanto, se proporciona en la presente memoria un método mejorado para tratar

y/o prevenir cáncer colorrectal, metástasis o poliposis adenomatosa.

Sumario de la invención

5 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas, y cualesquiera otros aspectos o formas de realización expuestos en la presente memoria son únicamente informativos.

10 Se proporciona en la presente memoria un método para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que provienen de células que segregan progastrina, en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión a beta-catenina y Tcf-4 (ICAT) a un individuo que lo necesite.

15 También se proporciona un método para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que presentan células que segregan progastrina y células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión de beta-catenina y Tcf-4 (ICAT) a un individuo que lo necesita.

20 Se describe en la presente memoria por primera vez que el agotamiento de progastrina, y no cualquiera de los otros productos del gen *GAST*, es capaz de invertir la tumorigénesis actuando directamente sobre la activación constitutiva de la actividad de beta-catenina/Tcf4. Esta inversión implica la regulación de la expresión de ICAT, baja en un contexto de progastrina elevada, alta en el contexto de agotamiento de progastrina. Cuando ICAT es elevado, la activación constitutiva de la actividad de beta-catenina/Tcf4 está profundamente disminuida debido al hecho de que ICAT secuestra la vía de beta-catenina de Tcf4.

30 Por lo tanto, por primera vez, se demuestra que el agotamiento de progastrina es una terapia muy eficiente para cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis provenientes de células que segregan progastrina, en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, y para cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que presentan células que segregan progastrina y células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa. De este modo, la población de esos tumores colorrectales humanos, poliposis adenomatosa o metástasis que tienen una baja expresión de ICAT, una actividad constitutiva mediada por beta-catenina/Tcf-4, y una expresión elevada de progastrina, se puede seleccionar para la terapia antiprogastrina.

35 También se proporciona un método para determinar si un paciente que sufre cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis es sensible a un tratamiento terapéutico con un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión de beta-catenina y Tcf-4 (ICAT), comprendiendo dicho método la etapa de determinar si el cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa o la metástasis proviene de células que segregan progastrina en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa.

40 También se proporciona un método que combina la selección de una población específica de pacientes que probablemente son sensibles al régimen de tratamiento, con el tratamiento y/o prevención de cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis.

45 También se proporciona el uso de un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión de beta-catenina y Tcf-4 (ICAT) en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que provienen de células que segregan progastrina, en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa.

50 También se proporciona el uso de un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión de beta-catenina y Tcf-4 (ICAT) en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que presentan células que segregan progastrina y células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa.

55 También se proporciona en la presente memoria un método para cribar compuestos para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que provienen de células que segregan progastrina, en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa.

Descripción detallada de la invención

5 Se proporciona un método para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que presentan células que segregan progastrina y células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión de beta-catenina y Tcf-4 (ICAT) a un individuo que lo necesite.

10 También se proporciona el uso de un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión de beta-catenina y Tcf-4 (ICAT) en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que presentan células que segregan progastrina y células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa.

15 Típicamente, las células que segregan progastrina y las células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 son células colónicas.

Típicamente, las células que segregan progastrina y las células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa pueden ser las mismas.

20 También se proporciona un método para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que provienen de células que segregan progastrina, en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión de beta-catenina y Tcf-4 (ICAT) a un individuo que lo necesite.

25 Típicamente, las células que segregan progastrina son células colónicas.

30 También se proporciona el uso de un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión de beta-catenina y Tcf-4 (ICAT) en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis provenientes de células que segregan progastrina, en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa.

35 Las metástasis de cáncer de colon son una causa importante de muerte para pacientes, y raramente se operan, debido a que son difíciles de acceder, o debido a que tal eliminación quirúrgica presentaría riesgos críticos para la supervivencia inmediata del paciente. Este es especialmente el caso cuando la masa metastásica ha crecido muy próximamente a una arteria vital. El tratamiento descrito en la presente memoria induce una regresión de tales metástasis, y por lo tanto es extremadamente útil, ya sea extirpando completamente el cuerpo de las metástasis, o por lo menos permitiendo la eliminación quirúrgica forzando a las metástasis a contraerse lejos de la arteria. Además, la disminución de la síntesis de progastrina en células de cáncer colorrectal restaura la capacidad adhesiva de células tumorales colorrectales y conduce a una reducción de su potencial de migración (Hollande *et al.*, 2003). Típicamente, las metástasis tratadas pueden no ser quirúrgicamente eliminables. La metástasis se puede originar a partir de un tumor primario para el cual se desconoce el estado de activación de la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4. Típicamente, el tumor primario a partir del que se origina la metástasis es un tumor de colon.

45 Por individuo, se quiere decir un animal o ser humano.

50 Por ruta transcripcional constitutivamente activa mediada por beta-catenina/Tcf-4, se quiere decir una activación permanente, y desregulada, de la ruta que conduce a la formación de un complejo transcripcional entre beta-catenina y Tcf-4, conduciendo a una mayor transcripción de genes diana de Tcf-4 debido a la falta de degradación de beta-catenina citoplásmica.

55 Los ejemplos de células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa son células en las que el gen supresor de tumores adenomatous polyposis coli (APC) está mutado, o células en las que el gen de beta-catenina está mutado de una manera que evita una degradación normal de beta-catenina.

60 Típicamente, antes de aplicar un método de tratamiento como se describe en la presente memoria a un paciente que sufre cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis, se ha de llevar a cabo una prueba diagnóstica con el fin de determinar si el cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa o la metástasis provienen de células que segregan progastrina en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, o si el cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa o la metástasis presentan células que segregan progastrina y células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa. Al llevar a cabo tal prueba diagnóstica antes del tratamiento, es posible determinar si un paciente sería sensible a un método de tratamiento descrito en la presente memoria.

65 El experto tiene la capacidad para llevar a cabo tal prueba diagnóstica.

Típicamente, los niveles plasmáticos de progastrina en la sangre de los pacientes se pueden determinar con el fin de tratar solamente aquellos pacientes que tienen un nivel elevado de progastrina en el plasma. También se puede usar un estudio de progastrina plasmática para detectar una recidiva eventual del tumor y/o de las metástasis. A lo largo de su vida, los tumores colorrectales segregan factores que promueven la génesis de nuevos vasos sanguíneos (tales como VEGF), asegurando de ese modo que el tumor recibe una cantidad suficiente de nutrientes para lograr el crecimiento máximo (Wray *et al* 2004). La presencia de estos nuevos vasos también permite que el tumor libere diversos factores en el torrente sanguíneo, y este es especialmente el caso para la progastrina. Por lo tanto, la terapia dirigida contra la progastrina puede incluir la medida de los niveles de progastrina plasmática.

Alternativamente, o adicionalmente, se pueden detectar mutaciones del gen APC o del gen de beta-catenina, o se puede determinar el nivel anormal de transcripción de genes diana de Tcf, tales como, por ejemplo, c-Myc y ciclina D1, tiñendo estos marcadores en portaobjetos de tejidos tomados del paciente o usando por ejemplo tecnologías de micromatrices.

También se proporciona un método para determinar si un paciente que sufre cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis es sensible a un tratamiento terapéutico con un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión de beta-catenina y Tcf-4 (ICAT), comprendiendo dicho método la etapa de determinar si el cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa o la metástasis provienen de células que segregan progastrina en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, o si el cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis presentan células que segregan progastrina y células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa.

Típicamente, la etapa de determinar si el cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa o la metástasis provienen de células que segregan progastrina en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, o si el cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa o la metástasis presentan células que segregan progastrina y células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, comprende la etapa de medir los niveles plasmáticos de progastrina de dicho paciente. Adicionalmente, o alternativamente, la etapa de determinar si el cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa o la metástasis provienen de células que segregan progastrina en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, o si el cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa o la metástasis presentan células que segregan progastrina y células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, comprende la etapa de detectar una mutación del gen APC o del gen de beta-catenina, o un nivel anormal de la transcripción de los genes diana de Tcf.

Típicamente, el ensayo de progastrina puede ser un ensayo inmunofluorométrico resuelto en el tiempo (TR-IFMA), como se describe para proGRP (Nordlund *et al*, 2007). Este tipo de ensayo permite la cuantificación en el intervalo de 16 ng/l a 20,000 ng/l, valores en el intervalo de niveles plasmáticos de progastrina medidos en pacientes que poseen un tumor colorrectal. Se pueden usar dos anticuerpos monoclonales, uno dirigido contra el término N de progastrina y el otro contra el término C. El anticuerpo N-ter puede estar biotinilado, y se puede usar como el anticuerpo de fase sólida. El anticuerpo C-ter puede estar marcado con Eu^{3+} , y se puede usar como el anticuerpo trazador.

Los ejemplos de inhibidores de la represión inducida por progastrina de ICAT se pueden seleccionar dentro de entre el grupo que consiste en agentes que disminuyen la expresión de progastrina en células colónicas, anticuerpos contra progastrina, inhibidores de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), e inhibidores de cinasa ligada a integrinas (ILK).

Por ejemplo, el inhibidor de la represión inducida por progastrina de ICAT es un agente que disminuye la expresión de progastrina en células colónicas. Típicamente, un agente que disminuye la expresión de progastrina en células colónicas comprende un ácido nucleico que interfiere con la expresión de progastrina.

Los ejemplos de tales agentes son moléculas antisentido, o vectores que comprenden dichas moléculas antisentido. Las moléculas antisentido son hebras complementarias de pequeños segmentos de ARNm. Los métodos para diseñar moléculas antisentido eficaces son bien conocidos (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.165.990), y el experto en la materia tiene la capacidad para diseñar moléculas antisentido capaces de disminuir la expresión de progastrina en células colónicas. Ejemplos adicionales de agente que disminuye la expresión de progastrina son moléculas de interferencia del ARN (ARNi) tales como, por ejemplo, ARN interferentes cortos (ARNic), y ARN de horquilla cortos (ARNhc). ARNi se refiere a la introducción de ARN bicatenario homólogo para dirigirlo específicamente contra un producto de un gen, en el presente caso, progastrina, que da como resultado un fenotipo nulo o hipomórfico. Los métodos para diseñar moléculas de ARNi eficaces son bien conocidos (ver, para revisión, Hannon y Rossi *Nature*, 16 de septiembre de 2004; 431(7006):371-8), y el experto en la materia tiene la capacidad para diseñar moléculas de ARNi capaces de disminuir la expresión de progastrina en células colónicas.

Los ejemplos de los ARNic capaces de disminuir la expresión de progastrina en células colónicas son moléculas

de ácidos nucleicos que comprenden una de las siguientes secuencias:

ARNic hPG:

- 5 Sentido: 5'-GAAGAAGCCUAUGGAUGGATT-3' (SEC ID N°27)
Antisentido: 5'-UCCAUCCAUAGGCUUCUUCTT-3' (SEC ID N°28)

ARNic mPG:

- 10 Sentido: 5'-GAAGAGGCCUACGGAUGGTT-3' (SEC ID N°29)
Antisentido: 5'-CCAUCCGUAGGCCUCUUCTT-3' (SEC ID N°30)

Los ejemplos de ARNhc capaces de disminuir la expresión de progastrina en células colónicas son moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una de las siguientes secuencias:

15

ARNhc hPG:

- Sentido: 5'-GAAGAAGCCTATGGATGGATTCAAGAGAAGGTAGGTATCCGAAGAAGTTTTTT-3' (SEC ID N°1)
- 20 Antisentido: 5'-AATTAATAAACTTCTTCGGATACCTACCTTCTTGAATCCATCCATAGGCTTCTTCGGCC-3' (SEC ID N°2)

Una forma de realización de la presente descripción se refiere a un medicamento que comprende un ARNhc que comprende una de las secuencias seleccionadas de entre el grupo de SEC ID N°27, SEC ID N°28, SEC ID N°29 y SEC ID N°30. Típicamente, el medicamento puede comprender un par de ARNhc. Los ejemplos de pares de ARNhc son un primer ácido nucleico que comprende SEC ID N°27 y un segundo ácido nucleico que comprende SEC ID N°28, o un primer ácido nucleico que comprende SEC ID N°29 y un segundo ácido nucleico que comprende SEC ID N°30.

Una forma de realización de la presente descripción se refiere a un medicamento que comprende un ARNhc que comprende una de las secuencias seleccionadas de entre el grupo que consiste en SEC ID N°1 y SEC ID N°2. Típicamente, el medicamento puede comprender un par de ARNhc. Los ejemplos de pares de ARNhc son un primer ácido nucleico que comprende SEC ID N°1 y un segundo ácido nucleico que comprende SEC ID N°2.

En una forma de realización de la invención, el inhibidor de la represión inducida por progastrina de ICAT es un anticuerpo contra progastrina, o un fragmento biológicamente activo o derivado del mismo, que no reconoce formas amidadas y extendidas con glicina de gastrina. El experto en la materia tendrá conocimiento de los métodos estándar para producir tal anticuerpo específico. Por ejemplo, los anticuerpos específicos, o sus fragmentos biológicamente activos o derivados, se pueden generar inmunizando un animal con progastrina o fragmentos de progastrina, y seleccionando los anticuerpos que se unen a progastrina y que no reconocen formas amidadas y extendidas con glicina de gastrina. En una forma de realización preferida, los fragmentos de progastrina son secuencias de aminoácidos que son específicas para progastrina. La longitud de estas secuencias puede estar comprendida entre 8 y 15 aminoácidos. Estas secuencias pueden comprender restos de aminoácidos COOH-terminales o restos de aminoácidos NH₂-terminales de progastrina que no están presentes en las formas G17 y G35-Gly de gastrina. Estas secuencias pueden comprender el sitio de escisión de prohormona convertasa o de carboxipeptidasa E.

En una forma de realización de la presente invención, el anticuerpo o fragmento biológicamente activo o derivado del mismo se une a los restos de 10 aminoácidos COOH-terminales de progastrina, o a los restos 15 aminoácidos COOH-terminales de progastrina. Un ejemplo de restos de 10 aminoácidos COOH-terminales de progastrina es FGRRSAEDEN (SEC ID N°31). En una forma de realización alternativa, el anticuerpo, fragmento biológicamente activo o derivado del mismo, se une a los restos de 40 aminoácidos NH₂-terminales de progastrina. Típicamente, el anticuerpo, fragmento biológicamente activo o derivado del mismo, se puede unir a SWKPRSQQPDAPLGT (SEC ID N°32). Estas secuencias de aminoácidos son específicas para progastrina, ya que no están presentes en las formas G17, G17-Gly, G34 y G34-Gly de gastrina.

El experto en la materia tendrá conocimiento de los métodos estándar para producir anticuerpos tanto policlonales como monoclonales y sus fragmentos biológicamente activos y derivados. Por fragmento biológicamente activo o derivado del mismo, se quiere hacer referencia a capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo, en el presente caso, un epítipo de progastrina. Los fragmentos de anticuerpo, particularmente fragmentos Fab y otros fragmentos que retienen la capacidad y especificidad de unión al epítipo, también son bien conocidos, como lo son los anticuerpos quiméricos, y los anticuerpos "humanizados", en los que las regiones estructurales (que no determinan la especificidad por el antígeno) del anticuerpo se sustituyen por regiones análogas o similares procedentes de otras especies. De este modo, los anticuerpos generados en ratones se pueden "humanizar" para reducir los efectos negativos que pueden aparecer al administrarlos a sujetos humanos. Los anticuerpos quiméricos son modalidades terapéuticas aceptadas actualmente, conociéndose varios en el mercado. Por lo tanto,

la presente invención comprende la utilización de un anticuerpo específico para progastrina, que incluye los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂, F(ab)₂, Fab, Fv y Fd, anticuerpos quiméricos en los que una o más regiones se han sustituido por porciones humanas o no humanas homólogas. El experto en la materia también tendrá conocimiento de que se pueden preparar derivados de anticuerpo biológicamente activos, tales como, por ejemplo, fragmentos ScFv y moléculas de tipo ScFv divalentes, usando métodos recombinantes. El anticuerpo se puede marcar con un marcador detectable, que es adecuadamente un marcador radioactivo, tal como yodo radioactivo, o puede ser un marcador fluorescente o quimioluminiscente. El experto en la materia será capaz de seleccionar marcadores radioactivos, fluorescentes o quimioluminiscentes adecuados.

Una forma de realización de la presente invención se refiere a un medicamento que comprende un anticuerpo o fragmento biológicamente activo o derivado del mismo, que se une a los restos de 15 aminoácidos COOH-terminales o a los restos de 40 aminoácidos NH₂-terminales de progastrina.

Típicamente, el anticuerpo o fragmento biológicamente activo o derivado del mismo se une a FGRRSAEDEN (SEC ID N°31) o a SWKPRSQQPDAPLGT (SEC ID N°32).

En seres humanos sanos, la progastrina comprende menos de 10% de las gastrinas en circulación, y no se ha asociado ningún papel fisiológico a la progastrina. En consecuencia, seleccionando específicamente como diana a la progastrina con anticuerpos o fragmentos biológicamente activos o derivados de los mismos, se disminuyen, si no se evitan, los efectos secundarios del tratamiento.

En una forma de realización adicional de la presente descripción, el inhibidor de la represión inducida por progastrina de ICAT es un inhibidor de PI3K. Los inhibidores de PI3K son bien conocidos. LY294002, wortmanina y quercetina son inhibidores de PI3K usados habitualmente. Los documentos US2006058321 y WO2004052373, por ejemplo, describen familias de inhibidores de PI3K.

También se pueden usar como inhibidores de PI3K antisentido, moléculas de ARNi, formas dominante negativas de PI3K, anticuerpos contra PI3K, fragmentos biológicamente activos y derivados de los mismos.

En una forma de realización adicional de la presente descripción, el inhibidor de la represión inducida por progastrina de ICAT es un inhibidor de ILK. Los inhibidores de ILK son bien conocidos. KP-392 y QLT-0267 son inhibidores de ILK usados habitualmente. Por ejemplo, los inhibidores de ILK de tipo molécula pequeña se describen en el documento US6214813. Los inhibidores antisentido de ILK se describen en el documento US6177273. Las moléculas de ARNi, las formas dominante negativas de ILK, y los anticuerpos contra ILK, fragmentos biológicamente activos y derivados de los mismos, también se pueden usar como inhibidores de ILK.

Típicamente, los medicamentos según la descripción comprenden un inhibidor de la represión inducida por progastrina del inhibidor de la unión de beta-catenina y Tcf-4 (ICAT), junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un experto en la materia tendrá conocimiento de los vehículos adecuados. Las formulaciones adecuadas para la administración mediante cualquier vía deseada se pueden preparar mediante métodos estándar, por ejemplo mediante referencia a textos bien conocidos tales como Remington; The Science and Practice of Pharmacy.

En otra forma de realización de la presente descripción, se proporciona un método para cribar compuestos para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que provienen de células que segregan progastrina, en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar células que segregan progastrina en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa; y
- b) añadir el compuesto que se debe cribar; y
- c) seleccionar el compuesto que induce la expresión de ICAT.

En una forma de realización alternativa de la presente descripción, se proporciona un método para cribar compuestos para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa o metástasis que provienen de células que segregan progastrina, en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa, que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar células sensibles a progastrina; y
- b) añadir progastrina al medio que contiene las células; y
- c) añadir el compuesto que se debe cribar; y
- d) seleccionar el compuesto que induce la expresión de ICAT.

Típicamente, las células que segregan progastrina o las células sensibles a progastrina son células colónicas.

Por células sensibles a progastrina, se pretende hacer referencia a células en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está activa cuando la progastrina está presente en el medio de cultivo.

- 5 El experto en la materia tendrá conocimiento de métodos estándar para poner en práctica estos métodos. Típicamente, la expresión de ICAT se puede determinar mediante RT-PCR cuantitativa.

Leyendas de las figuras

10 Figura 1. El agotamiento de progastrina disminuye la tumorigenicidad de estirpes celulares de CRC humanas en ratones atímicos Balb/c, e inhibe el desarrollo espontáneo de tumores en el intestino de ratones APC Δ 14. (A) El histograma muestra la cuantificación de ARNm de GAST en células SW480/ β gal⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾ (clones [1] y [2], que expresan o no un ADNc de preprogastrina insensible a ARNhc (cPG)). Los resultados se expresan como un porcentaje de niveles encontrados en SW480/ β gal⁽⁻⁾ (*, p < 0.05 en comparación con SW480/GAST⁽⁻⁾, n = 3). Tabla inferior, cuantificación mediante RIA (pmol/l/24h) de progastrina, gastrina extendida con glicina, y gastrina amidada, segregadas por células SW480/ β gal⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾. (B) Evolución del volumen tumoral a lo largo del tiempo tras la inyección subcutánea de células DLD-1/VO, DLD-1/ASG, SW480/GAST⁽⁻⁾ o SW480/ β gal⁽⁻⁾ en ratones atímicos BALB/c. Media +/- s.e.m. de 2 clones/estirpe celular (4 ratones/clon), (*, p < 0.05 en comparación con células DLD-1/VO o SW480/ β gal⁽⁻⁾, prueba de la t de Student). (C-D) Ratones APC Δ 14 de 3 meses se trataron durante dos semanas con ARNhc dirigidos contra el gen *Gast* murino o el gen de luciferasa (9 ratones/grupo). Los resultados se expresan como una relación entre la expresión del gen *Gast* en mucosa tumoral/sana en el íleon (C) o en el colon (D) (paneles izquierdos), cuantificada usando RT-QPCR. El número y tamaño de adenomas se cuantificaron tras la tinción con azul de metileno en el íleon (C) y en el colon (D), y se expresan como número total de tumores para cada grupo de tamaño (paneles derechos). ARNhc de *GAST* fracasó a la hora de reducir los niveles de expresión del gen *Gast* en la muestra A (C), recogida en un ratón con un número elevado de tumores intestinales. "B" y "C" corresponden a ratones que no poseían ningún tumor de colon o del íleon, respectivamente (D).

