

(11) Número de Publicação: **PT 1079851 E**

(51) Classificação Internacional:  
**A61K 38/02** (2006.01) **A61K 38/22** (2006.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1999.05.11**

(30) Prioridade(s): **1998.05.12 US 85128 P**  
**1999.02.05 US 246041**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.03.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.07.04**  
**095/2007**

(73) Titular(es):

**GREENVILLE HOSPITAL SYSTEM**  
**ONCOLOGY RESEARCH INSTITUTE,**  
**MOLECULAR BIOLOGY 900 WEST FARIS ROAD**  
**GREENVILLE, SC 29605** **US**

(72) Inventor(es):

**THOMAS E. WAGNER** **US**  
**WEN Y. CHEN** **US**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA**  
**R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: "UTILIZAÇÃO DE AGENTES ANTI-PROLACTINA PARA TRATAR CANCRO"

(57) Resumo:

RESUMO

**"Utilização de agentes anti-prolactina para tratar cancro"**

O presente invento refere-se a formas variantes de prolactina humana que actuam como antagonistas no receptor da prolactina, e à utilização de tais variantes no tratamento de cancros humanos e distúrbios proliferativos, incluindo doenças tanto benignas como malignas da mama e da próstata.

## DESCRIÇÃO

### **"Utilização de agentes anti-prolactina para tratar cancro"**

#### **1. INTRODUÇÃO**

O presente invento refere-se à inibição dos efeitos promotores da proliferação celular da prolactina no seu receptor. O presente invento pode ser utilizado no tratamento de condições tanto benignas como malignas que envolvam proliferação celular indesejada.

#### **2. ANTECEDENTES DO INVENTO**

A prolactina ("PRL") é uma hormona neuroendócrina de 23 kDa que é estruturalmente aparentada com a hormona de crescimento e, num menor grau, com membros da família das interleucinas (Reynolds et al., *Endocrinol.* 138: 5555-5560, 1997; Cunningham et al., *Science* 247: 1461-1465, 1990; Wells et al., *Recent Prog. Horm. Res.* 48: 253-275, 1993). Actuando através do receptor da prolactina, esta é necessária para a proliferação e diferenciação terminal do cancro da mama (Mani et al., *Cancer Res.* 46: 1669-1672, 1986; Malarkey et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 673-677, 1983; Biswas e Vonderhaar, *Cancer Res.* 47: 3509-3514, 1987), promoção do crescimento e diferenciação do epitélio ductal, proliferação e diferenciação das unidades lobulares, e iniciação e manutenção da lactação (Kelly et al., *Recent Prog. Horm. Res.* 48: 123-164, 1993; Shiu et al., *Recent Prog. Horm. Res.* 43: 277-303, 1987). Uma diversidade de outros efeitos foram atribuídos à PRL, incluindo papéis na reprodução e na resposta imunitária (Wennbo et al., *Endocrinol.* 138: 4410-4415, 1997; Nicoll, 1974, em "Handbook of Physiology", Knobil e Sawyer, eds., American Physiological Society, Washington, D.C.; Shiu e Friesen, *Annu. Rev. Physiol.* 42: 83-96, 1980).

O receptor da prolactina ("PRLR") é um membro da superfamília de receptores de citocinas e liga-se a um grupo de hormonas, incluindo não apenas PRL como também lactogénios placentários e hormonas de crescimento ("GH") de primatas, para produzir um efeito mitogénico (Ormandy et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 3692-3699, 1997; Horseman, *Endocrinol.*

136: 5249-5251, 1995; Clevenger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6460-6464, 1990; Buckley et al., *Life Sci.* 37: 2569-2575, 1985; Costello et al., *Prostate* 24: 162-166, 1994). O PRLR é homólogo do receptor para GH ("GHR", também referido como receptor do somatogénio) e ambos pertencem à superfamília de receptores de citocinas (Kelly et al., *Endocrin Rev.* 12: 235-251, 1991; Kelly et al., *Recent Prog. Horm. Res.* 48: 123-164, 1993; Horseman e Yu-Lee, *Endocrin. Rev.* 15: 627-649, 1994).

Foi proposta uma associação entre a actividade de PRL e o cancro da mama (Ormandy et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 3692-3699, 1997). Verificou-se que níveis elevados de PRL aceleram o crescimento de tumores mamários induzidos por 7,12-dimetilbenz(α)antraceno em ratos, enquanto que se observou que a ablação de PRL tem um efeito inibidor (Welsch, *Cancer Res.* 45: 3415-3443, 1985). O crescimento de tumores mamários foi aumentado em ratinhos transgénicos que sobre-expressavam GH, que se liga ao PRLR de roedor (Bartke et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206: 345-359, 1994). Verificou-se que os receptores para os esteróides sexuais e PRL são co-expressos e regulados de forma cruzada, o que pode explicar as acções sinergéticas do estrogénio, da progesterona e da PRL no controlo do crescimento tumoral (Ormandy et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 3692-3699, 1997).

Contudo, até à data, as terapias que reduzem os níveis de PRL, tais como a hipofisectomia e a administração de bromocriptina (ambas dirigidas à diminuição ou eliminação da produção de PRL pela glândula pituitária), não tiveram sucesso no tratamento de cancro da mama (Peyrat et al., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 20: 1363-1367, 1984; Heuson et al., *Eur. J. Cancer* 8: 155-156, 1972). Foi proposto que a PRL pode contudo ter um papel no cancro da mama se existir uma volta reguladora do crescimento autócrina/parácrina (o mesmo é dizer, que a pituitária é apenas uma das várias fontes de prolactina; ver Clevenger et al., *Am. J. Pathol.* 146: 695-705, 1995; Fields et al., *Lab. Invest.* 68: 354-360, 1993; Ginsburg e Vonderhaar, *Cancer Res.* 55: 2591-2595, 1995; Fuh e Wells, *J. Biol. Chem.* 270: 13133-13137, 1995). A este respeito, quando se determinaram os níveis de ARN de PRL e PRLR utilizando técnicas de transcriptase inversa/PCR, verificou-se que a PRL e

o PRLR eram amplamente expressos em cancros da mama (>95 porcento) e em tecidos normais da mama (>93 porcento), sugerindo que intervenções no receptor PRL/PRLR podem ser úteis no tratamento de cancro da mama (Reynolds *et al.*, *Endocrinol.* 138: 5555-5560). De facto, foi recentemente relatado que um regímen combinado combinando um anti-estrogénio (tamoxifeno), um análogo de GH (octreótido) e um potente anti-prolactina (CV 205-502, um agonista da dopamina que inibe a secreção de prolactina pela pituitária) tinha melhores resultados clínicos em pacientes de cancro da mama metastáticos em comparação com a terapia de tamoxifeno sozinho (Botenbal *et al.*, *Br. J. Cancer.* 77: 115-122, 1998).

Foi também proposta uma associação entre a expressão de PRL e doença da próstata (Wennbo *et al.*, *Endocrinol.* 138: 4410-4415, 1997). Encontram-se receptores de PRL no tecido da próstata (Aragona e Friesen, *Endocrinol.* 97: 677-684, 1975; Leake *et al.*, *J. Endocrinol.* 99: 321-328, 1983). Observou-se que os níveis de PRL aumentam com a idade (Hammond *et al.*, *Clin. Endocrinol.* 7: 129-135, 1977; Vekemans e Robyn, *Br. Med. J.* 4: 738-739, 1975) coincidente com o desenvolvimento de hiperplasia da próstata e verificou-se que a PRL tinha efeitos tróficos e de diferenciação no tecido da próstata (Costello e Franklin, *Prostate* 24: 162-166, 1994). Ratinhos transgénicos que sobre-expressam o gene de PRL desenvolveram um aumento dramático da glândula da próstata (Wennbo *et al.*, *Endocrinol.* 138: 4410-4415, 1997). Contudo, o papel da PRL na doença da próstata permanece obscuro (Wennbo *et al.*, *Endocrinol.* 138: 4410-4415, 1997). Os níveis de PRL em pacientes possuindo hiperplasia da próstata foram relatados como estando aumentados (Odoma *et al.*, *J. Urol.* 133: 717-720, 1985; Saroff *et al.*, *Oncology* 37: 46-52, 1980), aumentados apenas em pacientes com cancro da próstata ou inalterados (Harper *et al.*, *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 81: 409-426, 1976). Janssen *et al.* relataram que a proliferação de linhas celulares da próstata humana insensíveis ao androgénio podem ser significativamente moduladas através de PRL (*Cancer* 77: 144-149, 1996). Para explicar estas discrepâncias, foi proposto que a síntese local de PRL na próstata (Nevalainen *et al.*, *J. Clin. Invest.* 99: 618-627, 1997) pode ser um factor importante. Foi observada expressão dependente de androgénio de PRL em epitélio da próstata de rato, apoiando o conceito de

uma volta autócrina/parácrina da acção da prolactina na próstata, onde podia mediar os efeitos associados ao androgénio (Nevalainen et al., *FASEB. J.* 11(14): 1297-1307, 1997). Mais, os dados clínicos parecem promissores: verificou-se que a hipofisectomia tem um efeito terapêutico aditivo quando combinada com castração e adrenalectomia em pacientes de cancro da próstata (Brendler, *Urology* 2: 99-102, 1973) e Rana et al. relatam que uma supressão máxima combinada de androgénios e prolactina resultou numa resposta clínica significativamente melhorada em relação a tratamentos convencionais em pacientes sofrendo de cancro da próstata avançado (Habib et al., *Eur. J. Cancer* 31A: 859-860, 1995).

Tendo em vista a relevância biológica da molécula de PRL e do seu receptor, vários investigadores avaliaram a actividade de variantes de PRL que possuíam diferenças estruturais relativamente à molécula nativa não modificada. Foi relatado que a PRL de rato naturalmente fosforilada antagoniza os efeitos promotores do crescimento da PRL não modificada num ensaio que mede a proliferação de células de linfoma T Nb2 de rato e na regulação autócrina da proliferação de células GH<sub>3</sub> (Wang e Walker, *Endocrinol.* 133: 2156-2160, 1993; Krown et al., *Endocrinol.* 122: 223-229, 1992). Mais, imitadores moleculares da PRL fosforilada possuindo um aminoácido volumoso com carga negativa (nomeadamente glutamato ou aspartato) a substituir a serina na posição 179 antagonizaram os efeitos promotores do crescimento da PRL (Chen et al., *Endocrinol.* 139: 609-616, 1998).

Outras estratégias para o desenho de variantes de PRL foram dirigidas à destruição da interacção entre PRL e o seu receptor. Para este fim, os investigadores estabeleceram analogias entre o PRLR e o GHR, para o qual as relações de estrutura/função são melhor compreendidas.

Certas características do GHR foram elucidadas através do estudo da base para a actividade antagonista completa de GH da variante da GH humana ("hGH") possuindo uma substituição da glicina na posição 120 por um resíduo de arginina (Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5061-5065, 1990; Chen et al., *Mol. Endocrinol.* 5: 1845-1852, 1991; Chen et al., *J. Biol. Chem.* 269: 15892-15897, 1994; Chen et al., *Mol.*

*Endocrinol.* 9: 1-7, 1995; Patente dos Estados Unidos 5350836 por Kopchick e Chen; Patente dos Estados Unidos 5681809 por Kopchick e Chen). Foi deduzido que a hGH forma um complexo com uma forma dimérica do hGHR. Fuh e colegas propuseram um modelo de dimerização sequencial pelo qual GH se ligaria primeiro a um receptor através de um primeiro local de ligação (delimitado por porções da hélice 1, hélice 4 e volta 1 de GH) para formar um complexo 1:1 intermediário inactivo e depois a hGH ligada ao receptor interagiria com um segundo receptor através do local de ligação 2 (envolvendo a glicina da hélice 3 da GH mutada na variante G120R) para produzir o complexo hormona/receptor 1:2 activo (Fuh et al., *Science* 256: 1677-1680, 1992; Fuh et al., *J. Biol. Chem.* 268: 5376-5381, 1993; Goffin et al., *J. Biol. Chem.* 269: 32598-32606, 1994). Quando a glicina da hélice 3 na posição 120 da GH é substituída por um resíduo de arginina, o segundo local de ligação fica fisicamente impedido e a GH já não pode induzir a dimerização do receptor.

Embora se saiba menos sobre a estrutura do PRLR, foi sugerido que este também é activado pela dimerização sequencial mediada pela hormona (Cunningham et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3407-3411, 1991; Fuh et al., *Science* 256: 1677-1680, 1992; Fuh et al., *J. Biol. Chem.* 268: 5376-5381, 1993). Foram produzidas variantes da PRL humana ("hPRL") contendo mutações na região que se acredita corresponder à interface hélice 3/hélice 1 da GH, incluindo mutações da alanina na posição 22, da leucina na posição 25, da serina na posição 26 e da glicina na posição 129 da PRL para triptofano e/ou arginina (especificamente, para criar A22W, L25R, L25W, S26R, S26W e G129R; Goffin et al., *J. Biol. Chem.* 269: 32598-32606, 1994). Foi relatado nesse artigo que as mutações pontuais em A22, S26 e G129 reduziam drasticamente a potência mitogénica da variante (em comparação com a PRL nativa) em 2-3 ordens de grandeza (testada no ensaio de proliferação de Nb2), embora tenha sido relatado que a variante G129R (posicionalmente análoga a G120R de GH) actuava como um agonista fraco em vez de antagonista. Foi subsequentemente relatado que quando testado num ensaio de actividade de PRLR no qual células, co-transfetadas com ácido nucleico codificando o hPRLR e um gene repórter sob o controlo de sequências de ADN que respondem a PRL, eram expostas à

variante G129R de hPRL, era observado um efeito antagonista (Goffin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 16573-16579, 1996).

Podem existir antagonistas de ocorrência natural da acção de GH. Uma forma truncada isenta de células do GHR (designada "GH-BP") foi identificada no homem e em certos animais (Baumann, *Acta Endocrinol.* 124(supl. 2): 21-26, 1991; Baumann *et al.*, *J. Endocrinol.* 141: 1-6, 1994; Baumann *et al.*, *Endocrinol.* 136: 377-378, 1995). A forma humana de GH-BP engloba o domínio extracelular do receptor e pode ser o resultado da clivagem proteolítica do receptor nativo ou do processamento alternativo do ARN. Foi sugerido que GH-BP actua inibindo a ligação de GH aos seus receptores (Baumann, *Acta Endocrinol.* 124(supl. 2): 21-26, 1991; Baumann *et al.*, *J. Endocrinol.* 141: 1-6, 1994). A apoiar esta hipótese está a observação de que os níveis de GH-BP em pacientes sofrendo de acromegalia (devido a sobre-expressão de GH) possuem uma correlação inversa com os níveis séricos de GH (o mesmo é dizer, quanto menos GH-BP, mais GH sérica presente; Amit *et al.*, *Hormone Res.* 37: 205-211, 1992). Níveis menores de GH-BP podem tornar a GH sérica de acromegalia relativamente mais activa no ensaio do receptor de GH e portanto contribuir negativamente para a doença (Hochberg *et al.*, *Acta Endocrinol.* 125: 23-27, 1994). Foram também observadas formas solúveis de outros receptores na superfamília de receptores de citocinas (Baumann, *Endocrinol.* 136: 377-378, 1995). Contudo, não houve, antes do presente invento, qualquer prova sugerindo a existência de uma forma isenta de células de ocorrência natural do PRLR.

