



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 041**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00978436 .4**

86 Fecha de presentación : **08.11.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1259813**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2002**

54 Título: **Diagnóstico de neoplasmas malignos.**

30 Prioridad: **08.11.1999 US 436184**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73 Titular/es: **RHODE ISLAND HOSPITAL
593 Eddy Street
Providence, Rhode Island 02902, US**

72 Inventor/es: **Wands, Jack, R.;
De la Monte, Suzanne, M.;
Ince, Nedim y
Carlson, Rolf, I.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico de neoplasmas malignos.

5 La presente invención se refiere a un método *ex vivo* para diagnosticar un neoplasma maligno en un mamífero. La presente invención también se refiere a un método *ex vivo* para pronosticar dicho neoplasma maligno.

10 Los neoplasmas malignos primarios del sistema nervioso central (denominado en la presente memoria CNS por sus iniciales en inglés: central nervous system), particularmente los glioblastomas, son sumamente mortales debido a su infiltración agresiva y extendida en el cerebro y su resistencia a los tratamientos anticancerosos. Aunque se han hecho progresos para aclarar los mecanismos patológicos subyacentes de los cánceres del CNS así como de otros tipos de cáncer, los enfoques terapéuticos y métodos específicos de diagnóstico han sido muy ambiguos.

15 Lavaissiere *et al.* (*J. Clin. Invest.* 1996, 98 (6): 1313-1323) describen que la aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa (denominada en la presente memoria AAH por sus iniciales en inglés: aspartyl (asparaginyl) beta-hydroxylase) se expresa en la superficie celular de varios carnomas hepatocelulares y colangiocarcinomas. Lavaissiere *et al.* describen la secuencia del cDNA que codifica la AAH humana (denominada en la presente memoria HAAH por sus iniciales en inglés: human AAH) y la secuencia de aminoácidos deducida y la producción de anticuerpos monoclonales para dicha HAAH.

20 Según un aspecto de la presente invención se proporciona un método para diagnosticar un neoplasma maligno en un mamífero como se reivindica en la reivindicación 1 siguiente.

25 Los neoplasmas malignos detectados de esta forma incluyen los derivados de tejido endodérmico, por ejemplo cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de hígado y cáncer de las vías biliares. También se detectan los neoplasmas del sistema nervioso central (CNS), tales como los neoplasmas malignos primarios del CNS tanto los de origen en células neuronales como en gliales de los neoplasmas metastáticos del CNS. Los fluidos corporales, tales como los fluidos corporales derivados del CNS, sangre, suero, orina, saliva, esputos, efusiones pulmonares y los fluidos ascíticos se pueden poner en contacto con un anticuerpo específico de la HAAH según la invención.

30 El formato del ensayo también es útil para generar datos temporales usados para el pronóstico de la enfermedad maligna.

35 Por lo tanto, según otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de pronóstico de un neoplasma maligno como se reivindica en la reivindicación 2 siguiente.

40 El anticuerpo se une preferiblemente a un sitio en el dominio catalítico carboxi-terminal de la HAAH. Alternativamente, el anticuerpo se une a un epítipo que está expuesto sobre la superficie de la célula. El anticuerpo es un antisuero policlonal o un anticuerpo monoclonal. La invención comprende no solo el uso de un anticuerpo monoclonal intacto, sino también de un fragmento del anticuerpo inmunológicamente activo, por ejemplo un fragmento Fab o (Fab)₂; una molécula Fv de cadena sencilla modificada; o una molécula híbrida, por ejemplo un anticuerpo que contiene la especificidad de enlace de un anticuerpo, por ejemplo de origen murino, y las porciones restantes de otro anticuerpo, por ejemplo de origen humano. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, tal como FB50, 5C7, 5E9, 19B, 48A, 74A, 78A, 86A, HA238A, HA221, HA239, HA241, HA329 o HA355. Los anticuerpos que se unen a los mismos epítopos que estos anticuerpos monoclonales también están dentro del alcance de la invención.

45 Un anticuerpo intracelular específico de la HAAH es un anticuerpo específico de la HAAH de cadena sencilla recombinante que se expresa dentro de una célula diana, por ejemplo una célula tumoral. Dicho anticuerpo intracelular se une a la HAAH intracelular endógena e inhibe la actividad enzimática de la HAAH o evita que la HAAH se una a un ligando intracelular. Los anticuerpos intracelulares específicos de la HAAH inhiben la transducción de la señal intracelular y, como resultado, inhiben el crecimiento de tumores que sobreexpresan la HAAH.

50 Un modo de realización adicional se refiere al uso *in vitro* de un kit como se reivindica en la reivindicación independiente 12.

55 También se describe un kit para el diagnóstico de un tumor en un mamífero que contiene un anticuerpo específico de la HAAH. El kit de ensayo de diagnóstico se formula preferentemente en un formato convencional de unión de dos anticuerpos en el que un anticuerpo específico de la HAAH captura la HAAH en una muestra del paciente y otro anticuerpo específico de la HAAH se usa para detectar la HAAH capturada. Por ejemplo, el anticuerpo de captura se inmoviliza sobre una fase sólida, por ejemplo una placa de ensayo, un pocillo de ensayo, una membrana de nitrocelulosa, un gránulo, una varilla o un componente de una columna de elución. El segundo anticuerpo, es decir el anticuerpo de detección, está marcado típicamente con un marcador detectable, tal como un agente colorimétrico o un radioisótopo.

65 La HAAH es una proteína que pertenece a la familia de la dioxigenasa dependiente del alfa-cetoglutarato de prolil y lisil hidroxilasas que tienen un papel fundamental en la biosíntesis del colágeno. Esta molécula hidroxila los restos ácido aspártico o asparagina en los dominios similares al EGF (factor de crecimiento epidérmico, denominado en la presente memoria EGF por sus iniciales en inglés: epidermal growth factor) de varias proteínas en presencia del

ión ferroso. Estos dominios similares al EGF contienen motivos conservados que forman secuencias repetitivas en proteínas, tales como factores de coagulación, proteínas de matriz extracelular, receptores de las LDL, homólogos del NOTCH u homólogos del ligando NOTCH.

5 La dioxigenasa dependiente del alfa-cetoglutarato aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa (AAH) hidroxila específicamente un resto ácido aspártico o asparagina en los dominios similares al EGF de varias proteínas. El cDNA de 4,3 kb que codifica el AspH humano (hAspH) se hibrida con transcritos de 2,6 kb y 4,3 kb en las células transformadas, y la secuencia de aminoácidos deducida del transcrito mayor codifica una proteína de aproximadamente 85 kDa. Tanto la transcripción como la traducción *in vitro* y los análisis de transferencia de Western también demuestran una proteína
10 de 56 kDa que puede resultar de la escisión posterior a la traducción del extremo C-terminal catalítico.

Una función fisiológica de la AAH es la beta-hidroxilación posterior a la traducción del ácido aspártico en las proteínas de coagulación dependientes de la vitamina K. Sin embargo, la abundante expresión de la AAH en varios neoplasmas malignos y los bajos niveles de la AAH en muchas células normales indican que esta enzima tiene un
15 papel en la malignidad. El gen de la AAH también es altamente expresado en los citotrofoblastos, pero no en los sincitiotrofoblastos de la placenta. Los citotrofoblastos son células invasivas que median en la implantación en la placenta. Los niveles aumentados de expresión de la AAH en colangiocarcinomas humanos, carcinomas hepatocelulares, cánceres de colon y carcinomas de mama se asociaron en primer lugar con lesiones invasivas o metastáticas. Sin embargo, la sobreexpresión de la AAH no refleja estrictamente un aumento en la síntesis del DNA y en la proliferación celular ya que se han observado niveles elevados de inmunorreactividad de la AAH en el 100 por ciento de los colangiocarcinomas, pero no en los procesos de enfermedad humana o experimental asociados con la regeneración o proliferación no neoplásica de las vías biliares. La sobreexpresión de la AAH y los niveles elevados de actividad beta-hidroxilasa relacionados llevan a un crecimiento invasivo de las células neoplásicas transformadas. La detección de un incremento en la expresión de la HAAH es útil para el diagnóstico temprano y fiable de los tipos de cáncer que se
20 han caracterizado ahora que sobreexpresan este producto genético.

Diagnóstico de tumores malignos

La HAAH es sobreexpresada en muchos tumores de origen endodérmico y en al menos 95% de los tumores del
30 CNS en comparación con las células no cancerosas normales. Un aumento en el producto del gen de la HAAH en un fluido corporal obtenido de un paciente puede ser detectado según la presente invención usando métodos convencionales, por ejemplo análisis de transferencia de Western, o un análisis cuantitativo, tal como ELISA. Por ejemplo, un formato convencional de ELISA competitivo usando un anticuerpo específico de la HAAH se usa para cuantificar los niveles de HAAH en el paciente. Alternativamente, se usa un análisis de ELISA de fase doble usando un primer anticuerpo como anticuerpo de captura y un segundo anticuerpo específico de la HAAH como anticuerpo de detección.
35

Los métodos de detección de la HAAH incluyen poner en contacto un fluido corporal con un anticuerpo específico de la HAAH unido a una matriz sólida, por ejemplo una placa de microvaloración, gránulo o varilla. Por ejemplo, la matriz sólida se sumerge en una muestra de un fluido corporal obtenida de un paciente, se lava y la matriz sólida se pone en contacto con un reactivo para detectar la presencia de complejos inmunes presentes en la matriz sólida.
40

Las proteínas en una muestra de ensayo se inmovilizan sobre una matriz sólida (por ejemplo, uniéndose a ella). Los métodos y medios para enlazar covalentemente o no covalentemente las proteínas a matrices sólidas son conocidas en la técnica. La naturaleza de la superficie sólida puede variar dependiendo del formato del ensayo. Para ensayos realizados en pocillos de microvaloración, la superficie sólida es la pared del pozo o copa de microvaloración. Para ensayos que usan gránulos, la superficie sólida es la superficie del gránulo. En los ensayos que usan varillas (por ejemplo, un cuerpo sólido hecho de un material poroso o fibroso, tal como tejido o papel), la superficie es la superficie del material del que está hecha la varilla. Los ejemplos de soportes sólidos útiles incluyen la nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membranas o de pocillos de microvaloración), cloruro de polivinilo (por ejemplo en láminas o en pocillos de microvaloración), látex de poliestireno (por ejemplo, en gránulos o en placas de microvaloración), fluoruro de polivinilidina (conocido como IMMULON®), papel diazotizado, membranas de nilón, gránulos activados y gránulos de proteína A. El soporte sólido que contiene el anticuerpo se lava típicamente después de ponerle en contacto con la muestra de ensayo y antes de la detección de complejos inmunes enlazados. La incubación del anticuerpo con la muestra de ensayo es seguida por la detección de los complejos inmunes mediante un marcador detectable. Por ejemplo, el marcador es enzimático, fluorescente, quimiluminiscente, radiactivo o un colorante. Los ensayos que amplifican las señales del complejo inmune también son conocidos en la técnica, por ejemplo ensayos que usan biotina o avidina.
50
55

Un reactivo de detección de la HAAH, por ejemplo un anticuerpo, se envasa en forma de un kit que contiene uno o más anticuerpos específicos de la HAAH, formulaciones de control (positivo y/o negativo) y/o un marcador detectable. El ensayo puede ser en forma del formato convencional de análisis de fase doble de dos anticuerpos conocido en la técnica.
60

Los anticuerpos anti-HAAH se puede obtener mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Dichos anticuerpos son policlonales o monoclonales. Los anticuerpos policlonales se pueden obtener usando métodos convencionales, por ejemplo mediante los métodos descritos en Ghose *et al.*, *Methods in Enzymology*, Vol. 93, 326-327, 1983. Un polipéptido de la HAAH, o uno de sus fragmentos antigénicos, se usó como inmunógeno para estimular la producción de los anticuerpos policlonales en los antiseros de conejo, cabra, ovejas o roedores. Los polipéptidos antigénicos para la
65

producción tanto de anticuerpos policlonales como monoclonales útiles como inmunógenos incluyen los polipéptidos que contienen un dominio catalítico de la HAAH. Por ejemplo, el polipéptido inmunogénico es la proteína HAAH madura de longitud total o un fragmento de la HAAH que contiene el dominio catalítico carboxiterminal, por ejemplo un polipéptido de la HAAH que contiene el resto His con la SEQ ID N° 1.