30 Figura 2. Progastrina estimula la actividad de B-catenina/Tcf-4 en células de CRC humanas (A) La actividad transcripcional de Tcf-4 se cuantificó usando el ensayo de gen informador de luciferasa TOP/FOP (Morin *et al.*, 1997) en células SW480/ β gal⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾ no tratadas (clones [1] y [2]) (barras negro), o en las mismas células tratadas con 5 nM de progastrina recombinante durante 72 h (rPG, barras gris claro), o transfectadas con ADNc de preprogastrina insensible a ARNhc (cPG, barras gris oscuro). Los valores son la media \pm s.e.m. de cuatro experimentos similares (*, p < 0.05 en comparación con células SW480/GAST⁽⁻⁾). Los niveles de Tcf-4 y de β -catenina desfosforilada fueron similares en todas estas células, como se muestra en la figura S2. (B) Imágenes confocales independientes y superpuestas de β -catenina (verde), Tcf-4 (rojo), y DAPI (azul) en células SW480/ β gal⁽⁻⁾ y células SW480/GAST⁽⁻⁾ con o sin tratamiento de progastrina 5 nM durante 72 h. Las barras representan 40 μ m. Se usa un mayor aumento para las células tratadas con progastrina, para proporcionar una mejor visualización de la inversión parcial. (C) Los clones [1] y [2] de SW480/GAST⁽⁻⁾ se trataron o no como en A. Los niveles de expresión de actina y proteínas codificadas por el gen diana de Tcf-4 c-Myc, ciclina-D1, Sox-9 y CLDN1, se cuantificaron mediante inmunotransferencia, usando células SW480/ β gal⁽⁻⁾ como controles (ver también las expresiones de ARNm en la figura S3 suplementaria). Los valores (estandarizados usando actina como un control de carga) son la media \pm s.e.m. procedente de tres experimentos independientes. Prueba de la t de Student, p < 0.05 (*)comparado con células SW480/GAST⁽⁻⁾.

45 Figura 3. Progastrina disminuye la expresión de ICAT *in vitro* e *in vivo*. (A-B) Células SW480/GAST⁽⁻⁾ sin progastrina (clones [1] y [2]) se transfectaron o no con un ADNc de preprogastrina insensible a ARNhc con codones optimizados (cPG). Los niveles de ARNm de ICAT se cuantificaron entonces mediante RT-QPCR (A) en comparación con células SW480/ β gal⁽⁻⁾, y la expresión de la proteína ICAT se analizó mediante inmunotransferencia (B) en SW480/GAST⁽⁻⁾ antes (barras gris claro) o después de la transfección transitoria con cPG (barras grises), en comparación con SW480/ β -gal⁽⁻⁾ (barras negras). (C) La expresión de ICAT se analizó mediante inmunohistoquímica y tinción inmunofluorescente en secciones tisulares obtenidas a partir de epitelio colónico de ratones que presentan sobreexpresión específica del intestino de progastrina (Tg/Tg) (Cobb *et al.*, 2004), así como en ratones de control procedentes del mismo antecedente genético (tipo salvaje). Las barras representan 40 μ m.

60 Figura 4. La expresión de ICAT *de novo* es responsable de la menor actividad de β -catenina-Tcf-4 en células de CRC sin progastrina. (A) Panel superior: inmunoprecipitados de β -catenina desfosforilada procedentes de SW480/ β gal⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾ +/- progastrina recombinante (rPG, 5 nM, 72 h) se sondaron para β -catenina desfosforilada, Tcf-4, e ICAT. Panel inferior, cuantificación a partir de 3 experimentos similares llevados a cabo sobre 2 clones independientes (###p < 0.01 y *p < 0.05 comparado con SW480/ β gal⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾, respectivamente, prueba de la t de Student). (B) Imágenes confocales independientes y superpuestas de β -catenina, ICAT, y DAPI en células SW480/ β gal⁽⁻⁾ y células SW480/GAST⁽⁻⁾ tratadas o no con progastrina 5 nM durante 72 h. Las barras representan 40 μ m. (C-D) El ensayo informador de luciferasa de Tcf-4 (TOP/FOP) (C),

y la cuantificación de ARNm y proteína de c-Myc (parte superior) y ciclina D1 (parte inferior) (D), se llevaron a cabo en células SW480/GAST⁽⁻⁾/Luc⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾/ICAT⁽⁻⁾ con o sin la expresión nuevamente de ADNc de ICAT insensible a ARNh_c (+cICAT).

5 Figura 5. La expresión de ICAT se correlaciona de forma inversa con los niveles de progastrina y la expresión del gen diana de β -catenina-Tcf-4 en tumores murinos y humanos. (A). Ratones APC Δ 14 de 3 meses se trataron durante dos semanas con ARN_ic dirigido contra el gen *GAST* murino o contra el gen de luciferasa, como se muestra en la figura 1. Los adenomas intestinales se procesaron para la extracción de ARN, y la expresión de ARNm de ICAT se cuantificó (Ad) con respecto a la expresión en epitelio equivalente (Ep) procedente de los mismos animales (n = 5). (B) La expresión de las dianas de Tcf-4 ciclina D1, CD44 y C-Myc se analizó usando inmunotransferencia Western en adenomas (Ad) y epitelio macroscópicamente intacto (Ep) procedente de los mismos animales, en comparación con epitelio intestinal de ratones de control procedentes del mismo antecedente genético (ver la cuantificación en la figura S5 suplementaria). (C) Los adenomas procedentes de animales APC Δ 14 tratados con ARN_ic específico para *Luc* o para *GAST* se embebieron en parafina y se procesaron para la detección inmunohistoquímica de c-Myc e ICAT. Se proporcionan imágenes representativas de adenomas de *GAST*⁽⁻⁾ y *Luc*⁽⁻⁾ recogidos en el íleon. Las barras representan 20 μ m. (D) Expresiones de ARNm de *GAST* e *ICAT* en tumores microdisecados (barras negras) procedentes de 23 pacientes con CRC, expresadas con respecto a las cantidades encontradas en su epitelio sano equivalente respectivo (barras blancas), que se normalizaron a 1 para cada paciente. Los valores son la media \pm s.e.m. de tres experimentos independientes. Inserto: los valores logarítmicos de la expresión de *GAST* y de *ICAT* se representaron gráficamente unos contra otros, con la curva de regresión y su intervalo de confianza. El coeficiente de correlación de Spearman (r) se proporciona con su grado de significancia (p). (E) Panel superior: inmunotransferencia de progastrina (IB) en muestras sanas (H) o tumorales (T) procedentes de 4 pacientes con CRC. Panel inferior: inmunohistoquímica (IHC) representativa para pacientes de ICAT, c-Myc, claudina-1, y CD44 con expresión de progastrina tumoral elevada (paciente 4) o baja (paciente 22) (el control positivo en WB fue progastrina recombinante (rPG); el tiempo de exposición fue 20 s para el control positivo, y 10 min. para muestras humanas). Se obtuvieron resultados similares de IB e IHC en muestras procedentes de los 11 pacientes ensayados. La barra representa 20 μ m.

30 Figura 6. La represión de ICAT es esencial para el papel promotor de tumores de progastrina en células de CRC humanas. (A) Panel superior: la disminución de ICAT invierte la tasa de crecimiento disminuida de células sin progastrina en agar blando, como se muestra mediante las diferencias notables en el tamaño de las colonias entre células SW480/ β gal⁽⁻⁾, SW480/GAST⁽⁻⁾, SW480/GAST⁽⁻⁾/ICAT⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾/Luc⁽⁻⁾. Panel inferior: cuantificación de 3 experimentos similares, expresado como una media \pm s.e.m. de 10 campos escogidos aleatoriamente por clon. (B) Células SW480/GAST⁽⁻⁾/Luc⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾/ICAT⁽⁻⁾ se inyectaron en la pata posterior de ratones atímicos BALB/c, y se midió regularmente el crecimiento tumoral. Media \pm s.e.m. de 4 clones cada uno. *, p < 0.05 comparado con células SW480/GAST⁽⁻⁾/Luc⁽⁻⁾, prueba de la t de Student.

40 Figura 7. La activación de la ruta PI3K/ILK es esencial para la represión de ICAT por progastrina. (A) La activación de PI3K es esencial para la represión de ICAT inducida por progastrina en células de CRC humanas. La expresión de ARNm de ICAT se midió como se describió anteriormente (izquierda), y la fosforilación de Akt/PKB se analizó mediante transferencia Western (derecha) en células SW480/ β gal⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾ con o sin tratamiento con progastrina 5 nM (PG) y/o el inhibidor de PI3Cinasa LY-294002 (LY), como se indica. (B) La expresión y actividad de ILK están reducidas en células de CRC humanas sin progastrina. Panel superior, se analizó la expresión de ILK (transferencia Western) y la actividad enzimática (fosforilación *in vitro* de Proteína Básica de Mielina (MBP)) tras la inmunoprecipitación de ILK a partir de lisados de células SW480/ β gal⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾, con o sin tratamiento con progastrina recombinante (5 nM, 72 h). El panel central muestra la cuantificación de la actividad de ILK, llevada a cabo en tres experimentos independientes tras corregir las variaciones de la expresión de ILK en células descritas anteriormente. En el panel inferior, se analizó la fosforilación de la diana de ILK, la β 1-integrina, sondando secuencialmente inmunoprecipitados de β 1-integrina con un anticuerpo anti-fosfoserina y un anticuerpo contra β 1-integrina. ILK, β 1-integrina, y la fosforilación de MBP nunca se detectaron cuando los lisados se inmunoprecipitaron con suero de conejo preinmunitario (no representado). (C) La activación de ILK es esencial para la represión de ICAT mediada por progastrina en células de CRC humanas. La expresión de ARNm de ICAT (panel izquierdo) y la fosforilación de Akt/PKB en Ser473 (panel derecho) se cuantificaron en células SW480/ β gal⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾ transfectadas o no con un ILK dominante negativo (Δ N-ILK), y con o sin tratamiento con progastrina exógena 5 nM (PG) según se indicó. Para todos los paneles, p < 0.05 comparado con células SW480/ β gal⁽⁻⁾ (#), SW480/GAST⁽⁻⁾ (*), o SW480/GAST⁽⁻⁾ (^o) tratadas con progastrina.

60 Figura 8. El agotamiento de progastrina induce diferenciación y apoptosis de células de CRC humanas *in vitro*, y promueve la diferenciación tumoral en el intestino de ratones APC Δ 14 *in vivo*. (A) Experimento representativo que muestra la localización nuclear de PTEN en dos clones de células SW480/GAST⁽⁻⁾ pero no en células SW480/ β gal⁽⁻⁾. (B) Cuantificación de la expresión de Muc-2, de fosfatasa alcalina intestinal (ALP), y de ARNm de cromogranina A (CgA) en células SW480 48 h después de la transfección con los ARN_ic dirigidos contra *GAST* o β -galactosidasa. (C) Expresión de Muc-2 y activación de caspasa-3 en células de CRC SW480 tras la

transfección transitoria con los ARN^{ic} específicos de GAST pero no específicos de β -galactosidasa. Las células se transfectaron con los ARN^{ic} etiquetados con rodamina (rojo) dirigidos contra GAST (flechas) o β -galactosidasa (puntas de flecha), y se trataron o no con progastrina recombinante 5 nM. La expresión de Muc-2 (A488, verde) y caspasa-3 activada (Cy-5, mostrada en la presente memoria en rojo) se detectaron mediante tinción inmunofluorescente, y los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul). Se obtuvieron resultados similares con células DLD-1. Las barras representan 20 μ m. (D). Ratones APC Δ 14 de 3 meses se trataron durante dos semanas con ARN^{ic} dirigido contra el gen GAST murino o contra el gen de luciferasa, como en la figura 1. Los adenomas intestinales se embebieron en parafina y se procesaron para la detección inmunohistoquímica de células productoras de moco (Muc2 y Alcian blue) y células implicadas en la ruta apoptótica (caspasa 3 activada, puntas de flecha negras). Se proporcionan imágenes representativas de adenomas de GAST⁽⁻⁾ y Luc⁽⁻⁾ recogidos en el íleon. Las barras representan 20 μ m.

Figura 9. Ruta de señalización que conecta el agotamiento de progastrina con una menor activación del complejo transcripcional de β -catenina/Tcf-4 en células de carcinoma colorrectal con APC mutado. (A). Células de CRC producen y segregan progastrina endógena, que actúa a su vez sobre células tumorales para activar PI3 cinasa e ILK, induciendo de ese modo una represión de ICAT y facilitando la amplificación de la actividad transcripcional de β -catenina/Tcf-4 iniciada por la mutación de APC. Este proceso da como resultado una transcripción máxima de los genes diana, tal como el gen que codifica progastrina, creando así un bucle de activación que se autoamplifica. (B) La inhibición de la acción de progastrina, tal como la inducida por silenciamiento del gen GAST por ARN^{ic} (①), reduce notablemente la actividad de PI3 cinasa y de ILK (②), dando como resultado un fuerte aumento de ICAT (③). La competición de este pequeño inhibidor con Tcf-4 por la unión a β -catenina es suficiente para disminuir fuertemente la transcripción de dianas de Tcf-4 en células tumorales (④).

Figura 10. Se revistieron concentraciones crecientes de antígeno sobre placas de 96 pocillos como se indica (para detalles, ver la sección "Métodos"), seguido de la incubación con anticuerpos selectivos contra las extremidades N-terminal (panel superior) o C-terminal (panel inferior) de progastrina (1-80). Los antígenos ensayados fueron los inmunógenos originales usados para generar los anticuerpos (panel superior: SWKPRSQQPDAPLGT, panel inferior: FGRRSAEDEN), gastrina17 amidada, gastrina17 extendida con glicina, el péptido de flanco C-terminal de progastrina (SAEDEN), y hemocianina de lapa californiana (KLH), que se usó como proteína portadora durante el proceso de inmunización. Los resultados se expresan como lecturas directas a 492 nm tras la incubación con anticuerpos secundarios y sustrato de OPD.

Figura 11. Células de carcinoma colorrectal SW480 se trataron durante 30 horas con un anticuerpo de control o con anticuerpos dirigidos contra las extremidades C-terminal o N-terminal de progastrina (dilución 1/5,000), como se describe en la sección de Métodos. Tras la lisis celular, se cuantificó la expresión del ARNm para ICAT, c-Myc y ciclina D1, usando RT-qPCR. Los resultados se expresan como relación entre la expresión en células tratadas con anticuerpos antiprogastrina C-terminal (barras grises) o N-terminal (barras blancas) y células tratadas con el anticuerpo de control, en las que cada nivel de expresión génica se fijó a un valor de 1 (representado en la presente memoria mediante el eje horizontal).

Figura S1. Sobreexpresión de progastrina en los adenomas de ratones APC Δ 14, y falta de respuesta proinflamatoria después de un tratamiento de dos semanas con ARN^{ic} selectivo para el gen GAST murino. (A) Niveles de gastrina amidada y de gastrina extendida con glicina en la mucosa intestinal sana y en los adenomas de ratones APC Δ 14 de 3.5 meses, cuantificados mediante radioinmunoensayo. (B) Inmunotransferencia representativa de progastrina en extractos proteicos de mucosa intestinal sana y de adenoma (50 μ g) procedentes de ratones APC Δ 14 de 3.5 meses tratados con ARN^{ic} específico del gen Luc o del gen GAST, en comparación con ratones de control del mismo antecedente genético (actualmente no hay ningún RIA para cuantificar progastrina murina). Las películas se expusieron durante 30 min. Histograma, cuantificación de PG en adenomas recogidos en el colon y el íleon de 4 animales por grupo, expresado con respecto a colon e íleon de animales C57/BL6 (para cada segmento intestinal, p < 0.05 comparado con valores respectivos en in C57/BL6[#] o en APC Δ 14 Luc⁽⁻⁾). (C) Células de CRC murino Colo-26 y células de colon de ratón adulto joven (YAMC) se transfectaron con ARN^{ic} dirigido contra la secuencia de GAST murina (ARN^{ic} de mGAST) o humana (ARN^{ic} de hGAST), y la expresión de ARNm de GAST se cuantificó usando RT-QPCR. (D) Gráfica de dispersión que resume los niveles de IL-6 (negro) y TNF α (blanco) en plasma en ratones tratados con ARN^{ic} de Luc o GAST. No se observaron diferencias significativas entre estos dos grupos, en el que los niveles de ambas citocinas reflejan la ausencia de inflamación.

Figura S2. Progastrina, pero no gastrina amidada o gastrina extendida con glicina, estimula la actividad transcripcional de β -catenina/Tcf-4 en células de CRC. (A) (Panel superior) la actividad transcripcional de Tcf-4 se cuantificó usando el ensayo de gen informador de luciferasa TOP/FOP (31) en células DLD-1/VO, DLD-1/ASG (clones [1] y [2]), SW480/ β gal⁽⁻⁾ y SW480/GAST⁽⁻⁾ (clones [1] y [2]). Los valores son la media \pm s.e.m. de 4 experimentos similares. Los niveles de β -catenina desfosforilada (panel central) y de Tcf-4 (panel inferior) fueron similares en todas estas estirpes celulares, como se muestra mediante inmunotransferencia (usando actina como un control de carga). (B) ARNm del receptor de gastrina amidada humano (CCK-B) se detectó

mediante RT-PCR en muestras de células COS-7 transfectadas con el constructo del receptor de CCK-B, pero no en células DLD-1 y SW480 o en el control negativo (COS-7/CCK-B sin transcripción inversa).

Figura S3. La expresión de ARNm de los genes diana de Tcf-4, c-Myc, ciclina D1, Sox-9 y CLDN1, está regulada por progastrina en células de CRC humanas. Los clones [1] y [2] de SW480/GAST⁽⁻⁾ se trataron o no con progastrina 5 nM (rPG) durante 72 h, o se transfectaron con un ADNc de preprogastrina insensible a ARNhc con codones optimizados (cPG). La expresión de ARNm de las dianas de Tcf-4 c-Myc, ciclina D1, Sox-9 y claudina-1 (en (9) hay disponible una lista de genes diana de Tcf-4) se cuantificó mediante RT-QPCR, usando como controles células SW480/βgal⁽⁻⁾. Los valores son la media ± s.e.m. de tres experimentos independientes. Prueba de la t de Student, p < 0.05 (*) comparado con células SW480/GAST⁽⁻⁾.

Figura S4. Modulación experimental de la expresión de ICAT en células de CRC. El ARNm (A) y los niveles proteicos (B) de ICAT se cuantificaron en dos clones, cada uno de células de CRC sin progastrina (SW480/GAST⁽⁻⁾, barras blancas), transfectadas o no con ARNhc de control (SW480/GAST⁽⁻⁾/Luc⁽⁻⁾, barras grises) o con ARNhc selectivo para ICAT (células (SW480/GAST⁽⁻⁾/ICAT⁽⁻⁾, barras negras), así como en células SW480/GAST⁽⁻⁾/ICAT⁽⁻⁾ transfectadas transitoriamente con un ADNc de ICAT insensible a ARNhc con codones optimizados (+c.ICAT) (barras gris oscuro). (p < 0.05 comparado con SW480/GAST⁽⁻⁾/Luc⁽⁻⁾ (*), o comparado con SW480/GAST⁽⁻⁾/ICAT⁽⁻⁾(#), prueba de la t de Student, n = 3).

Figura S5. La expresión elevada de genes diana de Tcf-4 en adenomas intestinales procedentes de ratones APCΔ14 se reduce tras el tratamiento con ARNhc dirigido contra progastrina. Ratones APCΔ14 de 3 meses se trataron durante dos semanas con ARNhc dirigido contra el gen GAST murino o el gen de luciferasa, como en la figura 1. Los adenomas intestinales se procesaron para la extracción proteica, y la expresión de las dianas de Tcf-4 ciclina D1 (parte superior), c-Myc (parte central) y CD44 (parte inferior) se cuantificó tras la inmunotransferencia Western en adenomas (Ad) y epitelio macroscópicamente intacto (Ep) procedente de los mismos animales, en comparación con epitelio intestinal de ratones de control procedente del mismo antecedente genético (en la figura 5B se muestra la inmunotransferencia representativa). Los valores representan medias ± sem de adenomas de 4 animales/grupo. Para cada segmento intestinal, p < 0.05 comparado con los valores respectivos en C57/BL6[#] o en APCΔ14 Luc^{(-)*}.

Figura S6. Población de pacientes usada para la microdissección por captura activada por láser de muestras de colon. (A) Microfotografías representativas de tejidos de colon sanos y tumorales típicos antes de (original) y después de la microdissección por captura activada por láser (microdisseccionado). (B) Características de la población de pacientes usada para determinar los niveles de expresión del gen GAST e ICAT, incluyendo la puntuación de patología de su tumor según la clasificación TNM. La localización del tumor se representa como PC (colon proximal), MC (colon central), DC (colon distal), colon sigmoideo, o recto. La metástasis en el momento de la cirugía (MS), la metástasis en una etapa posterior (M), y pacientes fallecidos (DC) se proporcionan con el siguiente código (0: No; 1: Sí).

Figura S7. La inhibición farmacológica de PI3K inhibe la actividad transcripcional de Tcf-4 en células SW480/βgal⁽⁻⁾. Células SW480/βGal⁽⁻⁾ se trataron o no con LY294002 10 μM, y se cuantificó la actividad de Tcf-4 como se describió anteriormente. Los valores son la media ± s.e.m. de tres experimentos independientes. Prueba de la t de Student, p < 0.05 (*) comparado con células SW480/βgal⁽⁻⁾ sin tratar.

Ejemplos

Ejemplo 1

En la siguiente descripción, todos los experimentos de biología molecular para los cuales no se proporciona un protocolo detallado se llevan a cabo según el protocolo estándar.

Sumario

Antecedentes y objetivos: La activación aberrante del complejo transcripcional de β-catenina/Tcf-4 representa un suceso iniciador para la carcinogénesis colorrectal, desplazando el balance desde la diferenciación hacia la proliferación en criptas colónicas. En la presente memoria, se evaluó si la progastrina endógena, codificada por un gen diana de este complejo, fue capaz a su vez de regular la actividad de β-catenina/Tcf-4 en células con APC mutado, y se analizó el impacto del agotamiento de progastrina tópica en el crecimiento de tumor intestinal *in vivo*.

Métodos: Se indujo el silenciamiento estable o transitorio del gen GAST mediante ARN en células tumorales humanas y en ratones portadores de una mutación heterocigota de Apc (APCΔ14), que sobreexpresan progastrina pero no gastrina amidada o gastrina extendida con glicina.

Resultados: El agotamiento de la producción de progastrina endógena disminuyó fuertemente el crecimiento de tumor intestinal *in vivo*, a través de una notable inhibición de la actividad constitutiva de β-catenina/Tcf-4 en células

tumorales. Este efecto estaba mediado por la expresión *de novo* del inhibidor de β -catenina y Tcf-4 (ICAT), que resulta de una disminución de cinasa ligada a integrina (ILK) en células sin progastrina. En consecuencia, la disminución de ICAT correlacionó con la sobreexpresión de progastrina y la activación de los genes diana de Tcf-4 en tumores colorrectales humanos, y se detectó represión de ICAT en el epitelio de colon de ratones que sobreexpresan progastrina propensos a tumores. En ratones APC Δ 14, el agotamiento de progastrina mediado por ARNic no solo redujo el tamaño y los números de tumores intestinales, sino también incrementó la diferenciación de la estirpe de células calciformes y aumentó la apoptosis celular en los adenomas restantes.