### **3. SUMÁRIO DO INVENTO**

O presente invento refere-se à inibição dos efeitos de promoção da proliferação celular da prolactina no seu receptor.

Num primeiro conjunto de concretizações, o presente invento proporciona a utilização de uma variante da prolactina humana possuindo uma substituição da glicina na posição 129 para a preparação de um medicamento para inibição da proliferação de uma célula de cancro da mama ou da próstata que expressa um receptor de prolactina. O presente invento

baseia-se na observação de que uma variante de prolactina é capaz de inibir a proliferação celular de um modo dependente da dose. Mais, observou-se que a variante de prolactina era capaz de induzir apoptose em células de cancro. A variante de prolactina é uma forma mutada da prolactina humana na qual o aminoácido glicina na posição 129 é substituído por outro aminoácido. Em concretizações específicas não limitantes, a glicina na posição 129 da prolactina humana é substituída por arginina. A variante de prolactina pode ser utilizada em conjunto com um anti-estrogénio. Tais anti-estrogénios incluem, mas não se limitam a, tamoxifeno, raloxifeno ou ICI 164384 (Imperial Chemical Industries). Isto baseia-se na observação de que a administração de uma variante de prolactina juntamente com um anti-estrogénio induz um efeito inibidor sinergético na proliferação celular. Adicionalmente, a variante de prolactina pode ser utilizada em conjunto com um anti-androgénio. Tais anti-androgénios incluem, mas não se limitam a, flutamida, anandron ou acetato de ciproterona para induzir uma inibição sinergética da proliferação celular (ver, Smith, D.C., *Semin. Urol. Oncol.* 15: 3-12, 1997, para uma revisão sobre terapia anti-androgénios; Gomella, I.M., 3: 16-24, 1997; Suciu, S., *Cancer* 15: 3841-6, 1993).

Uma forma truncada do receptor da prolactina que é capaz de se ligar à prolactina e deste modo diminuir a disponibilidade da prolactina para se ligar ao seu receptor é também aqui descrita. As variantes de prolactina e os receptores truncados de prolactina podem ser utilizados em métodos de inibição da proliferação de células que expressam receptores de prolactina.

O presente invento proporciona ainda a utilização de uma variante de prolactina humana possuindo uma substituição da glicina na posição 129 para a preparação de um medicamento para indução de apoptose celular numa célula de cancro da mama ou da próstata expressando o receptor de prolactina. O presente invento baseia-se na observação de que uma variante de prolactina é capaz de induzir apoptose celular em células de cancro da mama humanas.

Noutra concretização do presente invento, o presente invento proporciona um método *in vitro* para identificação de

um composto capaz de modular a actividade do receptor de prolactina, compreendendo o método:

- a) a colocação de um composto em contacto com uma célula que expresse o receptor de prolactina;
- b) a medição do nível de apoptose na célula; e
- c) a comparação do nível de apoptose obtido em (b) com o nível obtido na ausência do composto;

de modo a que se o nível obtido em (b) diferir do obtido na ausência do composto, é identificado um composto capaz de modular a actividade do receptor da prolactina.

Ainda noutra concretização do presente invento, o presente invento proporciona uma proteína de fusão compreendendo uma variante da prolactina humana que está ligada a outra proteína, em que a variante possui uma substituição da glicina na posição 129.

Assim, o presente invento pode ser utilizado no tratamento de distúrbios clínicos em animais humanos e não humanos que envolvam proliferação celular indesejada. Em concretizações específicas, o presente invento pode ser utilizado no tratamento de cancro da mama e da próstata em seres humanos.

#### **4. BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

FIGURA 1A. Representação esquemática da clonagem e construção do plasmídeo de expressão pUCIG-MT-hPRLcDNA.

FIGURA 1B. Mapa plasmídico e estratégia geral de mutagénese dirigida por PCR. pcDNA3, o vector parental, contém as sequências reguladoras da transcrição iniciais imediatas de citomegalovírus (CMV) humano e a sequência sinal de poliadenilação e de terminação da transcrição do gene da GH bovina (BGH pA). O ADNc de hPRL foi clonado utilizando RT-PCR a partir de ARNm de pituitária humana e inserido em locais *Bst*X1. A mutação foi gerada através do desenho de iniciadores de PCR em locais *Xba*I.

FIGURA 2. Dados de experiências de ligação competitiva de radio-receptores para hGH e hPRL utilizando várias linhas celulares de cancro humanas (listadas ao longo do eixo dos

xx). HTB123 e T47D são linhas celulares de cancro da mama humano. O eixo dos yy representa a percentagem de ligação específica. Cada ponto representa a média de três experiências que foram, cada uma, realizadas em duplicado.

FIGURA 3. Análise “Western blot” mostrando a fosforilação de proteínas STAT (banda na seta) em células de cancro da mama humanas sob várias condições. Lendo da esquerda para a direita, a pista 1 representa uma cultura de controlo, a pista 2 representa uma cultura recebendo hPRL 5 nM, a pista 3 representa uma cultura recebendo hPRLA 5 nM, a pista 4 representa os efeitos competitivos quando a cultura é exposta a hPRL 5 nM e hPRLA 5 nM, e a pista 5 representa os efeitos competitivos quando a cultura é exposta a hPRL 5 nM e hPRLA 25 nM.

FIGURA 4. Efeitos da hormona de crescimento e da prolactina na proliferação de células de cancro da mama. O eixo dos xx representa a concentração de hGH ou hPRL presente no meio de cultura de células de cancro da mama humanas T-47D. O eixo dos yy representa o número total de células no final do período de incubação. Os pontos são a média (+DP) de três experiências, cada uma das quais foi realizada em duplicado.

FIGURA 5A-B. (A) Efeitos de várias concentrações de hPRL ou da variante da prolactina G129R hPRLA na proliferação de células de cancro da mama humanas T47D em cultura. (B) Efeitos de várias concentrações de estrogénio (E2) e tamoxifeno (Tam) na proliferação de células T47D ao longo de um período de 24 ou 72 horas.

FIGURA 6. O diagrama de um ensaio de cultura de células mista para avaliação dos efeitos de hPRL recombinante e da variante da prolactina G129R hPRLA na proliferação de células T47D.

FIGURA 7. Efeitos de hPRL expressa de modo recombinante, (L-PRL) e da variante da prolactina G129R hPRLA (L-PRLA) na proliferação de células de cancro da mama T47D num ensaio de cultura de células mista após 24 e 72 horas.

FIGURA 8. Efeitos de hPRL expressa de modo recombinante, (L-PRL) e da variante da prolactina G129R (L-PRLA) na

proliferação de células de cancro da mama T47D num ensaio de cultura de células mista após um (D1), dois (D2), três (D3) ou cinco (D5) dias.

FIGURA 9A-B. Proliferação de (A) células de cancro da mama humanas T47D ou de (B) células de cancro da mama humanas MCF-7 em ensaios de cultura de células mista com células L que expressam a variante da prolactina humana G129 hPRLA recombinante após três dias em cultura.

FIGURA 10A-B. Sequências de aminoácidos de várias formas humanas e não humanas de prolactina.

FIGURA 11. Ilustração esquemática do mecanismo de GH ou do antagonista hPRL (ligando). Quatro regiões helicoidais no ligando (ovais ponteadas) são marcadas como I, II, III e IV. Dois receptores ligados à membrana (ovais sombreadas) são também mostrados na figura. Arg representa a mutação de substituição na terceira hélice  $\alpha$  resultando no impedimento de um segundo receptor para formar um complexo funcional (de A para B).

FIGURA 12. Análise "imunoblot" da expressão do gene hPRL-G129R por células L de ratinho transfectadas com o vector pcDNA3 geneticamente modificado para codificar a variante G129R. As pistas A-D representam amostras contendo hPRL purificada (de NIH) como padrões. As pistas E-H representam os meios de cultura de células L de ratinho transfectadas de modo estável.

FIGURA 13. Efeitos antagonísticos de hPRL-G129R na fosforilação da tirosina de proteínas STAT induzida por hPRL em células de cancro da mama humanas (T47-D). A atribuição das pistas é: A, controlo negativo; B, células estimuladas com 100 ng/ml de hPRL; C, células tratadas com 100 ng/ml de hPRL-G129R; D, células tratadas com 100 ng/ml de hPRL e 100 ng/ml de hPRL-G129R; E, células tratadas com 100 ng/ml de hPRL e 500 ng/ml de hPRL-G129R. A seta indica a posição das proteínas de 95 kDa.

FIGURA 14A-E. O exame de microscopia óptica de células de cancro da mama humanas T47-D após uma única dose de tratamento com 200 ng/ml de hPRL (15B); 200 ng/ml de hPRL-G129R (15C); E2

200 nM (15D); ou 4-OH-Tamoxifeno 200 nM (15E) após uma incubação de 4 dias em comparação com o controlo (15A). 200x.

FIGURA 15. Efeitos de resposta à dose de hPRL e seus efeitos sinérgicos com E2 em ensaio de proliferação de células de cancro da mama humanas T47-D. O eixo dos xx representa a concentração de hPRL na ausência (barras vazias) ou na presença de E2. Cada ponto representa uma média de pelo menos três experiências independentes com poços triplicados. Barras, DP.

FIGURA 16A-B. Efeitos de resposta à dose de 4-OH-Tamoxifeno (17A) e hPRL-G129R (17B). O eixo dos xx representa a concentração de 4-OH-Tamoxifeno (17A) e de hPRL-G129R (17B). Cada ponto representa uma média de pelo menos três experiências independentes com poços em triplicado. Barras, DP.

FIGURA 17. Efeitos inibidores de resposta à dose de hPRL-G129R na proliferação de células T47-D induzida por hPRL. O eixo dos xx representa a concentração de hPRL-G129R na ausência (barras vazias) ou na presença de hPRL. Cada ponto representa uma média de pelo menos três experiências independentes com poços em triplicado. Barras, DP.

FIGURA 18. Efeitos de resposta à dose de hPRL-G129R e seus efeitos sinergéticos com 4-OH-Tamoxifeno em ensaio de proliferação de células de cancro da mama humanas T47-D. O eixo dos xx representa a concentração de hPRL-G129R na ausência (barras vazias) ou na presença de 4-OH-Tamoxifeno. Cada ponto representa uma média de pelo menos três experiências independentes com poços em triplicado. Barras, DP.

FIGURA 19A-B. Efeitos inibidores de resposta à dose de hPRL-G129R em duas linhas celulares de cancro da mama humano utilizando o método de co-cultura. O eixo dos xx representa o número de células L co-cultivadas (controlo) ou de células L-hPRL-G129R. Cada ponto representa uma média de pelo menos três experiências independentes com poços em triplicado. Barras, DP.

FIGURA 20A-F. Resposta à dose de células de cancro da mama humanas T47-D a hPRL-G129R após tratamento de 24 horas utilizando o ensaio TUNEL (painéis A-F). O painel (G) e (H) mostram os resultados da competição entre hPRL e hPRL-G129R a uma razão de 1:1 (125 ng/ml de hPRL + 125 ng/ml de hPRL-G129R, painel G) e a uma razão de 1:4 (125 ng/ml de hPRL-G129R + 500 ng/ml de hPRL, painel H).

FIGURA 21A-E. Tempo decorrido de resposta de células de cancro da mama humanas T47-D ao tratamento de hPRL-G129R (50 ng/ml) utilizando ensaio TUNEL.

FIGURA 22A-H. Resposta de múltiplas células de cancro da mama a tratamento com 4-OH-Tamoxifeno (1  $\mu$ M durante 24 horas) utilizando o ensaio TUNEL. Os marcadores C e T são para células de controlo e tratadas, respectivamente.

FIGURA 23A-F. Resposta de múltiplas células de cancro da mama a tratamento com 250 ng de hPRL-G129R durante 24 horas utilizando o ensaio TUNEL. Os marcadores C e T são para células de controlo e tratadas, respectivamente.

FIGURA 24. Indução de Caspase-3 por hPRL-G129R. É mostrado o efeito de hPRL-G129R na activação da caspase-3 em células T47-D utilizando um estojo de ensaio ApopAlert CPP32/Caspase-3 (Clontech, Palo Alto, CA). As células T47-D foram tratadas com 250 ng/ml de hPRL-G129R durante 2 h. O ensaio foi efectuado na presença de DEVD-CHO (inibidor da caspase-3) para demonstrar que a indução da Caspase-3 através de hPRL-G129R é um acontecimento específico. As amostras foram em duplicado e cada amostra era constituída por cerca de 2 milhões de células.

FIGURA 25. Resposta de duas células de cancro da próstata ao tratamento com 250 ng de hPRL-G129R durante 24 horas utilizando o ensaio TUNEL.

## **5. DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO**

Para fins de clareza e não como limitação, a descrição detalhada do presente invento é dividida nas seguintes subsecções:

- i) variantes de prolactina;

- ii) receptores truncados de prolactina; e
- iii) utilidade do presente invento.

### **5.1. VARIANTES DE PROLACTINA**

São aqui descritas variantes de prolactina (PRL) que antagonizam a acção da PRL no seu receptor.

O termo prolactina (PRL) refere-se aqui a formas animais humanas e não humanas da hormona prolactina. Tais prolactinas incluem, mas não se limitam a, prolactinas para as quais as sequências de aminoácidos estão expostas na FIGURA 10 (ver também Cooke et al., *J. Biol. Chem.* 256: 4007, 1981; Cooke et al., *J. Biol. Chem.* 225: 6502, 1980; Kohmoto et al., *Eur. J. Biochem.* 138: 227, 1984; Tsubokawa et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 25: 442, 1985; Bondar et al., 1991, N.º de Acesso GenBank #X63235; Sasavage et al., *J. Biol. Chem.* 257: 678, 1982; Miller et al., *Endocrinol.* 107: 851, 1980; Li et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 141: 705, 1970; Li, *Int. J. Peptide Protein Res.* 8: 205, 1976; Martinant et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1077: 339, 1991; Lenhrman et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 31: 544, 1988; Li et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 33: 67, 1989; Hanks et al., *J. Mol. Endocrinol.* 2: 21, 1989; Watahiki et al., *J. Biol. Chem.* 264: 5535, 1989; Karatzas et al., *Nuc. Acids Res.* 18: 3071, 1990; Yasuda et al., *Gen. Comp. Endocrinol.* 80: 363, 1990; Noso et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 39: 250; Buckbinder et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3820, 1993; Takahashi et al., *J. Mol. Endocrinol.* 5: 281; Yamaguchi et al., *J. Biol. Chem.* 263: 9113, 1988; Rentler-Delrue et al., *DNA* 8: 261; Yasuda et al., *Gen. Comp. Endocrinol.* 66: 280, 1987; Chang et al., 1991, N.º de Acesso GenBank #X61049; Chang et al., 1991, N.º de Acesso GenBank #X61052; Yasuda et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 244: 528, 1986; Kuwana et al., *Agric. Biol. Chem.* 52: 1033, 1988; Song et al., *Eur. J. Biochem.* 172: 279, 1988; Mercier et al., *DNA* 8: 119, 1989).

O termo variante de prolactina (PRL) refere-se a uma forma de prolactina que foi estruturalmente alterada relativamente à sua forma nativa, incluindo quando a sequência de aminoácidos da forma nativa foi alterada através de inserção, deleção e/ou substituição de aminoácidos.