TABLA 1

Secuencia de aminoácidos de la HAAH

10 **MAQRKNAKSS GNSSSSGSGS GSTSAGSSSP GARRETKHGG HKNGRKGGLS GTSFFTWFMV 61**
IALLGVWTSV AVVWFDLVDY EEVLGKLGIIY DADGDGDFDV DDAKVLGLK ERSTSEPAVP 121
PEBAEPHTEP EEQVPVEAEP QNIEDEAKEQ IQSLLHEMVH AEHVEGEDLQ QEDGPTGEPQ 181
15 **QEDDEFLMAT DVDDRPFETLE PEVSHEETEH SYHVEETVSQ DCNQDMEEMM SEQENPDSSE 241**
FVVEDERLHH DTDDVTYQVY EEQAVYEPLLE NEGIEITEVT APPEDNPVED SQVIVEEVSII 301
FPVEEQQEVF PETNRKTDDP EQKAKVKKKK PKLLNKFDKT IKAELDAAEK LRKRGKIEEA 361
20 **VNAFKELVRK YPQSPFRARYG KAQCEDDLAE KRRSNEVLRG AIETYQEVAS LPDVPADLLK 421**
LSLKRRSDRQ QFLGHMRGSL LTLQRLVQLF PNDTSLKNDL GVGYLLIGDN DNAKRVYEEV 481
LSVTPNDGFA KVHYGFILKA QNKIAESIPY LKEGIESGDP GTDDGRFYFPH LGDAMQRVGN 541
25 **KEAYKWYELG HKRGHFASVW QRSLYNVNGL KAQFWWTPKE TGYTELVKSL ERNWKLRDE 601**
GLAVMDKAKG LFLPEDENLR EKGDSQFTL WQOGRNENA CKGAPKTCTL LEKFPETTGC 661
RRGQIKYSIM HPGTHVWPHY GPTNCRLEMH LGLVIPKEGC KIRCANETRT WEEGKVLIFD 721
30 **DSFEHEVWQD ASSFRLIFIV DVWHPELTPO QRRSLPAI**

(SEQ ID N° 2; N° de registro del GENGANK S83325 ; el resto His está subrayado; las
35 secuencias conservadas en el dominio catalítico se señalan con tipo en negrita)

Los anticuerpos que se enlazan a los mismos epítopes que los anticuerpos descritos en la presente memoria se identifican usando los métodos convencionales, por ejemplo ensayos de enlace competitivo, conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante técnicas convencionales. Diez μg de polipéptido de HAAH recombinante se administraron a los ratones intraperitonealmente en coadyuvante de Freund, seguido por un único estímulo intravenoso (en la vena de la cola) 3-5 meses después de la inoculación inicial. Los hibridomas productores de anticuerpos se realizaron usando métodos convencionales. Para identificar los hibridomas que producen anticuerpos que eran altamente específicos para un polipéptido de la HAAH, los hibridomas se muestrearon usando el mismo inmunógeno polipeptídico usado para inmunizar. Aquellos anticuerpos para los que se identificó que tenían actividad para enlazarse con la HAAH también se muestrearon por su capacidad para inhibir la actividad catalítica de la HAAH usando los ensayos enzimáticos descritos a continuación. Preferiblemente, el anticuerpo tiene una afinidad de enlace de al menos aproximadamente 10^8 litros/mol y más preferiblemente una afinidad de al menos 10^9 litros/mol.

Los anticuerpos monoclonales se pueden humanizar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo el MAb con una especificidad de enlace deseada puede ser humanizado comercialmente (Scotgene, Escocia; Oxford Molecular, Palo Alto, CA).

Los anticuerpos intracelulares específicos de la HAAH se producen como sigue. Después de la identificación de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal adecuado, se clona el DNA que codifica el anticuerpo. El DNA que codifica un anticuerpo específico de la HAAH de cadena única en el que los dominios variables de cadena pesada y ligera están separados por un péptido de unión flexible se clona en un vector de expresión usando métodos conocidos (por ejemplo, Marasco *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7889-7893 y Marasco *et al.*, 1997, *Gene Therapy* 4: 11-15). Dichos constructos se introducen en las células, por ejemplo usando técnicas convencionales de distribución genética para la producción intracelular de los anticuerpos. Los anticuerpos intracelulares se usan para inhibir la transducción de señal por la HAAH. Los anticuerpos intracelulares que se enlazan al dominio catalítico carboxiterminal de la HAAH inhiben la capacidad de la HAAH para hidroxilar las secuencias diana similares al EGF.

Los métodos de unión de los anticuerpos específicos de la HAAH (o sus fragmentos) que se enlazan a los epítopes de la HAAH expuestos de la superficie celular, sobre la superficie de una célula tumoral, se unen a agentes citotóxicos conocidos, por ejemplo la ricina o la toxina de la difteria, usando métodos conocidos.

ES 2 286 041 T3

A continuación se da una descripción a modo únicamente de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, de los materiales y metodologías que se pueden hacer en la presente invención.

En los dibujos:

5

La figura 1 es un gráfico de barras que muestra la formación de colonias inducida por la transfección transitoria de células NIH-3T3 con varios cDNA de la aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa (AAH). La formación de colonias se indujo mediante la transfección transitoria con 10 μ g de DNA. Por el contrario, el constructo de AAH murina mutante sin actividad enzimática no presenta actividad transformadora. Los datos se presentan como número medio de focos transformados \pm EEM.

10

La figura 2 es un gráfico de barras que muestra el resultado de un análisis densitométrico de un análisis de transferencia de Western de las proteínas producidas por varios clones celulares transfectados de forma estable con AAH murina. En los clones 7 y 18 se produjo un ligero aumento de la expresión del gen de la HAAH, mientras que la sobreexpresión presentó un grado inferior en el clon 16.

15

Las figuras 3A-B son gráficos de barras que muestran la formación de colonias en agar blando que presentan los clones transfectados de forma estable con la HAAH en comparación con la actividad enzimática de la HAAH. La figura 3A muestra una medida de la actividad enzimática de la AAH murina en los clones 7, 16 y 18, y la figura 3B muestra la formación de colonias que presentan los clones 7, 16 y 18. Los datos se presentan como número medio de colonias 10 días después de la siembra en las placas \pm EEM. Los tres clones con incrementos pequeños en la actividad enzimática de la HAAH, que se correlacionaba con la expresión de la proteína, presentaban un crecimiento independiente del anclaje.

20

La figura 4 es un gráfico de barras que muestra la formación de tumores en ratones sin pelo a los que se les inyectaron clones transfectados que sobreexpresaban la AAH murina. El crecimiento tumoral se evaluó después de 30 días. El peso medio del tumor observado en los ratones inyectados con los clones 7, 16 y 18 en comparación con en comparación con el clon transfectado con DNA simulado. Todos los animales a los que se les inyectaron clones que sobreexpresaban la HAAH desarrollaron tumores.

25

30

Las figuras 5A-D son gráficos de barras que muestran la expresión de la AAH aumentada en células PNET2 (figuras 5A, 5C) y SH-Sy5y (figura 5B) tratadas con ácido retinoico (figuras 5A, 5B) o éster de forbol miristato (PMA, figura 5C) para inducir el sobrecrecimiento de las neuritas como ocurre durante la invasión de las células tumorales. Las células se trataron con ácido retinoico 10 μ M o PMA 100 nM durante 0, 1, 2, 3, 4 ó 7 días. Los lisados celulares se analizaron mediante análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal específico de la HAAH para detectar la proteína AAH de 85 kDa. Los niveles de inmunoreactividad se midieron por densitometría volumétrica (unidades arbitrarias). Los gráficos indican la media \pm desviación estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos separados. En la figura 5D, las células PNET2 se trataron durante 24 horas con concentraciones sub-letales de H₂O₂ para inducir la retracción de las neuritas. La viabilidad de más de 90% de las células se demostró por exclusión con colorante azul de tripán. Resultados similares se obtuvieron para las células SH-Sy5y.

35

40

La figura 6 es un gráfico de barras que muestra los efectos de la sobreexpresión de la AAH sobre de los niveles de moléculas anti-apoptosis (Bcl-2), inhibidoras mitóticas del ciclo celular (p16 y p21/Waf1) y de proliferación (antígeno nuclear de células proliferantes, PCNA por sus iniciales en inglés: proliferating cells nuclear antigen). Las células neuronales PNET2 se transfectaron de forma estable con el cDNA humano de longitud completa que codifica la AAH (pHAAH) o con un vector vacío (pcDNA). La expresión del gen de la AAH se controló con un promotor CMV. Se realizaron los análisis de transferencia de Western con lisados celulares preparados a partir de cultivos que eran 70 a 80% confluentes. La carga de proteína fue equivalente en cada línea. Las membranas replicadas se ensayaron con los diferentes anticuerpos. Los gráficos de barras muestran la media y la desviación estándar de los niveles de expresión de la proteína medidos en tres experimentos. Todas las diferencias son significativas estadísticamente según el análisis de la T de Student ($P < 0,01$ - $P < 0,001$).

45

50

La figura 7 es un diagrama que muestra los componentes de la vía de transducción de señal IRS-1.

55

Ejemplo 1

La expresión aumentada de la HAAH está asociada con la transformación maligna

60

La HAAH es una enzima muy conservada que hidroxila los dominios similares al EGF en las proteínas asociadas con la transformación. El gen de la HAAH está sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, incluyendo los carcinomas hepatocelulares y los colangiocarcinomas humanos. Se encontró que la expresión del gen de la HAAH no era detectable durante la proliferación de las vías biliares tanto en la enfermedad humana como en modelos de rata en comparación con el colangiocarcinoma. La sobreexpresión de la HAAH en células NIH-3T3 se asoció con la generación de un fenotipo maligno y se encontró que era necesaria la actividad enzimática para la transformación celular. Los datos descritos a continuación indican que la sobreexpresión de la HAAH está unida a la transformación celular de las células epiteliales biliares.

65

ES 2 286 041 T3

Para identificar las moléculas que están específicamente sobreexpresadas en células malignas transformadas de origen hepatocítico humano se usó la línea celular de carcinoma hepatocelular (abreviado en la presente memoria como HCC por sus iniciales en inglés: hepatocellular carcinoma) FOCUS como un inmunógeno para generar anticuerpos monoclonales (abreviado a continuación en la presente memoria como mAb por sus iniciales en inglés: monoclonal antibody) que reconocieran específica o preferentemente las proteínas asociadas con el fenotipo maligno. Se muestreó una biblioteca de expresión de cDNA de lambda GT11 obtenida de células HepG2 de HCC, y se encontró que uno de los mAb específicos para la HAAH producidos frente a la línea celular FOCUS reconocía un epítipo en una proteína codificada por un cDNA de la HAAH. Se encontró que la enzima HAAH presentaba regulación aumentada en varias líneas celulares humanas transformadas y en tejidos tumorales en comparación con tejidos adyacentes humanos homólogos. Se encontró que la enzima HAAH sobreexpresada en diferentes tejidos malignos humanos era catalíticamente activa.

Se examinó la expresión del gen de la HAAH en vías biliares proliferantes y en células NIH 3T3. Su papel en la generación del fenotipo maligno se midió mediante la formación de focos transformados, cultivado en agar blando, como un índice del crecimiento independiente del anclaje y mediante la formación de tumores en ratones sin pelo. El papel de la actividad enzimática en la inducción del fenotipo transformado se midió usando un constructo de cDNA con una mutación en el sitio catalítico que suprimió la actividad hidroxilasa. Los resultados indicaron que un aumento en la expresión del gen de la HAAH está asociado con una transformación maligna de los conductos biliares.

Los siguientes materiales y métodos se usaron para generar los datos descritos a continuación.

Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal FB50 se generó por inmunización celular de células de ratón Balb/C con células de HCC FOCUS. Se usó un anticuerpo monoclonal de virus anti-Dengue como control no relacionado. El anticuerpo monoclonal HBOH2 se generó frente a un polipéptido de HAAH recombinante de 52 kDa y reconoce el dominio catalítico de la beta-hidroxilasa de proteínas humanas y de ratón. Los anticuerpos policlonales anti-HAAH presentan reacción cruzada con la proteína hidroxilasa de rata. El anticuerpo de control anti-Erk-1 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA. Los antiseros anti-ratón de oveja y anti-conejo de burro marcados con peroxidasa de rábano se obtuvieron de Amersham, Arlington Heights, IL.

Constructos

El constructo de AAH murina de longitud completa (pNH376) y el constructo con mutación dirigida (pNH376-H660) con actividad catalítica suprimida se clonaron en el vector de expresión eucariótica pcDNA3 (Invitrogen Corp., San Diego, CA). La AAH humana de longitud completa se clonó en el vector de expresión procariótica pBC-SK+ (Stratagene, La Jolla, CA.). La AAH humana de longitud completa (Nº de registro del GENBANK S83325) se subclonó en el sitio EcoRI del vector pcDNA3.

Modelo animal de proliferación de las vías biliares

Se dividieron las ratas en 9 grupos separados de 3 animales cada uno, excepto para el grupo 9 que contenía 5 ratas. El grupo 1 fue el grupo de control no quirúrgico y el grupo 2 fue el grupo de control quirúrgico con operación fingida. Los grupos restantes padecieron la ligadura de vías biliares comunes para inducir la proliferación de vías biliares intrahepáticas y se evaluaron después de 6, 12, 24 y 48 horas y de 4, 8 y 16 días como se muestra en la tabla 3. Los animales se asfixiaron con CO₂ y se tomaron muestras hepáticas de los lóbulos medio y lateral izquierdo, se fijaron en paraformaldehído al 2% y se introdujeron en parafina. Las muestras hepáticas (5 m) se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina para evaluar la proliferación de las vías biliares intrahepáticas. Se realizó el análisis inmunohistoquímico con anticuerpos policlonales anti-HAAH que presentaban reacción cruzada con la proteína de rata para determinar los niveles de expresión de la proteína.