Conclusiones: De este modo, el agotamiento de progastrina endógena inhibe *in vivo* la tumorigenicidad de células de CRC con APC mutado al promover la expresión de ICAT, contrarrestando de ese modo la actividad de Tcf-4. Las estrategias dirigidas contra progastrina deberían proporcionar una perspectiva excitante para la terapia de diferenciación de cáncer colorrectal.

Introducción

En años recientes se han desarrollado diversas estrategias dirigidas a reducir el desarrollo tumoral a través de la inducción de la diferenciación de las células tumorales, proporcionando resultados muy prometedores en modelos de animales y en pacientes humanos. En particular, el uso de ácido todo-trans-retinoico ha demostrado ser extremadamente útil en el tratamiento de leucemia promielocítica aguda (Lallemant-Breitenbach *et al.*, 2005; Wang y Chen, 2000), y se considera como un enfoque prometedor para forzar la diferenciación tumoral en cáncer de tiroides avanzado (Coelho *et al.*, 2005). En el intestino, se han puesto grandes esperanzas en agentes que modulen dos rutas principales implicadas en el control de la proliferación y diferenciación celulares, a saber, la cascada Notch y la ruta de Wnt/ β -catenina/Tcf-4 (Radtko y Clevers, 2005; van Es y Clevers, 2005).

Sin embargo, puesto que una interacción ajustada finamente entre la activación de Notch y la activación de Wnt es esencial para la homeostasis de las criptas intestinales, es probable que los enfoques dirigidos a seleccionar directamente como dianas estas rutas de señalización en tumores de colon tengan efectos adversos sobre la fisiología intestinal global. De forma ideal, tales estrategias se beneficiarían enormemente de la capacidad para identificar dianas que están selectivamente activadas, o fuertemente estimuladas, en células tumorales, mientras que están ausentes o inactivas en tejidos circundantes. Entre las dianas específicamente activadas en células tumorales intestinales, los productos del gen de gastrina (*GAST*) parcialmente procesados, tales como gastrina extendida con glicina y progastrina, ofrecen una perspectiva interesante para la selección selectiva como diana del crecimiento tumoral. De hecho, el propio gen *GAST* es una diana tanto de Tcf-4 como de K-Ras (Chakladar *et al.*, 2005; Koh *et al.*, 2000), dos rutas que están frecuentemente activadas y que actúan sinérgicamente en cánceres colorrectales (Janssen *et al.*, 2006), y estos péptidos derivados de *GAST* parecen estimular la proliferación vía un bucle autocrino/paracrino en células tumorales (Hollande *et al.*, 1997; Hollande *et al.*, 2003). El efecto proliferativo de Ggyl se descubrió durante los últimos pocos años (Seva *et al.*, 1994), y más recientemente, se mostró que progastrina estimula la proliferación (Ottewell *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2000) y modula la adhesión célula/célula y la migración de células epiteliales (Hollande *et al.*, 2003; Hollande *et al.*, 2005). Además, surgieron resultados opuestos de experimentos que usan animales con una supresión buscada del gen *GAST*. De hecho, esta supresión potenció enormemente la tumorigénesis inducida mediante un carcinógeno químico, el azoximetano (Cobb *et al.*, 2002), mientras que dio como resultado un menor número de pólipos en el antecedente genético de ratones APC^{+/*min*} (Koh *et al.*, 2000). Además, proporcionaron poca información relativa al potencial para tratamientos que alteran la función de estos péptidos para ralentizar o invertir el crecimiento de tumores preexistentes. Críticamente, la progastrina es producida y segregada en cantidades significativas por casi el 80% de tumores colorrectales humanos y estirpes celulares tumorales, mientras que su secreción cae prácticamente por debajo de los niveles de detección en condiciones fisiológicas (Ciccotosto *et al.*, 1995; Konturek *et al.*, 2002; Siddheshwar *et al.*, 2001; Van Solinge *et al.*, 1993). Por lo tanto, puesto que la activación constitutiva de la ruta de señalización de Wnt representa un signo distintivo de CRC esporádico, así como de la afección hereditaria de poliposis adenomatosa (Fodde *et al.*, 2001), y puesto que el propio gen *GAST* es una diana de Tcf-4, se investigó si la progastrina fue capaz, a su vez, de modular la tumorigénesis motivada por la mutación de *APC*, y si la selección como diana de progastrina podría representar una estrategia relevante para reducir el crecimiento de tumores intestinales.

Se muestra que el agotamiento de progastrina mediado por la interferencia por ARN fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral inducido por una mutación del gen *APC* *in vivo*. Se demuestra entonces que esta inhibición reflejó la capacidad de progastrina para modular el nivel de actividad transcripcional de β -catenina/Tcf-4 en células tumorales, a pesar de su activación constitutiva disparada por la mutación de *APC*. La expresión *de novo* del inhibidor de la unión de β -catenina y Tcf-4 (ICAT) fue decisiva para inhibir la ruta transcripcional de β -catenina/Tcf-4 y para disminuir la tumorigenicidad en células tumorales sin progastrina, mientras que se detectó represión de ICAT en mucosa colónica de ratón que sobreexpresa progastrina, y en tumores intestinales humanos y de ratón. Finalmente, el tratamiento con ARNic específico de *GAST* indujo una diferenciación terminal con respecto a la estirpe de células calciformes, no solo de células de CRC humanas *in vitro*, sino también de los adenomas intestinales que segregan progastrina de ratones portadores de una mutación heterocigota del gen *Apc*.

Resultados

El agotamiento de progastrina invierte el crecimiento tumoral inducido por mutaciones de *APC in vivo*

Para evaluar si una estrategia dirigida a actuar selectivamente sobre progastrina endógena en tumores preexistentes sería capaz de antagonizar *in vivo* el crecimiento tumoral promovido por Tcf-4, se usaron xenoinjertos de ratones atímicos Balb/c procedentes de la estirpe celular colorrectal SW480 (Morin *et al.*, 1997), así como un modelo de ratón de tumorigénesis intestinal espontánea, APC Δ 14 (Colnot *et al.*, 2004). Similar a lo que se encuentra en una mayoría de tumores colorrectales humanos (Korinek *et al.*, 1997), estos dos modelos experimentales son portadores de mutaciones de *APC*, y en consecuencia presentan una activación constitutiva de la ruta de β -catenina/Tcf-4.

Se mostró que las células del control SW480/ β gal⁽⁻⁾ y DLD-1/VO expresan niveles elevados de progastrina, pero poco de las formas amidada y extendida con glicina de gastrina (Tabla 1). Dentro de las 7 semanas de inyección subcutánea en ratones atímicos Balb/c, estas células produjeron tumores grandes (figura 1B). Por el contrario, la capacidad para formar tumores en el mismo período de tiempo se redujo enormemente cuando la secreción de progastrina se disminuyó mediante la expresión estable de ARN de horquilla corto (ARNhc), dirigido contra el gen *GAST* (células SW480/*GAST*⁽⁻⁾, Figura 1A-B). Se obtuvieron resultados similares tras la inyección de células de cáncer colorrectal DLD-1 previamente caracterizadas (Hollande *et al.*, 2003) que expresan ADNc del gen *GAST* antisentido (figura 1B).

Tabla 1:

	DLD-1/VO	DLD-1/ASG[1]	DLD-1/ASG[2]
Progastrina	(396 \pm 11)	(19 \pm 3)	(23 \pm 1.5)
Ggly	(310 \pm 7)	(18.6 \pm 2)	(17 \pm 2)
Gamide	(<7)	(<7)	(<7)
	SW480/ β gal ⁽⁻⁾	SW480/ <i>GAST</i> ⁽⁻⁾ [1]	SW480/ <i>GAST</i> ⁽⁻⁾ [2]
Progastrina	45.3 \pm 3	9 \pm 1.5	6 \pm 1
Ggly	2.7 \pm 1	3 \pm 1.5	2.1 \pm 1
Gamide	<7	7	<7

A continuación, se demostró que la inhibición de progastrina disminuyó el crecimiento de tumores intestinales preexistentes en un contexto patológicamente más relevante, usando ratones APC Δ 14. Estos animales tienen una mutación truncante similar del gen *Apc* a la encontrada en poliposis adenomatosa familiar humana y en pacientes con cáncer colorrectal esporádico. También recapitulan parcialmente el fenotipo de epitelio intestinal encontrado en estos pacientes, puesto que desarrollan tumores espontáneos en el íleon, pero también más tumores de colon que el modelo APCmin^{+/-} (Colnot *et al.*, 2004). Los ratones APC Δ 14 de tres meses siempre presentan múltiples adenomas en el íleon y el colon (dato no mostrado), y se encontró que los niveles de progastrina, pero no los de gastrina amidada o de gastrina extendida con glicina, son elevados en estos adenomas (figura S1). Por lo tanto, estos animales nos proporcionan un modelo *in vivo* ideal para estudiar específicamente el papel de la modulación de progastrina en el crecimiento tumoral promovido por Tcf-4.

El tratamiento diario durante dos semanas con ARNhc dirigido contra el gen *GAST* murino (APC Δ 14/*GAST*⁽⁻⁾), que se mostró previamente que es eficaz en células de ratón (figura S1), indujo una reducción en la expresión del gen *GAST* y de progastrina en adenomas intestinales, en comparación con la encontrada tras el tratamiento con un ARNhc específico de luciferasa (APC Δ 14/*Luc*⁽⁻⁾) (figura 1C-D, y S1). En correlación con la expresión reducida de *GAST*, se detectó una reducción significativa en el tamaño tumoral en el intestino de animales APC Δ 14/*GAST*⁽⁻⁾, en comparación con los controles (chi cuadrado, $p < 0.0001$, $n = 9$ por grupo). Esta reducción era particularmente señalada en el íleon (figura 1C), pero fue visible una tendencia similar en el colon, aunque sin alcanzar significancia debido al número más pequeño de tumores situados en esta área (prueba exacta de Fischer, $p = 0.228$) (figura 1D). Además, se detectó en general una disminución del 20% en el número total de tumores intestinales en ratones APC Δ 14/*GAST*⁽⁻⁾, en comparación con animales del control. En particular, esta reducción fue drástica en dos animales del grupo APC Δ 14/*GAST*⁽⁻⁾, en los que se encontró que el íleon o el colon estaban libres de tumores. Por el contrario, el tratamiento con ARNhc específico de *GAST* fracasó a la hora de disminuir los niveles del gen *GAST* en un ratón del mismo grupo, y este animal presentó un número y tamaño similar de tumores a los encontrados en los controles (figura 1C). Por lo tanto, aunque la eficiencia de la disminución mediada por ARNhc de la producción de progastrina varió entre los animales APC Δ 14/*GAST*⁽⁻⁾, los tamaños y números de tumores se redujeron consistentemente en ratones que presentan niveles reducidos de progastrina.

Tomados juntos, estos resultados muestran que la secreción de progastrina es esencial para la tumorigenicidad de células de CRC humanas con *APC* mutado, y que un tratamiento que inhibe la producción de progastrina *in vivo* disminuyó fuertemente el crecimiento tumoral en un modelo de ratón que recapitula las etapas tempranas de poliposis adenomatosa y tumorigénesis colorrectal humana.

La progastrina modula el nivel de actividad transcripcional de β -catenina/Tcf-4 en células tumorales intestinales

con APC mutado.

Puesto que se mostró que la selección de progastrina como diana inhibió el crecimiento tumoral en dos modelos de tumor intestinal con *APC* mutado diferentes, se postula que este efecto fue debido a la capacidad de la progastrina para modular los niveles de actividad del complejo transcripcional de β -catenina/Tcf-4, que se sabe que está activado constitutivamente por la mutación de *APC*. Esta actividad, cuantificada mediante transcripción de un gen informador de luciferasa (TOP/FOP) (Korinek *et al.*, 1997), fue de hecho elevada en células del control (SW480/ β gal⁽⁻⁾), pero se inhibió significativamente en clones sin progastrina (figura 2A), sin modulación detectable de los niveles de β -catenina o Tcf-4 (figura S2). Se obtuvo un resultado similar en células DLD-1 previamente establecidas (Hollande *et al.*, 2003) que expresan un ADNc de *GAST* antisentido (figura S2). Se encontró que el tratamiento con progastrina recombinante 5 nM, pero también progastrina endógena producida mediante expresión de un constructo de preprogastrina insensible a ARNhc con codones optimizados en clones SW480/*GAST*⁽⁻⁾, restauran un fuerte nivel de transcripción del gen informador de luciferasa, confirmando que la progastrina es capaz de estimular esta ruta transcripcional (figura 2A). Además, la tinción inmunofluorescente indicó que la reducción de la actividad de β -catenina/Tcf-4 correlacionó con una marcada reducción en las cantidades nucleares de Tcf-4 y β -catenina desfosforilada en células SW480/*GAST*⁽⁻⁾, y el tratamiento de estas células con progastrina recombinante 5 nM restauró parcialmente la compartimentación nuclear de β -catenina y Tcf-4 (figura 2B). De forma similar, la expresión de varios genes diana de Tcf-4 (*c-myc*, ciclina D1, *Sox-9* y *claudina-1*) (Blache *et al.*, 2004; van de Wetering *et al.*, 2002) se redujo considerablemente tras el agotamiento de progastrina, y se estimuló significativamente mediante la reexpresión de progastrina o mediante tratamiento con el péptido recombinante (figuras 2C y S3). Por el contrario, el tratamiento con gastrina17 amidada o extendida con glicina, o con el antagonista L365, 260, del receptor de gastrina amidada (CCK-B), no afectó la actividad de β -catenina/Tcf-4 en estas células (figura S2), indicando que las formas procesadas cortas de gastrina fueron incapaces de imitar la regulación de la actividad de β -catenina/Tcf-4 por progastrina en estas células.

Los datos anteriores demuestran claramente que la progastrina producida mediante células de CRC SW480 estimula la actividad del complejo de β -catenina/Tcf-4. También muestra que el bloqueo de la producción de gastrina da como resultado una fuerte inhibición de esta ruta transcripcional, a pesar de su activación constitutiva en células con *APC* mutado.

El inhibidor de β -catenina y Tcf-4 (ICAT) es el interruptor molecular que media la modulación de la activación de β -catenina/Tcf-4 por progastrina.

A partir del estado mutado del gen *APC* en las células de CRC usadas, y puesto que la compartimentación nuclear de Tcf-4 y β -catenina se alteró significativamente en células sin progastrina (figura 2A), se teorizó que la menor actividad de β -catenina/Tcf-4 podría resultar de una mayor interacción de β -catenina con otra de sus parejas. Una de estas parejas, ICAT (inhibidor de β -catenina y Tcf-4), se identificó recientemente como un inhibidor directo de la asociación entre estas dos proteínas (Tago *et al.*, 2000), y es responsable de la menor proliferación y mayor muerte celular cuando se sobreexpresa en células DLD-1 y SW480 (Sekiya *et al.*, 2002). El agotamiento de progastrina indujo una fuerte expresión de ARNm y de proteína de ICAT en células SW480/*GAST*⁽⁻⁾ (figura 3A y B), mientras que la expresión de otra pareja de unión de β -catenina, la E-cadherina, no se vio afectada (dato no representado). La represión *de novo* de ICAT fue inducida por la reexpresión del ADNc de preprogastrina insensible a ARNhc (figura 3A y B), así como después del tratamiento con progastrina recombinante 5 nM (dato no representado).

Además, la expresión de ICAT fue mucho más débil en el epitelio colónico de ratones transgénicos que presentan sobreexpresión intestinal específica de tejidos de progastrina humana (Tg/Tg) (Cobb *et al.*, 2004) que la detectada en sus compañeros de camada de tipo salvaje (figura 3C). Puesto que la progastrina expresada por estos ratones está mutada, y por lo tanto es insensible a enzimas de procesamiento (Cobb *et al.*, 2004), este resultado demuestra que la progastrina de longitud completa es también capaz de disminuir *in vivo* la expresión de ICAT.

De este modo, progastrina endógena es capaz de reprimir la expresión de ICAT *in vitro* e *in vivo*, y el agotamiento de progastrina en células de CRC es suficiente para inducir una fuerte expresión *de novo* de este inhibidor.

Por lo tanto, se investigó si ICAT fue ciertamente la diana molecular implicada en la regulación de β -catenina/Tcf-4 por progastrina en células de CRC. Usando coimmunoprecipitación, se detectó un incremento significativo en la asociación entre β -catenina desfosforilada e ICAT en células SW480/*GAST*⁽⁻⁾ sin progastrina (figura 4A), en paralelo con la aparición de colocalización citoplásmica de estas dos proteínas (figura 4B). Por el contrario, la cantidad de Tcf-4 que coimmunoprecipita con β -catenina desfosforilada disminuyó significativamente en comparación con SW480/ β -gal⁽⁻⁾ (figura 4A). A su vez, β -catenina se unió de nuevo preferentemente a Tcf-4 después del tratamiento de las células SW480/*GAST*⁽⁻⁾ con progastrina recombinante, mientras que se redujo la unión a ICAT y la colocalización de estas dos proteínas (figura 4A-B).

Para confirmar que la represión de ICAT en células sin progastrina era funcionalmente responsable de la inhibición de la actividad transcripcional de β -cat/Tcf-4, se evitó experimentalmente la expresión *de novo* de ARNm y de

5 proteína de ICAT en células SW480/*GAST*⁽⁻⁾, usando la expresión de ARNhc conducida por retrovirus (figura S4). Se encontró que la activación del complejo transcripcional de β -catenina/Tcf-4 se restauró en las células SW480/*GAST*⁽⁻⁾/*ICAT*⁽⁻⁾ resultantes (figura 4C), que también presentaron una mayor expresión de genes diana de Tcf-4 (figura 4D). A su vez, este incremento se evitó mediante la sobreexpresión de una versión con codones optimizados de ADNc de ICAT en células SW480/*GAST*⁽⁻⁾/*ICAT*⁽⁻⁾ (figuras 4C, 4D y S4), demostrando en este proceso la especificidad de ICAT.

Estos resultados indican que la modulación de los niveles de expresión de ICAT es el suceso molecular principal que subyace a la regulación de la actividad de β catalizador/Tcf-4 por progastrina.

10 *In vivo*, se detectaron niveles bajos de ICAT (figura 5A y 5C) y una expresión elevada de los genes diana de Tcf-4 (figura 5B-C, y figura S5) en los tumores intestinales que sobreexpresan progastrina de animales APC Δ 14. Por el contrario, la expresión de ICAT estaba significativamente incrementada en adenomas recogidos de ratones tratados con los ARNc específicos de *GAST*⁽⁻⁾ (figura 5A-C), concomitantemente con una fuerte expresión de genes diana de Tcf-4. De forma interesante, se encontró que la expresión de ciclina D1, c-Myc y CD44 en el epitelio macroscópicamente sano de ratones APC3,14/Luc⁽⁺⁾ es elevada cuando se compara con animales *GAST*⁽⁻⁾, sugiriendo que la mutación de un único alelo de *Apc* es suficiente para incrementar parcialmente la expresión de genes diana en los intestinos de APC Δ 14, y que el agotamiento de progastrina ya es eficaz para reducir la actividad de Tcf-4 en este marco precanceroso (figura 5B y figura S5).

20 Además, los niveles de ARNm de *GAST* en tumores de colon humanos microdisecionados y en muestras sanas equivalentes obtenidas de 23 pacientes con CRC (figura S6) aumentaron hasta diversos grados en los tumores de 78% de pacientes estudiados (18/23) (figura 5D, gráfica superior), mientras que la expresión de ICAT se redujo en las muestras tumorales correspondientes (figura 5D, gráfica inferior). Se encontró una correlación estadística significativa en general entre la mayor expresión del gen *GAST* y la represión de ICAT (coeficiente de correlación de Spearman: $r = -0.46$, $p = 0.027$), corroborando la relevancia de la represión de ICAT inducida por progastrina *in vivo* (figura 5D, inserto). Esta correlación se confirmó mediante inmunohistoquímica en muestras de pacientes con expresión baja (por ejemplo paciente 22) o alta (por ejemplo paciente 4) de progastrina, que muestra que ICAT estaba reprimido, y que la inmunorreactividad para los genes diana de Tcf-4 fue fuerte en tumores que expresan niveles elevados de progastrina, mientras que estos patrones de expresión se invirtieron en tumores con baja progastrina (figura 5E). Se obtuvieron resultados similares en muestras de CRC procedentes de los 11 pacientes ensayados mediante inmunohistoquímica, y esta correlación refleja la correlación inversa entre los niveles de ICAT y la actividad de β -catenina/Tcf-4 observada *in vitro*.

35 En general, estos resultados demuestran que, a pesar de la activación constitutiva del complejo de β -catenina/Tcf-4 en células con *APC* mutado, la actividad de esta ruta se puede inhibir mediante agotamiento de progastrina a través de una reexpresión del inhibidor ICAT, *in vivo* e *in vitro*. Por lo tanto, estos resultados también proporcionan la primera demostración de una regulación hormonal de ICAT, un pequeño inhibidor de la unión de β -catenina a Tcf-4 (Tago *et al.*, 2000) descrito previamente como un supresor de tumores (Daniels y Weis, 2002).

40 La restauración de la expresión de ICAT es responsable de la menor tumorigenicidad inducida por agotamiento de progastrina en células de CRC.

45 A partir del papel esencial desempeñado por la activación constitutiva de la actividad transcripcional de β -catenina/Tcf-4 en la tumorigénesis del colon, y puesto que los presentes resultados indican que la reexpresión de ICAT fue la responsable de la menor transcripción mediada por Tcf-4 en células tumorales sin progastrina, se investigó *in vitro* e *in vivo* el papel de la represión de ICAT como un componente esencial de la actividad promotora de tumores de progastrina.

50 *In vitro*, se encontró que la inhibición de la reexpresión de ICAT en células SW480/*GAST*⁽⁻⁾/*ICAT*⁽⁻⁾ potencia su capacidad para el crecimiento, independiente del anclaje, en un ensayo de crecimiento en agar blando, hasta un nivel similar al encontrado para células SW480/ β -Gal⁽⁻⁾ (figura 6A). *In vivo*, la capacidad de las células SW480/*GAST*⁽⁻⁾/*ICAT*⁽⁻⁾ para formar tumores tras la inyección en ratones atímicos BALB/c fue mucho mayor que aquella de las células SW480/*GAST*⁽⁻⁾/Luc⁽⁻⁾ (figura 6B), y fue similar a las células SW480/ β -Gal⁽⁻⁾ (ver la figura 1B).