A capacidade de uma tal variante para antagonizar a acção da PRL no seu receptor é definida como a capacidade da variante para inibir um efeito mediado, sob condições normais, pela PRL. Por exemplo, quando a PRL possui um efeito proliferativo numa espécie de células, uma variante de PRL inibe a proliferação da espécie de células; sem estar limitado pela seguinte teoria, crê-se que a PRL esteja presente nalgum nível para que seja observado um efeito inibidor. A FIGURA 5A ilustra um exemplo operativo do presente invento no qual a prolactina humana (hPRL) induz a proliferação de células de cancro da mama humanas T47-D, enquanto que uma variante da hPRL possuindo uma substituição da glicina na posição 129 por um resíduo de arginina, designada hPRLA, inibe a proliferação de células T47-D relativamente a células T47-D sem a hPRL ou hPRLA adicionada; crê-se que níveis de T47-D produzem PRL (Ginsberg e Vonderharr, *Cancer Res.* 55: 2591-2595, 1995).

Como um exemplo específico, uma variante de PRL pode ser identificada como um antagonista da PRL através da determinação da capacidade da variante para bloquear a capacidade da PRL para actuar através do seu receptor quando estão presentes ambas a PRL e a variante de PRL. Como exemplo, quando uma dada concentração X de PRL está associada a um aumento Y na proliferação de células que expressam o PRLR em cultura, e quando uma amostra comparável de células é exposta a PRL à concentração X e a uma variante de PRL a uma concentração V, a proliferação das células aumentará Z, onde Z é menos que Y e pode ser um número negativo.

No presente invento, a variante de PRL é uma variante da PRL humana possuindo uma substituição da glicina na posição 129 por outro aminoácido. A substituição, representada na forma abreviada por G129\*, onde \* é um aminoácido de ocorrência natural ou sintético diferente de glicina, pode ser a única variação da sequência nativa ou uma de várias alterações (incluindo inserções, deleções e/ou substituições de aminoácidos). O aminoácido substituinte pode ser um aminoácido neutro polar tal como alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, prolina, metionina; um aminoácido neutro apolar tal como serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano, asparagina, glutamina, ácido aspártico; um

aminoácido ácido tal como ácido aspártico e glutâmico; e aminoácidos básicos tais como arginina, histidina ou lisina. Em concretizações preferidas do presente invento, a glicina na posição 129 de hPRL pode ser substituída por valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, prolina, tirosina, cisteína, metionina, arginina, histidina, triptofano, fenilalanina, lisina, asparagina, glutamina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Numa concretização mais preferida do presente invento, a substituição substitui a glicina na posição 129 por arginina (G129R). É também descrita aqui uma variante de prolactina em que a glicina na posição 129 é suprimida.

Ainda noutras concretizações, uma variante de prolactina possuindo uma substituição da glicina na posição 129 é ligada a outra proteína como parte de uma proteína de fusão. Como concretização específica, a variante de prolactina pode ser ligada à interleucina 2. Um exemplo não limitante de uma tal concretização é uma variante G129R da prolactina humana ligada à interleucina 2.

As variantes de prolactina utilizadas no presente invento podem ser preparadas através de síntese química ou através de técnicas de ADN recombinante. Geralmente, um ADNc de PRL pode ser preparado utilizando técnicas padrão de amplificação por PCR, o ARN ou ADNc preparado a partir de uma célula que produza PRL (tal como uma célula da pituitária) como molde, e iniciadores oligonucleotídicos desenhados com base na sequência de ácido nucleico ou de aminoácidos de PRL conhecida. Um exemplo não limitante da preparação de um ADNc codificando hPRL é exposto na Secção 7, abaixo. Podem então ser introduzidas alterações no ADNc da PRL aleatoriamente ou através de mutagénese dirigida. Um exemplo da utilização de mutagénese dirigida ao local mediada por oligonucleótidos é também exposto no Exemplo 7, e ilustra a introdução da substituição G129R em hPRL.

Quando se pretende produzir a variante de PRL através de técnicas recombinantes, pode ser incorporado um ácido nucleico codificando a variante de PRL num vector de expressão, operativamente ligado a uma sequência promotora/estimuladora adequada. O vector de expressão pode conter ainda um ou mais elementos que auxiliem na expressão da variante de PRL,

incluindo um local de terminação da transcrição, um sinal de poliadenilação, um local de ligação ao ribossoma, uma sequência sinal, etc. Sistemas de expressão adequados incluem células de mamífero, células de insecto, células vegetais, células de levedura, bolores e organismos, incluindo plantas transgénicas e animais transgénicos. Vectores de expressão adequados incluem vectores baseados no vírus de herpes simples tais como pHSV1 (Geller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8950-8954, 1990); vectores retrovirais tais como MFG (Jaffe et al., *Cancer Res.* 53: 2221-2226, 1993) e em particular vectores retrovirais de Moloney tais como LN, LNSX, LNCX, LXSN (Miller e Rosman, *Biotechniques* 7: 980-989, 1989); vectores virais de vacínia tais como MVA (Sutter e Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10847-10851, 1992); vectores adenovirais tais como pJM17 (Ali et al., *Gene Therapy* 1: 367-384, 1994; Berker, *Biotechniques* 6: 616-624, 1988; Wand e Finer, *Nature Medicine* 2: 714-716, 1996); vectores virais adeno-associados tais como AAV/neo (Mura-Cacho et al., *J. Immunother.* 11: 231-237, 1992); vectores de lentivírus (Zufferey et al., *Nature Biotechnology* 15: 871-875, 1997); vectores plasmídicos tais como pCDNA3 e pCDNA1 (InVitrogen), pET11a, pET3a, pET11d, pET3d, pET22d e pET12a (Novagen); plasmídeo AH5 (que contém a origem de SV40 e o principal promotor tardio de adenovírus), pRC/CMV (InVitrogen), pCMU II (Paabo et al., *EMBO J.* 5: 1921-1927, 1986), pZipNeo SV (Cepko et al., *Cell* 37: 1053-1062, 1984), pSRα (DNAX, Palo Alto, CA) e pBK-CMV; e vectores de expressão de baculovírus (O'Reilly et al., 1995, "Baculovirus Expression Vectors", Oxford University Press), tal como p2Bac (InVitrogen).

Uma variante de PRL produzida num sistema de expressão recombinante pode então ser purificada através de técnicas padrão, incluindo electroforese, cromatografia (incluindo cromatografia de afinidade) e ultrafiltração.

## **5.2. RECEPTORES TRUNCADOS DE PROLACTINA**

São aqui descritos receptores truncados de prolactina isentos de células (aqui referidos como PRL-BP(s)), que mantêm a capacidade para se ligarem a PRL e são deste modo capazes de competir com as formas da superfície celular de PRLR pela

ligação a PRL, inibindo deste modo a capacidade da PRL para interagir com o seu receptor.

Um PRL-BP pode ser preparado através da remoção de todo ou de uma parte dos domínios transmembranares e/ou intracelulares do PRLR enzimaticamente ou utilizando técnicas de ADN recombinante. Num exemplo específico, o PRLR a truncar é tal como descrito em Boutin *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 3: 1455-1461, 1989.

Para preparação recombinante, as moléculas de ácido nucleico codificando o receptor de prolactina nativo podem ser preparadas e depois alteradas para codificarem um PRL-BP. Por exemplo, o PRLR pode ser clonado utilizando técnicas tais como expostas no Exemplo 9, abaixo.

A sequência de aminoácidos do PRLR de uma variedade de diferentes organismos é conhecida. A sequência do PRLR humano é obtenível no Genbank, N.º de Acesso 13032. Mais, os resíduos de aminoácidos que delineiam os domínios extracelular, transmembranar e citoplasmático do PRLR são também conhecidos (ver por exemplo, Kelly *et al.*, *Biol. Reprod.* 40: 27-32, 1989). Dada a elucidação destes domínios, um perito na arte seria facilmente capaz de produzir uma forma truncada do PRLR que mantivesse a capacidade para se ligar a PRL, mas que pudesse ser utilizada para inibir os efeitos da PRL.

Métodos de ADN recombinante que são bem conhecidos dos peritos na arte podem ser utilizados para construir vectores de expressão contendo PRL-BP codificando sequências e sinais de controlo da transcrição/tradução apropriados. A eficiência da expressão pode ser aumentada através da inclusão de elementos apropriados estimuladores da transcrição, terminadores da transcrição, etc.. Os métodos podem incluir técnicas *in vitro* de ADN recombinante e sintéticas e recombinantes *in vivo* (ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, e Glover, D.M. (ed.), "DNA Cloning: A Practical Approach" MRL Press, Ltd., Oxford, U.K., Vol. I, II, 1985).

Quando é utilizada tecnologia de ADN recombinante para produzir PRL-BP, pode ser vantajoso desenhar proteínas de fusão que possam facilitar, por exemplo, a solubilidade ou a purificação. Tais proteínas de fusão podem ser produzidas através de ligação das sequências de ácido nucleico apropriadas codificando as sequências de aminoácidos desejadas para cada uma através de métodos conhecidos na arte, no enquadramento de leitura correcto, e da expressão da proteína de fusão através de métodos vulgarmente conhecidos na arte. O produto do gene de PRL-BP contido dentro de tais proteínas de fusão pode compreender, por exemplo, um ou mais dos domínios ou porções extracelulares, de preferência a porção de ligação ao ligando.

Num exemplo específico, para expressão de hPRL-BP, pode ser utilizado um vector de expressão de mamífero tal como pcDNA3.1/His Xpress (Invitrogen Corp., San Diego, CA). Este vector contém um promotor de citomegalovírus inicial imediato humano e um sinal de adição poli-A de bGH. Adicionalmente, oferece um péptido (His)<sub>6</sub> enquadradado no terminal N que permite uma detecção fácil após purificação de hPRL-BP. A hPRL-BP recombinante produzida utilizando um tal vector em cultura celular pode ser concentrada através de ultrafiltração, utilizando técnicas tais como as expostas na Secção 7 abaixo. A concentração de hPRL-BP após ultrafiltração pode ser determinada através de ensaio de proteínas e confirmada através de análise "Western blot" utilizando anticorpo anti-His (Santa Cruse, CA) e pode ser quantificada através de métodos densitométricos (Fernandez e Kopchick, *Anal. Biochem.* 191: 268-271, 1990).

Alternativamente, pode ser produzido um hPRL-BP truncado através de técnicas de síntese proteica, p. ex., através da utilização de um sintetizador de péptidos. Adicionalmente, pode ser preparado hPRL-BP truncado através de purificação da proteína PRLR inteira, a partir de células produtoras de PRLR de ocorrência natural ou geneticamente modificadas, seguido de clivagem enzimática da proteína purificada utilizando enzimas proteolíticas, tais como tripsina, para formar PRL-BP.

### **5.3. ENSAIOS DE PESQUISA PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS DE PRLR**

O presente invento proporciona a utilização de um sistema de ensaio baseado em células para identificar compostos ou composições que modulem a actividade do PRLR e portanto possam ser úteis para a regulação da proliferação celular e tratamento de doenças associadas a proliferação celular aberrante. O sistema de ensaio baseado em células é desenhado para ensaiar quanto a apoptose celular. O sistema de ensaio baseia-se na observação de que o antagonista de PRLR G129R é capaz de induzir apoptose em células expressando o PRLR.

De acordo com o presente invento, é utilizado um sistema de ensaio *in vitro* baseado em células para pesquisar compostos que modulem a actividade de PRLR e deste modo modulem a proliferação celular. Os compostos que podem afectar a actividade de PRLR incluem mas não se limitam a compostos que se ligam ao PRLR e activam a transdução de sinal (agonistas) ou bloqueiam a activação (antagonistas). Os sistema de ensaio do presente invento proporcionam métodos rápidos e de confiança para identificar compostos que interajam com, e deste modo afectem, a função de PRLR.

Um método *in vitro* para identificação de um composto capaz de modular a actividade do receptor de prolactina, compreende os seguintes passos:

- a) colocação de um composto em contacto com uma célula que expresse o receptor de prolactina;
- b) medição do nível de apoptose na célula; e
- c) comparação do nível de apoptose obtido em (b) com o nível obtido na ausência do composto;

de modo a que se o nível obtido em (b) diferir do obtido na ausência de um composto, é identificado um composto capaz de modular a actividade do receptor de prolactina. Se o nível de apoptose estiver aumentado num tal ensaio é identificado um antagonista do receptor da prolactina.

Ainda noutra concretização do presente invento, é proporcionado um método *in vitro* para identificação de um

composto capaz de induzir a actividade do receptor da prolactina, que compreende os seguintes passos:

- a) colocação de um composto em contacto com uma célula que expresse o receptor de prolactina, na presença e na ausência de um composto que induza apoptose mediada pelo receptor de prolactina;
- b) medição do nível de apoptose na célula na presença e na ausência do composto que induz apoptose mediada pelo receptor de prolactina; e
- c) comparação dos níveis de apoptose obtidos em (b);

de modo a que se o nível de apoptose estiver diminuído na presença do composto que induz apoptose mediada pelo receptor de prolactina, é identificado um composto capaz de activar a actividade do receptor da prolactina.

Para este fim, as células que expressam endogenamente PRLR podem ser utilizadas para pesquisar compostos que modulem a actividade do receptor. Numa concretização preferida do presente invento as células são células transformadas, tais como por exemplo, células de cancro da mama ou células de cancro da próstata. Adicionalmente, células que normalmente não expressam PRLR podem ser geneticamente modificadas para expressarem o gene de PRLR e tais células podem ser utilizadas para fins de pesquisa. Os peritos na arte reconhecerão que qualquer linha celular capaz de transfecção e possuindo um nível de fundo de PRLR baixo ou ausente é aceitável.

Ao utilizar tais sistemas de ensaio baseados em células, as células que expressam PRLR são expostas a um composto de teste ou a controlos de veículo (p. ex., placebos). Em ensaios desenhados para identificação de agonistas de PRLR, os compostos que induzem apoptose mediada por PRLR, tal como G129R, são também adicionados ao ensaio. Após exposição, as células podem ser ensaiadas para se medir o nível de apoptose. Os ensaios desenhados para medir apoptose incluem o ensaio de marcação terminal de cortes com dUTP mediada por desoxinucleotidil-transferase (TUNEL) (Kebers *et al.*, *Experimental Cell Research* 240:197-205, 1998); ensaios para detectar caspases activadas (Janicke *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273:9357-9360; 1998); ensaios em gel de gradação de ADN para detectar ADN fragmentado através de electroforese em gel

(Bursch *et al.*, *Carcinogenesis* 17:1595-1607, 1996); ensaios para detectar os níveis proteicos de *bcl-2* e *bax* (Wuerzberger *et al.*, *Cancer Research* 58:1876-1885, 1998); coloração Hoechst/DAPI para detectar condensação nuclear em células apoptóticas (Bursch *et al.*, *Carcinogenesis* 17:1595-1607, 1996); coloração de Anexina V da fosfatidil-serina na membrana citoplasmática (van Engeland *et al.*, *Cytometry* 24:131-139, 1996); análise do teor de ADN através de coloração de iodeto de propídio seguida de citometria de fluxo (Sherwood *et al.*, *Methods in Cell Biology* 46:77-97); e estudos morfológicos utilizando microscopia electrónica e de contraste de fase (Bursch *et al.*, *Carcinogenesis* 17:1595-1607).

A capacidade de um composto de teste para induzir o nível de apoptose, acima dos níveis observados com células tratadas com um controlo de veículo, indica que o composto de teste actua como um antagonista para inibir a transdução de sinal mediada por PRLR. Em contraste, a capacidade de um composto de teste para reduzir o nível de apoptose na presença de compostos tais como G129R, acima dos níveis observados com células tratadas com um controlo de veículo, indica que o composto de teste induz transdução de sinal mediada por PRLR.