Proliferación de las vías biliares asociada con colangitis esclerosante primaria (PSC)

Se obtuvieron muestras de biopsia de hígado de 7 individuos con colangitis esclerosante primaria (generalmente abreviado como PSC por sus iniciales en inglés: primary sclerosing cholangitis) y se asociaron con la proliferación de las vías biliares. Estos individuos se evaluaron según los protocolos gastroenterohepatológicos convencionales. Los pacientes tenían entre 22 y 46 años de edad y eran 4 varones y 3 hembras. Cuatro tenían asociada una enfermedad inflamatoria del intestino (3 colitis ulcerativa y 1 colitis de Crohn). Todos los pacientes se sometieron a evaluación radiológica, incluyendo ultrasonografía abdominal y colangiopancreatografía endoscópica retrógrada para excluir la diagnosis de obstrucción biliar extrahepática. Las secciones de tejido se prepararon a partir de los bloques incrustados de parafina y se evaluó la proliferación de la vías biliares por tinción con hemotoxilina y eosina. La expresión de la HAAH se determinó mediante análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo monoclonal específico de la HAAH, tal como el FB50.

Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido hepático (5 μ m) se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en alcohol graduado. La actividad peroxidasa endógena se detuvo mediante un tratamiento de 30 minutos con H₂O₂ al 6% en metanol al 60%. La

biotina endógena se enmascaró por incubación con disoluciones de bloqueo de avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se añadieron a las láminas mAb FB50 (para las muestras de PSC) y anticuerpos policlonales anti-HAAH-hidroxilasa (para las muestras de hígado de rata) en una cámara humidificada a 4°C durante la noche.

5 La tinción inmunohistoquímica se realizó usando un método convencional con complejo de avidina-biotina peroxidasa de rábano (ABC) usando kits Vectastain con diaminobencidina (DAB) como cromógeno siguiendo las instrucciones del fabricante (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). A las secciones de tejido se les realizó una
10 contratinción con hematoxilina seguido por deshidratación en etanol. Las secciones se examinaron con un microscopio óptico para estudiar la proliferación de las vías biliares y la expresión de la proteína HAAH. Las secciones en parafina de colangiocarcinoma y placenta se usaron como controles positivos y las muestras de hepatoesteatosis se usaron como controles negativos. Para controlar la especificidad de enlace del anticuerpo, se realizó la inmunotinción de las secciones adyacentes en ausencia de un anticuerpo primario, o usando un anticuerpo no relacionado con el virus de Dengue. Como control positivo para la inmunorreactividad del tejido, se realizó la inmunotinción de las secciones adyacentes de todos los especímenes con un anticuerpo monoclonal para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

15

Análisis de transferencia de Western

Los lisados celulares se prepararon en una disolución tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación convencional (abreviado como RIPA por sus iniciales en inglés: radioimmunoprecipitation assay) que contenía los inhibidores de la
20 proteasa. La cantidad total de proteína en los lisados se determinó mediante un ensayo colorimétrico Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA) seguido por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas PVDF y se sometieron al análisis de transferencia de Western usando FB50, HBOH2, anti-Erk-1 (usado como control interno para la carga de proteína) como anticuerpos primarios, antiseros anti-ratón de oveja y anticonejo de burro marcados con peroxidasa de rábano como anticuerpos secundarios. La unión de los anticuerpos se
25 detectó con reactivos de quimioluminiscencia aumentada (SuperSignal, Pierce Chemical Company, Rockford, IL) y autorradiografía en película. Los niveles de inmunorreactividad se midieron por densitometría volumétrica usando un programa de imagen de NIH.

Análisis de la actividad enzimática

30

La actividad AAH se midió en los lisados celulares usando el primer dominio similar al EGF de la proteína S bovina como sustrato en el que el alfa-cetoglutarato marcado con ¹⁴C hidroxila el dominio que libera CO₂ que contiene ¹⁴C según los métodos convencionales, por ejemplo los descritos en Jia *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.* 267: 14322-14327; Wang *et al.*, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 14004-14010; o Gronke *et al.*, 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 8558-8565. Las
35 incubaciones se realizaron a 37°C durante 30 minutos en un volumen final de 40 µL que contenían 40 µg de proteína del extracto celular bruto y 75 µg de sustrato de EGF.

Estudios de transfección celular

40 Se cultivaron células NIH-3T3 en medio de Eagle con modificación de Dulbecco (DNEM; Mediatech, Washington, DC) complementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) inactivado con calor, 1% de L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina-estreptomina (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Las células NIH-3T3 subconfluentes (3 x 10⁵ células/placa de 60 mm) se transfectaron con 10 µg de uno de los siguientes plásmidos: 1) vector pcDNA3 no recombinante (Invitrogen Corp.,
45 San Diego, CA) como control negativo; 2) pNH376-H660, el cDNA de la AAH murina que se mutó en el dominio catalítico y se clonó en el vector pcDNA3 controlado por un promotor CMV; 3) pNH376, el cDNA de la AAH murina de fenotipo salvaje clonado en el vector pcDNA3; 4) pCDHH, el cDNA de la AAH humana de fenotipo salvaje clonado en el vector pcDNA3; o 5) pLNCX-UP1, un cDNA que codifica el oncogén v-Src (control positivo). Las células se transfectaron usando el kit de transfección con sulfato de calcio siguiendo las instrucciones del fabricante (5 Prime-
50 3 Prime, Inc., Boulder, CO). La comparación de la eficacia de la transfección celular se evaluó con los diferentes constructos. Para este procedimiento, placas confluentes obtenidas 48 horas después de la transfección se dividieron y se volvieron a sembrar en 12 placas de 6 cm separadas y 6 de ellas se cultivaron en presencia de 400 µg/mL de un medio que contenía G-418 (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). El número de focos resistentes al G-418 se determinó 14 días después de la transfección y se usó para corregir cualquier variabilidad en la eficacia de la transfección.

55

Análisis de la transformación

60 Se transfectaron células NIH-3T3 con los diferentes constructos y se permitió que alcanzaran la confluencia después de 48 horas, como se ha descrito anteriormente. Cada placa de 6 cm se dividió y se sembró en 12 placas de 6 cm diferentes. Mientras que 6 de ellas se cultivaron en presencia de G-418 para detectar la eficacia de la transfección, las otras seis se cultivaron en medio completo sin G-418 y con un cambio de medio cada 4 días. Se contó el número de focos transformados en estas placas sin G-418 y se expresó como focos transformados por µg de DNA transfectado.

Análisis del crecimiento celular independiente del anclaje

Se realizó una técnica de dilución limitante (0,15 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano) sobre los transfectantes cultivados en G-418 con el fin de aislar los clones celulares con distintos niveles de actividad HAAH

según los resultados de los análisis de transferencia de Western y el análisis enzimático de la actividad hidroxilasa. Se pusieron en suspensión las líneas celulares clonadas ($1,0 \times 10^4$ células) en un medio completo que contenía 0,4% de agarosa de bajo punto de fusión (SeaPlaque GTG Agarose; FMC Bioproducts, Rockland, Maine) y se extendieron sobre un fondo de una mezcla de agar que consistía en medio completo con 0,53% de agarosa de bajo punto de fusión. Cada clon se analizó en triplicado. Los clones se sembraron en estas condiciones y 10 días más tarde se determinaron el tamaño (crecimiento positivo $> 0,1$ mm de diámetro) y el número de focos.

Tumorigenicidad en ratones sin pelo

Los mismos clones que se evaluaron en el análisis de crecimiento independiente del anclaje se inyectaron en ratones sin pelo y se observó la formación de tumor. La tumorigenicidad se evaluó usando 10 animales en cada uno de los 4 grupos (Charles River Labs., Wilmington, MA). El grupo 1 recibió 1×10^7 células transfectadas de forma estable con DNA simulado, los grupos 2-4 recibieron 1×10^7 células de clones transfectados de forma estable con pNH376 y que expresaban varios niveles de la proteína HAAH murina. Los ratones sin pelo se conservaron en condiciones libres de patógenos en una instalación para animales convencional. Treinta días después de la inoculación de células tumorales, los animales se sacrificaron usando cámaras que contenían isoflurano (Aerrane, Anaquest, NJ) y se retiraron cuidadosamente los tumores y se determinó su peso.

Modelo animal de proliferación de las vías biliares

Después de la ligadura de las vías biliares comunes, la proliferación de vías biliares intrahepáticas fue evidente a las 48 horas. Las muestras de tejido obtenidas los días 8 y 16 después de la ligadura de las vías biliares comunes revelaron una extensa proliferación de vías biliares como se muestra en la tabla 3.

TABLA 3

Proliferación de las vías biliares y expresión de la HAAH a diferentes intervalos después de la ligadura de las vías biliares comunes

Grupo	Procedimiento quirúrgico	Microscopía*	Inmunohistoquímica
1	sin cirugía	normal	negativa
2	cirugía fingida	normal	negativa
3	6 horas después de la ligadura	normal	negativa
4	12 horas después de la ligadura	normal	negativa
5	24 horas después de la ligadura	normal	negativa
6	48 horas después de la ligadura	proliferación de las vías biliares mínima	negativa
7	4 días después de la ligadura	proliferación de las vías biliares moderada	negativa
8	8 días después de la ligadura	proliferación de las vías biliares extensa	negativa
9	16 días después de la ligadura	proliferación de las vías biliares extensa	negativa

* La investigación se realizó por microscopía óptica después de tinción con hematoxilina y eosina.

La tinción inmunohistoquímica no logró detectar la presencia de HAAH en las vías biliares proliferantes en ninguno de los grupos. El análisis de la expresión de la HAAH en las vías biliares obtenidas de los controles con cirugía fingida también fue negativo, mientras que todas las muestras presentaron inmunorreactividad positiva con los anticuerpos de control para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Por lo tanto, la proliferación de las vías biliares no se asoció con la expresión aumentada de la HAAH en este sistema de modelo animal convencional.

Expresión de la HAAH en PSC

Los especímenes de biopsia hepática de pacientes con PSC presentaron proliferación de las vías biliares acompañada de fibrosis periductal y un infiltrado de células inflamatorias mononucleares sin evidencia de displasia. Las secciones adyacentes con inmunotinción con el anticuerpo monoclonal específico de la HAAH no presentaban inmunorreactividad de la HAAH detectable en las vías biliares proliferantes. Por el contrario, las secciones de colangiocarcinoma a las que se realizó la inmunotinción simultáneamente usando el mismo anticuerpo y reactivos de detección presentaron niveles intensos de inmunorreactividad de la HAAH en casi todas las células tumorales, mientras que las secciones adyacentes a los colangiocarcinomas presentaron una reacción de inmunotinción negativa con anticuerpo monoclonal del virus de Dengue. Estos resultados indican que la expresión de la HAAH está asociada con la transformación maligna más que con la proliferación celular no cancerosa de las vías biliares intrahepáticas.

Transformación de las células NIH-3T3 asociada con la HAAH

La capacidad de transformación de los genes de la AAH murina y humana, así como la del constructo mutante de la AAH murina sin actividad enzimática se compararon con DNA simulado (control negativo) y células NIH-3T3 transfectadas con v-Src (control positivo). Se encontró que la capacidad de transformación de la AAH murina era 2-3 veces la del DNA vector de control como se muestra en la figura 1. La capacidad de transformación del gen humano fue mayor que la observada con la AAH murina ($32 \pm 1,5$ frente a $13 \pm 2,6$ focos transformados respectivamente). Las células transfectadas con AAH murina y humana formaron focos grandes, parecidos a los de los fibroblastos transfectados con v-Src, en comparación con los focos ocasionales mucho más pequeños observados en las células transfectadas con el DNA vector que presentaban la inhibición del contacto de las líneas celulares de fibroblastos. Experimentos paralelos realizados usando el constructo mutante pN37-H660 sin actividad enzimática revelaron una actividad de transformación nula. Estos resultados indican que la actividad enzimática de la HAAH es necesaria para la actividad de transformación presentada por el gen de la HAAH.

Análisis del crecimiento celular independiente del anclaje

Después de la transfección transitoria con el constructo de la AAH murina, se aislaron varios focos transformados diferentes para experimentos de clonación por dilución para establecer clones celulares transfectados de forma estable con niveles diferentes de expresión del gen de la HAAH. Se eligieron nueve líneas celulares clonadas diferentes para estudios adicionales. El nivel de expresión de la proteína HAAH se determinó por análisis de transferencia de Western. Los clones 7 y 18 presentaban un aumento pequeño de la expresión de la proteína HAAH, aunque formaban colonias grandes en agar blando (figura 2). La carga de proteína fue equivalente en todas las líneas, como se muestra por inmunoelectrotransferencia de las mismas membranas con un anticuerpo monoclonal anti-Erk-1. La expresión aumentada de la proteína se asoció con una actividad enzimática aumentada como se muestra en la figura 3. La capacidad de estos clones para presentar un crecimiento celular independiente del anclaje en agar blando se presenta en la figura 3. Los 3 clones con expresión aumentada del gen de la HAAH mostraron crecimiento celular independiente del anclaje en comparación con el clon transfectado con DNA simulado.

Formación de tumores en ratones sin pelo

Se evaluó la capacidad para formar tumores en ratones sin pelo de los tres clones con expresión aumentada del gen de la HAAH. El tamaño del tumor en el ratón denominado clon 18 se comparó con un clon transfectado con DNA simulado. Los clones 7, 16 y 18 se transformaron de forma importante en este ensayo y produjeron tumores grandes con un peso medio de 2,5, 0,9 y 1,5 gramos respectivamente (figura 4). Estos datos indican que la sobreexpresión de la HAAH contribuye a la inducción y mantenimiento del fenotipo maligno *in vivo*.