55 En general, estos resultados demuestran claramente que la represión de ICAT por progastrina endógena en células de CRC es fundamental para la actividad promotora de tumores de esta prohormona. Críticamente, también muestran que la expresión *de novo* de ICAT inducida por el agotamiento de progastrina es suficientemente fuerte para inducir una inhibición significativa de la actividad de β -catenina/Tcf-4 y disminuir de ese modo el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*.

60 La activación de cinasa ligada a integrina mediada por fosfatidilinositol 3 cinasa es responsable de la represión de ICAT y de la modulación de la ruta de β -catenina/Tcf-4 por progastrina.

65 Puesto que se mostró recientemente que progastrina activa la ruta de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) en células

intestinales *in vitro* (Hollande *et al.*, 2003) e *in vivo* (Ferrand *et al.*, 2005), se determinó si la activación de esta enzima fue necesaria para la represión de ICAT inducida por progastrina y para la estimulación de la actividad de β -catenina/Tcf-4 en células SW480.

5 En primer lugar, se encontró que la incubación de células SW480/ β gal⁽⁻⁾ con el inhibidor selectivo de PI3K LY294002 fue suficiente para inducir la expresión de ICAT (figura 7A), y para reducir la actividad transcripcional de β -catenina/Tcf-4 (figura S7), resolviendo así una relación previamente desconocida entre estas dos rutas. Por el contrario, la inhibición farmacológica de la ruta de Src o de ERK1/2 usando PP2 10 μ M o PD98059 1 μ M, respectivamente, no afectó a la expresión de ICAT o a la actividad de β -catenina/Tcf-4 (dato no mostrado). Además, LY294002 anuló la disminución de ICAT inducida mediante un tratamiento de clones de SW480/GAST⁽⁻⁾ con progastrina recombinante (figura 7A), mostrando que la activación de PI3K es esencial para la represión de ICAT por progastrina. En consecuencia, la fosforilación de serina 473 de Akt/PKB, una diana aguas abajo de PI3K, disminuyó notablemente en células SW480/GAST⁽⁻⁾ sin progastrina, pero se restableció tras la incubación con progastrina recombinante 5 nM (figura 7A).

15 Es conocido que Ser473 de Akt/PKB es una diana de fosforilación directa de cinasa ligada a integrina (ILK) (Delcommenne *et al.*, 1998). Para determinar si la activación de ILK fue la relación molecular perdida entre progastrina y la represión de ICAT, se evaluó en primer lugar si la expresión y/o actividad de ILK estaban reguladas por progastrina en células SW480. Tanto la expresión como la actividad de ILK estaban significativamente disminuidas en células SW480/GAST⁽⁻⁾, y esta inhibición se invirtió parcialmente tras el tratamiento con progastrina recombinante 5 nM (figura 7B). Estos resultados se corroboran mediante datos que muestran una reducción drástica en la fosforilación de serina de integrina β 1, una diana aguas abajo de ILK (Mulrooney *et al.*, 2000) en clones de SW480/GAST⁽⁻⁾ (figura 7B).

25 Además, se encontró que la expresión transitoria de ILK dominante negativa (DN-ILK), que se confirmó que reprime la fosforilación de Akt/PKB, fue capaz de inducir la expresión de ICAT en células SW480/ β gal⁽⁻⁾ (figura 7C), indicando que esta enzima está implicada en la ruta de señalización que controla la expresión del gen de ICAT. La inhibición farmacológica de PI3K en estas células SW480/ β gal⁽⁻⁾/DN-ILK no incrementó la expresión de ICAT más allá, indicando que las dos enzimas están implicadas en la misma ruta, o en rutas redundantes, en la regulación de la expresión del gen de ICAT (dato no representado).

30 Además, la represión de ARNm y proteína de ICAT, y la mayor fosforilación de Akt/PKB, inducida por el tratamiento de células SW480/GAST⁽⁻⁾ sin progastrina con progastrina recombinante, se evitó mediante la inhibición dominante negativa de ILK (figura 7C). Por el contrario, la represión de ICAT mediada por ARNhc en células SW480/GAST⁽⁻⁾ (como se muestra en la figura S4) no alteró la expresión o actividad de ILK (dato no representado), confirmando que ICAT está situado aguas abajo de ILK en la señalización mediada por progastrina.

40 Estos resultados demuestran claramente que las activaciones de PI3K y de ILK son fundamentales para la represión de ICAT mediada por progastrina en células de CRC.

El agotamiento de progastrina *in vitro* e *in vivo* induce la diferenciación terminal de células tumorales intestinales a lo largo de la estirpe celular de células calciformes productora de moco.

45 Puesto que se considera que la ruta de Wnt/B-catenina/Tcf-4 es esencial para el mantenimiento del fenotipo de células madre/progenitoras en la parte inferior de la cripta intestinal, y es vista ampliamente como un interruptor molecular entre la proliferación y diferenciación celulares (Radtke y Clevers, 2005; van de Wetering *et al.*, 2002), se determinó a continuación si su disminución en células de CRC sin progastrina fue capaz de llevar a estas células a la diferenciación.

50 A partir de este papel recientemente descrito como un promotor temprano de la diferenciación celular (Chung y Eng, 2005), se analizó en primer lugar la localización de PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina suprimido del cromosoma 10) en clones estables de SW480/GAST⁽⁻⁾. En sorprendente contraste con su localización predominantemente citoplásmica en células SW480/ β gal⁽⁻⁾, PTEN se encontró mayoritariamente en el núcleo de clones de SW480/GAST⁽⁻⁾ (figura 8A), una localización que se pensó que estaba asociada con su papel en la diferenciación celular (Lian y Di Cristofano, 2005).

55 Puesto que se espera que el proceso de desarrollar clones estables sin progastrina seleccione las células menos diferenciadas y no apoptóticas, se cuantificó en células SW480 la expresión de genes asociados con estirpes celulares intestinales terminalmente diferenciadas, tras la transfección transitoria con oligonucleótidos de ARNhc etiquetados con rodamina dirigidos contra el gen GAST o el de P-galactosidasa. Se detectó una inducción significativa en la expresión del gen Muc-2 específico de células calciformes en células SW480/GAST⁽⁻⁾, pero no en células SW480/ β -gal⁽⁻⁾, sin alteraciones detectables de los genes que codifican cromogranina A (expresada en células enteroendocrinas) o fosfatasa alcalina específica de enterocitos (figura 8B). Finalmente, la detección de la activación de caspasa-3 en células GAST⁽⁻⁾, y el hallazgo de que las células positivas para caspasa-3 activada también eran positivas para Muc-2 (figura 8C), indicó que el agotamiento de progastrina fue capaz de diferenciar

células de CRC hacia una estirpe secretora, antes de promover su apoptosis *in vitro*. El tratamiento con progastrina recombinante durante 48 h invirtió estos fenotipos (figura 8C), mientras que las gastrinas amidada y extendida con glicina no tuvieron ningún efecto (no representado). Se obtuvieron resultados similares con células DLD-1 transfectadas con oligonucleótidos de ARNic específicos de GAST (no representado). De este modo, el agotamiento de progastrina fue capaz de conducir a las células de CRC hacia una diferenciación terminal y apoptosis *in vitro*.

Además, se buscó demostrar que la reducción de los niveles de progastrina *in vivo* sería suficiente también para inducir la diferenciación de tumores intestinales inducidos mediante una activación constitutiva de la ruta de β -catenina/Tcf-4. La inmunohistoquímica en muestras recogidas de ratones APC Δ 14 tratados con los ARNic específicos de luciferasa o de GAST (ver la figura 1) demostró que los pequeños adenomas intestinales y colónicos remanentes de animales APC Δ 14/GAST^{-/-} presentaron números enormemente incrementados de células positivas para Muc-2 y Alcina-blue en comparación con los controles (figura 8D), en línea con la mayor expresión de ICAT y la expresión reducida de c-Myc en las mismas muestras (ver la figura 5A-C). Finalmente, mientras que las células que se tiñen para caspasa 3 activada fueron muy escasas en los animales del control, se encontró que sus números eran enormemente elevados en adenomas de animales APC Δ 14/GAST^{-/-} (figura 8D). Estos resultados demuestran que la disminución mediada por ARNic del gen GAST es capaz de conducir a las células tumorales a la diferenciación terminal y apoptosis *in vivo*. Los adenomas intestinales desarrollados por ratones APC Δ 14 no expresan formas extendidas con glicina o amidadas de gastrina. Puesto que nunca se detectaron intermedios de procesamiento de alto peso molecular mediante inmunotransferencia usando anticuerpos policlonales dirigidos contra progastrina recombinante, y puesto que se mostró que progastrina recombinante de longitud completa regula la diferenciación de células de CRC *in vitro*, se concluye que la diferenciación de células tumorales y el crecimiento tumoral reducido tras el tratamiento con ARNic específico de GAST son debidos mayoritariamente a concentraciones reducidas de progastrina de longitud completa.

Discusión

El presente trabajo proporciona la demostración de que el bloqueo de la producción de progastrina inhibe significativamente la "actividad transcripcional constitutiva de beta-catenina/Tcf-4 en células de CRC humanas, reduce su crecimiento independiente del anclaje *in vitro* así como su capacidad para formar tumores en ratones atímicos, y promueve su diferenciación y apoptosis. El agotamiento de progastrina dio como resultado la reexpresión del "inhibidor de beta-catenina y Tcf-4" (ICAT), un pequeño péptido identificado originalmente en *Xenopus* y que se muestra que inhibe la interacción de beta-catenina con Tcf-4 (Gottardi y Gumbiner, 2004; Tago *et al.*, 2000). Además, el tratamiento con progastrina recombinante disminuyó ICAT e incrementó la actividad de beta-catenina/Tcf-4 en células en las que la expresión del gen GAS se había apagado previamente, confirmando que la secreción crónica de progastrina estaba implicada en el mantenimiento de un nivel elevado de activación para esta ruta en estirpes celulares de CRC. La relevancia fisiológica de la conexión descubierta en la presente memoria entre la secreción crónica de progastrina y la represión de ICAT se subrayó *in vivo* mediante resultados que muestran una estrecha correlación entre estos dos sucesos en tumores colorrectales en un panel de 16 pacientes con CRC, y mediante la demostración de que la expresión de ICAT disminuyó en el epitelio colónico de ratones que sobreexpresan progastrina susceptibles a tumores (Cobb *et al.*, 2004).

Este dato es consistente con la observación previa de que la progastrina promueve el desarrollo de tumores colorrectales, y proporciona una explicación molecular para la fuerte reducción en el número y tamaño de adenomas observada en ratones APCmin^{+/-} con deficiencia de gastrina (Koh *et al.*, 2000). Además, el perfil de expresión de genes diana en células parietales gástricas procedentes de ratones con una mutación nula en el gen GAS, en comparación con ratones de tipo salvaje de un antecedente similar, mostró que 20% de genes expresados diferencialmente también se sabía que eran genes diana para Wnt y Myc, subrayando la conexión entre estas dos rutas de señalización (Jain *et al.*, 2006).

Es de señalar que, aunque la mayor expresión de progastrina en CRC está bien documentada (Ciccotosto *et al.*, 1995; Konturek *et al.*, 2002; Siddheshwar *et al.*, 2001; Van Solinge *et al.*, 1993), la represión de ICAT descrita en el presente trabajo entra en conflicto con el único informe previo referido a este campo (Koyama *et al.*, 2002). Esta discrepancia podría ser debida al hecho de que la mayor expresión de ICAT dada a conocer por Koyama *et al.* fue medida usando RT-PCR semicuantitativa en tejido no microdisecionado. Los presentes resultados, que permiten una comparación directa de la expresión de ICAT por células de origen epitelial en la mucosa sana y en tumores, parecen ser más consistentes con el papel descrito para ICAT como un supresor de tumores. De hecho, la represión de ICAT mediada por progastrina aparece esencial para el crecimiento tumoral, puesto que se mostró que ICAT nuevamente sintetizado en células de CRC sin progastrina compite con Tcf-4 por la unión a beta-catenina, dando como resultado una menor actividad transcripcional de Tcf-4 y una menor tumorigenicidad, de acuerdo con datos previamente dados a conocer referidos a este péptido (Sekiya *et al.*, 2002).

La capacidad para restablecer, si bien incompletamente, la represión de ICAT, y la activación de la ruta de beta-catenina/Tcf-4 mediante tratamiento con progastrina exógena, avala la existencia de un bucle autocrino/paracrino mediado por un receptor de membrana. El análisis de los sucesos de señalización implicados en la modulación

mediada por ICAT de la actividad de beta-catenina/Tcf-4 por progastrina permitió identificar una nueva conexión entre las rutas de beta-catenina/Tcf-4 y PI3Cinasa/ILK en células de CRC. De hecho, la inhibición farmacológica de PI3K y la interrupción de la señalización de ILK inducida de forma dominante negativa incrementó la expresión de ICAT y evitó la represión de este péptido mediada por progastrina. Los resultados previos por Tan *et al.* (Tan *et al.*, 2001) demostraron que la inhibición de ILK suprimió la transcripción dependiente de beta-catenina-Tcf/Lef, a través de la represión de Snail, incrementando de ese modo la expresión de E-cadherina y el reclutamiento de beta-catenina en la membrana en células de carcinoma de colon humanas con APC mutado. Los resultados del presente trabajo indican que incluso en células no confluentes, en las que el reclutamiento membránico de beta-catenina es bajo, la señalización de ILK mediada por progastrina es capaz de modular la actividad de beta-catenina/Tcf-4 a través de un control de la expresión de ICAT.

Finalmente, los presentes resultados también muestran que los agentes que antagonizan las funciones de progastrina proporcionan nuevas opciones terapéuticas para apoyar el presente enfoque quirúrgico en cáncer colorrectal. Los resultados presentados en la presente memoria muestran que la inhibición de la señalización de progastrina proporciona una alternativa terapéutica específica para el manejo de cáncer de colon. Puesto que progastrina parece ser segregada únicamente por el tumor y no por el epitelio sano, tal estrategia debería contrarrestar el efecto de las mutaciones frecuentes de APC y disminuir la activación de la señalización de beta-catenina/Tcf-4 próxima a niveles fisiológicos, promoviendo de ese modo la conservación de la integridad de la cripta normal.

Métodos

Células y condiciones de cultivo celular

Las estirpes celulares de cáncer colorrectal DLD1 y SW480 se mantuvieron a 37°C en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Eurobio, Les Ulis, Francia), 1% de L-glutamina y penicilina/estreptomina.

Materiales

Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-beta-catenina desfosforilada de ratón (clon 8E4; AG Scientific), anti-beta-catenina y anti-E-cadherina de ratón (Transduction Laboratories), anti-Tcf-4 de cabra (Santa Cruz Biotechnology), anti-ICAT de conejo (un regalo generoso de Dr C. Gottardi; (Gottardi y Gumbiner, 2004)), anti-PTEN policlonal (Upstate), anti-fosfoserina de conejo (Zymed), anti-ILK de conejo para transferencia western (Cell Signaling) y para inmunoprecipitación (Upstate), anti-integrina $\beta 1$ de ratón (Chemicon), anti-Akt de conejo, anti-Akt fosforilada en Ser473, anti-caspasa-3 activada (Cell Signaling), anticuerpo monoclonal Anti-Muc2 (Neomarkers),

Recogida de tejido humano

Los especímenes de tumores de colon y de epitelio histológicamente normal (tomado a una distancia significativa del tumor) procedentes de 16 pacientes se obtuvieron del patólogo tras la extirpación según las normas del gobierno francés y directrices de los comités locales. Se obtuvo la autorización por escrito de todos los pacientes. Las muestras tisulares se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el uso posterior.

Secciones tisulares, microdissección y reparación del ARN

Las secciones tisulares se prepararon a partir de muestras tumorales congeladas en nitrógeno líquido, y se llevó a cabo la tinción con hematoxilina/eosina para evaluar su calidad, orientación dentro del tejido, y contenido epitelial. La detección inmunofluorescente de beta-catenina, Tcf-4, c-myc e ICAT se llevó a cabo en secciones adyacentes a las usadas para microdissección.

Se llevó a cabo la microdissección por captura activada por láser (LCM) en cuatro a seis secciones por muestra usando un microdisseccionador PixCell® IIe de Arcturus (Alphelys, Plaisir, Francia). Se usaron los siguientes ajustes del haz del láser: 265 mV, 45 mWh, diámetro de 15 μ m, 18 ms. Los tejidos microdisseccionados se recogieron entonces directamente en amortiguador de lisis de ARN, y se preparó ARN usando el RNAeasy Microkit (Qiagen, Courtaboeuf, Francia), según las instrucciones del fabricante. La calidad y la cantidad del ARN recuperado se evaluaron usando RNA pico Labchips (Agilent Technologies, Palo Alto, California).

Transfección estable

La transfección del ADNc antisentido del gen de gastrina y del ADNc de control en estirpes celulares DLD1 se describió en (Hollande *et al.*, 2003). Con el fin de generar ARNhc de progastrina, se clonaron los siguientes oligonucleótidos en el vector pSilencer (Ambion), y se transfectoron en células SW480: sentido: 5'-GAAGAAGCCTATGGATGGATTCAAGAGAAGGTAGGTATCCGAAGAAGTTTTT-3' (SEC ID N°1) y antisentido: 5'-AATTA AAAA AACTTCTTCGATACCTACCTTCTCTTGAATCCATCCATAGGCTT CTTCGGCC 3' (SEC ID N°2).

Los oligonucleótidos de β -galactosidasa usados para generar ARNhc de control fueron: sentido: 5' GATCCCAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTCAAGAGAAAATAATTCGCGTCTGGCCTTTTTTTG GAAA-3' (SEC ID N°3); antisentido: 5'-AGCTTTTCCAAAAAAGGCCAGACGCGAATTATTTCTTTGAAAAATAATTCGCGTCTGGCCT TGG-3' (SEC ID N°4). Se sembraron 5×10^4 células/pocillo y se transfectaron 24 h más tarde con 500 ng de pSilencer/ARNhc de progastina o con pSilencer/ARNhc de β -galactosidasa, 50 ng de pCDNA-3, y 5 μ l/pocillo de Exgen 500 (Euromedex). La selección se llevó a cabo con neomicina (500 ng/p.1).

Transfección mediada por retrovirus de ARNhc de ICAT o luciferasa en células SW480/GAS⁽⁻⁾. Los oligonucleótidos de ARNhc para ICAT sentido 5' GATCCGGATGGGATCAAACCTGACATTTTCAAGAGAAATGTCAGGTTTGATCCATCTTTTTTGG 3' (SEC ID N°5) y antisentido 5' AATTCAAAAAGATGGGATCAAACCTGACATTTCTTTGAAAATGTCAGGTTTGATCCCATCCG 3' (SEC ID N°6), y para luciferasa (sentido 5'GATCCGACATTAAGAAGGCCAGCTTTTCAAGAGAGCTGGGCCTTAATCTTTTTT 3' (SEC ID N°7), y antisentido 5'AATTGATTAAGGCCAGCTCTCTTGAAGGCTGGGCCCTTCTTAATGTCG 3' (SEC ID N°8), se clonaron en pSIREN-retroQ (Clontech). La estirpe celular de empaquetamiento anfotrópico (Φ NX; Dr Garry Nolan, Stanford University, Stanford, California) se transfectó como se describió por Pear *et al.* (Pear *et al.*, 1993). El medio que contiene el virus se eliminó 48 h después de la transfección, y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. para sedimentar el desecho celular. Las células diana ($2 \cdot 10^5$ /pocillo, en placas de 6 pocillos) se infectaron en presencia de polibreno (8 μ g/ml) con 2 ml del medio centrifugado que contiene el virus. Las células infectadas se trataron con puromicina (5 μ g/ml) con el fin de seleccionar clones positivos.

Transfecciones transitorias

El día anterior a la transfección, se sembraron células SW480 en placas de 24 pocillos (5×10^4 células/pocillo). Las células se transfectaron con 100 pmol de ARNhc específico de GAS o específico de β -galactosidasa, etiquetado con rodamina, y 5 μ l/pocillo de Exgen 500 (Euromedex), según las instrucciones del fabricante. 48 h o 72 h después de la transfección, las células se lisaron (para inmunotransferencia y PCR), o se fijaron en paraformaldehído al 1% para inmunotinción.

Tinción con Alcian blue

72 h después de la transfección, las células en un cubreobjetos se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min. con Alcian blue (10 g/l en ácido acético al 3%). Tras aclarar las células en agua, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos de vidrio en mowiol, y se almacenaron a 4°C hasta el uso.

RT-PCR cuantitativa

Se pretrataron 2.5 μ g de ARN total con DNase RQ1 (Promega) durante 30 min. a 37°C y se usaron para la transcripción inversa con transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen). La PCR cuantitativa se llevó a cabo usando el kit LightCycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I (Roche Diagnostics, Meylan, Francia), en las siguientes condiciones:

Actina: desnaturalización durante 10 min. a 95°C, amplificación durante 50 ciclos: 10 s a 95°C, 6 s a 58°C, 11 s a 72°C. Curva de fusión: 0 s a 95°C, 30 s a 68°C, 0 s a 95°C, y el enfriamiento se realizó durante 2 min. a 40°C. Amplificación de c-myc, ILK, cromogranina A y GAPDH: desnaturalización durante 10 min. a 95°C, amplificación durante 50 ciclos: 10 s a 70°C, 6 s a 58°C, 13 s a 72°C. La curva de fusión fue 0 s a 95°C, 30 s a 80°C, 0 s a 95°C, y el enfriamiento se realizó durante 2 min. a 40°C. Amplificación de progastina, Muc-2, ALP e ICAT: desnaturalización durante 10 min. a 95°C, amplificación durante 50 ciclos con: 10 s a 70°C, 6 s a 95°C, 11 s a 72°C. La curva de fusión fue 0 s a 95°C, 30 s a 80°C, 0 s a 70°C, y el enfriamiento se realizó durante 2 min. a 40°C. Los cebadores usados para la amplificación de los genes seleccionados fueron: GAPDH-sentido: 5'GGTGGTCTCTCTGACTTCAACA3' (SEC ID N°9) antisentido: 5'GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT3' (SEC ID N°10); actina-sentido: 5'CGGGAATCTGCGTGACAT3' (SEC ID N°11); antisentido: 5'AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC3' (SEC ID N°12); ILK-sentido: 5'ATGACTGCCCGAATTAGCATG3' (SEC ID N°13); antisentido: 5'GCTACCCAGGCAGGTGCATA3' (SEC ID N°14); ICAT-sentido: 5'GCTCTGGTCTTTAGTTAGG3' (SEC ID N°15); antisentido: 5'GCACTTGGTTTCTTTCTTTTC3' (SEC ID N°16); c-myc-sentido: 5'CGTCTCCACACATCAGAGCACAA3' (SEC ID N°17); antisentido: 5'TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT3' (SEC ID N°18); progastina humana-sentido: 5'AGAGGATCCAAATGCAGCGACTATGTGTATG3' (SEC ID N°19); antisentido: 5'GGCGAATTCCTAGGATTGTTCTCTCATCCTCAG3' (SEC ID N°20); Muc-2-sentido: 5'TGGGTGTCCTCGTCTCTCTACA3' (SEC ID N°21); antisentido: 5'TGTTGCCAAACCGGTGGTA3' (SEC ID N°22); fosfatasa alcalina-sentido: 5'CTCCAACATGGACATTGACG3' (SEC ID N°23); antisentido: 5'CAGTGCGGTTCCACACATA3' (SEC ID N°24); cromogranina A-sentido: 5'ATCACCGCCACTGCCACCACCA3' (SEC ID N°25); antisentido: 5'CACCTTAGTGCCCTTTTGTATAGGGCT3' (SEC ID N°26).