Pesquisa de elevada tiragem pode ser alcançada através do plaqueamento das células de teste em poços de placas de microtítulo, cada uma das quais conterá um potencial antagonista ou agonista de PRLR. Os poços conterão também meio completo e por vezes quando se pretende identificar um agonista é incluído um composto tal como G129R. Após a incubação com potenciais antagonistas ou agonistas, as células são ensaiadas quanto a apoptose utilizando métodos tais como os descritos acima. Potenciais antagonistas são os compostos que induzem apoptose em células expressando o PRLR. Potenciais agonistas são os compostos que competem com G129R pela ligação ao receptor e deste modo inibem a apoptose induzida por G129R.

Os compostos que podem ser pesquisados de acordo com o presente invento incluem, mas não se limitam a compostos inorgânicos, péptidos, anticorpos e fragmentos destes, e outros compostos orgânicos (p. ex., imitadores de péptidos) que se ligam a PRLR e activam a actividade de PRLR (i.e., agonistas) ou inibem a actividade de PRLR (i.e.,

antagonistas). Os compostos podem incluir, mas não se limitam a, péptidos tais como, por exemplo, péptidos solúveis, incluindo mas não se limitando a membros de bibliotecas aleatórias de péptidos (ver, p. ex., Lam *et al.*, *Nature* 354: 82-84, 1991; Houghten *et al.*, *Nature* 354: 84-86, 1991) e da biblioteca molecular derivada de química combinatória constituída por aminoácidos de configuração D e/ou L, fosfopéptidos (incluindo, mas não se limitando a, membros de bibliotecas de fosfopéptidos dirigidos aleatórios ou parcialmente degenerados; ver, p. ex., Songyang *et al.*, *Cell* 72: 767-778, 1993). A pesquisa das bibliotecas pode ser conseguida através de qualquer um de uma variedade de métodos vulgarmente conhecidos. Numa concretização específica do presente invento, as variantes peptídicas da PRL podem ser pesquisadas quanto à sua capacidade para regular a actividade do PRLR.

Os compostos identificados através de ensaios tais como os descritos aqui podem ser úteis, por exemplo, para melhorar doenças associadas a proliferação celular aberrante. Os ensaios para testar a eficácia de compostos identificados nas pesquisas podem ser testados em sistemas modelo animais para distúrbios proliferativos, tais como cancro.

#### **5.4. UTILIDADES DO INVENTO**

O presente invento proporciona a utilização de uma variante da prolactina humana possuindo uma substituição da glicina na posição 129 para a preparação de um medicamento para inibição da proliferação de uma célula de cancro da mama ou da próstata que expresse um receptor de prolactina. Uma forma truncada do PRLR (que compete com o receptor endógeno pela ligação a PRL) pode ser utilizada para inibir os efeitos da PRL, e em particular, pode ser utilizada para inibir a proliferação celular mediada por PRL. A variante de prolactina, ou a forma truncada do PRLR, é administrada a um sujeito possuindo uma condição proliferativa em que as células proliferativas expressam um receptor de prolactina.

A variante de PRL do PRLR truncado (também referido como PRL-BP) pode ser testada quanto à capacidade para antagonizar a actividade da PRL num painel de linhas celulares expressando diferentes níveis do PRLR e/ou de PRL, de modo a permitir a

inferência de um efeito que varia de acordo com a disponibilidade de PRL/PRLR. Por exemplo, a actividade de uma variante de hPRL ou de um hPRLR truncado pode ser testada em todas ou num subconjunto das seguintes cinco linhas celulares de cancro da mama humano diferentes (T47-D, MCF-7, HTB19, HTB20 e HTB123 de ATCC). O número de receptores de hPRL nestas linhas celulares foi relatado como sendo: T47-D (25800/célula), MCF-7 (8300/célula), HTB19 (6435/célula), HTB20 (5480/célula), HTB123 (1094/célula, célula da mama normal = 1700/célula). Portanto, estas linhas representam um espectro de níveis de receptores de hPRL em células de cancro da mama humanas. Deve observar-se que a utilização de linhas celulares de cancro da mama humano é preferida em relação à utilização da linha celular de linfoma de células T de rato Nb2, amplamente utilizada nos estudos de hormonas lactogénicas, para evitar potenciais efeitos confusos causados pela especificidade da espécie. Os ensaios que podem ser utilizados para determinar o efeito da variante de PRL ou do PRLR truncado incluem (i) (para a variante de PRL) um ensaio competitivo de ligação ao receptor, para examinar se os antagonistas estão a competir ao nível do receptor; (ii) detecção/quantificação da fosforilação da proteína STAT5 para examinar se o putativo antagonista inibe a transdução do sinal intracelular induzida pela PRL; e (iii) um ensaio de proliferação celular, que é utilizado como um teste global para os potenciais efeitos inibidores da PRL variante ou de um PRLR truncado. Um método preferido de testar os efeitos de proliferação ou anti-proliferação da PRL, da PRL variante ou do PRLR truncado é um ensaio de cultura de células mista tal como o esquematizado na FIGURA 6 e explicado na Secção 8 abaixo.

As condições que podem beneficiar da administração de uma variante de PRL ou de um PRL-BP incluem a proliferação tanto benigna como maligna de células que expressam um PRLR. Tais condições incluem mas não se limitam a doenças proliferativas da mama, incluindo condições benignas tais como adenomas da mama e doença fibroquística, e condições malignas tais como cancro da mama, incluindo carcinomas dos ductos, cirrosos, medulares, coloidais e lobulares (locais ou metastáticos); e doenças proliferativas da próstata, incluindo hipertrofia benigna da próstata e cancro da próstata (local ou

metastático). Podem também ser tratadas condições proliferativas envolvendo células que expressam um receptor homólogo ao PRLR, incluindo condições envolvendo células que expressam um receptor da hormona de crescimento.

Tal como exposto no Exemplo 11, abaixo, as variantes de prolactina são capazes de induzir apoptose celular em células de cancro da mama e células de cancro da próstata humanas. Assim, o presente invento proporciona a utilização de uma variante da prolactina humana possuindo uma substituição da glicina na posição 129 para a preparação de um medicamento para indução de apoptose celular numa célula de cancro da mama ou da próstata expressando o receptor de prolactina. Numa concretização do presente invento, a expressão do receptor PRLR pode ser direcionada a uma população celular específica direcionada para apoptose, tal como uma população de células de cancro. As moléculas de ácido nucleico que expressam PRLR podem ser transferidas para a população celular alvo utilizando métodos tais como os empregues em protocolos de terapia génica. Uma vez expresso à superfície da população celular alvo, o receptor pode ser activado através do contacto com variantes de prolactina para induzir apoptose da célula alvo.

No tratamento de condições proliferativas, a variante de PRL ou PRL-BP pode ser administrada isolada ou como parte de um regímen de tratamento sequencial ou combinado. Como exemplos não limitantes, quando a condição a tratar é cancro da mama, os agentes adicionais utilizados num regímen combinado podem incluir anti-estrogénios como tamoxifeno e/ou um agente quimioterapêutico. Quando a condição a tratar é cancro da próstata, os agentes adicionais utilizados num regímen de combinação podem incluir um agente anti-androgénio e/ou um quimioterapêutico. Um regímen de tratamento combinado baseia-se na observação de que a utilização de uma variante de prolactina, em combinação com um anti-estrogénio, tal como 4-OH-tamoxifeno, exibiu um efeito inibidor sinergético.

São também aqui descritas composições compreendendo uma variante de PRL ou PRL-BP, num transportador farmacêutico adequado. Tais composições podem ser administradas através de qualquer técnica adequada, incluindo aplicação local,

intravenosa, intra-arterial, intratecal, intraperitoneal, oral, etc.

As composições farmacêuticas incluem composições contendo uma variante de PRL ou PRL-BP numa quantidade eficaz para alcançar o seu fim pretendido. Mais especificamente, uma dose eficaz refere-se à quantidade de variante de PRL ou PRL-BP necessária para inibir a proliferação de células que expressam o PRLR, diminuindo deste modo os sintomas associados a uma condição proliferativa. A determinação das quantidades eficazes está bem dentro da capacidade dos peritos na arte.

As concentrações eficazes dos compostos podem ser estabelecidas em sistemas de cultura de células e/ou em animais transgénicos. A dose eficaz pode ser determinada utilizando uma variedade de diferentes ensaios. Por exemplo, podem ser conduzidos ensaios de proliferação celular para quantificar a concentração da variante de PRL ou PRL-BP necessária para inibir a proliferação celular. Adicionalmente, podem ser efectuados ensaios para quantificar a concentração de variante de PRL ou PRL-BP necessária para induzir apoptose celular. A inibição do crescimento de células tumorais pode ser ensaiada para detectar a inibição da proliferação de células tumorais mediada pela variante de PRL ou PRL-BP. Em tais casos, a dose eficaz de variante de PRL ou PRL-BP é a quantidade necessária para inibir a proliferação de células de cancro e inibir o crescimento de um tumor num paciente. Em certos casos, pode ser desejável co-administrar a um sujeito exibindo uma condição proliferativa, variantes de prolactina ou PRL-BP em conjunto com um ou mais agentes adicionais. Tais agentes incluem, por exemplo, anti-estrogénios, tais como tamoxifeno ou anti-androgénios. A determinação das quantidades eficazes destes compostos adicionais está bem dentro da capacidade dos peritos na arte.

A quantidade da composição estará também, claro, dependente do sujeito a tratar, do distúrbio proliferativo a tratar, da gravidade dos sintomas do distúrbio e da avaliação do médico prescritor. Nalguns casos pode ser necessário ajustar o tratamento a uma dose menor devido a efeitos secundários indesejados bem como ajustar o tratamento a níveis maiores se a resposta clínica não for adequada.

## 6. EXEMPLO: DESENHO DE UMA PROLACTINA VARIANTE POSSUINDO ACTIVIDADE DE ANTAGONISTA

Uma vez que não existem actualmente disponíveis dados da estrutura cristalina em relação a hPRL, foi utilizado um algoritmo de computador desenvolvido por Garnier *et al.*, *J. Mol. Biol.* 120: 97-120, 1978, para analisar e comparar as estruturas secundárias de hPRL e hGH. Os resultados mostraram que as regiões globais das hélices  $\alpha$  são muito semelhantes, sugerindo que estas hormonas partilham uma conformação global semelhante. Quando se comparam as sequências de aminoácidos na terceira hélice  $\alpha$  entre as GH e as PRL, é claro que o Gly 129 da hPRL corresponde ao Gly 120 da hGH e é absolutamente conservado entre a família GH/PRL (Chen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 15892-15897, 1994). Portanto, foi preparada uma mutação de substituição de Gly para Arg na hPRL para gerar um antagonista específico do receptor de hPRL.

## 7. EXEMPLO: PREPARAÇÃO DA VARIANTE DE PROLACTINA G129R

### 7.1. CLONAGEM DO GENE DA PROLACTINA HUMANA

A PRL humana foi clonada com sucesso utilizando a transcrição inversa (RT) seguida de reacção em cadeia da polimerase (PCR). Resumidamente, foi utilizado como molde ARN poli-A de pituitária humana (CloneTech, Ins. Palo Alto, CA). Um iniciador anti-sentido de hPRL foi desenhado começando a 2 bases do codão stop (TAA) do ADNc de hPRL (5'-GCTTAGCAGTTGTTGTTG-3') e um iniciador com sentido foi desenhado a partir do ATG (5'-ATGAACATCAAAGGAT-3'). A RT/PCR foi realizada utilizando um estojo de Perkin-Elmer Cetus, Inc. (Norwalk, CT). A sequência nucleotídica da hPRL resultante foi determinada através do método de terminação da cadeia didesoxi utilizando ADN-polimerase de T7 modificada (Sequenase, United States Biochemical) e verificou-se que era idêntica à relatada no GenBank excepto quanto à diferença de uma base que resulta numa mutação silenciosa no codão 21 (CTG $\rightarrow$ CTC). Uma representação esquemática do processo de clonagem, incluindo a preparação do vector de expressão pUCIG-Met, está resumida na FIGURA 1.

## **7.2. CRIAÇÃO DA VARIANTE DE PROLACTINA G129R**

O plasmídeo parental que contém o ADNc de hPRL e uma origem de replicação F1 de M13 (FIGURA 1) foi transformado para *E. coli* (CJ236). ADN plasmídico de cadeia simples contendo uridina foi isolado a partir das bactérias CJ236 transformadas utilizando o bacteriófago auxiliar, M13k07. Seis pmol de oligonucleótido contendo a sequência dirigindo a mutação G129R foram ligados com 0,2 pmol de ADN de cadeia simples em tampão de ligação (Tris 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, NaCl 100 mM) através do aquecimento a 70°C durante 5 minutos seguido de arrefecimento lento. O oligonucleótido (5'-CGGCTCCTAGAG**AGG**ATG-GAGCT-3'), que codifica a mutação G129R foi utilizado para iniciar a síntese de uma cadeia complementar de ADN, utilizando ADN de cadeia simples como molde, que é catalisada pela ADN-polimerase T4. Após a síntese, o ADN de cadeia dupla foi utilizado para transformar *E. coli* (DH5a). Os clones individuais foram isolados e pesquisados quanto a hPRL-G129R através de sequenciação dos nucleótidos de ADN. A variante de hPRL G129R é daqui em diante referida como hPRLA, referindo-se o "A" à sua actividade de antagonista.

## **7.3. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CLONADAS**

Os ácidos nucleicos codificando hPRL e hPRLA foram inseridos, cada um, num vector de expressão de células de mamífero no qual a transcrição dos ADNc é controlada através da sequência estimuladora/promotora da metalotioneína de ratinho e do sinal de adição de poli-A de bGH (Chen et al., *J. Biol. Chem.* 266: 2252-2258, 1991; Chen et al., *Endocrinol.* 129: 1402-1408, 1991; Chen et al., *Mol. Endocrinol.* 5: 1845-1852, 1991; Chen et al., *J. Biol. Chem.* 269: 15892-15897, 1994). Para estabelecer linhas de células L de ratinho estáveis que produzam hPRL e hPRLA, foram seleccionadas células L de ratinho [negativas para timidina-quinase (TK) e negativas para adenina-fosforribosil-transferase (APRT)] como sistema de expressão *in vitro*. Foram preparadas linhas celulares estáveis que expressam hPRL (que serão utilizadas como controlo positivo) e hPRLA ( $\approx$ 5-10 mg/1/24 h/milhão de células).

Foi utilizada ultrafiltração por membranas para purificar parcialmente bem como concentrar hPRL e hPRLA a partir dos meios de cultura de células condicionados, utilizando técnicas tais como expostas em Chen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 15892-15897, 1994. A separação baseia-se no tamanho molecular relativo e no tamanho do poro da membrana. As membranas de ultrafiltração foram obtidas em Amicon, Inc. Northborough, MA). Foram utilizados dois tipos de membranas, YM10 e YM100. Foi primeiro utilizada uma célula agitada de 200 ml com Amicon YM100 sob uma pressão transmembranar de 20 psi para remoção de grandes impurezas dos meios de cultura. O permeado (>90% de recuperação de hPRL) foi aplicado num segundo protocolo de filtração que utiliza a membrana YM10 para reduzir o volume de solução e assim concentrar a proteína. A concentração de hPRL e hPRLA foi determinada, utilizando um estojo de ensaio imuno-radiométrico (IRMA) de Diagnostic Products Corp. (Los Angeles, CA).