Un nivel elevado de la expresión de la HAAH es indicativo de malignidad

Con el fin de determinar si la expresión de la HAAH está asociada con la malignidad más que con un cambio celular aumentado, se estudiaron dos modelos de proliferación de las vías biliares. En el modelo animal, la ligadura de las vías biliares comunes indujo una proliferación extensa de vías biliares intrahepáticas pero no hubo evidencia de expresión del gen de la HAAH en estas condiciones experimentales como se muestra en la tabla 3. De forma análoga, se evaluó la expresión del gen de la HAAH en un modelo de enfermedad humana asociada con la proliferación de las vías biliares, ya que la PSC es una enfermedad hepática autoinmune asociada con la destrucción así como con la proliferación de las vías biliares intra- y extrahepáticas. La PSC es una enfermedad pre-maligna y una proporción significativa de los individuos afectados desarrollarán eventualmente un colangiocarcinoma. Sin embargo, no hay evidencia de una expresión aumentada del gen de la HAAH en presencia de la proliferación extensa de las vías biliares.

Habiendo establecido que los niveles de la proteína HAAH eran elevados en los colangiocarcinomas y no en vías biliares normales o proliferantes, se estudió el papel de la HAAH en la generación de un fenotipo maligno. El gen de HAAH se transfectó en células NIH-3T3 y se evaluaron los cambios celulares, por ejemplo formación aumentada de focos transformados, crecimiento de colonias en agar blando y formación de tumores en ratones sin pelo asociados con la transformación maligna. Los genes de longitud completa de la AAH murina y humana se clonaron en constructos de expresión y se transfectaron de forma transitoria en células NIH-3T3. Se detectó un nú-

mero aumentado de focos transformados en las células transfectadas, tanto con los genes de la AAH murina como con los de la humana, en comparación con los controles transfectados con DNA simulado. El número aumentado de focos transformados, después de controlar la eficacia de la transfección, no fue tan alto en comparación con las células transfectadas con el gen v-Scr usado como control positivo. La actividad enzimática del gen de la HAAH era necesaria para un fenotipo maligno porque un constructo mutante cuyo sitio catalítico había sido suprimido no presentó propiedades de transformación. Se establecieron varios transfectantes estables y líneas celulares NIH-3T3 clonadas con un pequeño aumento en los niveles de la proteína HAAH y en la actividad enzimática. Dichas líneas celulares se colocaron en agar blando para examinar el crecimiento celular independiente del anclaje como otra propiedad del fenotipo maligno. Todas las líneas celulares crecieron en agar blando en comparación con el control transfectado con DNA simulado, y se produjo una correlación positiva entre el nivel celular de la expresión del gen de la HAAH y el número y tamaño de las colonias formadas. Tres de estas líneas celulares clonadas formaron tumores en ratones sin pelo. Las tres líneas celulares con expresión aumentada de la HAAH fueron oncogénicas como se demostró por el desarrollo de tumores grandes como otra característica bien conocida del fenotipo transformado.

Para determinar si los cambios celulares inducidos por la sobreexpresión de la HAAH estaban relacionados con la función enzimática, se introdujo una mutación dirigida en el gen que cambia el sitio de unión de ión ferroso del hierro de la histidina a la lisina en la posición 660^a de la HAAH de ratón suprimiendo de este modo la actividad hidroxilasa de la HAAH murina. Se usó una mutación correspondiente en la HAAH como mutante negativo dominante para inhibir la actividad hidroxilasa de la HAAH. El constructo pNH376-H660 no presentaba actividad de transformación indicando que los cambios celulares del fenotipo maligno inducidos por la sobreexpresión dependen de la actividad enzimática de la proteína.

Los receptores Notch y sus ligandos tienen varios dominios similares al EGF en la región N-terminal que contienen la secuencia consenso putativa para la beta-hidroxilación. Los ligandos Notch son elementos importantes de la vía de transducción de señal Notch y la interacción del Notch con sus ligandos se produce mediante los dominios similares al EGF de ambas moléculas. Las mutaciones puntuales que afectan a los restos ácido aspártico o asparagina en los dominios similares al EGF que son dianas para la beta-hidroxilación por la HAAH reducen el enlace del calcio y las interacciones proteína-proteína implicadas en la activación de las vías de transducción de señal en dirección 3'. La sobreexpresión de la HAAH y la hidroxilación de la proteína Notch por la HAAH contribuye a la malignidad. El crecimiento tumoral es inhibido disminuyendo la hidroxilación de la proteína Notch por la HAAH.

Los datos presentados en la presente memoria evidencian que una expresión de la HAAH de alto nivel está unida a la transformación maligna. Un aumento en la expresión del cDNA de la HAAH en células NIH-3T3 indujo un fenotipo transformado manifestado por cantidades aumentadas de focos transformados, crecimiento independiente del anclaje y tumorigénesis en ratones sin pelo. Además, se encontró que era necesaria una enzima HAAH intacta para la transformación asociada con la HAAH. Consecuentemente, la inhibición de una cantidad tan pequeña como el 20% de la actividad enzimática o expresión de la HAAH endógena produce un beneficio terapéutico. Por ejemplo, se alcanzan beneficios clínicos por 50-70% de inhibición de la expresión o actividad de la HAAH después de la administración de un compuesto inhibidor de la HAAH en comparación con el nivel asociado con células cancerosas no tratadas o con células normales no cancerosas.

La HAAH está regulada al nivel de la transcripción. Solo fueron necesarios pequeños aumentos en la expresión y la actividad enzimática de la HAAH para la transformación celular. Estos resultados indican que la expresión y la actividad enzimáticas aumentadas del gen de la HAAH contribuyen a la generación o al mantenimiento del fenotipo transformado y que la disminución de la transcripción del gen de la HAAH o la disminución de la actividad enzimática del producto del gen de la HAAH conduce a una disminución de la malignidad. Consecuentemente, la transcripción de la HAAH es inhibida administrando compuestos que disminuyen la unión del Fos y/o el Jun (elementos que regulan la transcripción de la HAAH) a las secuencias promotoras de la HAAH.

Como la HAAH está presente regulada aumentada con la transformación maligna del epitelio de las vías biliares y la inmunoreactividad de la HAAH es detectable en las membranas de la superficie de las células tumorales, la HAAH también es una molécula que se puede usar como diana de un agente citotóxico, por ejemplo uniendo el agente citotóxico a un compuesto que se enlaza a la HAAH expresada sobre la superficie de una célula tumoral. El análisis de los niveles de proteína HAAH en los fluidos biológicos, tales como la bilis, es un marcador de diagnóstico del colangiocarcinoma humano.

60 Ejemplo 2

Expresión de la AHH y crecimiento e invasividad de neoplasmas malignos del CNS

La AAH se expresa abundantemente en los carcinomas y las células trofoblásticas pero no en la mayoría de las células normales, incluyendo las de origen en el CNS. Se observaron niveles elevados de la AAH en 15 de 16 glioblastomas, 8 de 9 oligodendrogliomas anaplásicos y 12 de 12 tumores neuroectodérmicos primitivos (abreviado generalmente como PNET por sus iniciales en inglés: primitive neuroectodermal tumor). Los niveles elevados de inmunoreactividad de la AAH se localizaron en primer lugar en los bordes infiltrantes más que en las partes centrales

de los tumores. Por tinción inmunohistoquímica de doble marcado se demostró una relación recíproca entre la AAH y la tenascina, un sustrato para la actividad enzimática de la AAH. Se trataron líneas celulares neuronales PNET2 con éster de forbol miristato o ácido retinoico para estimular la extensión neurítica y el crecimiento invasivo presentó niveles elevados de expresión de la AAH, mientras que la retracción de las neuritas inducida por H₂O₂ tuvo como resultado la regulación disminuida de la AAH. Las células neuronales PNET2 que habían sobreexpresado de forma estable el cDNA de la AAH humana tenían niveles aumentados de PCNA y Bcl-2 y niveles reducidos de p21/Waf1 y p16, lo que sugiere que la sobreexpresión de la AAH produce proliferación celular patológica aumentada, progresión del ciclo celular y resistencia a la apoptosis. Además, los niveles reducidos de p16 observados en los transfectantes de AAH indican que la sobreexpresión de la AAH confiere crecimiento invasivo aumentado de las células neoplásicas ya que la delección o la regulación disminuida del gen p16 se correlaciona con un crecimiento de glioblastomas *in vivo* más agresivo e invasivo. Se detectó la inmunorreactividad aumentada de la AAH en los márgenes infiltrantes de los neoplasmas del CNS malignos primarios indicando adicionalmente un papel de la HAAH en la invasividad tumoral.

Los siguientes materiales y métodos se usaron para generar los datos descritos a continuación.

Análisis de la inmunorreactividad de la AAH en neoplasmas del CNS malignos primarios humanos

La inmunorreactividad de la AAH se examinó en especímenes de resección quirúrgica de glioblastomas (N = 16), oligodendrogliomas anaplásicos (N = 9) y tumores neuroectodérmicos primitivos [PNET; neuroblastomas supratentoriales (N = 3) y meduloblastomas (N = 9)]. Las secciones histopatológicas se revisaron para confirmar los diagnósticos usando criterios convencionales. Se estudiaron secciones en parafina de los bloques que contenían muestras representativas de tumores sólidos viables o tumores con tejido adyacente intacto. Se incluyeron secciones de cerebros adultos normales *postmortem* (N = 4) como controles negativos. La inmunorreactividad de la AAH se detectó usando un anticuerpo monoclonal específico de la HAAH. La inmunorreactividad se reveló por el método del complejo de peroxidasa de rábano con avidina-biotina (Kit Vector ABC Elite; Vector Laboratories, Burlingame, CA) usando 3,3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno (24) y hemotoxilina como contratinción.

La tenascina y la laminina son probablemente sustratos para la AAH debido a la presencia de repeticiones similares al EGF en las moléculas. Se realizaron estudios de inmunotinción doble para localizar conjuntamente la AAH con tenascina o laminina. La inmunorreactividad de la AAH se detectó por el método ABC con DAB como cromógeno y la inmunorreactividad de la tenascina o laminina se detectó por el método del complejo de fosfatasa alcalina con avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) con BCIP/NBT como sustrato. Como controles positivos y negativos se inmunotifieron secciones adyacentes con anticuerpo monoclonal para la proteína glial fibrilar ácida (GFPA) y el antígeno de superficie de la hepatitis B. Todos los especímenes se inmunotifieron en lotes usando las mismas diluciones de anticuerpos y reactivos de inmunodetección.

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se realizaron estudios para determinar si la expresión de la AAH estaba modulada con la extensión (crecimiento rápido) de la neurita (filopodios) como ocurre con el crecimiento invasivo de los neoplasmas malignos. Se cultivaron células humanas PNET2 obtenidas del CNS y SH-Sy5y de neuroblastomas, y se estimularon durante 0, 1, 2, 3, 5 ó 7 días con 12-éster de forbol 13-acetato 100 nM o ácido retinoico 10 µM para inducir el crecimiento rápido. Además, para examinar los efectos de la retracción de las neuritas sobre la expresión de la AAH, se trataron cultivos subconfluentes durante 24 horas con concentraciones bajas (10-40 µM) de H₂O₂. Para ambos estudios se evaluó la expresión de la AAH por análisis de transferencia de Western usando el anticuerpo an específico de la HAAH.

Generación de clones de PNET2 transfectados con AAH

El cDNA de la AAH humana de longitud completa (SEQ ID N° 3) se ligó en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.1 en el que la expresión génica estaba bajo el control de un promotor CMV (Invitrogen Corp., San Diego, CA). Las células PNET2 se transfectaron bien con pHAAH o bien con pcDNA3 (control negativo) usando reactivo Cellfectin (Gibco BRL, Grand Island, NY). Se eligieron los clones resistentes a la neomicina para estudiar si los niveles constitutivos de expresión de la proteína AAH habían aumentado en al menos dos veces con respecto al control (pcDNA3) en función de los resultados del análisis de transferencia de Western. Para determinar como la sobreexpresión de la AAH alteraba la expresión de los genes que modulan el fenotipo transformado, se midieron los niveles de antígeno nuclear de las células proliferantes (PCNA), p53, p21/Waf1, Bcl-2 y p16 en los lisados celulares preparados a partir de cultivos subconfluentes de clones transfectados de forma estable de AAH (N = 5) y pcDNA3 (N = 5). El PCNA se usó como marcador de la proliferación celular. Los niveles de p53, p21/Waf1 y Bcl-2 se examinaron para determinar si las células que sobreexpresaban la AAH eran más propensas a la progresión del ciclo celular y más resistentes a la apoptosis. Los niveles de p16 se evaluaron para determinar si la sobreexpresión de la AAH tiene un papel en la invasividad tumoral.