Ensayo de formación de colonias en agar blando

5 Se suspendieron 1×10^5 células en agar al 0.2% en DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de glutamina y penicilina/estreptomina, y se sembraron en una cápsula de Petri de 6 cm que contiene una capa inferior solidificada (agar al 0.5% en medio de crecimiento). 8 días después de la siembra en placas, las células se tiñeron con violeta de cristal al 0.02%, y el tamaño y número de colonias se cuantificaron en un microscopio. Todos los clones se sembraron por triplicado, y se contaron diez campos para cada uno.

10 Estudios *in vivo*

15 Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* siguiendo las directrices francesas para estudios con animales experimentales (Direction des Services Vétérinaires, Ministère de l'Agriculture, Agreement N° B34-172-27), y cumplieron las directrices UKCCCR para el bienestar de animales en neoplasia experimental. Se inyectaron subcutáneamente 2×10^6 células en ratones BALB/c-nu/nu (atímicos) atímicos de 6 semanas. El crecimiento tumoral fue seguido de forma regular posteriormente (volumen tumoral estimado = (longitud x anchura x grosor)/2).

20 Ratones APC Δ 14 se enjaularon en condiciones convencionales y se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos. El primer grupo (n = 9) se trató una vez al día mediante administración intraperitoneal de 250 μ g/kg de ARNic contra el ARNm de *GAST* murino. Los ratones del control (n = 9) se trataron con una dosis similar de ARNic contra luciferasa (secuencia de ARNic en la figura S7 en línea). El diseño de los ARNic incorporó salientes en 3', y no incorporó una secuencia 5'UGUGU3', para minimizar la respuesta proinflamatoria y la degradación *in vivo* (Judge *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2006). Después de un tratamiento durante 10 días, los ratones se sacrificaron, se recogió su sangre, y se diseccionaron sus intestinos. La puntuación de los adenomas en el intestino y el colon se describió en (Colnot *et al.*, 2004). Las muestras de mucosa intestinal sana, así como de adenomas intestinales y de colon, se fijaron en PFA al 4% y se embebieron en parafina, o se congelaron en nitrógeno líquido, para transferencia Western, IHC o extracción de ARN. El plasma se preparó y evaluó para IL-6 y TNF α usando el sistema FACSarray (Becton Dickinson).

30 Ensayo de gen informador de luciferasa

35 El protocolo usado para medir la actividad transcripcional de TCF/LEF-1 se describe anteriormente (Morin *et al.*, 1997). De manera breve, las células se transfectaron con 500 ng de informador de TCF/LEF-1 (pTOP-FLASH), o con vector de control (pFOP-FLASH) y con 25 ng de pCMV-Renilla. La actividad de luciferasa se cuantificó usando el sistema de ensayo informador de luciferasa dual (Promega), y se normalizó con respecto a la actividad de Renilla.

Tinción inmunofluorescente

40 La tinción inmunofluorescente se llevó a cabo como se describe anteriormente (Hollande *et al.*, 2003). Los portaobjetos se observaron entonces usando un microscopio confocal LEICA sp2 de barrido por láser, con una lente de inmersión en aceite de x40.

45 Inmunohistoquímica en secciones tisulares en parafina

50 Se prepararon secciones tisulares de parafina a partir de ratones FVB/N que eran transgénicos para el gen GAS humano (Tg/Tg) o sus compañeros de camada de tipo salvaje (Cobb *et al.*, 2004). Tras el desparafinado y la hidratación, las secciones se pretrataron con peroxidasa durante 20 min. a temperatura ambiente. El antígeno se recuperó hirviendo las muestras durante 20 min. en 10 mM de Tris – 1 mM de EDTA, pH 9. Los portaobjetos se dejaron enfriar hasta la temperatura ambiente, y se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos en PBS + 0.05% de BSA. En todos los casos, el kit Envision+ (DAKO) se usó como reactivo secundario. Las tinciones se desarrollaron usando DAB (Sigma), y los portaobjetos se contratificaron con hematoxilina o con rojo nuclear sólido, y se montaron.

55 Lisados proteicos, inmunoprecipitación, SDS-PAGE, e inmunotransferencia Western

60 Los lisados proteicos, las inmunoprecipitaciones y la inmunotransferencia se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Hollande *et al.*, 2003). Las proteínas se visualizaron usando ECL Plus (Amersham Biosciences), y las bandas se cuantificaron mediante densitometría usando ImageJ 1.32J (NIH, Bethesda, MD).

Ensayos de cinasa del complejo inmunitario

65 Esta reacción se inició mediante adición de 25 μ l de amortiguador de cinasa (Hepes 50 mM pH 7.0, MnCl $_2$ 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, NaF 2 mM, 5 μ g de proteína básica de mielina (Sigma)) con 0.5 μ g de ATP (ATP 250 mM, 1 μ Ci de [γ - 32 P]ATP) por tubo, y se incubó a 30°C durante 20 min. La reacción se terminó mediante adición

de 10 µl de amortiguador de muestra 4X. Los tubos se centrifugaron a 10,000 g durante 1 min., y las proteínas se resolvieron en un gel de SDS-page al 14%. La fosforilación del sustrato se visualizó mediante autorradiografía (Marotta *et al.*, 2003).

5 Radioinmunoensayo

Los productos del gen GAS, progastrina, gastrina extendida con glicina (G-gly), y gastrina amidada (G-NH₂), en los sobrenadantes celulares se cuantificaron mediante radioinmunoensayo, como se describió anteriormente (Hollande *et al.*, 1997).

10

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando SAS versión 9.1 para Windows (Cary, NC, USA). Se usó la prueba de la t de Student con el fin de determinar la significancia estadística de las diferencias entre células del control y células sin progastrina, con o sin tratamiento con progastrina recombinante. Con el fin de determinar la asociación entre las expresiones de los genes GAS e ICAT en tumores humanos, las variables se normalizaron usando sus valores logarítmicos naturales antes de determinar el coeficiente de correlación de Pearson (r).

15

20

Ejemplo 2

Los anticuerpos selectivos contra progastrina invierten la represión de progastrina en la expresión de ICAT, e inducen una reducción en la expresión de c-myc.

25

Introducción

El presente ejemplo describe la caracterización de dos anticuerpos policlonales generados independientemente contra progastrina, con el objetivo de demostrar que reconocen selectivamente el péptido de progastrina de longitud completa (1-80) pero no los péptidos procesados potencialmente presentes en la sangre humana, tales como gastrina amidada, gastrina extendida con glicina, y el péptido de flanqueo C-terminal (CTFP) de seis aminoácidos. Esta caracterización se llevó a cabo *in vitro* usando un ensayo ELISA.

30

La segunda etapa descrita a continuación fue la validación de la prueba de concepto de que los efectos de progastrina sobre la expresión de ICAT y sobre la actividad de beta-catenina/Tcf4 se pueden bloquear mediante un anticuerpo selectivo. Con el fin de demostrar esta actividad así llamada neutralizante de los anticuerpos anti-progastrina, se usaron células de tumor colorrectal SW480 humanas, que presentan una mutación en el gen *apc* y desempeñan secreción de progastrina endógena debido a la actividad constitutiva de beta-catenina/Tcf4. En la tabla I se describe la capacidad de estas células para segregar cantidades elevadas de progastrina y niveles muy bajos de gastrina amidada y gastrina extendida con glicina.

35

40

Estas células se trataron independientemente con dos anticuerpos policlonales diferentes, uno dirigido contra la secuencia N-terminal de progastrina, el otro contra la secuencia C-terminal.

La secuencia N-terminal fue: SWKPRSQQPDAPLGT (SEC ID N°32)

La secuencia C-terminal fue: FGRRSAEDEN (SEC ID N°31)

45

Resultados

- Selectividad del anticuerpo: La selectividad de los anticuerpos se evaluó mediante una prueba de ELISA descrita en la sección de Métodos. Los resultados (figura 10) muestran que ambos anticuerpos policlonales reconocen selectivamente progastrina y los péptidos respectivos usados como inmunógenos para su producción. No se unen a gastrina extendida con glicina, a gastrina amidada, o al péptido de flanqueo C-terminal (CTFP) (secuencia: SAEDEN), otro péptido derivado del proceso de maduración de progastrina y detectado en el suero humano (Smith KA, Gastroenterology 2006).

50

- Actividad neutralizante de anticuerpos antiprogastrina: La capacidad de los anticuerpos antiprogastrina para inhibir la represión de ICAT por progastrina y para inducir una disminución resultante en la actividad transcripcional del complejo de beta-catenina/Tcf4 se abordó en células de carcinoma colorrectal SW480. Cuando las células se incubaron durante 30 horas en presencia de anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra el extremo N-terminal o C-terminal de progastrina (1-80), ambos a una dilución 1/5000, la expresión de ARNm de ICAT aumentó enormemente, mientras que disminuyó notablemente la de c-Myc y la de ciclina D 1, en comparación con células tratadas con la misma concentración de un anticuerpo policlonal de conejo no específico. C-myc y ciclina D1 son dianas reconocidas de la actividad transcripcional de beta-catenina/Tcf4, y se considera que la disminución en su expresión es una consecuencia de la disminución en la actividad de beta-catenina/Tcf4 (figura 11).

55

60

65

Conclusión

Estos resultados demuestran *in vitro* que la inhibición de la expresión de ICAT por progastrina se puede invertir mediante su unión a un anticuerpo selectivo, dando como resultado una inhibición de la actividad constitutiva de beta-catenina/Tcf4. De este modo, por primera vez se proporciona en la presente memoria la prueba de concepto de que un anticuerpo antiprogastrina se puede usar para bloquear los efectos protumorigénicos de progastrina que aparecen vía ICAT y la actividad de beta-catenina/Tcf4.

Métodos

Elisa

Los antígenos se diluyeron a la concentración indicada en PBS, y se revistieron 100 µl de placas de 96 pocillos Multisorb a 4°C toda la noche. Al día siguiente, los pocillos se lavaron 3 veces con 200 µl de PBS/Tween 1%, y se añadieron 100 µl de la disolución de bloqueo (PBS/Tween 1%/BSA 0.1%) durante 2 horas a 22°C. Después de otros 3 lavados con PBS/Tween al 1%, los anticuerpos primarios se diluyeron en la disolución de bloqueo, y se añadieron 100 µl a los pocillos durante 2 horas a 22°C. La concentración de los anticuerpos se indica en las figuras. Los anticuerpos secundarios se diluyen en el mismo amortiguador de bloqueo, y después de 3 lavados, se añaden 100 µl a los pocillos durante 2 horas a 22°C. Finalmente, los pocillos se lavaron de nuevo con PBS/Tween 1%, y se añadieron 100 µl de sustrato de disolución de OPD durante 20 minutos a 22°C. La reacción se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 4N, y la lectura se llevó a cabo a 492 nm.

Cultivo celular y tratamiento con anticuerpos selectivos para progastrina

La estirpe celular de CRC SW480 se mantuvo a 37°C en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Eurobio, Les Ulis, Francia), 1% de L-glutamina y penicilina/estreptomicina. Las células SW480 se sembraron en placas de 6 pocillos (200,000 células/pocillo) en DMEM que contiene 10% de FBS, 1% de antibióticos y 1% de glutamina, se dejaron crecer toda la noche a 37°C, 5% de CO₂, y después se privaron de suero durante 24 horas. A la mañana siguiente, el medio se sustituyó por DMEM sin FBS que contiene una dilución 1/5,000 de anticuerpos policlonales de control o anticuerpos policlonales selectivos para progastrina, seguido de la incubación a 37°C, 5% de CO₂. El medio que contiene los anticuerpos se renovó 12 horas más tarde. Después de 30 horas, las células se lavaron con PBS, y se lisaron con el amortiguador de lisis del kit de extracción de ARN.

Preparación de ARN y RT-PCR cuantitativa

Se preparó ARN a partir de células SW480 usando el RNeasy Protect Minikit (Qiagen France SA, 91974 Courtaboeuf, Francia). La calidad y cantidad del ARN recuperado se evaluaron usando RNA pico Labchips (Agilent Technologies, Palo Alto, California). Para la transcripción inversa, se pretrataron 2.5 µg de ARN total procedente de cada muestra con DNase RQ1 (Promega) durante 30 min. a 37°C, y se incubaron con M-MLV (InVitrogen). La PCR cuantitativa se llevó a cabo a partir de 24 de ADNc por muestra, usando el kit LightCycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I (Roche Diagnostics). Para calibrar la carga de ARN, se usó la expresión de ARNm de GAPDH.

Condiciones de los ciclos para PCR cuantitativa

- Para la amplificación de c-myc y GAPDH: desnaturalización durante 10 min. a 95°C, amplificación durante 50 ciclos: 10 s a 95°C, 6 s a 58°C, 13 s a 72°C. La curva de fusión fue 0 s a 95°C, 30 s a 80°C, 0 s a 95°C, y el enfriamiento se realizó durante 2 min. a 40°C.
- Para la amplificación de ICAT: desnaturalización durante 10 min. a 95°C, amplificación durante 50 ciclos con: 10 s a 95°C, 6 s a 60°C, 11 s a 72°C. La curva de fusión fue 0 s a 95°C, 30 s a 80°C, 0 s a 70°C, y el enfriamiento se realizó durante 2 min. a 40°C.
- Para la amplificación de ciclina D1: 10 min. a 95°C, amplificación durante 50 ciclos con: 10 s a 95°C, 6 s a 70°C, 11 s a 72°C. La curva de fusión fue 0 s a 95°C, 30 s a 80°C, 0 s a 95°C, y el enfriamiento se realizó durante 2 min. a 40°C.

Cebadores para la PCR cuantitativa en secuencias humanas:

GAPDH-sentido: 5'GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA3' (SEC ID N°33)
 GAPDH-antisentido: 5'GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT3' (SEC ID N°34)
 ICAT-sentido: 5'GCTCTGGTGCTTTAGTTAGG3' (SEC ID N°35)
 ICAT-antisentido: 5'GCACTTGGTTTCTTTCTTTTC3' (SEC ID N°36)
 c-Myc-sentido: 5'CGTCTCCACACATCAGAGCACAA3' (SEC ID N°37)
 c-Myc-antisentido: 5'TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT3' (SEC ID N°38)

Ciclina D1-sentido: 5'-CCGTCCATGGGGAAGATC-3' (SEC ID N°39)

Ciclina D1-antisentido: 5'-ATGGCCAGCGGGAAGAC-3' (SEC ID N°40)

Conclusiones generales sobre los ejemplos 1 y 2

5 Por primera vez, se proporcionan datos suficientes y necesarios que demuestran que el agotamiento de progastrina de células de tumor colorrectal humanas invierte la tumorigénesis, al igual que induce la diferenciación y apoptosis de células que tienen actividad constitutiva de beta-catenina/Tcf4. Estos efectos son específicos de progastrina. Esto se muestra *in vitro* en dos estirpes celulares (DLD-1 y SW480), así como *in vivo* con las mismas estirpes celulares injertadas en ratones atímicos y en un modelo de ratón que recapitula la tumorigénesis humana. De hecho, en este modelo de ratón (APC Δ 14), el gen *apc* posee una mutación que conduce a la activación de la ruta de beta-catenina/Tcf4, y los ratones desarrollan espontáneamente adenomas y adenocarcinomas. Estos ratones se trataron *in vivo* con un ARNⁱ dirigido contra el ARNm de progastrina. Esto dio como resultado una inversión de la tumorigénesis, conduciendo la diferenciación y la apoptosis a la contracción del tumor. Se muestra que este tratamiento inhibe profundamente la actividad constitutiva de beta-catenina/Tcf4. Por lo tanto, es la primera vez que se muestra que se invierte la tumorigénesis iniciada por una mutación del gen *apc*. A nivel molecular, se muestra que el agotamiento de progastrina tiene efectos antitumorales debido a que induce la reexpresión de ICAT, un inhibidor endógeno de la actividad transcripcional de beta-catenina/Tcf4.

20 En cáncer colorrectal humano, se demuestra por primera vez la aparición de una correlación entre hiperactivación de la ruta de beta-catenina/Tcf4, niveles elevados de expresión del gen de gastrina y niveles bajos de expresión de ICAT. Además, se mostró la sobreexpresión de la propia progastrina en muestras tumorales en las que los niveles del gen diana de Tcf4 están elevados. En adenomas intestinales que surgen espontáneamente de ratones APC Δ 14, también se detectaron niveles elevados de progastrina (y no de gastrina extendida con glicina ni de gastrina amidada), y una baja expresión de ICAT. Estos parámetros se invirtieron después del tratamiento con ARNⁱ selectivo para el gen de gastrina. Finalmente, se proporcionan datos que demuestran que el bloqueo de los efectos de progastrina también se puede lograr con anticuerpos dirigidos específicamente contra progastrina, incapaces de unirse a gastrina extendida con glicina o a gastrina.

30 De este modo, se proporcionan pruebas de concepto y datos científicos suficientes para el uso de ARNⁱ, ARN^h o de anticuerpos dirigidos contra progastrina para inducir la expresión de ICAT y bloquear e invertir la tumorigénesis de colon asociada con una actividad constitutiva de beta-catenina/Tcf4.

Referencias:

- 35 Blache, P., M. van de Wetering, I. Duluc, C. Domon, P. Berta, J.N. Freund, H. Clevers, and P. Jay. 2004. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Mol.* 166:37-47.
- 40 Brown, D., U. Yallampalli, A. Owlia, y P. Singh. 2003. pp60c-Src Kinase mediates growth effects of the full-length precursor progastrin1-80 peptide on rat intestinal epithelial cells, *in vitro*. *Endocrinology.* 144:201-11.
- 45 Chakladar, A., A. Dubeykovskiy, L.J. Wojtulciewicz, J. Pratap, S. Lei, y T.C. Wang. 2005. Synergistic activation of the murine gastrin promoter by oncogenic Ras and beta-catenin involves SMAD recruitment. *Biochem Biophys Res Commun.* 336:190-6.
- Chung, J.H., y C. Eng. 2005. Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res.* 65:8096-100.
- 50 Ciccotosto, G.D., A. McLeish, K.J. Hardy, and A. Shulkes. 1995. Expression, processing, and secretion of gastrin in patients with colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 109:1142-53.
- Cobb, S., T. Wood, J. Ceci, A. Varro, M. Velasco, y P. Singh. 2004. Intestinal expression of mutant and wild-type progastrin significantly increases colon carcinogenesis in response to azoxymethane in transgenic mice. *Cancer.* 100:1311-23.
- 55 Cobb, S., T. Wood, L. Tessarollo, M. Velasco, R. Given, A. Varro, N. Tarasova, y P. Singh. 2002. Deletion of functional gastrin gene markedly increases colon carcinogenesis in response to azoxymethane in mice. *Gastroenterology.* 123:516-30.
- 60 Coelho, S.M., M. Vaisman, y D.P. Carvalho. 2005. Tumour re-differentiation effect of retinoic acid: a novel therapeutic approach for advanced thyroid cancer. *Curr Pharm Des.* 11:2525-31.
- 65 Colnot, S., M. Niwa-Kawakita, G. Hamard, C. Godard, S. Le Plenier, C. Houbbron, B. Romagnolo, D. Berrebi, M. Giovannini, y C. Perret. 2004. Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab Invest.* 84:1619-30.