## 8. EXEMPLO: ACTIVIDADE INIBIDORA DA VARIANTE DE PROLACTINA G129R

### 8.1. MATERIAIS E MÉTODOS

**Ensaio de ligação do radio-receptor.** A hPRL purificada foi marcada com  $\text{Na}^{125}\text{I}$  através do método de lactoperoxidase para uma actividade específica de 80-105  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  tal como descrito em Harding *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 6708-6712, 1996. Resumidamente, foram adicionados 1,0 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  a 1 mg de hPRL. Foram então adicionadas lactoperoxidase (10  $\mu\text{g}$  dissolvidos em 10  $\mu\text{l}$  de 0,4 mol/litro de tampão acetato, pH 5,6) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5  $\mu\text{l}$  de 1,76 mmol/litro). Após 30 min, a reacção foi terminada através da adição de 100  $\mu\text{l}$  de tampão de transferência (0,47 mol/litro de sacarose, 0,06 mol/litro de KI, azida de sódio a 0,02%, pH 7,6). A hPRL radiomarcada foi então separada através de cromatografia de Sephadex G-100. Células de cancro da mama humanas foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após pré-incubação em DMEM isento de soro durante 2-3 horas para esgotar o soro, a monocamada de células foi exposta a meio condicionado isento de soro contendo  $^{125}\text{I}$ -hPRL (50 000 cpm) na presença de várias concentrações de hPRL ou hPRLA durante 2-3 horas a 37°C. Após incubação à temperatura ambiente durante 3 horas, as células foram lavadas com solução

salina tamponada com fosfato (PBS) duas vezes e depois lisadas em 1 ml de SDS a 1%/NaOH 0,1 N. Foram então determinadas as cpm nos lisados. A ligação inespecífica foi medida através da adição de 5 µg/ml de hPRL não marcada em meio condicionado de células L de ratinho normais para controlar a deslocação inespecífica.

**Ensaio de indução de hPRL da fosforilação da tirosina da proteína STAT5.** As proteínas STAT representam uma família de proteínas, possuindo massas moleculares de aproximadamente 92-95 kDa, que se verificou serem tirosil-fosforiladas quando células contendo GHR ou PRLR são tratadas com GH ou PRL, respectivamente. A tirosil-fosforilação de STAT5 é um acontecimento mediado pelo receptor e pensa-se ser um passo importante na transdução do sinal induzido pelo ligando (Wakao et al., *EMBO J.* 13: 2182-2191, 1994; Kasansky et al., *Mol. Endocrinol.* 9: 1598-1609, 1995; Waxman et al., *J. Biol. Chem.* 270: 13262-13270, 1995). Este ensaio foi utilizado para avaliar a capacidade da hPRL e da hPRLA para inibir a indução da fosforilação de STAT5 através da PRL de tipo selvagem.

Resumidamente, células de cancro da mama humanas foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após pré-incubação em DMEM isento de soro durante 2-3 horas, as células foram expostas a várias concentrações de hPRL e hPRLA em DMEM isento de soro. As células foram incubadas durante 15 min a 37°C, lavadas uma vez com PBS e lisadas em 300 µl de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS a 1%, β-mercaptoetanol a 1%, DTT 0,1 M, sacarose a 5%, ortovanadato de sódio 100 µM e azul de bromofenol a 0,6%). Trinta microlitros de lisados celulares foram sujeitos a SDS-PAGE a 4-12,5% e análise imunoblot utilizando anticorpo PY20 anti-fosfotirosina conjugado com peroxidase de rábano (HRP) e estojo de reagente ECL (Amersham, IL). As membranas foram então expostas a películas de raios X e reveladas utilizando procedimentos padrão (Kodak, Rochester, NY). Este ensaio foi descrito em Chen et al., *J. Biol. Chem.* 269: 15892-15897, 1994; Chen et al., *Endocrinol.* 136: 660-667, 1995; Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1391-1395, 1994; Chen et al., *Mol. Endocrinol.* 9(3): 292-302, 1995; Harding et al., *J. Biol. Chem.* 271(12): 6708-6712, 1996.

**Ensaios de proliferação celular.** A hPRLA foi testada quanto à sua capacidade para inibir a proliferação de células de cancro da mama em cultura de tecidos. As células de cancro da mama humanas foram criadas no correspondente meio de cultura de acordo com as recomendações da ATCC. As células foram mantidas a 37°C num atmosfera húmida de CO<sub>2</sub> a 5% ao ar. As condições do ensaio foram essencialmente tal como descritas por Ginsburg e Vonderharr (*Cancer Res.* 55: 2591-2595, 1995). Para experiências individuais de crescimento, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 12 poços a uma densidade de aproximadamente  $2 \times 10^4$ /ml, 1 ml/poço. As células foram então deixadas a aderir durante um dia (células T47-D, MCF-7, HTB19 e HTB20, excepto para HTB123, que são células em suspensão), depois o meio que estava por cima foi removido e mudado para condições isentas de soro com meios contendo ITS<sup>+</sup> (suplemento de cultura de insulina-transferrina-selénio-BSA-ácido linoleico; Collaborative Research Bedford, MA). Foram introduzidas concentrações variáveis de hPRL sozinha ou em combinação com hPRLA. Após mais três dias em cultura, as células foram colhidas após uma rápida tripsinização e contadas num contador de células.

Para certas experiências, foi utilizado um ensaio de cultura de células mista, representado esquematicamente na FIGURA 6. Neste ensaio, foram co-cultivadas células de cancro da mama com células expressoras que tinham sido transfectadas com ácido nucleico codificando PRL ou uma variante de PRL e expressando essas proteínas recombinantes. Ao variar o número de células expressoras, a quantidade de PRL ou de variante de PRL presente na cultura de células mista foi aumentada ou diminuída. Tal como mostrado na FIGURA 6, foi adicionado aos poços de uma placa de cultura de células de múltiplos poços um número fixo de células de cancro da mama (T47-D). Em certos poços, que serviram de controlo, não foram adicionadas células expressoras. Depois, foi adicionado um número crescente de células expressoras (células L transfectadas expressando hPRL (L-PRL) ou hPRLA (L-PRLA)) aos poços contendo células de cancro da mama para criar culturas mistas. O mesmo número de células expressoras foi cultivado em paralelo (sem células T47-D) para servir de controlo. Após a cultura sob condições padrão durante um período de tempo, o número de células presente nos poços foi contado e foi subtraído o número de

células L na cultura de controlo correspondente. O número resultante pôde então ser comparado com o número de células T47-D na cultura de controlo de T47-D para avaliar os efeitos do produto recombinante na proliferação de células de cancro da mama.

## **8.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**Resultados do ensaio de ligação do radio-receptor.** Os resultados do ensaio efectuado utilizando células T47-D e HTB123 juntamente com um painel de células de cancro humanas são mostrados na FIGURA 2. Eles demonstram que duas linhas celulares (T47-D e HTB123) entre as testadas contêm uma ligação específica ao receptor de hGH mínima em comparação com células de leucemia, células de linfoma e células de retinoblastoma humanas.

**Fosforilação das proteínas STAT5.** Experiências testando as capacidades de hPRL e hPRLA, e combinações destas, para induzir fosforilação das proteínas STAT5 em células de cancro da mama humanas T47-D, demonstraram que hPRLA é capaz de bloquear a transdução de sinal induzida por hPRL (FIGURA 3), demonstrando deste modo actividade antagonista de PRLA. Em particular, a FIGURA 3 mostra que a indução de fosforilação das proteínas STAT5 induzida por hPRL (pista 2) estava ausente na presença de apenas hPRLA (pista 3), era parcialmente eliminada quando quantidades iguais de hPRL e hPRLA estavam presentes (pista 4) e era indetectável quando havia um excesso de hPRLA (pista 5).

**Ensaios de proliferação celular.** Os resultados do ensaio de proliferação celular de experiências nas quais células T47-D eram expostas a hGH ou hPRL são mostrados na FIGURA 4. As curvas de resposta à dose em forma de sino sugerem que mecanismos semelhantes (i.e., um ligando conduzindo à dimerização de receptores) são utilizados pela transdução de sinal tanto de GH como de PRL. Uma vez que a afinidade do local de ligação um do ligando é aparentemente muito superior à afinidade no local de ligação dois, a elevadas concentrações de hormona todos os receptores estão ocupados por um único ligando através do local de elevada afinidade (fenómeno de "auto-antagonismo"). A FIGURA 5A-B compara os efeitos de hPRL

e hPRLA (a variante G129R da prolactina humana) (FIGURA 5A) com os efeitos do estrogénio e do antagonista do estrogénio tamoxifeno (FIGURA 5B). Ao mesmo tempo que a hPRL e o estrogénio aumentaram a proliferação de células T47-D (relativamente às culturas de controlo não tratadas), a hPRLA e o tamoxifeno tiveram um efeito inibidor comparável.

As FIGURAS 7 e 8 representam os resultados de ensaios de culturas celulares mistas nos quais um número variável de células L transflectadas (mostrado no eixo dos yy) expressando hPRL ou hPRLA (a variante G129R da prolactina humana) foi co-cultivado com células de cancro da mama humanas T47-D durante 24 ou 72 horas (FIGURA 7) ou durante um, dois, três ou cinco dias (FIGURA 8). Enquanto que hPRL resultou num aumento da proliferação de T47-D (relativamente a culturas de células T47-D não tratadas), hPRLA inibiu a proliferação até cerca de 100 porcento.

A FIGURA 9A-B compara os efeitos inibidores de hPRLA em cultura de células mista sobre as duas linhas celulares de cancro da mama humanas diferentes T47-D e MCF-7 (FIGURAS 9A e 9B, respectivamente). A hPRLA expressa pelas células L transflectadas teve um efeito inibidor em ambas as linhas celulares, mas o efeito foi maior em células T47-D, provavelmente porque existe um maior número de receptores de prolactina nas células T47-D relativamente às células MCF-7 (Shiu *et al.*, *Cancer Res.* 39: 4381-4386, 1979; Ormandy *et al.*, *Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 3692-3699, 1997).

## **9. EXEMPLO: CLONAGEM DO RECEPTOR DA PROLACTINA**

O ADNC de hPRL-BP foi clonado utilizando transcrição inversa (RT) seguida de reacção em cadeia da polimerase (PCR). O iniciador anti-sentido de hPRL-BP foi desenhado num local de corte da enzima de restrição *Nco*I que se situa a 66 bases do putativo domínio transmembranar e foi incorporado um codão stop (TGA) (5'-GCACTTCAGTATCCATGGTCTGGT-3'). O iniciador com sentido foi desenhado incluindo o codão de início da tradução ATG (5'-AGAAGGCAGCCAACATGAAG-3'). A RT/PCR foi realizada através da utilização de um estojo de Perkin-Elmer Cetus, Inc. (Norwalk, CT). A sequência nucleotídica hPRL-BP foi determinada através do método de terminação da cadeia didesoxi

utilizando ADN-polimerase T7 modificada (Sequenase, United States Biochemical).

## **10. EXEMPLO: EFEITOS INIBIDORES DE UM ANTAGONISTA DA PROLACTINA E SUA ACÇÃO SINERGÍSTICA EM CONJUNTO COM TAMOXIFENO**

A subsecção abaixo descreve dados derivados de ensaios de proliferação celular que demonstram que a variante de prolactina, quando adicionada juntamente com um agente anti-estrogénio, induz um efeito inibidor sinergético na proliferação celular.

### **10.1. MATERIAIS E MÉTODOS**

**RT-PCR.** Foi utilizada a técnica de RT-PCR para clonar o ADNc de hPRL. O ARNm de pituitária humana foi adquirido em Clontech Laboratory, Inc. (Palo Alto, CA 94303). O estojo de RT-PCR foi de Perkin-Elmer, Inc. (Norwalk, CT). O iniciador anti-sentido da hPRL (para a reacção de RT) foi desenhado a 2 bases do codão stop (a cheio) do ADNc de hPRL (5'-**GCTTA**GCAGTTGTTGTTGTG-3') e o iniciador com sentido foi desenhado a partir do codão de início da tradução ATG (5'-**ATG**AACATCAAAGGAT-3'). A reacção de RT-PCR foi realizada seguindo a recomendação do fabricante. O produto de PCR foi então clonado num vector de expressão pcDNA3.1 de Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). A expressão do ADNc de hPRL foi controlada pelo estimulador/promotor de citomegalovírus (CMV) inicial imediato humano e de uma sequência sinal de poliadenilação e de terminação da transcrição do gene de GH bovina. Este vector contém também um gene de neomicina que permite a selecção de células de mamífero resistentes à neomicina (FIGURA 1B).

**Desenho Racional de Hprl-G129R.** As sequências de aminoácidos para todas as PRL conhecidas na terceira região em hélice  $\alpha$  foram alinhadas com sequências de GH. É claro que o Gly 129 de hPRL está invariavelmente entre as PRL e corresponde ao 120 de hGH sugerindo um papel potencialmente importante na sua função. Decidimos, portanto, fazer uma mutação de substituição de um único aminoácido em Gly 129 de hPRL (hPRL-G129R). Utilizámos uma abordagem semelhante à que

utilizámos anteriormente com sucesso na descoberta de antagonistas de hGH, na esperança de produzir um antagonista específico de hPRLR (FIGURA 11).

**Mutagénese Dirigida por Oligonucleótidos.** O ADNc de hPRL-G129R foi gerado utilizando um protocolo de mutagénese dirigida por PCR. Os oligonucleótidos contendo a mutação desejada (5'-CTTCTAGAGCGCATGGAGCTCATA-3'; e 5'-CCCTCTAGACTCGAGCGGCCGC-3') foram sintetizados por National Biosciences, Inc. (Plymouth, MN). O codão para o Arg 129 está a cheio e o local de restrição XbaI está sublinhado. O produto de PCR foi digerido com XbaI e ligado novamente no vector anteriormente descrito (FIGURA 1B). A mutação foi então confirmada através de sequenciação dos nucleótidos do ADN.

**Linhos Celulares.** Duas linhas celulares de cancro da mama humanas (T47-D e MCF-7) e uma linha de fibroblastos L de ratinho foram adquiridas em ATCC. Ambas as linhas celulares de cancro da mama humanas foram caracterizadas como linhas celulares positivas para o receptor de estrogénio (ER) e positivas para PRLR (Ormandy, C.J., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metabo.* 82: 3692-99, 1997). As células foram rotineiramente criadas como uma cultura em monocamada em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) para as células MCF-7 e L e foi utilizado meio RPMI-1640 para as T47-D após ser suplementado com soro fetal de vitelo a 10% que foi tratado com carvão revestido a dextrano (DCC-FCS). Os meios para as células de cancro da mama humanas foram utilizados sem vermelho de fenol (para evitar as suas potenciais actividades semelhantes a estrogénio). As culturas celulares foram mantidas a 37°C numa atmosfera húmida com CO<sub>2</sub> a 5% e passadas duas vezes por semana.