65

ES 2 286 041 T3

TABLA 2

Secuencia del cDNA de la HAAH

5 **cggaaccgtgc aatggcccag cgtaagaatg ccaagagcag cggcaacagc agcagcagcg** 61
gctccggcag cggtagcacg agtgccgggca gcagcagccc cggggcccgg agagagacaa 121
agcatggagg acacaagaat gggaggaaag gcggactctc gggaaacttca ttcttcacgt 181
10 **ggtttatggt gattgcattg ctgggctgtc ggacatctgt agctgtcgtt tggtttgatc** 241
ttgttgacta tgaggaagtt ctaggaaaac taggaatcta tgatgctgat ggtgatggag 301
atthttgatgt ggatgatgcc aaagthttat taggacttaa agagagatct acttcagagc 361
cagcagtcoc gccagaagag gctgagccac aactgagcc cgaggagcag gttcctgtgg 421
15 **aggcagaacc ccagaatata gaagatgaag caaaagaaca aattcagtc cttctccatg** 481
aaatggtaca cgcagaacat gttgagggag aagacttgca acaagaagat ggaccacag 541
gagaaccaca acaagaggat gatgagthtc ttatggcgac tgatgtagat gatagatttg 601
20 **agaccctgga acctgaagta tctcatgaag aaaccgagca tagttaccac gtggaagaga** 661

25 **cagthtcaca agactgtaat caggatatgg aagagatgat gtctgagcag gaaaatccag** 721
attccagtga accagtagta gaagatgaaa gattgcacca tgatacagat gatgtaacat 781
accaagtcta tgaggaacaa gcagtatatg aacctctaga aatgaaggg atagaaatca 841
cagaagtaac tgctccccct gaggataatc ctgtagaaga ttcacaggta attgtagaag 901
aagtaagcat thttcctgtg gaagaacagc aggaagtacc accagaaaca aatagaaaaa 961
30 **cagatgatcc agaacaaaa gcaaaagtha agaaaaagaa gcctaaactt thaaataaat** 1021
ttgataagac tathaaagct gaacttgatg ctgcagaaaa actccgtaaa aggggaaaaa 1081
ttgaggaagc agtgaatgca thhaaagaac tagtacycaa ataccctcag agtccacgag 1141
caagatatgg gaaggcgag tgtgaggatg atthggctga gaagaggaga agtaatgagg 1201
tgctacgtgg agccatcgag acctaccaag aggtggccag cctacctgat gtccctgcag 1261
acctgctgaa gctgagthtg aagcgtcgtc cagacaggca acaathttcta ggtcatatga 1321
gaggttccct gcttaccctg cagagattag thcaactatt thccaatgat acttccthaa 1381
40 **aaaatgacct tggcgtggga tacctcttga taggagataa tgacaatgca aagaaagtht** 1441
atgaagaggt gctgagtgtg acacctaag atggctthgc thaaagthcat tatggtthca 1501
thctgaaggc acagaacaaa atthgctgaga gcatcccata thhaaaggaa ggaatagaat 1561
ccggagatcc tggcactgat gatgggagat ththattthca cctgggggat gccatgcaga 1621
gggtthggaa caagaggca tataagthgt atgagctthg gcacaagaga ggacactthg 1681
catctgtctg gcaacgctca ctctacaatg thaatggact gaaagcacag cctthgtgga 1741
ccccaaaaga aacgggctac acagagthtag thaaagthtt agaaagaaac thggaagthaa 1801
50 **thccgagatga aggcctthga thgthggata aagccaaagg thctthctcgt cctgaggatg** 1861
aaaacctgag gaaaaaggg gactggagcc agthcacgct thggcagcaa ggaagaagaa 1921
atgaaaatgc ctgcaagga gthcctaaaa cctgtacct actagaaaag thccccgaga 1981
caacaggatg cagaagagga cagatcaaat atthcatcat gcaccccggt actcacgtgt 2041
ggccgcacac agggcccaca aactgcaggc thcgaatgca cctgggctthg thgattthca 2101
aggaaggctg caagathcga thtgccaacg agaccaggac ctgggaggaa gthcaagthgc 2161
thcatththga thactcttht gagcacgagg ththggcagga thcctcatct thccggctga 2221
60 **thattcatcgt gthgthgtgg catccggaac thgaccaca gcagagacyc agcctthccag** 2281
caaththagca thaatthcat caagctthgg aaactctgga gaga

65 (SEQ ID N° 3; N° de registro del GENBANK : S83325 ; el codon que codifica la metionina inicial está subrayado)

Análisis de transferencia de Western

Las células cultivadas en placas de 10 cm² se lisaron y se homogeneizaron en una disolución tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación RIPA convencional que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa. Los sobrenadantes recogidos después de centrifugar las muestras a 12.000 x g durante 10 minutos para eliminar los restos insolubles se usaron para los análisis de transferencia de Western. La concentración de proteína se midió usando el ensayo BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Las muestras que contenían 60 µg de proteína se sometieron a electroforesis en geles de dodecilsulfato de sodio poliacrilamida (SDS-PAGE) y se sometieron a análisis de transferencia de Western. Las membranas replicadas se ensayaron frente a los anticuerpos individuales. La inmunoreactividad se detectó con IgG conjugada con peroxidasa de rábano (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) y reactivos de quimioluminiscencia mejorada. Para cuantificar los niveles de expresión de la proteína, las autorradiografías no saturadas se sometieron a densitometría volumétrica usando el programa NIH Image versión 1.6. Las comparaciones estadísticas entre las células transfectadas con pHAH y con pcDNA3 se hicieron usando los análisis de la T de Student.

15 *Anticuerpos*

Los anticuerpos monoclonales específicos de la HAAH generados frente a las células de carcinoma hepatocelular FOCUS se usaron para detectar la inmunoreactividad de la AAH. Los anticuerpos monoclonales de la tenascina y la proteína glial fibrilar ácida y el anticuerpo policlonal de conejo para la laminina se obtuvieron de Sigma Co. (St. Louis, MO). El anticuerpo policlonal de conejo para el p16 humano se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). El control negativo 5C3, anticuerpo monoclonal del antígeno de superficie de la hepatitis B, se generó usando proteína recombinante y se usó como control negativo.

25 *Inmunoreactividad de la AAH en tumores cerebrales malignos primarios*

La inmunoreactividad de la AAH se detectó en 15 de 16 glioblastomas, 8 de 9 oligodendrogliomas anaplásicos y los 12 PNET. La inmunoreactividad de la AAH se localizó en los citoplasmas, núcleos y procedimientos celulares. La distribución tisular de la inmunoreactividad de la AAH fue notable por el intenso marcado localizado en las interfases entre tumor y cerebro intacto, y los niveles notablemente bajos de la inmunoreactividad en las porciones centrales de los tumores. También se observaron niveles elevados de inmunoreactividad de la AAH en las células neoplásicas distribuidas en las zonas subpiales, leptomeninges, espacios perivasculares de Virchow-Robin y en las células neoplásicas individuales o en pequeños aglomerados que infiltran el parénquima. Por el contrario, la inmunoreactividad de la AAH no fue detectable en el cerebro normal. La distribución de la inmunoreactividad de la AAH parece no estar estrictamente correlacionada con la síntesis del DNA, ya que la densidad de los núcleos en la mitosis (1-5%) fue similar en las partes centrales y periféricas de los tumores.

Relación entre la inmunoreactividad de la AAH y de la tenascina en glioblastomas

La tenascina es un antígeno asociado a la matriz extracelular que es expresado en los gliomas malignos. La tenascina contiene dominios similares al EGF en la molécula, un sustrato para la hidroxilación de la HAAH. Para localizar la AAH con respecto a la inmunoreactividad de la tenascina en los tumores malignos de cerebro, se realizó una tinción inmunohistoquímica de doble marcado en la que la AAH se detectó usando un cromógeno marrón (DAB) y la tenascina con un cromógeno azul (BCIP/NBT). De forma análoga, las secciones adyacentes se marcaron doblemente para localizar conjuntamente la AAH con la laminina, otro dominio EGF que contiene moléculas de matriz extracelular expresadas en el CNS. Se observaron niveles elevados de inmunoreactividad de la tenascina en el tejido conectivo perivascular y en asociación con la proliferación glomeruloide de las células endoteliales. Los estudios de marcado doble demostraron una relación recíproca entre la inmunoreactividad de la AAH y la de la tenascina, de forma que niveles elevados de AAH se asociaron con niveles bajos o no detectables de tenascina y niveles bajos de AAH se asociaron con abundante inmunoreactividad de la tenascina. Aunque las lamininas también son sustratos probables para la actividad enzimática de la AAH debido a las repeticiones del EGF en las moléculas, los estudios de doble marcado revelaron solo niveles bajos de inmunoreactividad de la laminina por toda la extensión de los tumores y en las interfases entre el tumor y el tejido intacto.

55 *Análisis de la expresión de la AAH en líneas celulares neuronales tratadas con PMA o RA*

La extensión del crecimiento rápido neurítico/filopodios caracteriza el crecimiento invasivo de las células neuronales neoplásicas. El PMA activa las vías de transducción de la señal de la proteína cinasa C que están implicadas en el crecimiento rápido neurítico. El ácido retinoico (abreviado en la parte siguiente de la presente memoria como RA por sus iniciales en inglés: retinoic acid) se enlaza a su propio receptor y el complejo ligando-receptor se traslada al núcleo donde se enlaza a las secuencias de consenso específicas presentes en las regiones promotora/potenciadora de los genes diana implicados en el crecimiento neurítico. Tanto las células PNET2 como las SH-Sy5y pueden ser inducidas para que se produzca el crecimiento rápido por tratamiento con PMA (60-120 nM) o ácido retinoico (5-10 µM). Las figuras 5A-D muestran datos de autorradiografías de transferencia de Western representativas; los gráficos de barras corresponden a la media ± desviación estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos. Los análisis de transferencia de Western con el anticuerpo FB50 detectaron bandas dobles correspondientes a la proteína con un peso molecular de aproximadamente 85 kDa. Las células PNET2 sin tratar presentaban niveles relativamente bajos de inmunoreactividad de la AAH (figura 5A), mientras que las células SH-Sy5y mostraban una expresión de la AAH detectada fácilmente (figura 5B). Las células PNET2 sin tratar presentaban una morfología poligonal con procesos

gruesos de células radiales cortas, mientras que en las células SH-Sy5y eran ligeramente alargadas y se extendían espontáneamente en procesos finos que disminuían gradualmente. Ambas líneas celulares manifestaban aumentos dependientes del tiempo en los niveles de la inmunorreactividad de la AAH después de la estimulación bien con RA (figuras 5A y 5B) o bien con PMA (figura 5C) y extensión de las neuritas. En las células PNET2 los niveles de la proteína AAH aumentaron en al menos 2 veces 24 horas después de la exposición a RA o a PMA y los niveles elevados de AAH se mantuvieron a lo largo de los 7 días del estudio. En las células SH-Sy5y, los aumentos en la expresión de la AAH estimulados por el RA o el PMA se produjeron más gradualmente y fueron mayores después de 7 días de tratamiento (figura 5B).

Para examinar el efecto de la expresión de la AAH en la retracción de las neuritas, se trataron las células PNET2 y SH-Sy5y con concentraciones bajas (8-40 μ M) de H₂O₂. Después de 24 horas de exposición a hasta 40 μ M de H₂O₂ la mayoría de las células seguían siendo viables (exclusión con colorante azul de tripán), presentaron retracción y redondeado de las neuritas. Los análisis de transferencia de Western usando el anticuerpo FB50 demostraron la reducción dependiente de la dosis de H₂O₂ en los niveles de la proteína AAH.

15 *Efectos de la sobreexpresión de la AAH en células PNET2*

Para evaluar directamente el papel de la sobreexpresión de la AAH con respecto al fenotipo maligno, se transfectoron de forma estable células PNET2 con el cDNA humano de longitud completa con la expresión del gen bajo el control del promotor CMV (pHAAH). Se estudiaron los clones resistentes a la neomicina que tenían niveles de inmunorreactividad de la AAH al menos dos veces mayor que la de los clones pcDNA3 resistentes a la neomicina (simulado). Como el comportamiento agresivo de los neoplasmas malignos está asociado con una síntesis de DNA aumentada, progresión del ciclo celular, resistencia a la apoptosis y crecimiento invasivo, se caracterizaron los cambios en el fenotipo asociados con una sobreexpresión constitutiva de la AAH con respecto a PCNA, p21/Waf1, p53, Bcl-2 y p16. El PCNA se usó como índice de la síntesis del DNA y de la proliferación celular. El P21/Waf1 es un inhibidor del ciclo celular. La expresión del gen supresor tumoral p53 aumenta antes de la apoptosis, mientras que el Bcl-2 inhibe la apoptosis y aumenta la supervivencia de las células neuronales. El p16 es un gen oncosupresor que a menudo bien presenta regulación disminuida o bien está mutado en neoplasmas malignos infiltrantes.

Se estudiaron cinco clones pHAAH y cinco pcDNA3. Los niveles aumentados de la expresión de la AAH en los clones transfectados con pHAAH se confirmó por análisis de transferencia de Western (figura 6) y de transferencia de Northern. Los análisis de transferencia de Western usando lisados celulares de cultivos que eran 70 a 80 por ciento confluentes demostraron que niveles aumentados constitutivamente de la expresión de la AAH (aproximadamente 85 kDa; P < 0,05) en células transfectadas con pHAAH se asociaron con niveles aumentados significativamente de PCNA (aproximadamente 35 kDa; P < 0,01) y Bcl-2 (aproximadamente 25 kDa; P < 0,05) y niveles reducidos de p21/Waf1 (aproximadamente 21 kDa; P < 0,001) y p16 (aproximadamente 16 kDa; P < 0,001) (figura 6). Sin embargo, los transfectantes estables con pHAAH también presentaban niveles mayores que el p53 de fenotipo salvaje (aproximadamente 53-55 kDa). Aunque la expresión de la AAH (proteína de 85 kDa) en los transfectantes estables aumentó solo en 75 por ciento, los niveles de p16 y p21/Waf1 se redujeron bruscamente y el PCNA aumentó hasta casi dos veces (figura 6).