- Daniels, D.L., y W.I. Weis. 2002. ICAT inhibas beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules. *Mol Cell*. 10:573-84.
- 5 Delcommenne, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett, y S. Dedhar. 1998. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Nad Acad Sci USA*. 95:11211-6.
- 10 Ferrand, A., C. Bertrand, G. Portolan, G. Cui, J. Carlson, L. Pradayrol, D. Fourmy, M. Dufresne, T.C. Wang, y C. Seva. 2005. Signaling pathways associated with colonic mucosa hyperproliferation in mice overexpressing gastrin precursors. *Cancer Res*. 65:2770-7.
- 15 Finley, G.G., R.A. Koski, M.F. Melhem, J.M. Pipas, y A.I. Meisler. 1993. Expression of the gastrin gene in the normal human colon and colorectal adenocarcinoma. *Cancer Res*. 53:2919-26.
- 20 Fodde, R., R. Smits, y H. Clevers. 2001. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 1:55-67.
- Gottardi, C.J., y B.M. Gumbiner. 2004. Role for ICAT in beta-catenin-dependent nuclear signaling and cadherin functions. *Am J Physiol Cell Physiol*. 286:C747-56.
- Hollande, F., A. Imdahl, T. Mantamadiotis, G.D. Ciccotosto, A. Shulkes, y G.S. Baldwin. 1997. Glycine-extended gastrin acts as an autocrine growth factor in a nontransformed colon cell line. *Gastroenterology*. 113:1576-88.
- 25 Hollande, F., D.J. Lee, A. Choquet, S. Roche, y G.S. Baldwin. 2003. Adherensjunctions and tight junctions are regulated via different pathways by progastrin in epithelial cells. *J Cell Sci*. 116:1187-97.
- Hollande, F., A. Shulkes, y G.S. Baldwin. 2005. Signaling the junctions in gut epithelium. *Sci STKE*. 2005:pe13.
- 30 Jain, R.N., C.S. Brunkan, C.S. Chew, y L.C. Samuelson. 2006. Gene expression profiling of gastrin target genes in parietal cells. *Physiol Genomics*. 24:124-32.
- Janssen, K.P., P. Alberici, H. Fsihi, C. Gaspar, C. Breukel, P. Franken, C. Rosty, M. Abal, F. El Marjou, R. Smits, D. Louvard, R. Fodde, y S. Robine. 2006. APC and Oncogenic KRAS Are Synergistic in Enhancing Wnt Signaling in Intestinal Tumor Formation and Progression. *Gastroenterology*. 131:1096-109.
- 35 Judge, A.D., V. Sood, J.R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, e I. MacLachlan. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol*. 23:457-62.
- 40 Kochman, M.L., J. DelValle, C.J. Dickinson, y C.R. Boland. 1992. Posttranslational processing of gastrin in neoplastic human colonic tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 189:1165-9.
- Koh, T.J., C.J. Bulitta, J.V. Fleming, G.J. Dockray, A. Varro, y T.C. Wang. 2000. Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest*. 106:533-9.
- 45 Koh, T.J., G.J. Dockray, A. Varro, R.J. Cahill, C.A. Dangler, J.G. Fox, y T.C. Wang. 1999. Overexpression of glycine-extended gastrin in transgenic mice results in increased colonic proliferation. *J Clin Invest*. 103:1119-26.
- 50 Konturek, P.C., W. Bielanski, S.J. Konturek, A. Hartwich, P. Pierzchalski, M. Gonciarz, K. Mariiez, T. Starzynska, M. Zuchowicz, Z. Darasz, J.P. Gotze, J.F. Rehfeld, y E.G. Hahn. 2002. Progastrin and cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Dig Dis Sci*. 47:1984-91.
- Korinek, V., N. Barker, P.J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, y H. Clevers. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*. 275:1784-7. Koyama, T., K. Tago, T. Nakamura, S. Ohwada, Y. Morishita, J. Yokota, and T. Akiyama. 2002. Mutation and expression of the beta-catenin-interacting protein ICAT in human colorectal tumors. *Jpn J Clin Oncol*. 32:358-62.
- 55 Lallemand-Breitenbach, V., J. Zhu, S. Kogan, Z. Chen, y H. de The. 2005. Opinion: how patients have benefited from mouse models of acute promyelocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 5:821-7.
- 60 Lian, Z., y A. Di Cristofano. 2005. Class reunion: PTEN joins the nuclear crew. *Oncogene*. 24:7394-400.
- 65 Litvak, D.A., M.R. Hellmich, K. Iwase, B.M. Evers, J. Martinez, M. Amblard, y C.M. Townsend, Jr. 1999. JMV1155: a novel inhibitor of glycine-extended progastrin-mediated growth of a human colon cancer in vivo. *Anticancer Res*. 19:45-9.

- Marotta, A., K. Parhar, D. Owen, S. Dedhar, y B. Salh. 2003. Characterisation of integrin-linked kinase signalling in sporadic human colon cancer. *Br J Cancer*. 88:1755-62.
- 5 Marques, J.T., T. Devosse, D. Wang, M. Zamanian-Daryoush, P. Serbinowski, R. Hartmann, T. Fujita, M.A. Behlke, y B.R. Williams. 2006. A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol*.
- 10 Morin, P.J., A.B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, y K.W. Kinzler. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 275:1787-90.
- Mulrooney, J., K. Foley, S. Vineberg, M. Barreuther, y L. Gabel. 2000. Phosphorylation of the beta1 integrin cytoplasmic domain: toward an understanding of function and mechanism. *Exp Cell Res*. 258:332-41.
- 15 Nemeth, J., B. Taylor, S. Pauwels, A. Varro, y G.J. Dockray. 1993. Identification of progastrin derived peptides in colorectal carcinoma extracts. *Gut*. 34:90-5.
- Nordlund MS, Fermer C, Nilsson O, Warren DJ, y E. Paus. 2007. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies for Immunoassay of the Liang Cancer Marker proGRP. *Tumour Biol*. 28(2):100-10.
- 20 Ottewell, P.D., A. Varro, G.J. Dockray, C.M. Kirton, A.J. Watson, T.C. Wang, R. Dimaline, y D.M. Pritchard. 2005. COOH-terminal 26-amino acid residues of progastrin are sufficient for stimulation of mitosis in murine colonic epithelium in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 288:G541-9.
- 25 Ottewell, P.D., A.J. Watson, T.C. Wang, A. Varro, G.J. Dockray, y D.M. Pritchard. 2003. Progastrin stimulates murine colonic epithelial mitosis after DNA damage. *Gastroenterology*. 124:1348-57.
- Pear, W.S., G.P. Nolan, M.L. Scott, y D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:8392-6.
- 30 Radtke, F., y H. Clevers. 2005. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*. 307:1904-9.
- Sekiya, T., T. Nakamura, Y. Kazuki, M. Oshimura, K. Kohu, K. Tago, S. Ohwada, y T. Akiyama. 2002. Overexpression of Icat induces G(2) arrest and cell death in tumor cell mutants for adenomatous polyposis coli, beta-catenin, or Axin. *Cancer Res*. 62:3322-6.
- 35 Seva, C., C.J. Dickinson, y T. Yamada. 1994. Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin. *Science*. 265:410-2.
- 40 Siddheshwar, R.K., J.C. Gray, y S.B. Kelly. 2001. Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin or glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma. *Gut*. 48:47-52.
- Singh, P., A. Owlia, A. Varro, B. Dai, S. Rajaraman, y T. Wood. 1996. Gastrin gene expression is required for the proliferation and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res*. 56:4111-5.
- 45 Singh, P., M. Velasco, R. Given, A. Varro, y T.C. Wang. 2000. Progastrin expression predisposes mice to colon carcinomas and adenomas in response to a chemical carcinogen. *Gastroenterology*. 119:162-71.
- Singh, P., Z. Xu, B. Dai, S. Rajaraman, N. Rubin, y B. Dhruva. 1994. Incomplete processing of progastrin expressed by human colon cancer cells: role of noncarboxyamidated gastrins. *Am J Physiol*. 266:G459-68.
- 50 Stepan, V.M., M. Sawada, A. Todisco, y C.J. Dickinson. 1999. Glycine-extended gastrin exerts growth-promoting effects on human colon cancer cells. *Mol Med*. 5:147-59.
- 55 Tago, K., T. Nakamura, M. Nishita, J. Hyodo, S. Nagai, Y. Murata, S. Adachi, S. Ohwada, Y. Morishita, H. Shibuya, y T. Akiyama. 2000. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev*. 14:1741-9.
- Tan, C., P. Costello, J. Sanghera, D. Dominguez, J. Baulida, A.G. de Herreros, y S. Dedhar. 2001. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells. *Oncogene*. 20:133-40.
- 60 van de Wetering, M., E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Baffle, D. Coudreuse, A.P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema, y H. Clevers. 2002. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 111:241-50.
- 65

van Es, J.H., y H. Clevers. 2005. Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. Trends Mol Med. 11:496-502.

5 Van Solinge, W.W., F.C. Nielsen, L. Friis-Hansen, U.G. Falkmer, y J.F. Rehfeld. 1993. Expression but incomplete maturation of progastrin in colorectal carcinomas. Gastroenterology. 104:1099-107.

10 Wang, T.C., T.J. Koh, A. Varro, R.J. Cahill, C.A. Dangler, J.G. Fox, y G.J. Dockray. 1996. Processing and proliferative effects of human progastrin in transgenic mice. J Clin Invest. 98:1918-29.

10 Wang, Z.Y., y Z. Chen. 2000. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. Lancet Oncol. 1:101-6.

15 Wray C.J., Rilo H.L., y S.A. Ahmad. 2004. Colon cancer angiogenesis and antiangiogenic therapy. Expert Opin Investig Drugs. 13(6):631-41.

Listado de secuencias

- 20 <110> INSERM
- <120> Inhibidores de la represión inducida por progastrina de ICAT para tratar y/o prevenir cáncer colorrectal, poliposis adenomatosa que presentan células colónicas que segregan progastrina y células colónicas en las que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 está constitutivamente activa.
- 25 <130> BEP060186
- <160> 40
- <170> PatentIn versión 3.3
- 30 <210> 1
- <211> 53
- <212> ADN
- <213> artificial
- 35 <220>
- <223> ARNhc
- <400> 1
- 40 gaagaagcct atggatggat tcaagagaag gtaggtatcc gaagaagttt ttt 53
- <210> 2
- <211> 61
- <212> ADN
- 45 <213> artificial
- <220>
- <223> ARNhc
- 50 <400> 2
- aattaaaaaaa cttcttcgga tacctacctt ctcttgaatc catccatagg cttcttcggc 60
- c 61
- <210> 3
- <211> 67
- 55 <212> ADN
- <213> artificial
- <220>
- <223> ARNhc
- 60 <400> 3
- gatcccaagg ccagacgcga attatatttc aagagaaaat aattcgcgtc tggccttttt 60
- ttggaaa 67

ES 2 727 306 T3

<210> 4
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> ARNhc
 <400> 4
 agcttttcca aaaaaaggcc agacgcgaat tattttctct tgaaaaataa ttcgcgtctg 60
 10 gccttgg 67
 <210> 5
 <211> 64
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNhc
 20 <400> 5
 gatccggatg ggatcaaacc tgacattttc aagagaaatg tcaggtttga tcccatcttt 60
 tttg 64
 <210> 6
 <211> 64
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNhc
 30 <400> 6
 aattcaaaaa agatgggatc aaacctgaca tttctcttga aaatgtcagg tttgatcca 60
 tccg 64
 <210> 7
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> ARNhc
 <400> 7
 gatccgacat taagaagggc ccagctttc aagagagctg ggcottaatc ttttt 56
 45 <210> 8
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> ARNhc
 <400> 8
 aattgattaa ggcccagctc tottgaaaag ctgggccctt cttaatgctg 50
 55
 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 60

	<220> <223> cebador	
5	<400> 9 ggtggtctcc tctgactca aca	23
10	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> cebador	
15	<400> 10 gttgctgtag ccaaattcgt tgt	23
20	<210> 11 <211> 18 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> cebador	
25	<400> 11 cggaatctg cgtgacat	18
30	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 12 aaggaaggct ggaagagtgc	20
40	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 13 atgactgccc gaattagcat g	21
50	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
55	<220> <223> cebador	
60	<400> 14 gctaccagg caggtgcata	20
65	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	

	<220> <223> cebador	
5	<400> 15 gctctggtgc ttagttagg	20
10	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> artificial	
15	<220> <223> cebador <400> 16 gcacttgggt tctttcttt c	21
20	<210> 17 <211> 23 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> cebador <400> 17 cgtctccaca catcagagca caa	23
30	<210> 18 <211> 22 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> cebador <400> 18 tcttggcagc aggatagtc tt	22
40	<210> 19 <211> 33 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> cebador <400> 19 agaggatcca aatgcagcga ctatgtgtg atg	33
50	<210> 20 <211> 35 <212> ADN <213> artificial	
55	<220> <223> cebador <400> 20 ggcgaattcc taggattgtt agttctcatc ctacg	35
60	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> artificial	
65		

ES 2 727 306 T3

	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 21 tgggtgtccc tcgtctccta ca	22
	<210> 22	
	<211> 19	
10	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
15	<400> 22 tggtgcaaaa ccggtggta	19
	<210> 23	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
25	<400> 23 ctccaacatg gacattgacg	20
	<210> 24	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
35	<223> cebador	
	<400> 24 cagtgcggtt ccacacatac	20
40	<210> 25	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
45	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 25 atcaccgcca ctgccaccac ca	22
50	<210> 26	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 26 caccttagtg tccccttttg tcatagggct	30
60	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> ADN	
65	<213> artificial	

ES 2 727 306 T3

<220>
 <223> ARNic

 5 <400> 27
 gaagaagccu auggaugat t 21

 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> artificial

 <220>
 <223> ARNic

 15 <400> 28
 uccauccaua ggcuucuuct t 21

 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> artificial

 <220>
 <223> ARNic

 25 <400> 29
 gaagaggccu acggauggt 20

 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> artificial

 <220>
 <223> ARNic

 35 <400> 30
 ccauccguag gccucuuctt 20

 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> epítopo

 <400> 31
 Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
 1 5 10
 50
 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> epítopo

 <400> 32
 Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr
 1 5 10 15
 60
 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN

ES 2 727 306 T3

	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 33 ggtggctccc tctgactca aca	23
	<210> 34	
10	<211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 34 gttgctgtag ccaaattcgt tgt	23
20	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador	
	<400> 35 gctctggtgc ttagttagg	20
30	<210> 36 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 36 gcacttggtt tcttctttt c	21
	<210> 37 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 37 cgtctccaca catcagagca caa	23
	<210> 38 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador	
60	<400> 38 tctggcagc aggatagtc tt	22
	<210> 39 <211> 18 <212> ADN	
65		

ES 2 727 306 T3

<213> Artificial
<220>
<223> cebador
5
<400> 39
ccgtccatgg ggaagatc 18
10 <210> 40
<211> 17
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> cebador
<400> 40
atggccagcg ggaagac 17

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo que se une específicamente a la progastrina, para su utilización en el tratamiento del cáncer colorrectal.
2. Anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo para su utilización según la reivindicación 1, en el que la ruta transcripcional mediada por beta-catenina/Tcf-4 del cáncer colorrectal que es tratado está constitutivamente activa.
- 10 3. Anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo para su utilización según la reivindicación 1, en el que las células del cáncer colorrectal que es tratado contienen una mutación en su gen adenomatous polyposis coli (APC).
4. Anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo para su utilización según la reivindicación 1, en el que las células del cáncer colorrectal que es tratado contienen una mutación en su gen de beta-catenina.
- 15 5. Anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es selectivo para la progastrina en comparación con las formas amidada o extendida con glicina de la gastrina 17 y la gastrina 34.
- 20 6. Anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo para su utilización según la reivindicación 5, que se une a una región C-terminal de la progastrina humana.
7. Anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo para su utilización según la reivindicación 5, que se une a FGRRSAEDEN (SEC ID nº:31).
- 25 8. Anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo para su utilización según la reivindicación 5, que se une a una región N-terminal de la progastrina humana.
- 30 9. Anticuerpo o fragmento de unión de anticuerpo para su utilización según la reivindicación 5, que se une a SWKPRSQQPDAPLGT (SEC ID nº:32).