**Expressão e Produção de Proteínas hPRL e hPRL-G129R.** A transfecção de células L de ratinho e a selecção de células estáveis foram efectuadas tal como anteriormente descrito com pequenas modificações (Zhou, Y. et al., *Gene* 177: 257-129, 1996; Sun, X.Z., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 63: 29-36, 1997). Resumidamente, as células foram plaqueadas numa placa de 6 poços e cultivadas até a cultura estar 50% confluente. No dia da transfecção, as células foram lavadas uma vez com meio isento de soro e cultivadas em 1 ml de meio isento de soro

contendo 1 µg de pcDNA3-hPRL ou pcDNA3-hPRL-G129R e 10 µl de Lipofectamina (GibcoBRL) durante 5 h. Dois mililitros de meio de crescimento foram adicionados à solução de ADN/Lipofectamina e a incubação continuou. Após 18-24 horas de incubação, foi utilizado meio de crescimento fresco para substituir o meio contendo a mistura ADN/Lipofectamina. 72 horas após a transfecção, as células foram diluídas 1:10 e passadas para o meio selectivo (400 µg/ml de G418) para seleccionar quanto a expressão do gene neo. Colónias individuais foram isoladas e expandidas. Os níveis de expressão das linhas celulares individuais foram determinados através da utilização de um estojo de ensaio imuno-radiométrico (IRMA) de Diagnostic Products Corp. (Los Angeles, CA). As linhas celulares com elevados níveis de expressão foram expandidas.

Os meios condicionados contendo hPRL e hPRL-G129R foram preparados como se segue. As células estáveis foram plaqueadas em balões de cultura T-150 a 85 a 90% de confluência. O meio de crescimento foi então substituído por 50 ml de RPMI-1640 contendo DCC-FCS a 1% e recolhido dia sim, dia não por três vezes. Os meios recolhidos foram então reunidos e filtrados através de uma unidade de filtro de 0,2 µm para remover os restos celulares e armazenados a -20°C até à utilização. A concentração de hPRL ou hPRL-G129R foi determinada através de IRMA de hPRL. Cada produto da fornada foi ainda verificado utilizando um protocolo de análise "Western blot" (Fernandex, E. et al., *Anal. Biochem.* 191: 269-271, 1990). Utilizámos este protocolo em estudos de análogos de hGH incluindo um antagonista de hGH para estudos *in vitro* (Chen, W.Y. et al., *J. Biol. Chem.* 269: 15892-15897, 1994).

#### **Fosforilação da Tirosina das Proteínas STAT5 em células**

**T47-D.** Este ensaio é desenhado para examinar os efeitos de hPRL e hPRL-G129R na transdução de sinal utilizando células T47-D como células alvo modelo. Resumidamente, células T47-D foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após pré-incubação em meio isento de soro durante 2-3 horas, as células foram expostas a várias concentrações de hPRL ou hPRL-G129R ou uma combinação de hPRL e hPRL-G129R em meio isento de soro. As células foram incubadas durante 15 minutos a 37°C, lavadas uma vez com PBS e lisadas em 200 µl de tampão de lise (Tris-HCl

50 mM, pH 6,8, SDS a 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol a 1%, DTT 0,1 M, sacarose a 5%, ortovanadato de sódio 100  $\mu$ M e azul de bromofenol a 0,6%). Trinta microlitros de lisado celular são então sujeitos a SDS-PAGE a 4-12,5% utilizando o sistema Bio-Rad Protein II. Após a electroforese, os géis foram transferidos para uma membrana Hybond-ECL (Amersham, IL) a uma voltagem constante de 100 volts durante 2 horas. As membranas foram incubadas numa solução de bloqueio de BSA a 4% (Boehringer Mannheim, IN) em tampão de lavagem (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 75 mM, Tween 20 a 0,1%, EDTA 1 mM) durante 2 horas e subsequentemente lavadas duas vezes com tampão de lavagem durante 15 minutos. As membranas foram incubadas com anticorpo PY20 anti-fosfotirosina conjugado com peroxidase de rábano (Amersham, IL) a uma concentração de 0,1  $\mu$ g/ml na solução de bloqueio durante 1 hora. Após incubação, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem (15 min. cada por 2 vezes) e reveladas com um estojo de reagentes ECL de acordo com as sugestões do fabricante (Amersham, IL). As membranas foram então expostas a películas de raios X e reveladas utilizando procedimentos padrão (Kodak, Rochester, NY).

**Meios Condicionados de hPRLG129R.** As condições de ensaio foram modificadas das descritas por Ginsburg e Vonderharr, (Cancer Res. 55: 2591-2595, 1995). As células T47-D foram tripsinizadas e passadas para placas de 96 poços em meio RPMI-1640 contendo DCC-FCS a 1% num volume de 100  $\mu$ l/poço. O número óptimo de células/poço para cada linha celular foi predeterminado após um ensaio de titulação. Para as células T47-D, foram plaqueadas 15000 células/poço. As células foram deixadas a assentar e a aderir de um dia para o outro (12-18 horas) e foram adicionadas subsequentemente várias concentrações de hPRL, hPRL-G129R, E2 ou 4-OH-Tamoxifeno num volume total de 100  $\mu$ l de meios de cultura. Foi utilizada hPRL purificada (gentilmente proporcionada pelo Dr. Parlow, National Hormone & Pituitary Program, NIH) como controlo positivo para a hPRL produzida a partir de células L estáveis. As células foram incubadas durante mais 96 horas a 37°C numa incubadora humidificada com CO<sub>2</sub> a 5%. Após a incubação, foi adicionada a cada poço solução MTS-PMS (Cell Titer 96 Aqueous kit, Promega Corp.), seguindo as instruções do fabricante. As placas foram lidas a 490 nm utilizando um leitor de

microplacas Bio-Rad benchmark. As experiências foram efectuadas em triplicado e repetidas três a seis vezes para cada linha celular.

## 10.2. RESULTADOS

**Clonagem e Mutagénese de hPRL.** O ADNc de hPRL foi clonado a partir de ARNm de pituitária humana utilizando a técnica de RT-PCR. O tamanho do produto de PCR correspondente foi de 663 pares de bases de comprimento e foi clonado no vector de expressão pCDNA3.1. A sequência nucleotídica de hPRL foi determinada através do método de terminação da cadeia didesoxi utilizando um sequenciador automático (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Verificou-se que a sequência de ADNc de hPRL era idêntica à relatada no GenBank excepto quanto à diferença de uma base que resulta numa mutação silenciosa no codão 21 (CTG→CTC). O ADNc de hPRL-G129R foi também gerado através de PCR e sequenciado.

**Expressão de hPRL e hPRL-G129R.** As células L de ratinho foram estavelmente transfetadas com os ADNc de hPRL ou hPRL-G129R e os clones resistentes a neo foram seleccionados e expandidos. Os meios condicionados foram recolhidos e testados quanto à expressão através da utilização de um estojo RIMA. Foram geradas linhas de células L de ratinho estáveis de hPRL e hPRL-G129R que produziam hPRL e hPRL-G129R numa quantidade de aproximadamente 1 mg/l/24 h/milhão de células (FIGURA 12).

**Inibição da Fosforilação da Tirosina da Proteína STAT por hPRL-G129R.** As proteínas STAT representam uma família de proteínas com uma massa molecular de aproximadamente 92-95 kDa. Os efeitos inibidores do antagonista de GH podem ser ensaiados através da medição dos níveis de inibição da fosforilação da tirosina da proteína STAT (Chen et al., *J. Biol. Chem.* 269: 15892, 1994; Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1391-1395; Silva, *Endocrinol.* 133: 2307-2312, 1993). Utilizando um tal ensaio, foi demonstrado que o antagonista de GH hGH-G120R inibe a indução de GH da fosforilação da proteína STAT de um modo dependente da dose.

Os resultados utilizando hPRL e hPRL-G129R em células de cancro da mama humanas T47-D demonstraram que hPRL-G129R não era activa na estimulação da fosforilação da proteína STAT.

Contudo, quando hPRL-G129R era adicionada juntamente com hPRL, era capaz de bloquear a transdução de sinal induzida pela hPRL de um modo dependente da dose (FIGURA 13) sugerindo que estava a funcionar como antagonista de hPRL. A uma razão de 5:1, a hPRL-G129R inibiu completamente a fosforilação da proteína STAT induzida pela hPRL.

#### **Ensaios de Proliferação de Células de Cancro da Mama**

**Humanas.** A PRL humana e a hPRL-G129R foram ainda testadas quanto à sua capacidade para estimularem/inibirem a proliferação de células de cancro da mama em cultura celular. A examinação por microscopia óptica da proliferação de células de cancro da mama após hPRL, hPRL-G129R, E2 e 4-OH-Tamoxifeno é mostrada na FIGURA 14A-E. É claro que existe uma diferença significativa na densidade celular entre as células tratadas com hPRL (15B), hPRL-G129R (15C), E2 (15D) e 4-OH-Tamoxifeno (15E). É também digno de nota realçar que a condição global das células tratadas com hPRL-G129R não era tão saudável na examinação por microscopia óptica.

Os resultados do ensaio de proliferação celular de 96 poços são mostrados nas FIGURAS 15-18. A hPRL estimulou a proliferação de T47-D de um modo dependente da dose. A estimulação máxima da hPRL (250 ng/ml) foi de aproximadamente 20% acima dos níveis basais após uma dose única/quatro dias de incubação. No entanto, quando hPRL e E2 foram aplicadas simultaneamente, foi observado um efeito sinergético. A resposta máxima da hPRL (100 ng/ml) na presença de 10 nM de E2 foi de mais do triplo em comparação com a hPRL sozinha (FIGURA 15).

A hPRL-G129R, por outro lado, exibiu efeitos inibidores dependentes da dose na proliferação celular (FIGURA 16A). É digno de nota realçar que o efeito inibidor da hPRL-G129R (150 ng/ml) era mais potente que a dose máxima de 500 nM de 4-OH-Tamoxifeno no sistema de ensaio (FIGURA 16B). A inibição máxima de um dose única de 4-OH-Tamoxifeno (500 nM) é de aproximadamente 15% do controlo (FIGURA 16B) enquanto que a inibição máxima através de uma dose única de hPRL-G129R resultou em 25% do controlo (FIGURA 16A). A hPRL-G129R foi também capaz de inibir competitivamente a proliferação celular induzida por hPRL. A uma razão molar de 1:1, a hPRL-G129R foi capaz de parar o efeito estimulador da hPRL e a uma razão

molar de 2:1, inibiu a proliferação celular (FIGURA 17). Mais importante, quando hPRL-G129R foi aplicada juntamente com 4-OH-Tamoxifeno, os efeitos inibidores duplicaram em comparação com a dose máxima tanto de hPRL-G129R como de 4-OH-Tamoxifeno (FIGURA 18). Por exemplo, 100 nM de 4-OH-Tamoxifeno resultaram numa inibição de 15%, contudo, na presença de 100 ng/ml de hPRL-G129R o efeito inibidor resultou em aproximadamente 32% do controlo.

**Experiências de Co-cultura.** As linhas de células L de ratinho estáveis crescem a uma taxa semelhante à das células L normais independentemente de se estas estão a produzir hPRL ou hPRL-G129R devido ao facto das células L de ratinho possuírem PRLR não detectável (Chen, *J. Biol. Chem.* 269: 15892-15897, 1994). A montagem experimental de co-cultura proporciona uma presença constante de hPRL-G129R biologicamente activa, resultando deste modo numa resposta máxima nestas células tumorais.

Ambas as linhas de células de cancro humanas após co-cultura com células L-G129R demonstraram uma inibição do crescimento dependente da dose (FIGURA 19A-B). As respostas foram bastante dramáticas em comparação com as experiências de meios condicionados. A inibição completa da proliferação celular foi alcançada em ambas as linhas celulares. É digno de nota que o padrão de resposta das células MCF-7 foi deslocado para a direita em comparação com o das células T47-D, i.e., requereu mais hPRL-G129R para provocar os mesmos efeitos inibidores. Estes resultados podem ser explicados pelo facto do número total de hPRLR nas células MCF-7 ser muito menor que o verificado em células T47-D (Ormandy et al., *Genes Dev.* 15: 167-178; Shih, 1981, em: "Hormones and Breast Cancer", Cold Spring Harbor Laboratory, Pike, Siiteri e Walsh (eds.) págs. 185-194).

## **11. EXEMPLO: O ANTAGONISTA DO RECEPTOR DA PROLACTINA HUMANA G129R INDUZ APOTOSE EM MÚLTIPAS LINHAS DE CÉLULAS DE CANCRO DA MAMA HUMANAS E EM CÉLULAS DE CANCRO DA PRÓSTATA**

### **11.1. MATERIAIS E MÉTODOS**

**Linhos Celulares.** As linhas de células de cancro da mama humanas MDA-MB-134, T47-D, BT-474 e MCF-7 foram obtidas em

ATCC. Estas linhas celulares de cancro da mama foram escolhidas com base nos seus níveis de PRLR. A linha celular MDA-MB-134 possui o maior nível de PRLR seguido de T47-D, BT-474, MCF-7 em ordem decrescente dos níveis de PRLR (Ormundy, *J. Clinical Endocrinology and Metabolism* 82: 3692-3699).

**Cultura Celular.** As células T47-D obtidas em ATCC foram criadas em RPMI 1640 (sem vermelho de fenol), suplementado com FBS a 10% (Gibco BRL). As células BT-474 foram criadas em meio RPMI 1640 (sem vermelho de fenol), suplementado com FBS a 10% e suplementos recomendados pela ATCC. As células MCF-7 foram criadas em meio DMEM (sem vermelho de fenol), suplementado com FBS a 10%. As células foram criadas a 37°C numa atmosfera húmida na presença de CO<sub>2</sub> a 5%. As células MDA-MB-134 foram criadas em meio L-15 de Leibovitz suplementado com FBS a 20% e criadas em atmosfera isenta de CO<sub>2</sub>. As células de cancro da mama foram tripsinizadas (tripsina-EDTA a 0,02%) e criadas nos seus respectivos meios (sem vermelho de fenol) suplementados com CSS a 10% (soro limpo com carvão). Subsequentemente as células foram novamente tripsinizadas e plaqueadas num sistema de lâminas de 8 câmaras (Lab Tek II) até uma confluência de 60-70% por câmara. No dia seguinte os tratamentos foram efectuados nas células de cancro da mama utilizando os seus respectivos meios (sem vermelho de fenol), suplementados com CSS a 1%. As células MDA-MB-134 VI foram criadas em meio contendo vermelho de fenol, mas com as mesmas condições de soro que as outras células de cancro da mama.

**Ensaio de marcação terminal de cortes com dUTP mediada por desoxinucleotidil-transferase (TUNEL).** Os cortes no ADN fragmentado são marcados nas suas extremidades 3-OH. dUTP marcado com fluoresceína é incorporado nas extremidades 3-OH através da utilização da enzima desoxinucleotidil-transferase terminal. Após o período de tratamento atribuído as câmaras foram desmanteladas tal como nas instruções do fabricante e o ensaio TUNEL (sistema de detecção de apoptose, Fluoresceína-Promega) foi efectuado tal como nas instruções do fabricante. A lâmina foi examinada sob um filtro de FITC utilizando um sistema de microscópio Olympus IX 70.

## **11.2. RESULTADOS**

A apoptose (morte celular programada) é um dos principais mecanismos fisiológicos que regula a morte oportuna e ordenada das células (Stellar, H., *Science* 267: 1445, 1995). A característica bioquímica da apoptose é a clivagem internucleossómica do ADN (Wyllu, *Nature* 284: 555, 1980; Roy et al., *Exp. Cell Res.* 200: 416-424, 1992; Wyllu, *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306, 1980) e pode ser detectada através do ensaio TUNEL ou através de electroforese em gel convencional (Chen, *J. Cell. Biochem.* 61: 9-17, 1996). O cancro é uma doença na qual as células malignas possuem uma menor capacidade de sofrer apoptose em resposta a pelo menos alguns estímulos fisiológicos (Hoffman et al., *Oncogene* 9: 1807, 1994). Os fármacos que podem induzir as células cancerígenas a sofrer apoptose podem-se mostrar eficazes em terapia de cancro.