La expresión aumentada de la AAH es indicativa de crecimiento e invasividad de los neoplasmas malignos del CNS

Los datos descritos en la presente memoria demuestran que la sobreexpresión de la AAH es una herramienta de diagnóstico mediante la cual identificar neoplasmas malignos primarios del CNS de origen tanto neuronal como de células gliales. Los estudios de tinción inmunohistoquímica demostraron que la sobreexpresión de la AAH era detectable principalmente en las interfases entre los tumores sólidos y el tejido normal y en las células neoplásicas infiltrantes distribuidas en las zonas subpiales, leptomeninges, espacios perivasculares y parénquima. Lo experimentos *in vitro* demostraron que la expresión del gen de la AAH estaba modulado con la extensión de las neuritas (filopodio) y la invasividad y presentaba regulación disminuida con la retracción de las neuritas. Además, las células PNET2 transfectadas de forma estable con el cDNA de la AAH presentaban una expresión aumentada de PCNA y Bcl-2 y reducida de Waf1/p21 y p16. Por lo tanto, la sobreexpresión de la AAH contribuye al fenotipo transformado de las células de CNS modulando la expresión de otros genes que promueven la proliferación celular y la progresión del ciclo celular, inhiben la apoptosis o aumentan la invasividad de las células tumorales.

Los datos demostraron transcritos de mRNA de la AAH (4,3 kB y 2,6 kB) y proteínas (85 kDa y 50-60 kDa) fácilmente detectables en células PNET2 y SH-Sy5y pero no en cerebros normales. Consecuentemente, se observaron niveles elevados de inmunorreactividad de la AAH en 35 de los 37 neoplasmas primarios malignos procedentes del CNS estudiados, mientras que los 4 cerebros normales de control no presentaban inmunorreactividad de la AAH detectable. La presencia de niveles elevados de la inmunorreactividad de la AAH en los márgenes infiltrantes y generalmente no en las partes centrales de los tumores indicó que la sobreexpresión de la AAH está implicada en el crecimiento invasivo de los neoplasmas del CNS. La administración de compuestos que disminuyen la sobreexpresión de la AAH o la actividad enzimática inhibe la proliferación de los tumores del CNS que sobreexpresan la AAH, así como las metástasis de los tumores de la CNS a otros tipos de tejidos.

La enzima AAH hidroxila los dominios EGF de varias proteínas. La tenascina, una molécula de la matriz extracelular que es expresada abundantemente en los gliomas malignos, contiene dominios similares al EGF. Como la tenascina promueve la invasión de las células tumorales, su abundante expresión en los glioblastomas representa un

mecanismo autocrino de crecimiento aumentado de células tumorales frente a la frecuente sobreexpresión del EFG o los receptores similares al EGF en los neoplasmas malignos de células gliales. El análisis de los dominios funcionales de las tenascinas indicó que los efectos mitogénicos de esta familia de moléculas están mediados ampliamente por los dominios de fibronectina y que los dominios similares al EGF inhiben el crecimiento, la elongación del proceso celular y la invasión de la matriz. Por lo tanto, la hidroxilación de los dominios similares al EGF por la AAH representa un importante factor regulador en la invasividad de las células tumorales.

Los estudios de tinción inmunohistoquímica de doble marcado demostraron una relación recíproca entre la inmunorreactividad de la AAH y de la tenascina, de forma que niveles elevados de inmunorreactividad de la AAH presentes en los márgenes de los tumores se asociaron con niveles bajos de tenascina y niveles bajos de AAH se asociaron a menudo con niveles elevados de tenascina. Estas observaciones indicaron que la hidroxilación de la AAH de los dominios similares al EGF de la tenascina altera la inmunorreactividad de la proteína tenascina y, de esta forma, facilita el crecimiento invasivo de los neoplasmas malignos del CNS en los tejidos normales adyacentes y en los espacios perivasculares.

Se examinó la inmunorreactividad de la AAH en células neuronales PNET2 y SH-Sy-5y inducidas para sufrir una extensión de la neurita con PMA o ácido retinoico, o una retracción de la neurita por exposición a dosis bajas de H₂O₂. La expresión de la AAH aumentó bruscamente por la extensión de la neurita (filopodio) inducida con PMA o con ácido retinoico e inhibió la retracción de la neurita y redondeado celular inducido por el H₂O₂. La extensión de la neurita o filopodio y la unión a la matriz extracelular son necesarias para la invasión de las células tumorales en el CNS. Los dominios similares al EGF de la tenascina inhiben el crecimiento neurítico y de las células gliales en la matriz durante el desarrollo.

Para examinar directamente el papel de la sobreexpresión de la AAH con respecto al fenotipo transformado, se examinaron los genes modulados con la síntesis del DNA, la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la invasividad neuronal en clones de células neuronales que sobreexpresaban de forma estable el cDNA de la AAH humana. El descubrimiento de inmunorreactividad aumentada del PCNA y disminuida del Waf1/p21 indicó que la sobreexpresión de la AAH aumenta la proliferación celular y la progresión del ciclo celular. Además, el descubrimiento de una expresión aumentada del Bcl-2 indicó que la sobreexpresión de la AAH contribuye al fenotipo transformado aumentando la resistencia celular a la apoptosis. El descubrimiento aparentemente contradictorio de mayores niveles de p53 en las células que sobreexpresan la AAH se explicó por la observación de que niveles elevados de p53 de fenotipo salvaje en células neuronales inmaduras se asociaron con el crecimiento neurítico (invasividad) más que con la apoptosis. Los niveles de p16 estaban reducidos (en comparación con las células normales) o eran virtualmente no detectables en las células que sobreexpresaban constitutivamente la AAH; se ha correlacionado una mutación de delección del gen p16 con un crecimiento invasivo y una progresión más rápida de los neoplasmas malignos, incluyendo aquellos con origen en el CNS. Estos datos indicaron que la expresión del p16 está modulada por la AAH.

Ejemplo 3

Producción de HAAH aumentada y transducción de señal mediada por IRS

La vía de transducción de señal mediada por el IRS-1 es activada en el 95% de los tumores de HCC humanos en comparación con el tejido hepático adyacente no involucrado. El de la HAAH es un gen efector en dirección 3' implicado en esta vía de transducción de señal. La regulación aumentada del gen de la HAAH está estrechamente asociada con la sobreexpresión del IRS-1 en los tumores de HCC como se ha puesto de manifiesto por tinción inmunohistoquímica y análisis de transferencia de Western. Un nivel elevado de la proteína HAAH se expresa en HCC y en colangiocarcinomas en comparación con hepatocitos y vías biliares normales. Ambos tumores presentan también un nivel elevado de expresión del IRS-1 por tinción inmunohistoquímica. Los clones de células FOCUS de HCC transfectados de forma estable con un mutante de IRS-1 negativo dominante truncado en el extremo C-terminal, que bloquea la transducción de señal estimulada por la insulina y el IGF-1, se asoció con una reducción destacada en la expresión del gen de la HAAH en el hígado. Por el contrario, ratones transgénicos que sobreexpresan el IRS-1 mostraron un aumento en la expresión del gen de la HAAH por análisis de transferencia de Western. La estimulación de la insulina en células FOCUS de HCC (20 y 40 U) en un medio sin suero y después de privación de suero durante 16 horas, mostró una regulación aumentada de la expresión del gen de la HAAH. Estos datos indicaron que la expresión del gen de la HAAH es un efector en dirección 3' de la vía de transducción de señal IRS-1.

Ejemplo 4

Efectos de los niveles de expresión de la HAAH sobre las características del fenotipo maligno

La sobreexpresión del IRS-1 en células NIH 3T3 induce la transformación. El constructo de HAAH murina de longitud total se clonó en el vector de expresión eucariótico pcDNA3. Un segundo constructo murino codificó la HAAH con actividad catalítica suprimida debido a una mutación dirigida. El cDNA de la HAAH humana de longitud completa se clonó en el vector de expresión pcDNA3 así como un plásmido que codifica el v-src que se usó como control positivo para la actividad de transformación. Se usaron métodos convencionales para la transfección de células NIH 3T3, control para la eficacia de la transfección, ensayos de actividad enzimática de la HAAH, transformación por análisis de formación de focos, ensayos de crecimiento independiente del anclaje y análisis de tumorigenicidad en ratones sin pelo. Los datos indicaron que la sobreexpresión de la HAAH está asociada con la generación de un fenotipo maligno.

ES 2 286 041 T3

TABLA 4

La sobreexpresión de la HAAH enzimáticamente activa indica malignidad

DNAc	Nº de focos \pm D.E. ^b	Clon NIH 3T3	Nº de colonias ^c
pcDNA3 (simulado)	6,0 \pm 3,3	pcDNA (simulado)	0,4 \pm 0,5
HAAH murina	14,0 \pm 2,9	clon 18 ^d	6,2 \pm 2,9
HAAH murina mutante ^a	1,6 \pm 1,0	clon 16 ^e	4,7 \pm 6,5
HAAH humana	32,0 \pm 5,4		
v-scr	98,0 \pm 7,1		

^a HAAH enzimáticamente inactiva.

^b $p < 0,01$ en comparación con la HAAH murina simulada y mutante.

^c $P < 0,001$ en comparación con la HAAH simulada.

^d El clon 18 es una línea de células NIH 3T3 clonadas de forma estable que sobreexpresa la HAAH humana en aproximadamente dos veces.

^e El clon 16 es una línea de células NIH 3T3 clonadas de forma estable que sobreexpresa la HAAH en aproximadamente 50%.

Estos datos indicaron que la sobreexpresión de la HAAH está asociada con la formación de focos transformados. Para que la transformación celular se produzca es necesaria la actividad enzimática. Las líneas de células NIH 3T3 clonadas con expresión del gen de la HAAH humana aumentada crecieron como tumores sólidos en ratones sin pelo. La HAAH es un gen efector en dirección 3' de la vía de transducción de la señal de IRS-1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *ex vivo* para diagnosticar un neoplasma maligno en un mamífero, comprendiendo dicho método poner en contacto un fluido corporal de dicho mamífero con un anticuerpo o uno de sus fragmentos que se enlaza a un polipéptido aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa (AAH) en condiciones suficientes para formar un complejo antígeno-anticuerpo y detectar el complejo antígeno-anticuerpo.
- 10 2. Un método *ex vivo* para pronosticar un neoplasma maligno en un mamífero, comprendiendo dicho método el método según la reivindicación 1 y en el que dicho método genera datos temporales usados para el pronóstico de la enfermedad maligna.
3. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el paciente es un humano.
- 15 4. El método según la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que dicho neoplasma se deriva del tejido endodérmico.
5. El método según la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que dicho neoplasma se elige entre cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de hígado y cáncer de las vías biliares.
- 20 6. El método según la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que dicho neoplasma es un cáncer del sistema nervioso central (CNS).
7. El método según la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que dicho fluido corporal se elige entre un fluido corporal derivado del CNS, sangre, suero, orina, saliva, esputo, efusión pulmonar y fluido ascítico.
- 25 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante un marcador elegido entre un marcador enzimático, un marcador fluorescente, un marcador quimi-luminiscente, un marcador radiactivo y un marcador colorante.
- 30 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho neoplasma se elige entre un carcinoma hepatocelular, un colangiocarcinoma, un glioblastoma y un neuroblastoma.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo se enlaza a un epítope en un sitio catalítico de la AAH.
- 35 11. El método según la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo es una molécula Fv de cadena sencilla.
12. Un uso *in vitro* de un kit que comprende un anticuerpo marcado de forma detectable que se enlaza a una AAH, en el que el uso es para ayudar en el diagnóstico de un neoplasma detectable en el fluido corporal de un mamífero.