Figura 1

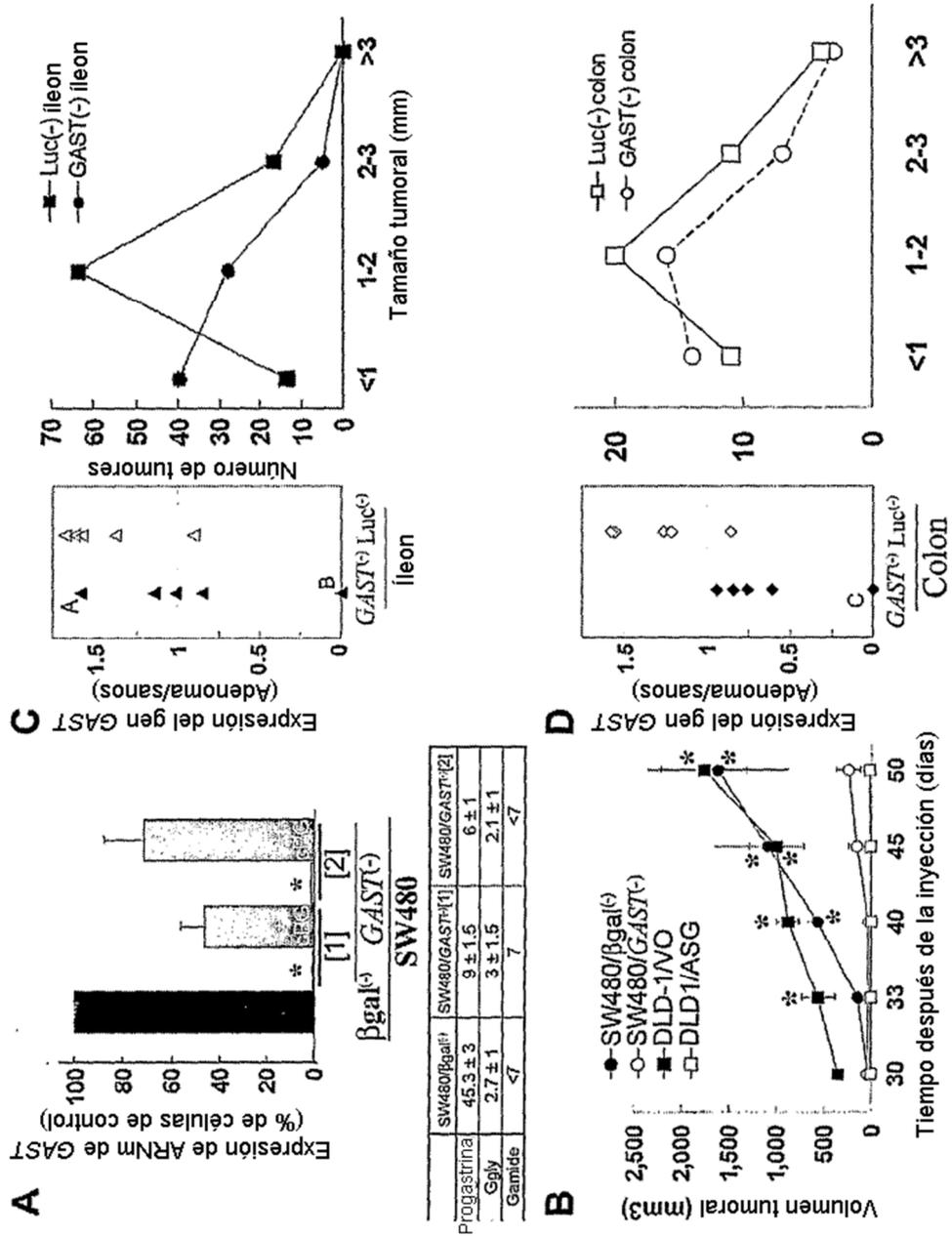


Figura 2

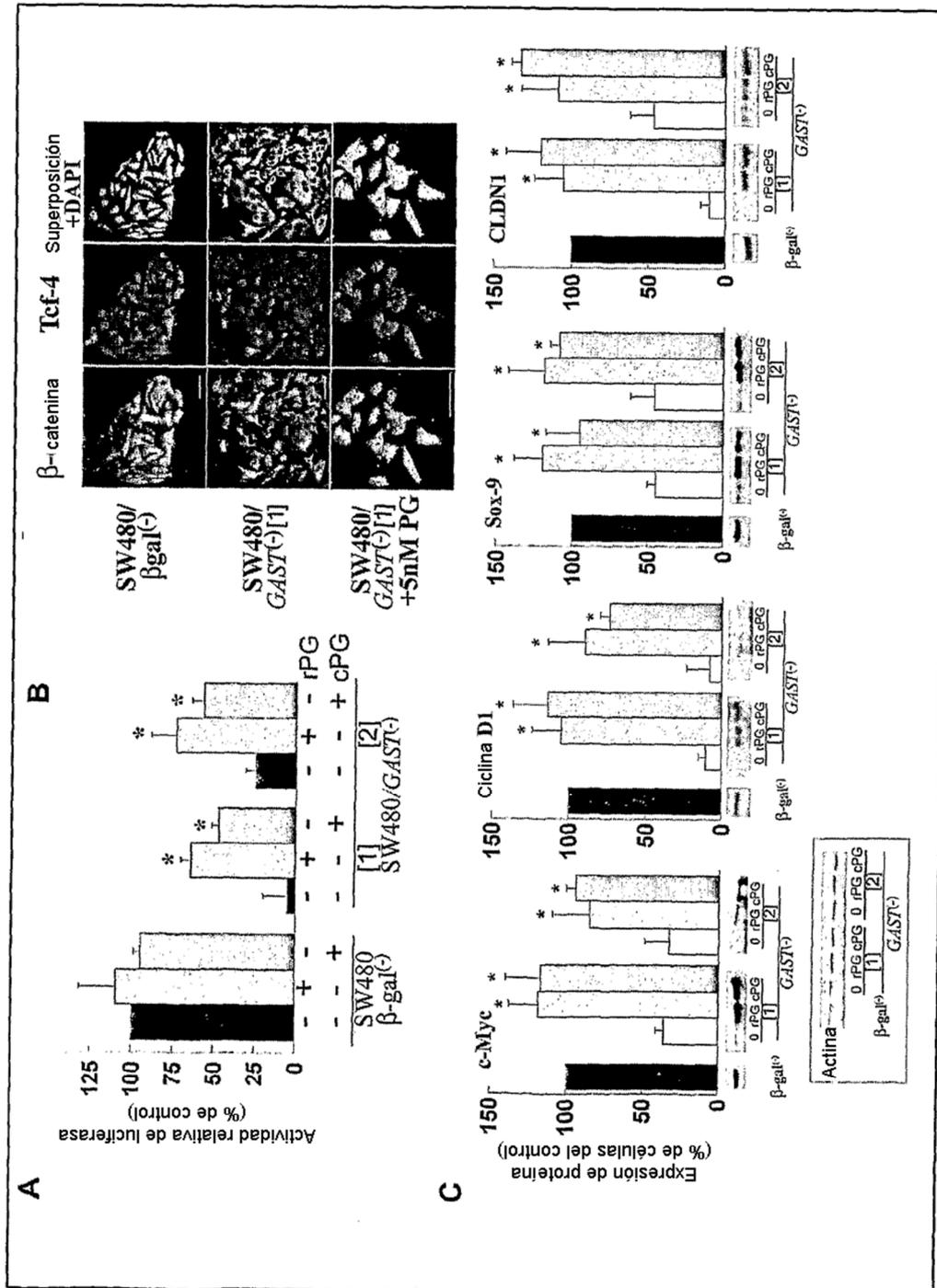


Figura 3

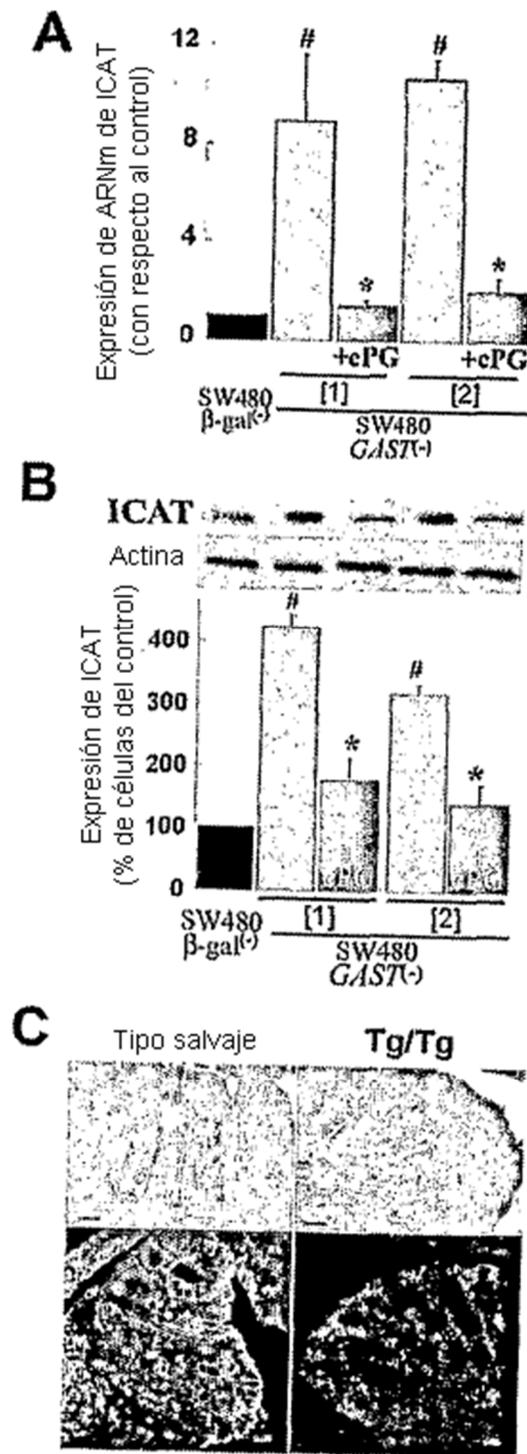


Figura 4

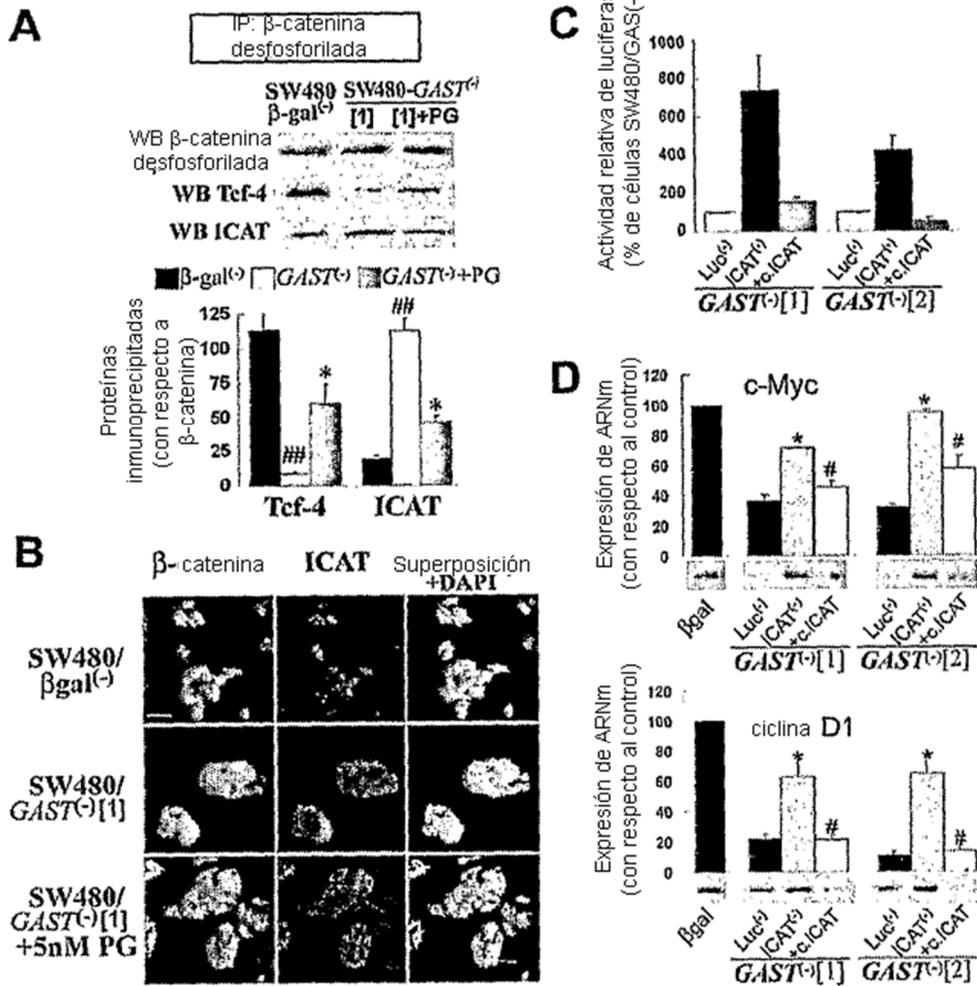


Figura 5

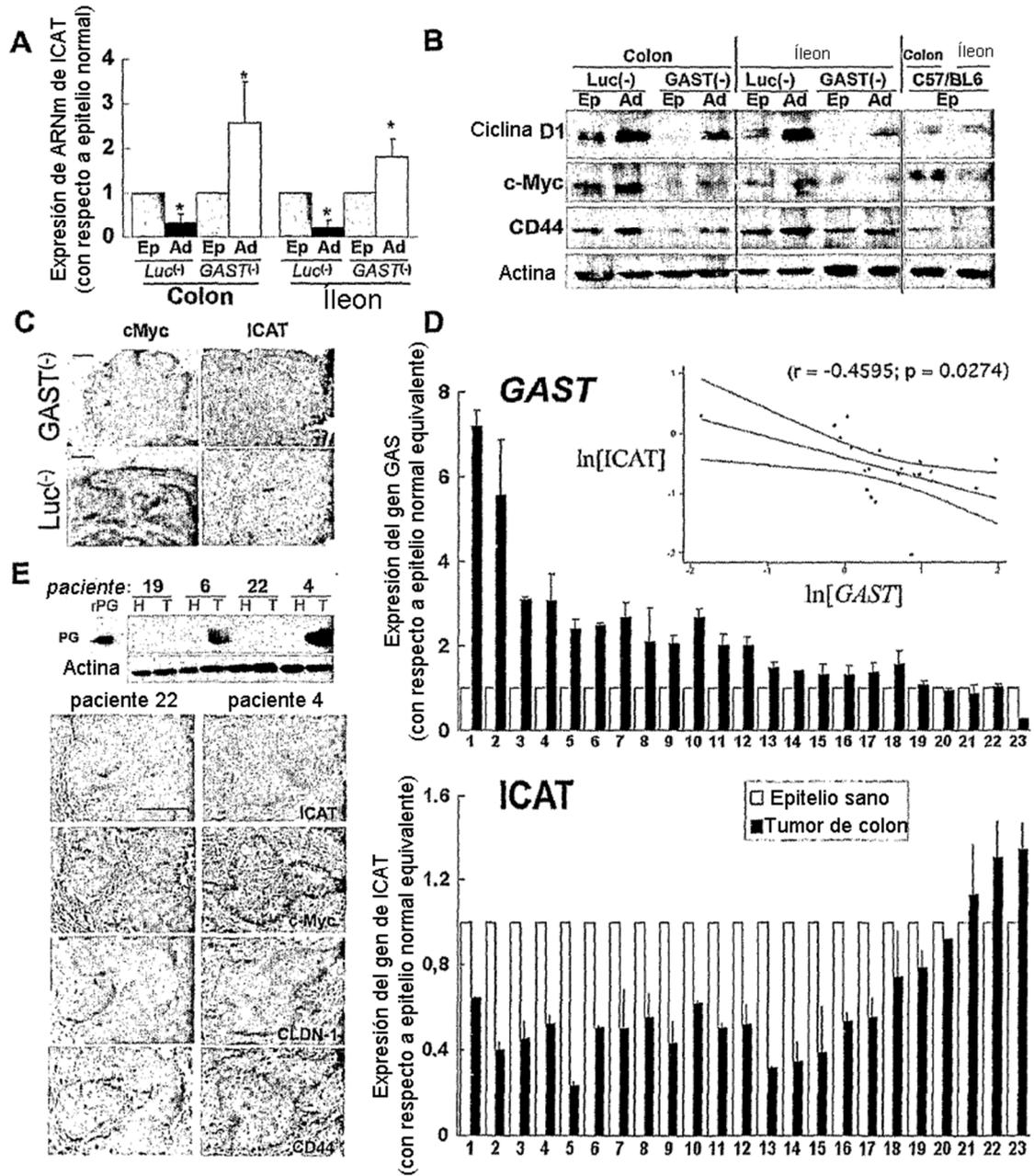
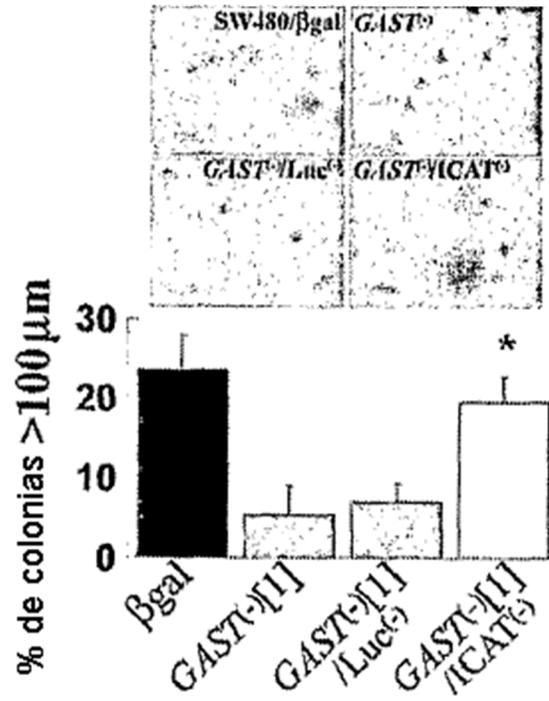


Figura 6

A



B

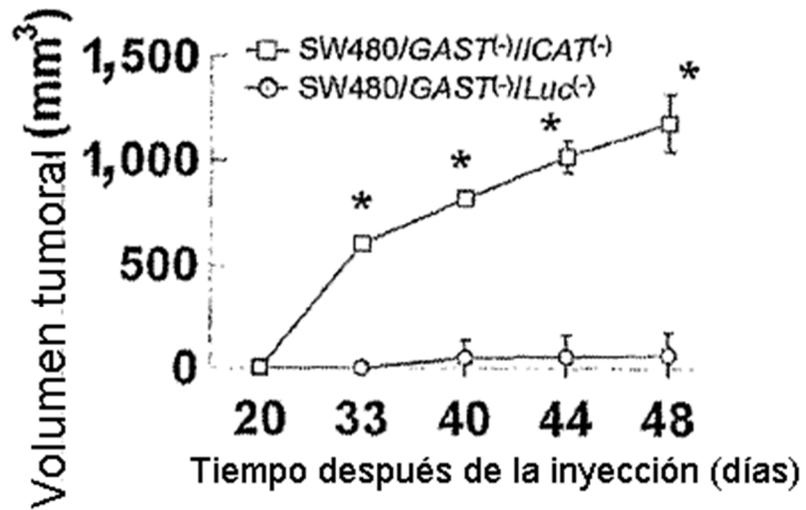


Figura 7

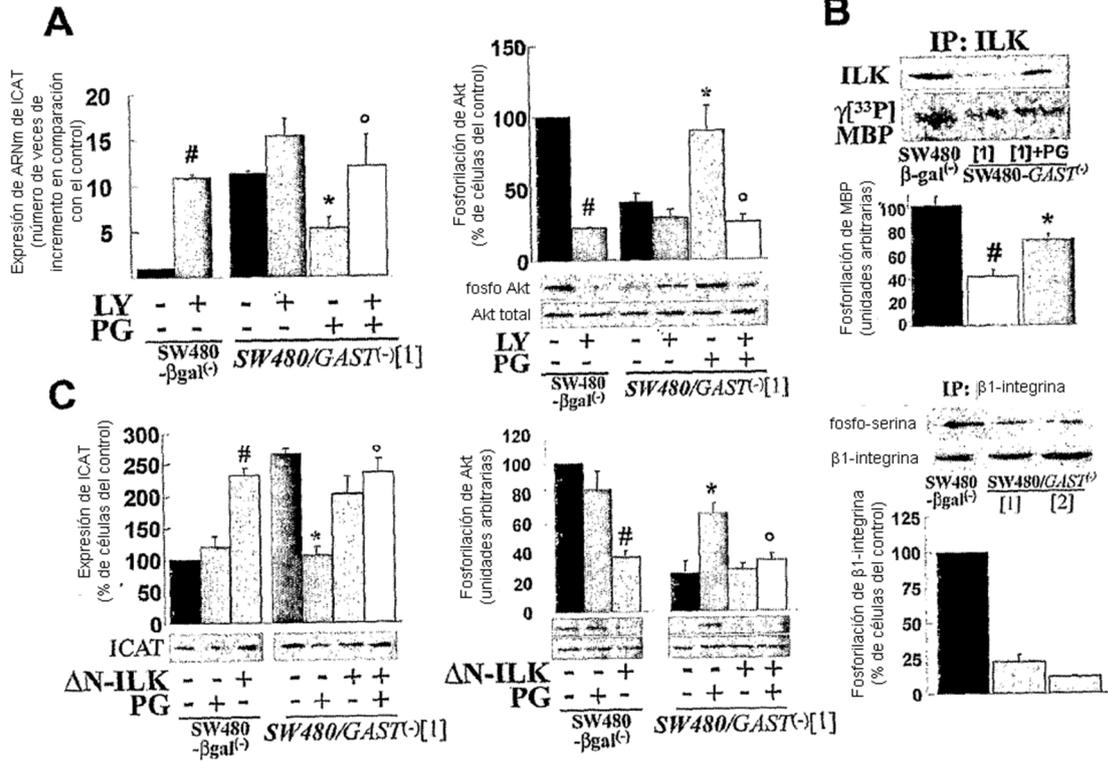


Figura 8

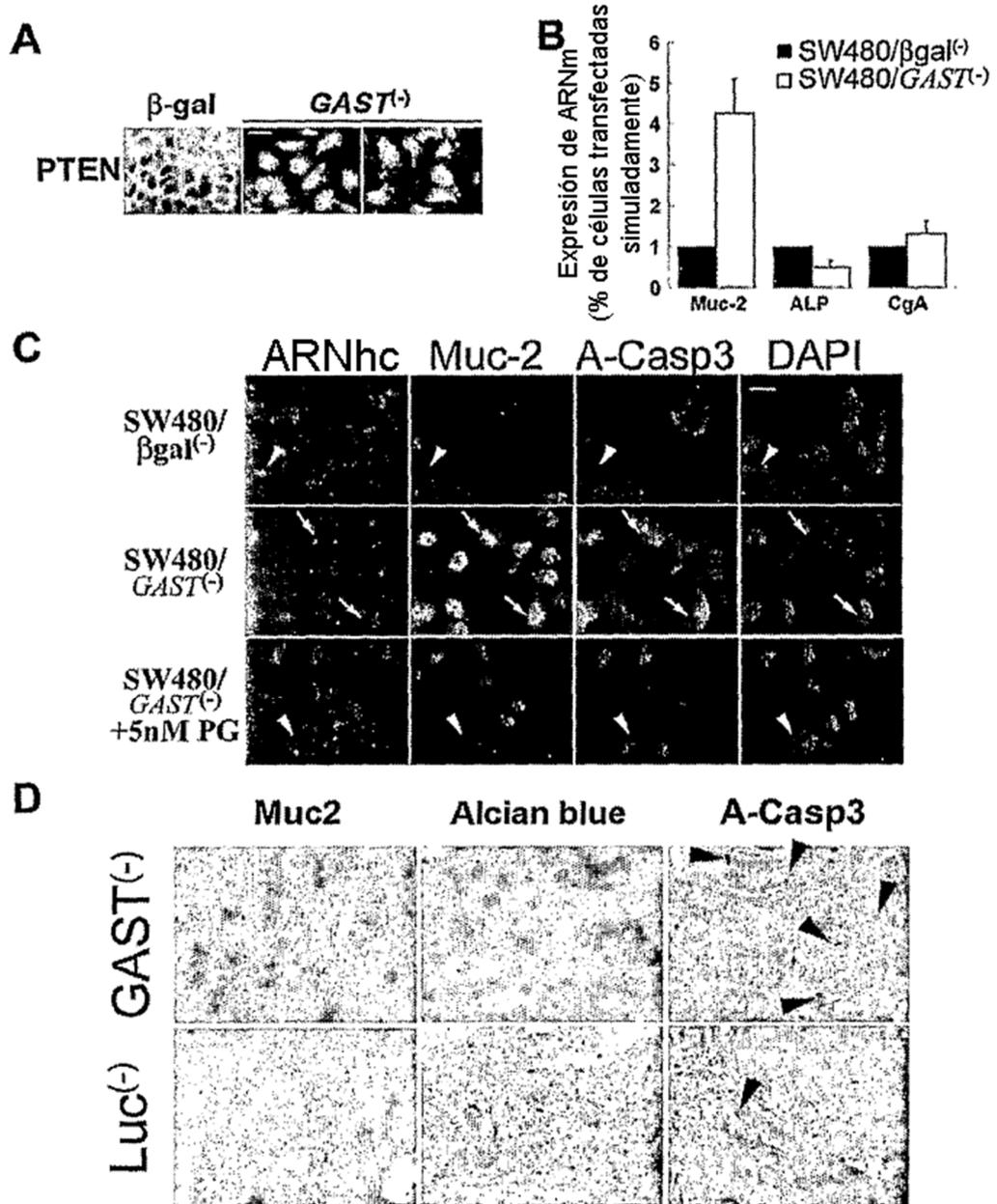


Figura 9

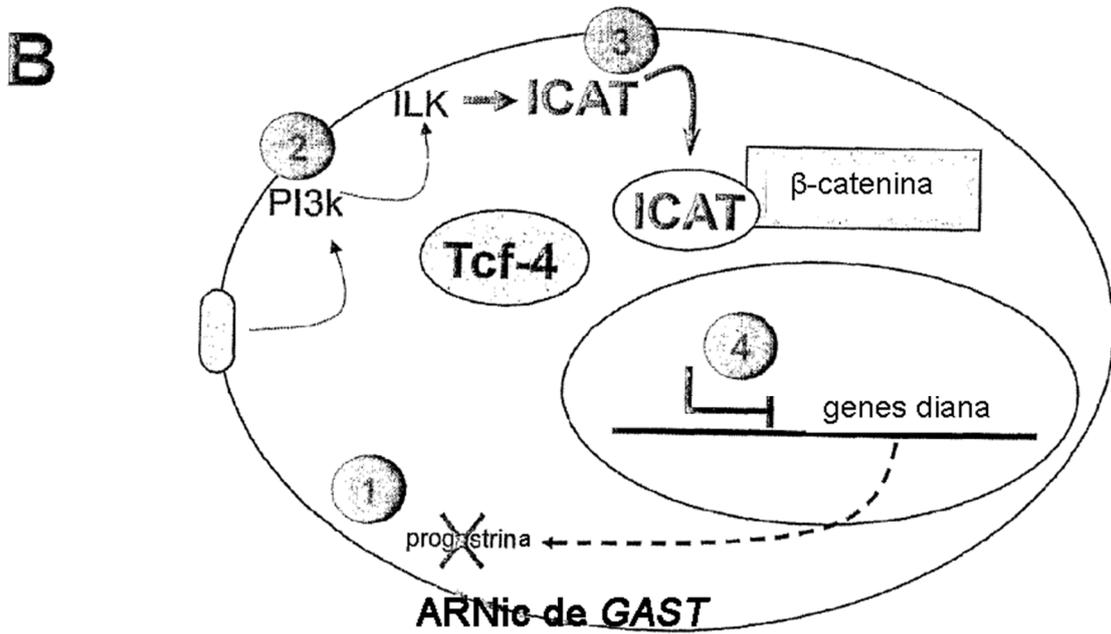
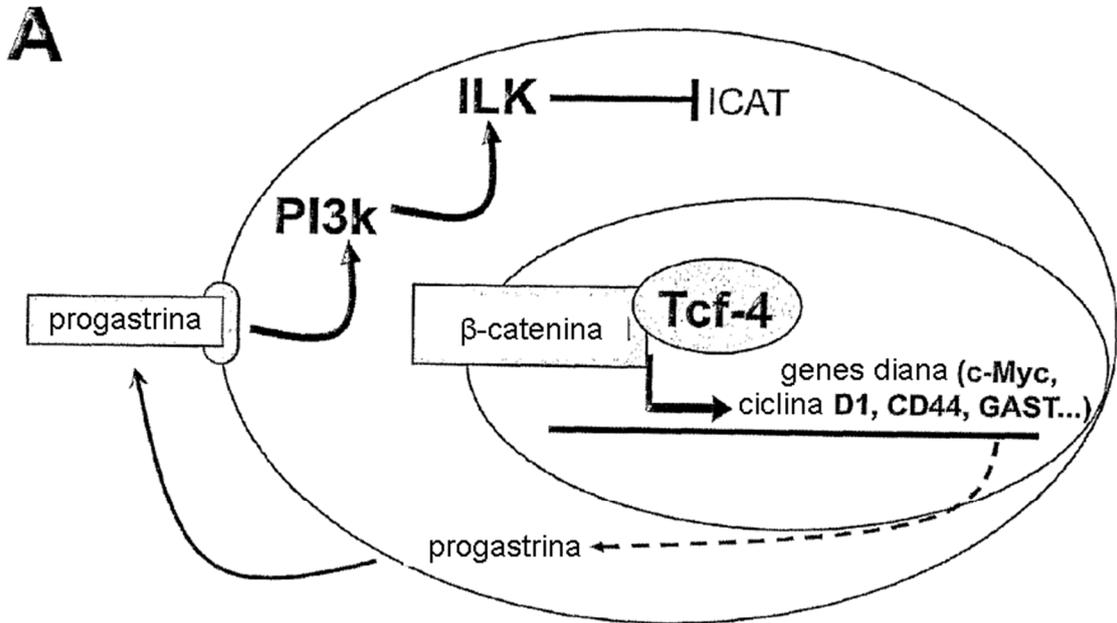
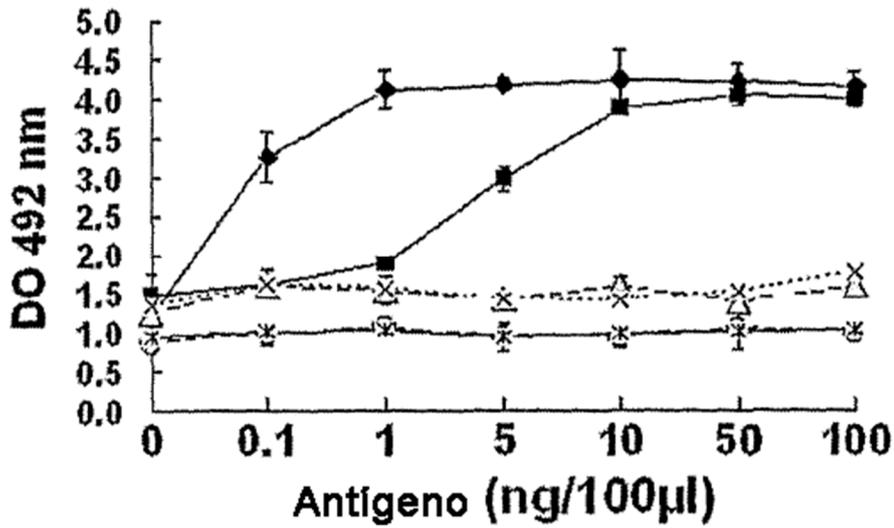