Tal como demonstrado aqui, o antagonista do PRLR G129R é capaz de induzir apoptose tal como detectado através de fragmentação do ADN em múltiplas linhas celulares de cancro da mama humanas. A FIGURA 20A-F mostra que G129R induziu apoptose de um modo dependente da dose após tratamento de 24 h e que ocorreu apoptose mesmo a concentrações fisiológicas (50 ng/ml, FIGURA 20C). Para demonstrar a especificidade de G129R para o PRLR, hPRL (gentilmente proporcionada pelo Dr. Parlow do NIH) e G129R foram simultaneamente utilizadas para tratar as células a uma razão de 1:1 e 1:4 (FIGURA 20G-H). É claro que G129R foi capaz de competir com hPRL a uma razão de 1:1 (FIGURA 20E) e é capaz de reverter competitivamente a fragmentação de ADN induzida por G129R a uma razão de 4:1 (FIGURA 20F). O efeito de recuperação de mitogénio de hPRL é ainda outra indicação de que G129R induz apoptose. Utilizando células BT-474 foram obtidos os mesmos resultados.

A fragmentação do ADN em células de cancro da mama é aparente mesmo após 2 horas de tratamento por G129R a uma concentração de 50 ng/ml (FIGURA 21A-D). Em estudos anteriores mostrou-se que o 4-OH-Tamoxifeno inibia sinergicamente a proliferação de células de cancro da mama juntamente com G129R. Portanto, 4-OH-Tamoxifeno foi incluído neste estudo para verificar que o 4-OH-Tamoxifeno também induziu apoptose

em células de cancro da mama através de fragmentação do ADN. Surpreendentemente, o 4-OH-Tamoxifeno não induziu apoptose em células T47-D, MCF-7 ou BT-474 a uma concentração tão elevada como 1  $\mu$ M conforme ensaiado pelo mesmo protocolo apesar do facto do 4-OH-Tamoxifeno ter sido capaz de inibir a proliferação celular (FIGURA 22A-H). Em contraste com o 4-OH-Tamoxifeno, 250 ng de G129R induziram fragmentação de ADN de apoptose em todas as quatro linhas celulares de cancro da mama positivas para PRLR após tratamento de 24 horas (FIGURA 23A-F).

Adicionalmente, o efeito de hPRL-G129R na activação da Caspase-3 foi ensaiado em células T47-D utilizando um estojo de ensaio ApopAlert CPP32/Caspase-3 (Clontech, Palo Alto, CA) tal como apresentado na FIGURA 24. As células T47-D foram tratadas com 250 ng/ml de hPRL-G129R durante 2 h. O ensaio foi efectuado na presença de DEVD-CHO (inibidor da caspase-3) para demonstrar que a indução da Caspase-3 por hPRL-G129R é um acontecimento específico.

Os dados descritos acima indicam que as células de cancro da mama estão adaptadas para utilizar prolactina como principal factor de crescimento e sofrem apoptose quando privadas desta através de ligação competitiva de G129R ao PRLR conduzindo ao bloqueio do sinal de crescimento de PRL. Assim, o sinal mitogénico continuado proporcionado por hPRL pode superar os sinais apoptóticos existentes dentro das células de cancro da mama permitindo que o processo de apoptose atrasada prossiga. Os dados aqui apresentados, indicam que o antagonista do receptor da prolactina G129R pode ser utilizado em terapia endócrina em conjunto com tamoxifeno ou por si só, no tratamento de cancro da mama.

Adicionalmente, duas células de cancro da próstata sofreram apoptose em resposta a tratamento com 250 ng de hPRL-G129R durante 24 horas tal como detectado utilizando o ensaio TUNEL (FIGURA 25). As amostras foram em duplicado e cada amostra era constituída por cerca de 2 milhões de células.

## LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> CHEN, WEN Y.  
WAGNER, THOMAS E.

<120> UTILIZAÇÃO DE AGENTES ANTI-PROLACTINA PARA TRATAR CONDIÇÕES  
PROLIFERATIVAS

<130> 31701-PCT

<150> 60/085,128  
<151> 1998-05-12

<150> 09/246,041  
<151> 1999-02-05

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Desconhecido

<400> 1  
gcttagcagt tgggttttg 20

<210> 2  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Desconhecido

<400> 2  
atgaacatca aaggat 16

<210> 3  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Desconhecido

<400> 3  
cggttcctag agaggatgg 23

<210> 4  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Desconhecido

<400> 4  
gcacttcagt atccatggc tgg 24

<210> 5  
<211> 20  
<212> ADN

<213> Desconhecido

<400> 5  
agaaggcagc caacatgaag 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Desconhecido

<400> 6  
gcttagcagt tggtgttg 20

<210> 7  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Desconhecido

<400> 7  
atgaacatca aaggat 16

<210> 8  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Desconhecido

<400> 8  
cttctagagc gcatggagct cata 24

<210> 9  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Desconhecido

<400> 9  
ccctctagac tcgagcggcc gcc 23

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma variante da prolactina humana possuindo uma substituição da glicina na posição 129 para a preparação de um medicamento para inibição da proliferação de uma célula de cancro da mama ou da próstata que expresse um receptor de prolactina.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a variante da prolactina humana possui uma substituição da glicina na posição 129 por arginina (G129R).

3. Utilização de uma variante da prolactina humana possuindo uma substituição da glicina na posição 129 para a preparação de um medicamento para indução de apoptose celular numa célula de cancro da mama ou da próstata expressando o receptor de prolactina.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a variante da prolactina humana possui uma substituição da glicina na posição 129 por arginina.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 3 ou 4, em que a célula é geneticamente modificada para expressar o receptor de prolactina.

6. Método *in vitro* para identificação de um composto capaz de modular a actividade do receptor de prolactina, compreendendo o método:

- a) a colocação de um composto em contacto com uma célula que expresse o receptor de prolactina;
- b) a medição do nível de apoptose na célula; e
- c) a comparação do nível de apoptose obtido em (b) com o nível obtido na ausência do composto;

de modo a que se o nível em (b) diferir do obtido na ausência do composto, é identificado um composto capaz de modular a actividade do receptor da prolactina.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que o composto aumenta o nível de apoptose na célula.

8. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, em que o composto diminui o nível de apoptose numa célula na presença de um antagonista do receptor de prolactina.

9. Proteína de fusão compreendendo uma variante da prolactina humana que está ligada a outra proteína, em que a variante possui uma substituição da glicina na posição 129.

10. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 9, em que a variante de prolactina está ligada à interleucina 2.

11. Proteína de fusão de acordo com as reivindicações 9 ou 10, em que a variante possui uma substituição da glicina na posição 129 por arginina.

12. Utilização de uma proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11 para a preparação de um medicamento para tratamento de cancro da mama ou da próstata.