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

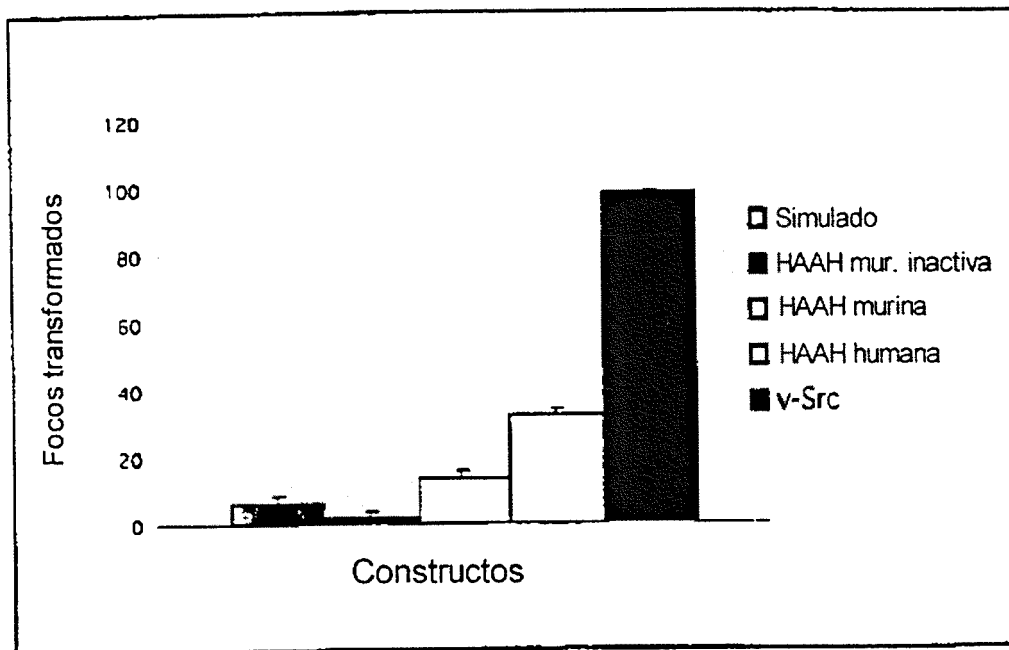


Fig. 2

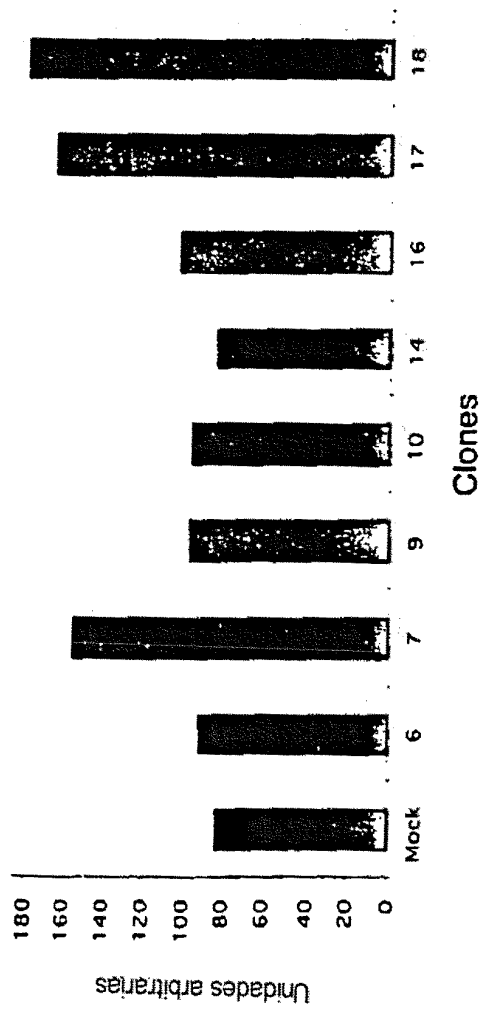


Fig. 3a

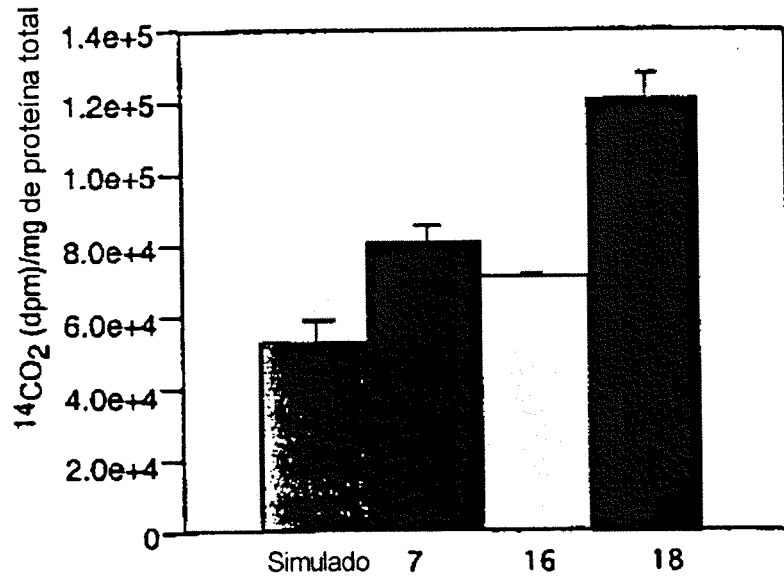
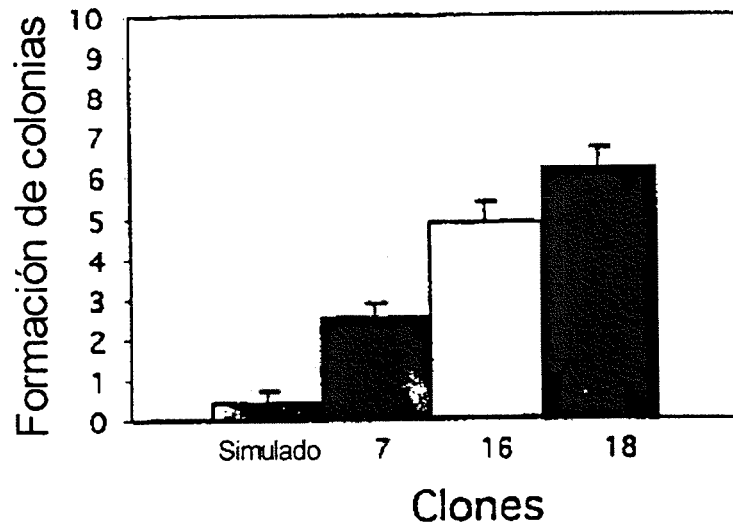


Fig. 3b



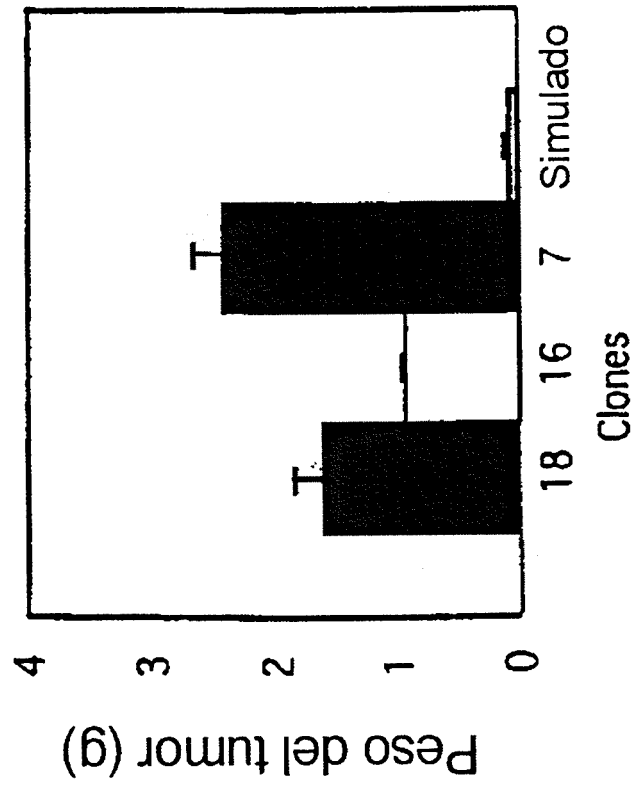


Fig. 4

Fig. 5b

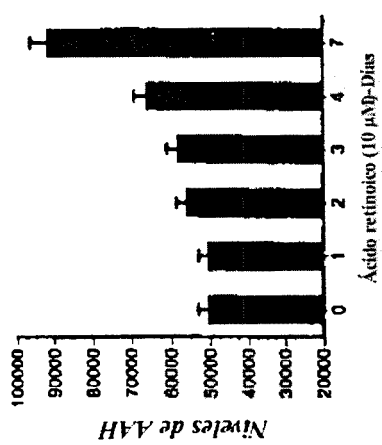


Fig. 5a

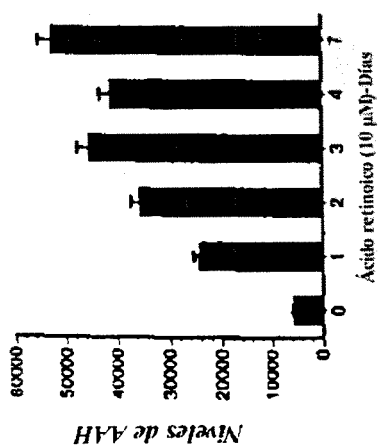


Fig. 5d

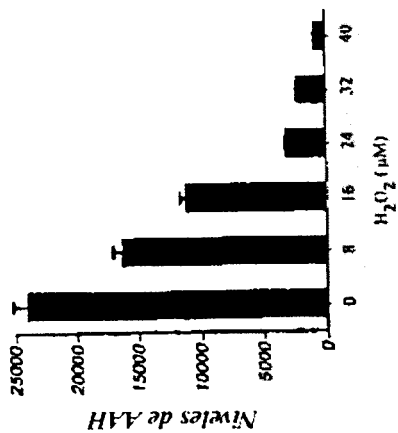


Fig. 5c

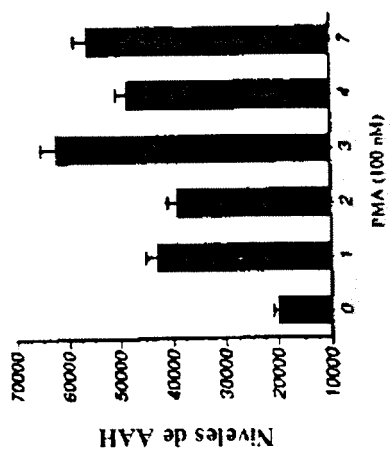
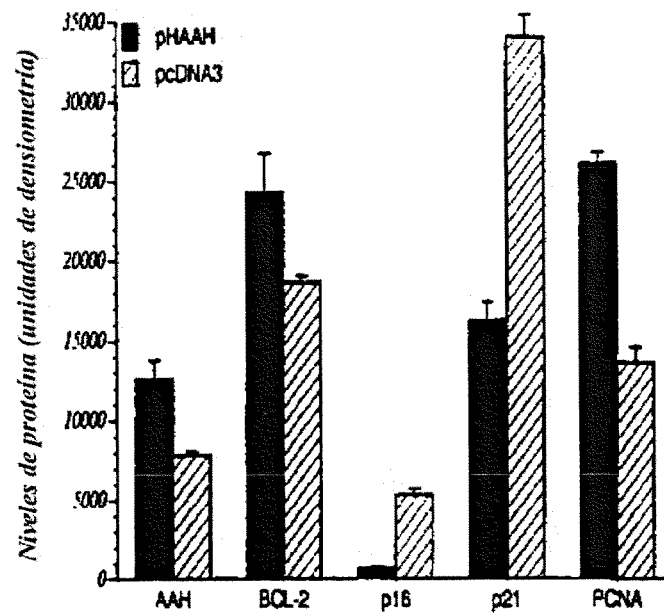