Figura 10

**Anticuerpo N-terminal
dilución 1/10,000 (Ab 2rio 1/10,000)**



◆ Immunógeno △ Gastrina amidada * CTFP
 ■ Progastrina ○ Gastrina extendida con glicina × KLH

**Anticuerpo C-terminal
dilución 1/10,000 (Ab 2rio 1/5,000)**

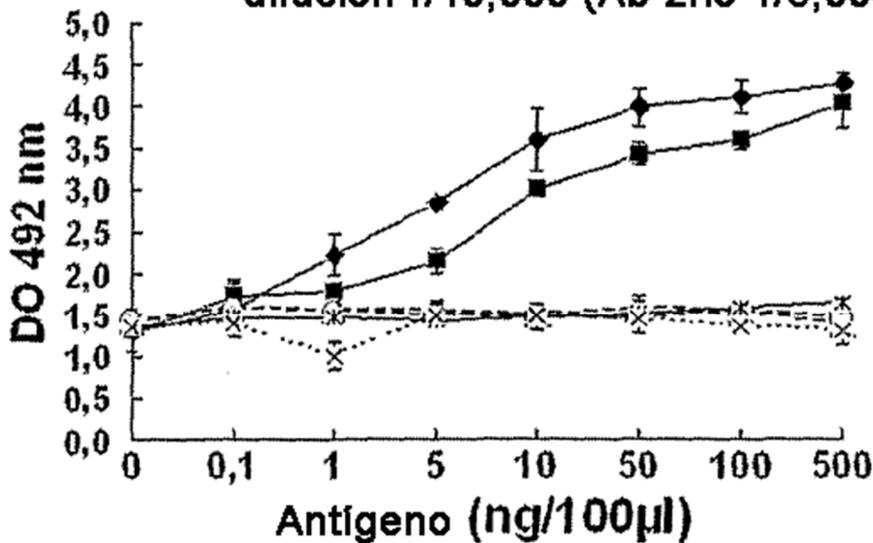


Figura 11

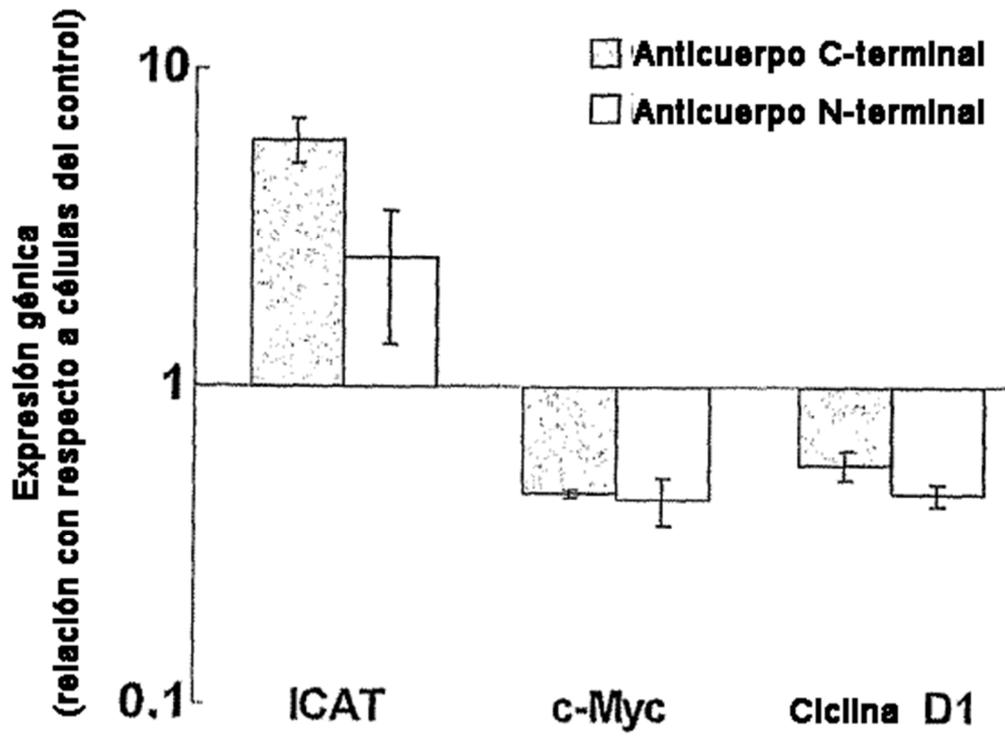


Figura S1

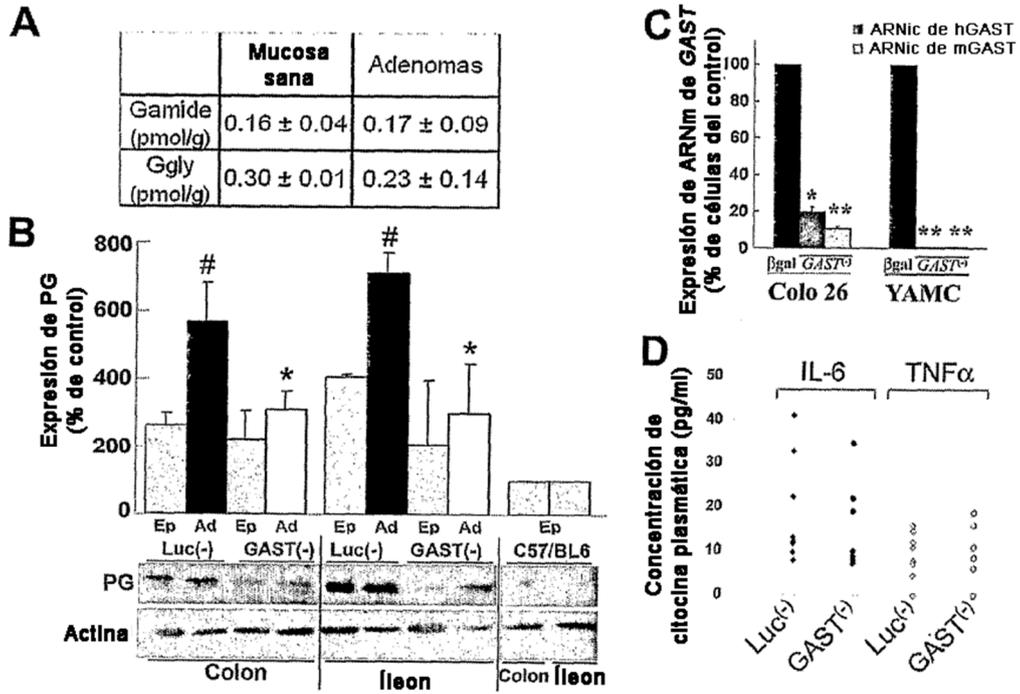


Figura S2

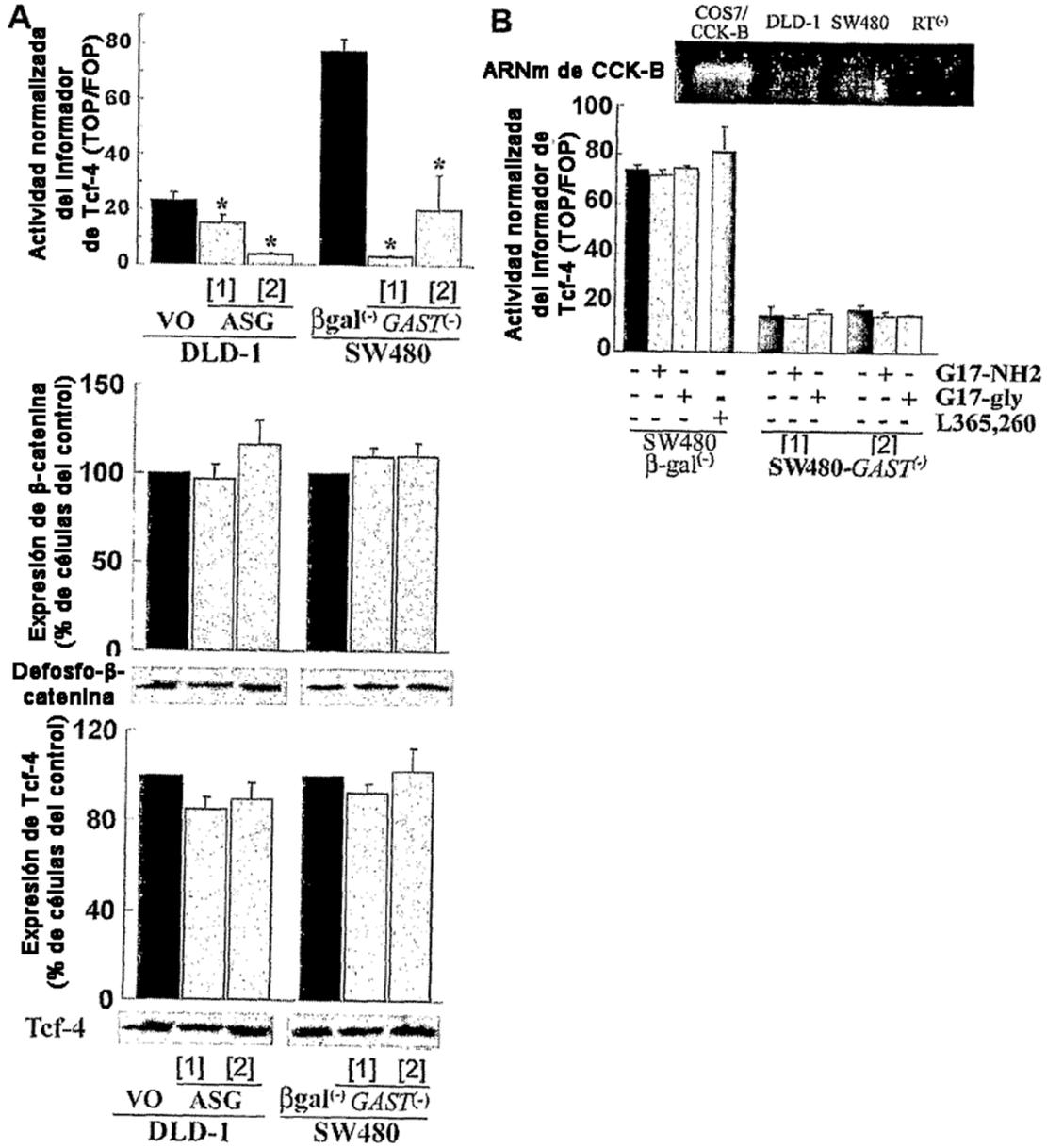


Figura S3

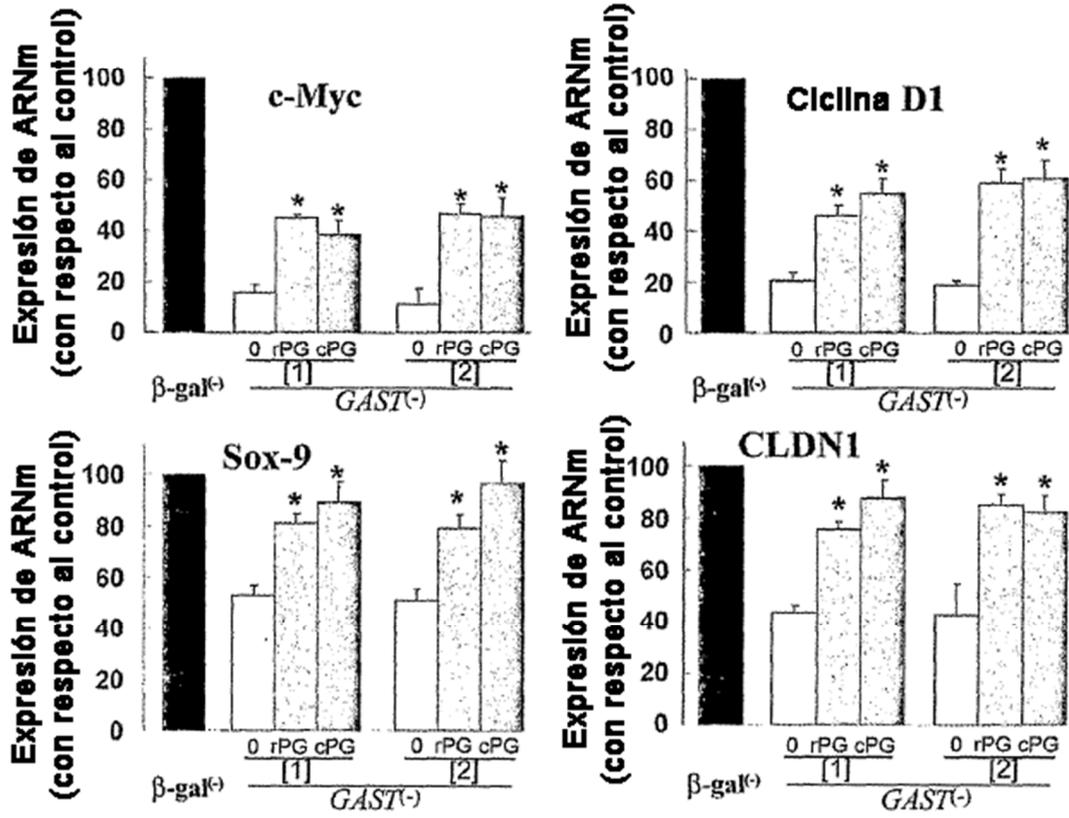


Figura S4 suplementaria

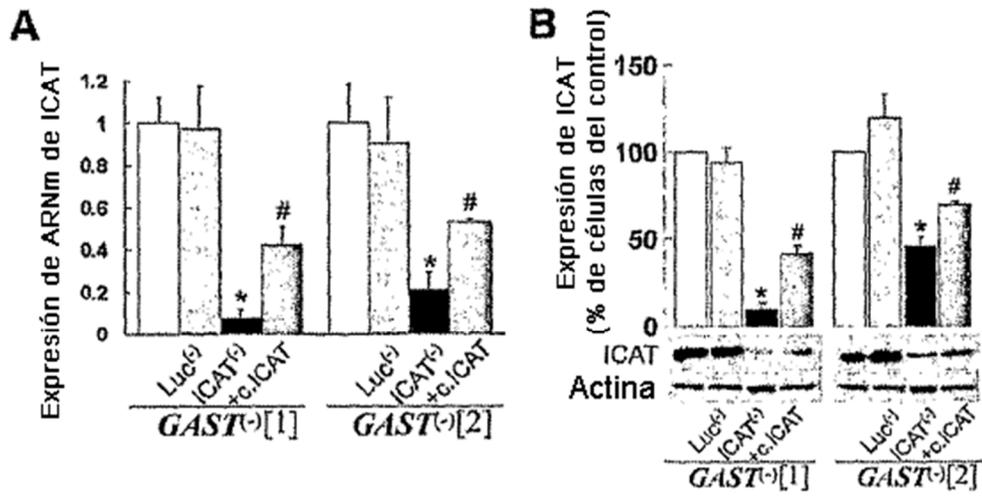


Figura S5

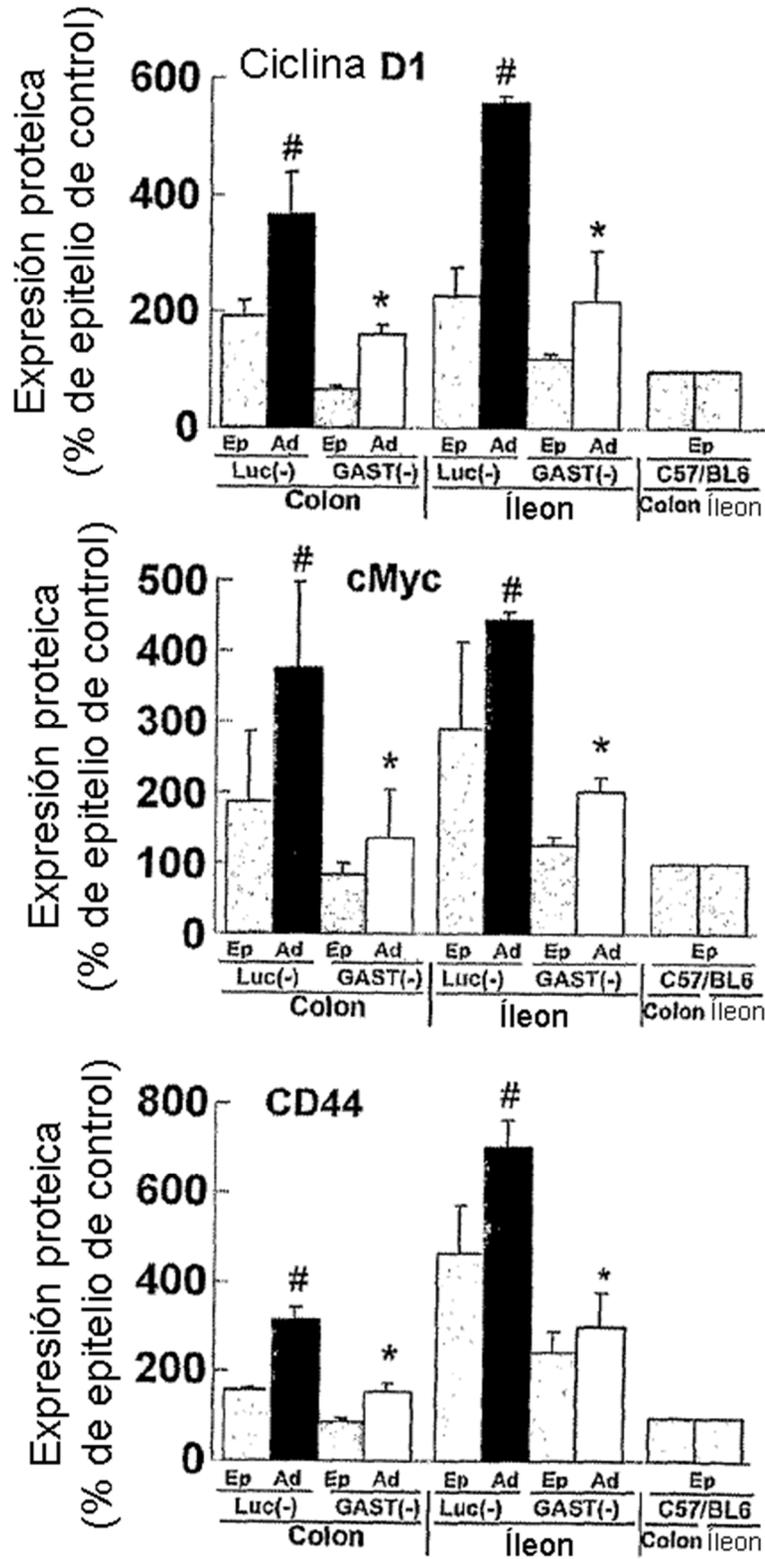
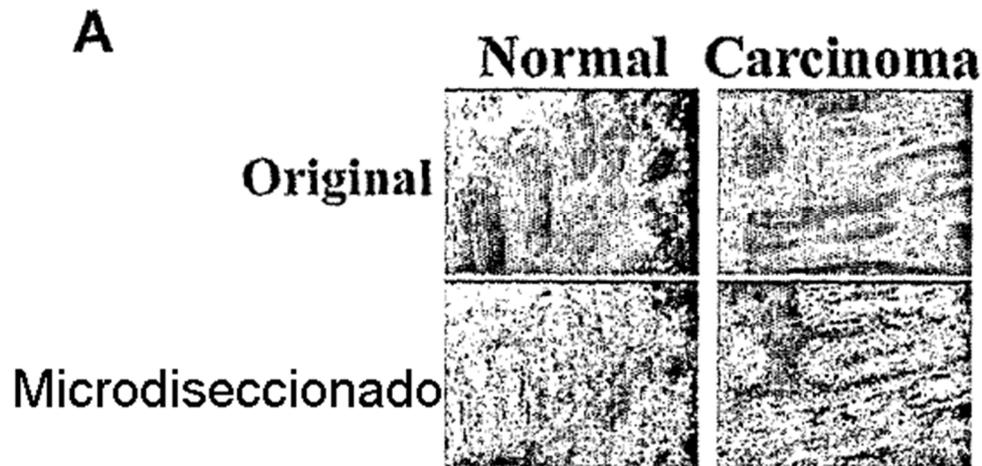


Figura S6



B

Número del paciente	Género	Edad	Localización del tumor	Puntuación TNM			M	DC
				T	N	MS		
1	H	72	PC/Ileon	3	2	0	0	0
2	H	48	DC	3	2	1	1	0
3	H	62	Recto	2	1	1	1	0
4	M	63	DC	2	0	0	0	0
5	M	66	PC	3	1	1	0	1
6	M	65	Recto	3	0	0	0	0
7	M	60	DC	3	1	1	0	1
8	H	86	Sigmoideo/Recto	3	0	0	0	0
9	H	61	PC/OC	3	1	0	0	0
10	H	81	Ciego	2	0	0	0	0
11	H	63	PC/MC	3	1	1	1	0
12	M	73	PC	3	0	0	0	0
13	H	78	PC	3	0	0	0	0
14	H	78	PC	3	2	0	0	i
15	M	66	Sigmoideo	3	2	1	0	0
16	M	75	DC	2	0	0	0	0
17	M	86	DC	2	0	0	0	0
18	H	73	DC	3	0	0	0	1
19	M	79	PC	1	0	0	a	0
20	H	62	MC	3	1	1	0	0
21	H	65	QC/Recto	3	2	0	0	0
22	H	75	DC	3	2	0	0	0
23	M	75	OC/Recto	3	2	1	0	1