Fig. 6



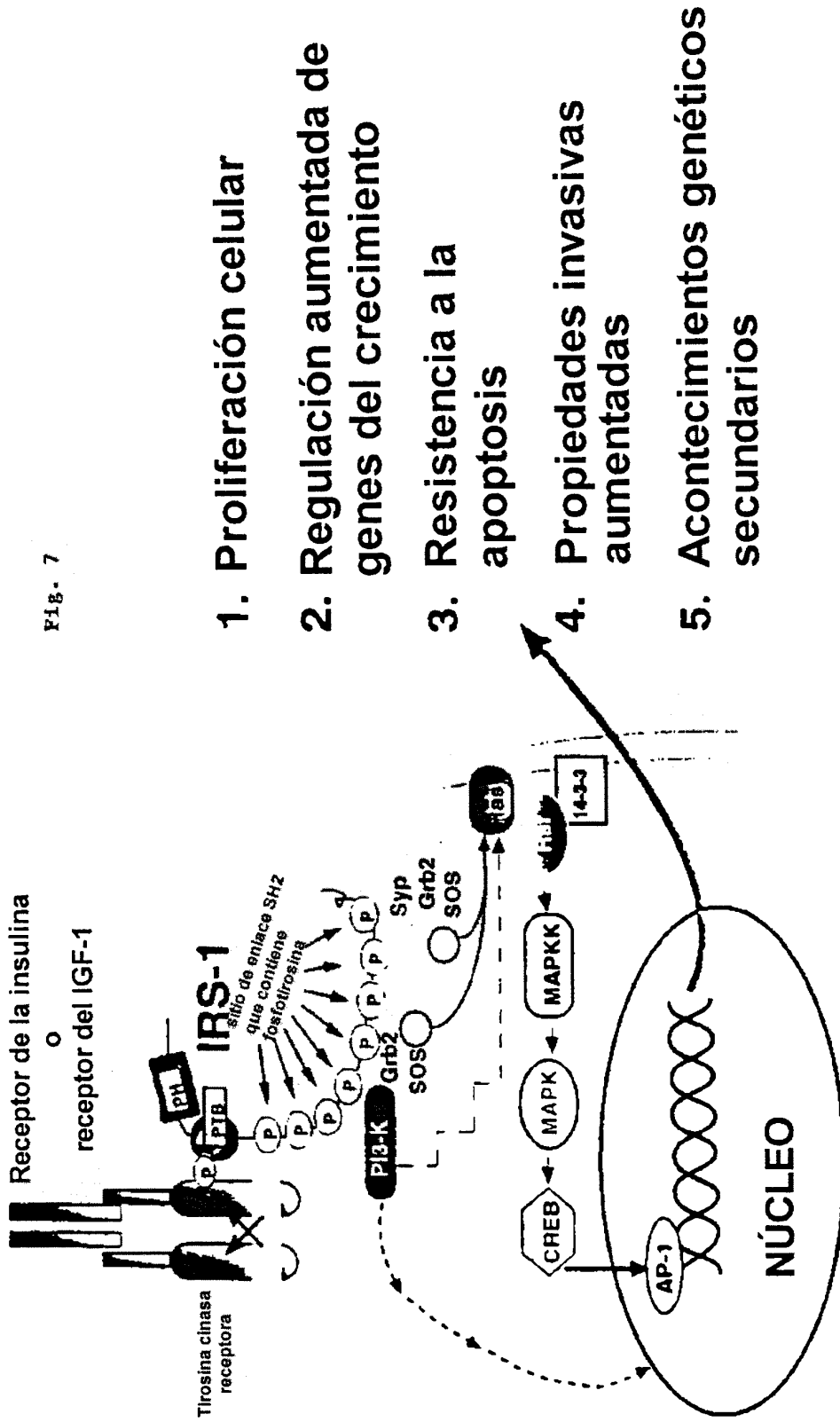


Fig. 8

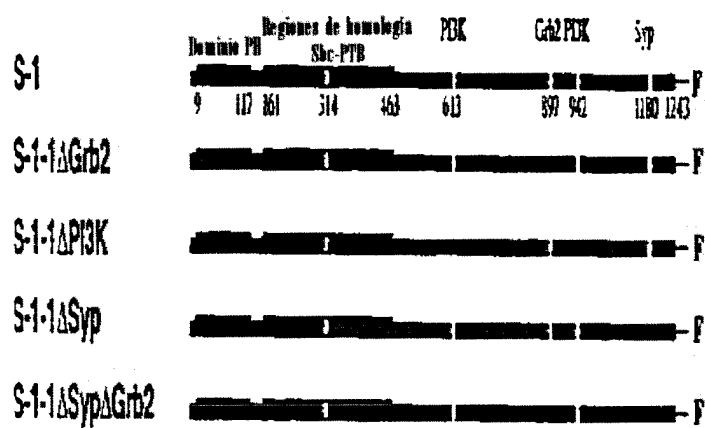


Fig. 9

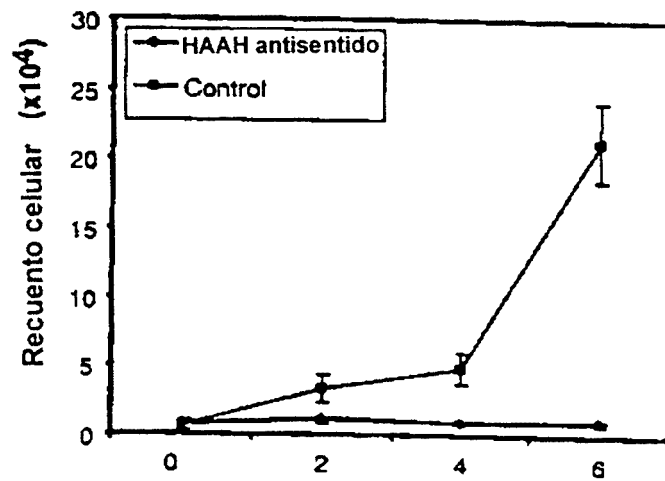


Fig. 1)

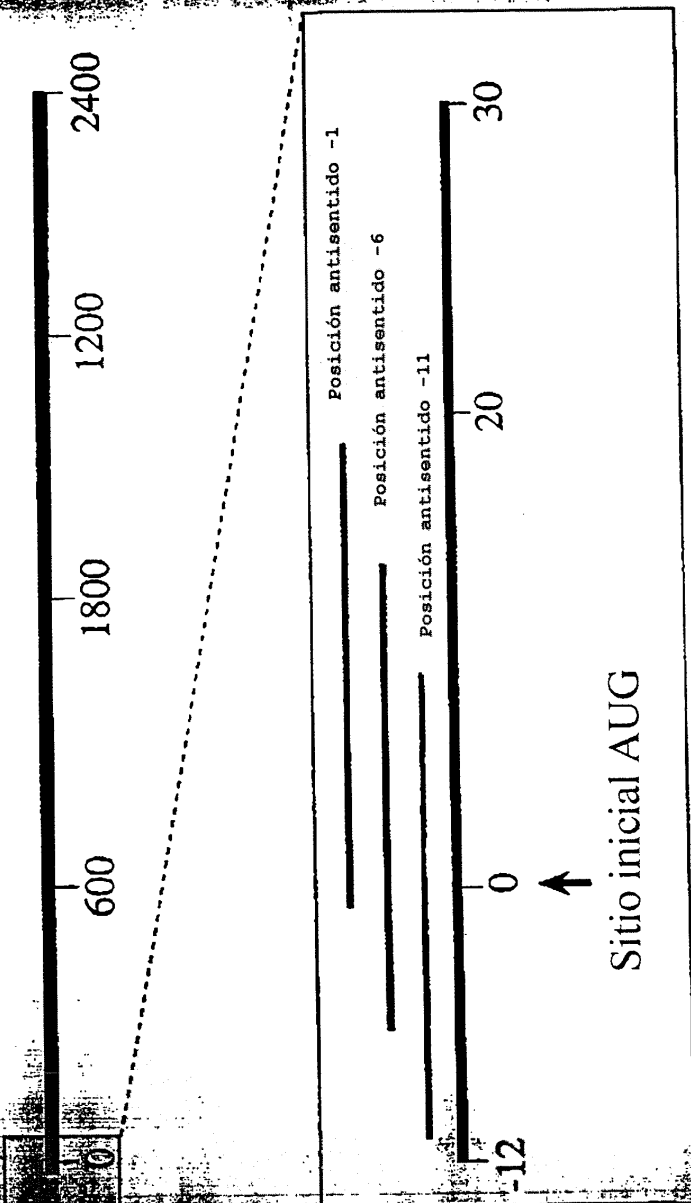


Fig. 11

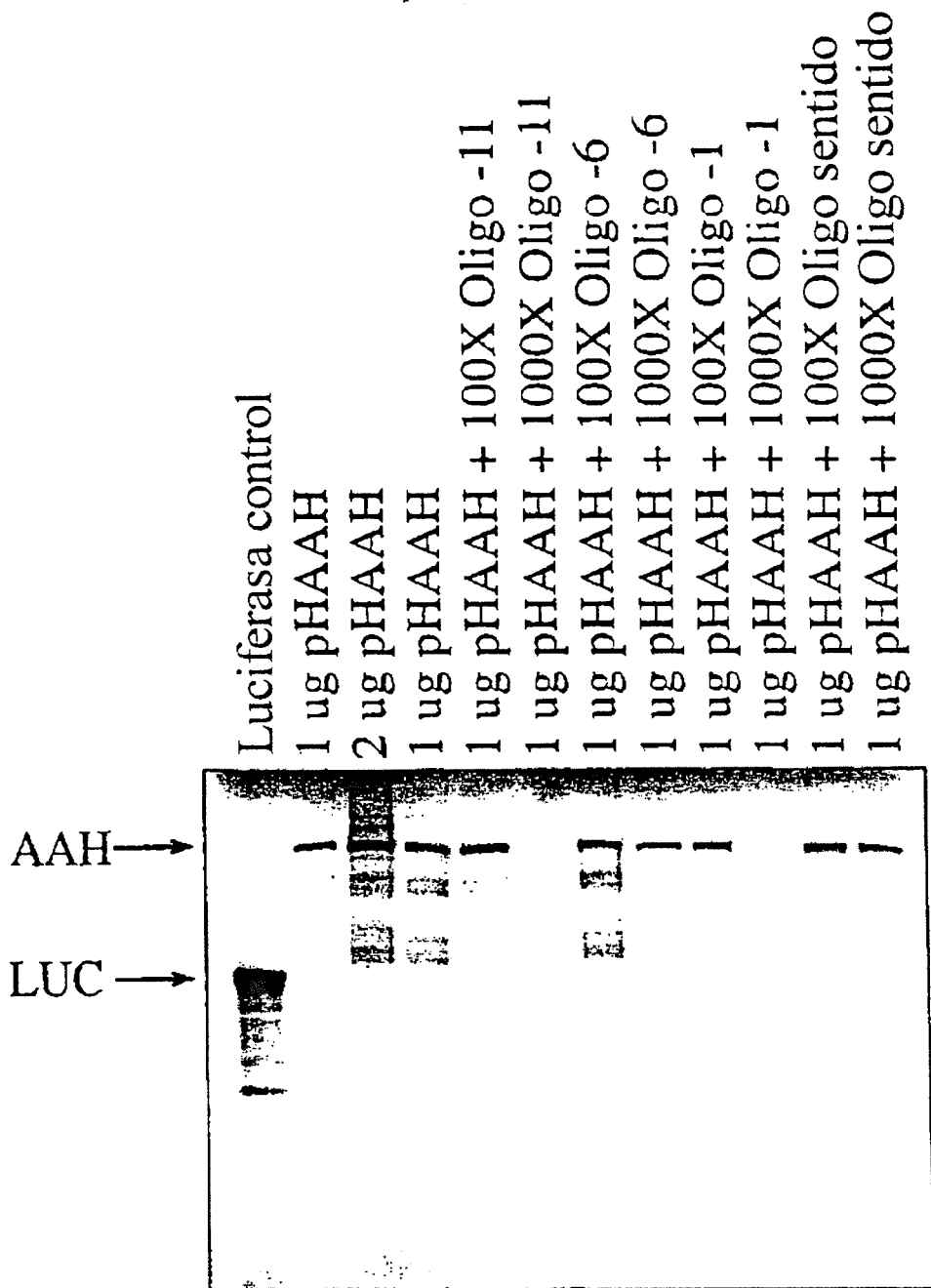


Fig. 12

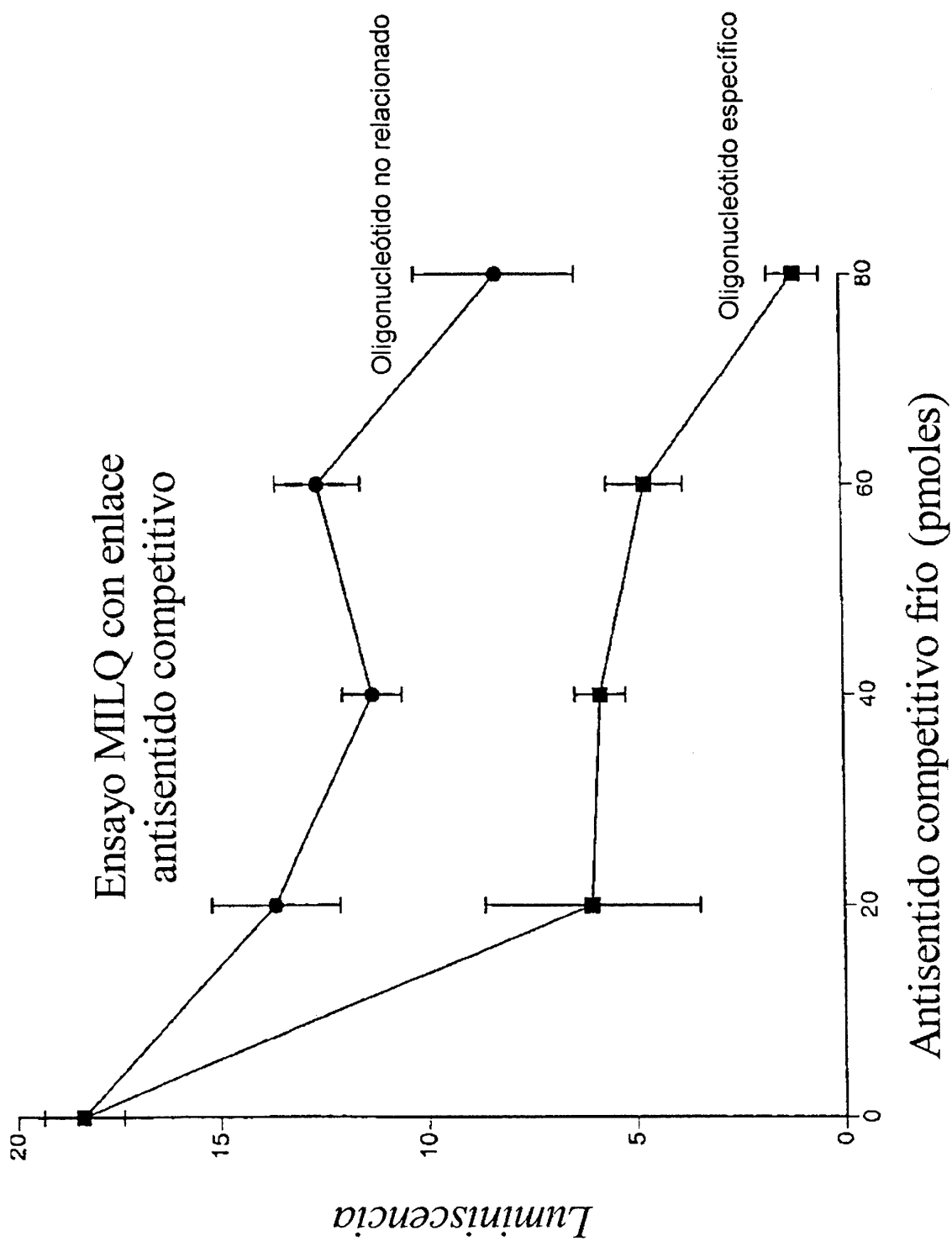


Fig 13