Lisboa,

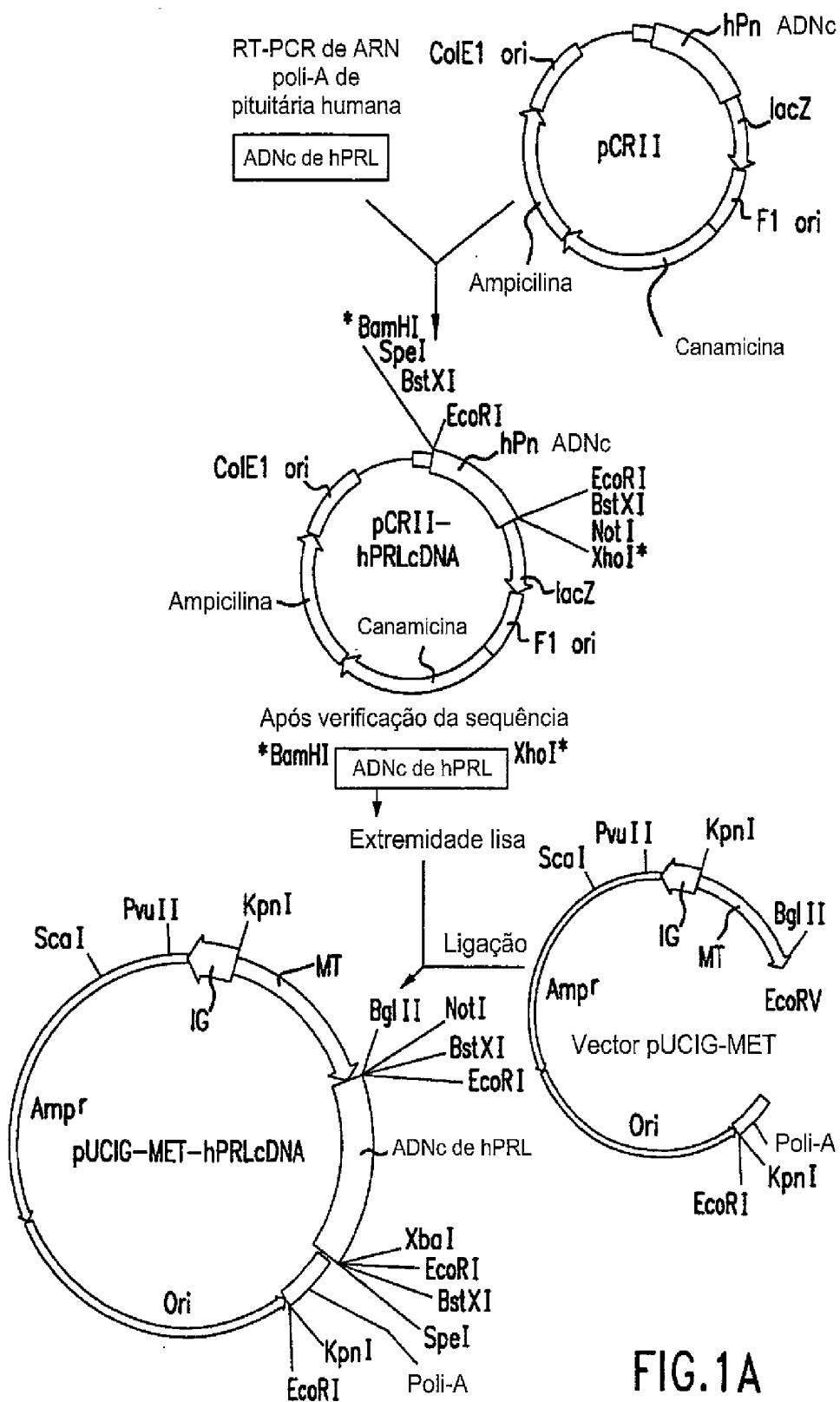


FIG.1A

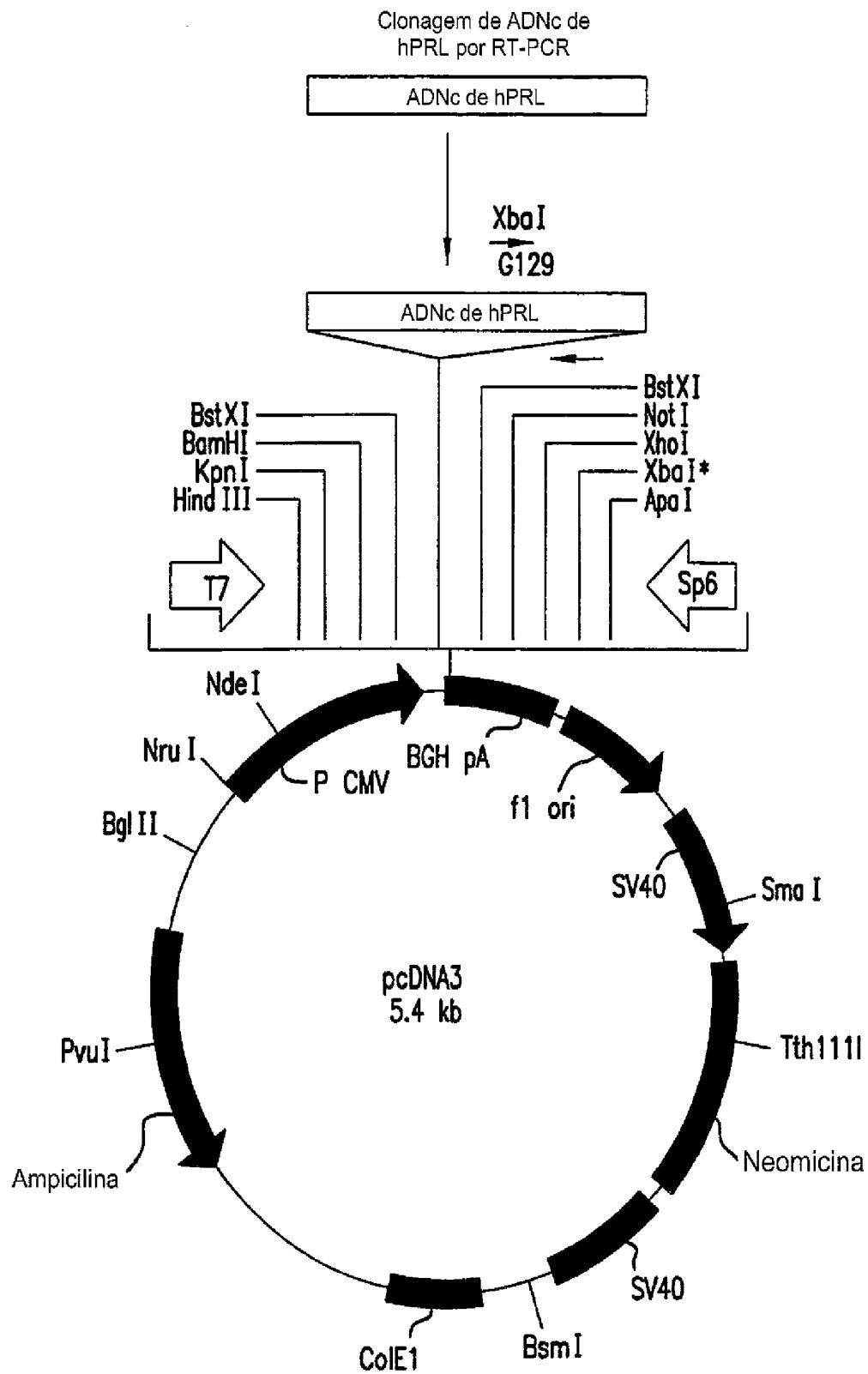


FIG.1B

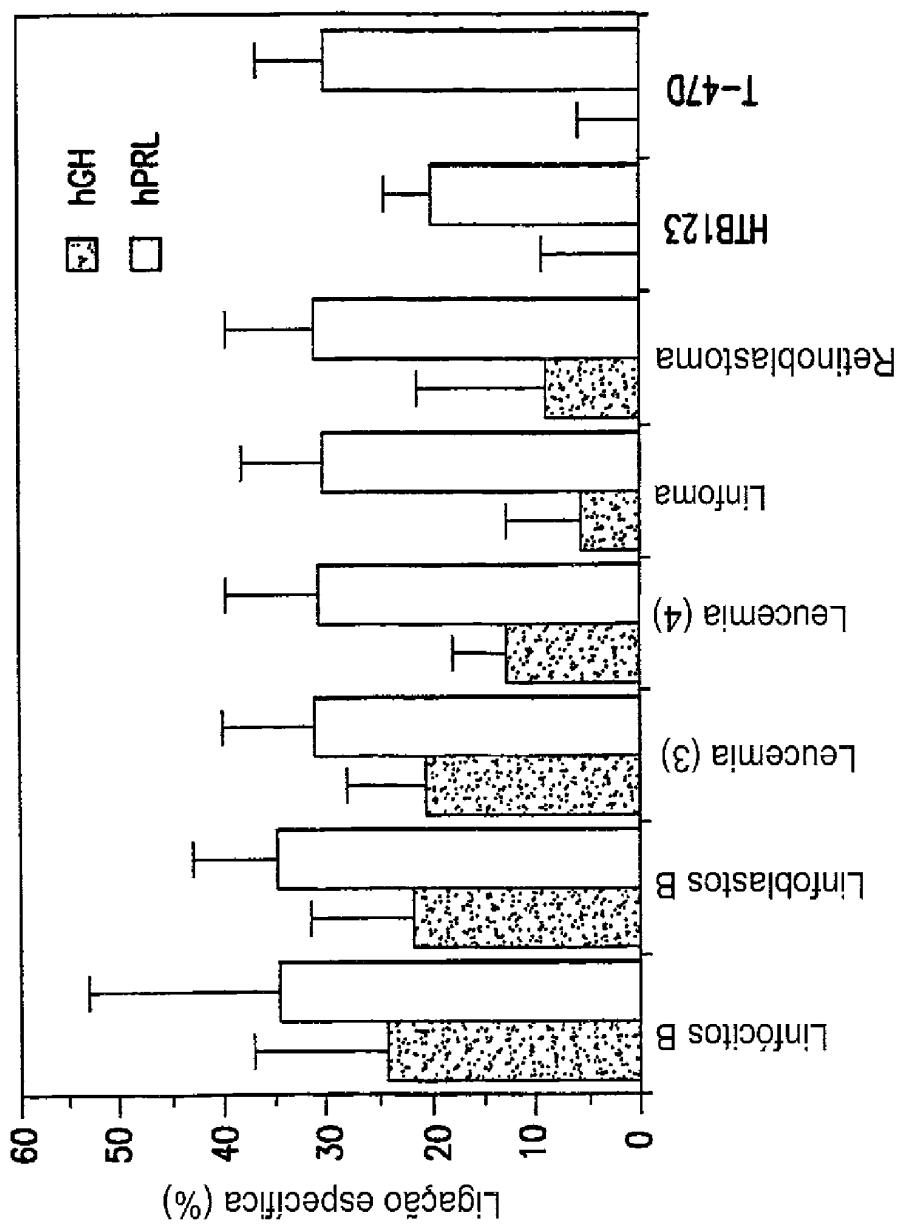


FIG.2

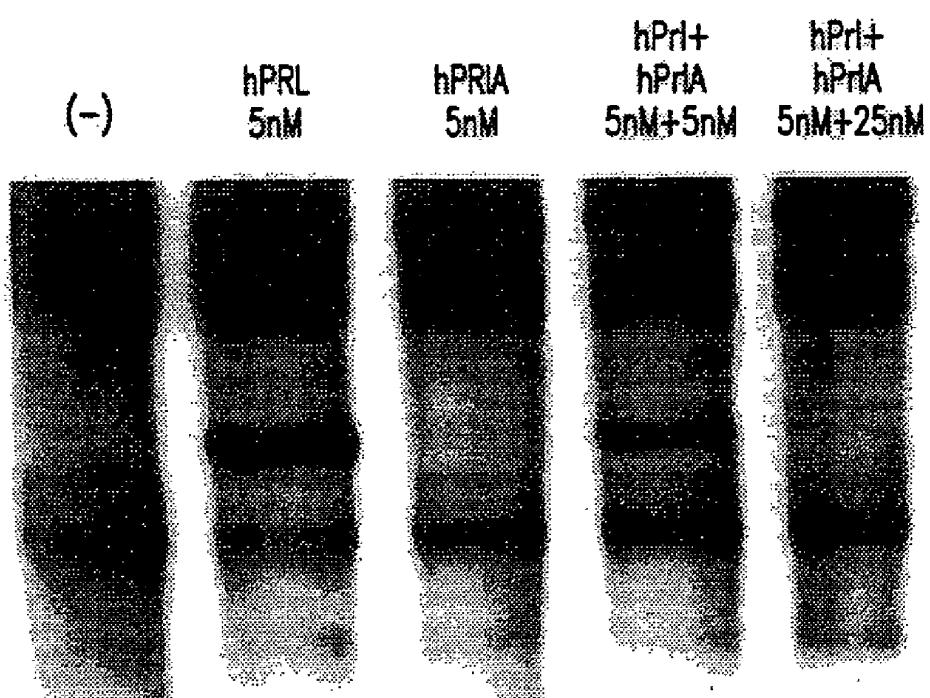


FIG.3

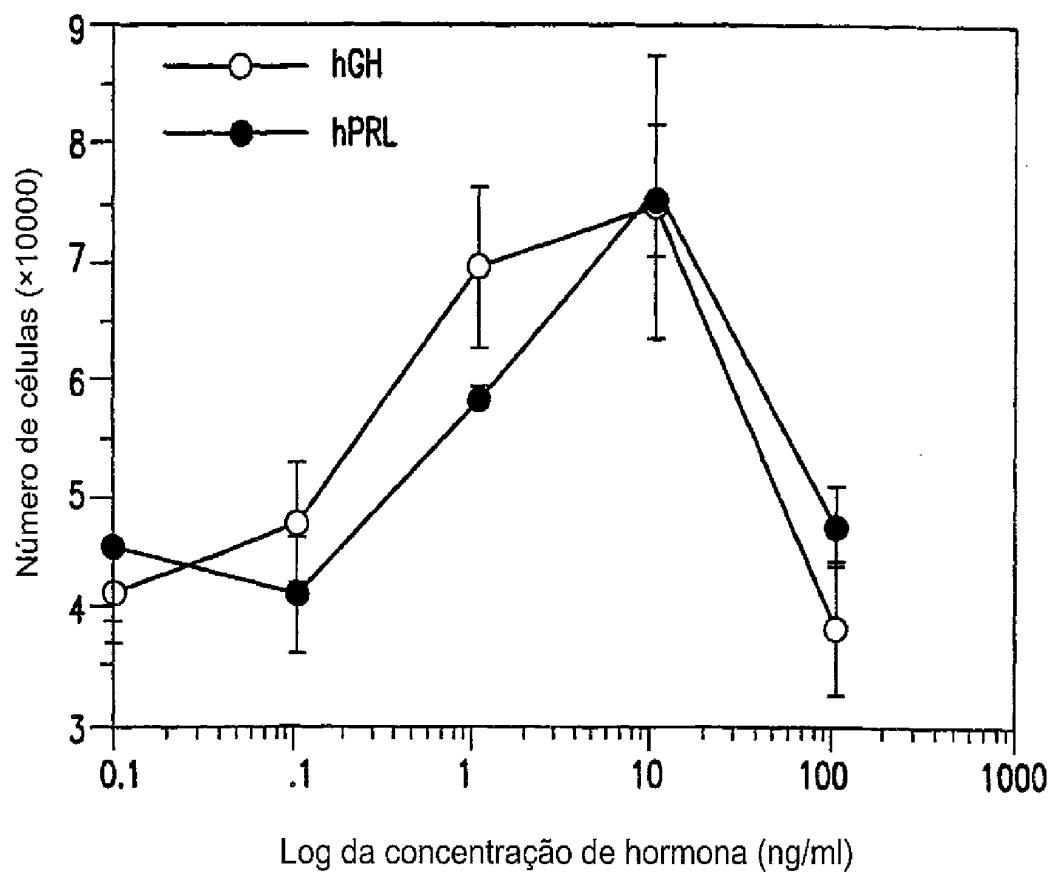


FIG.4

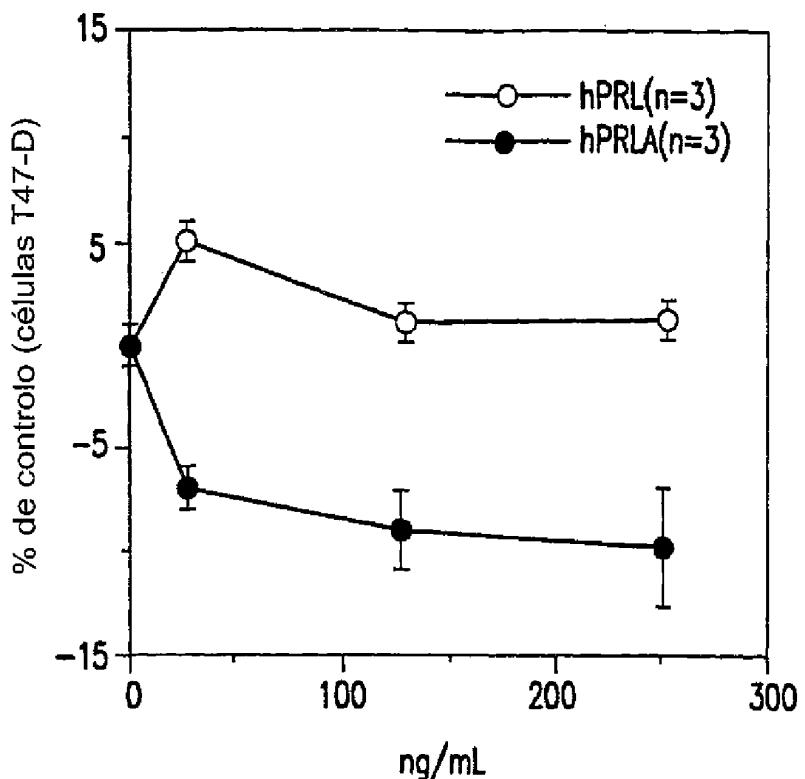


FIG.5A

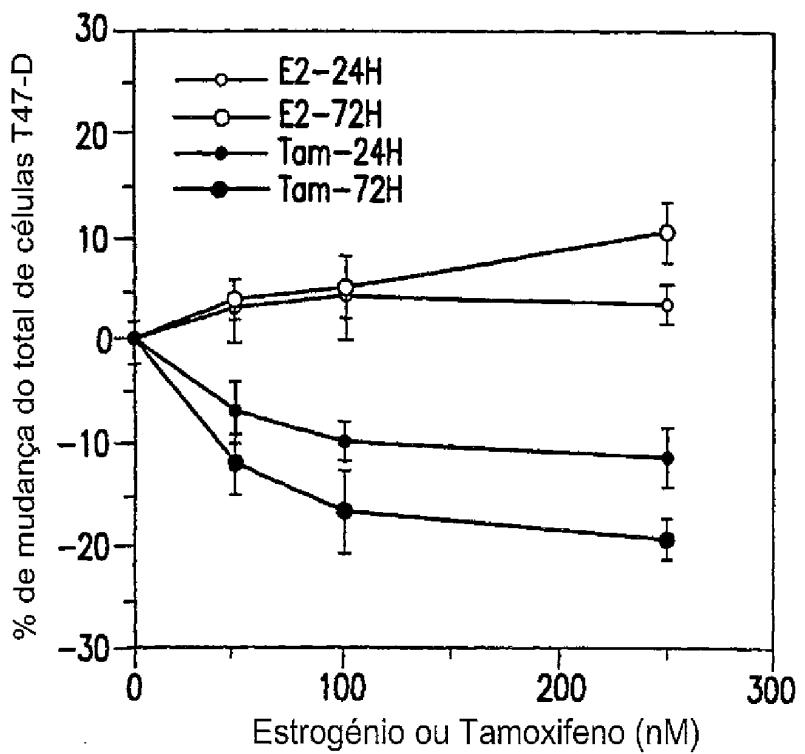


FIG.5B

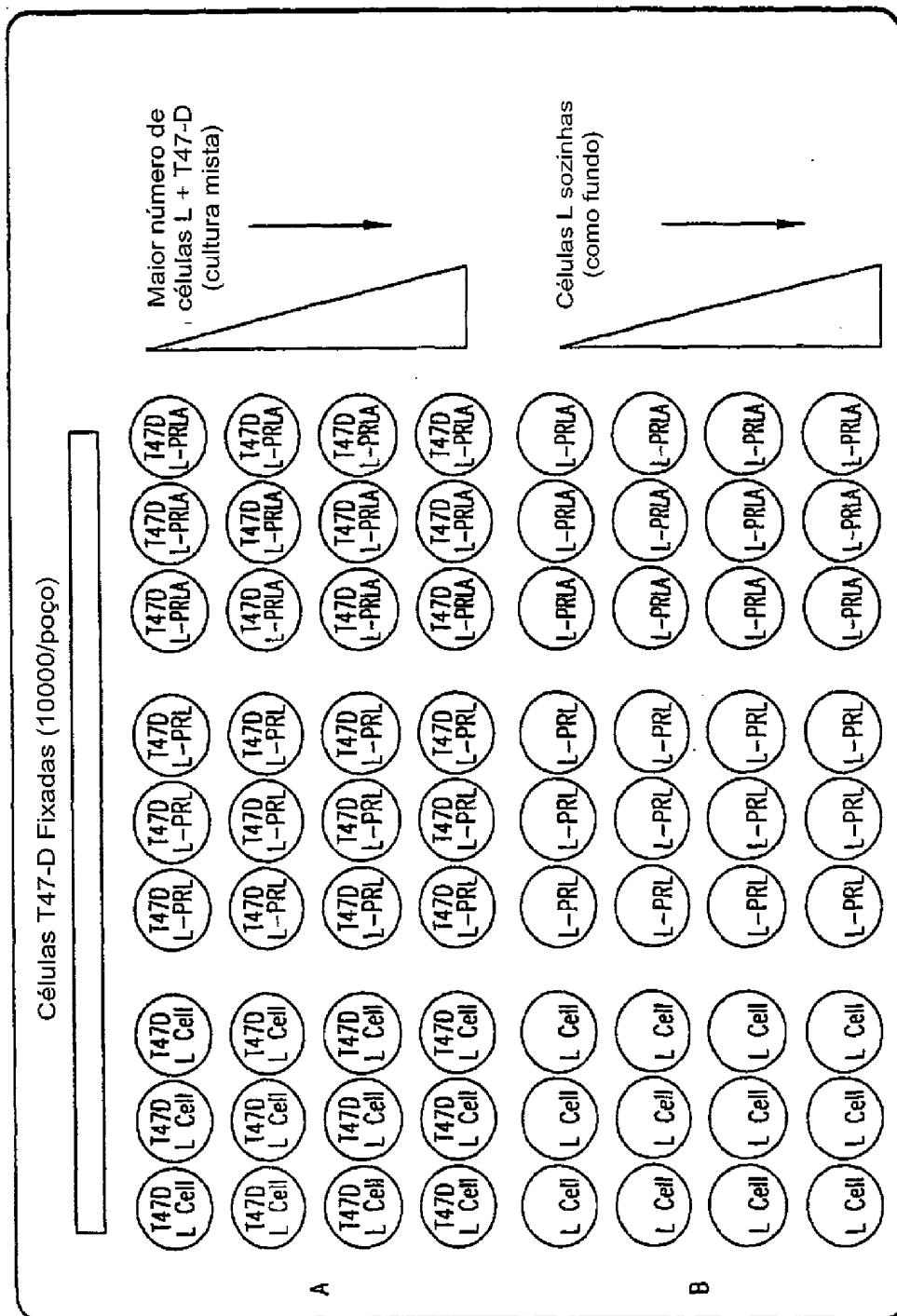


FIG. 6

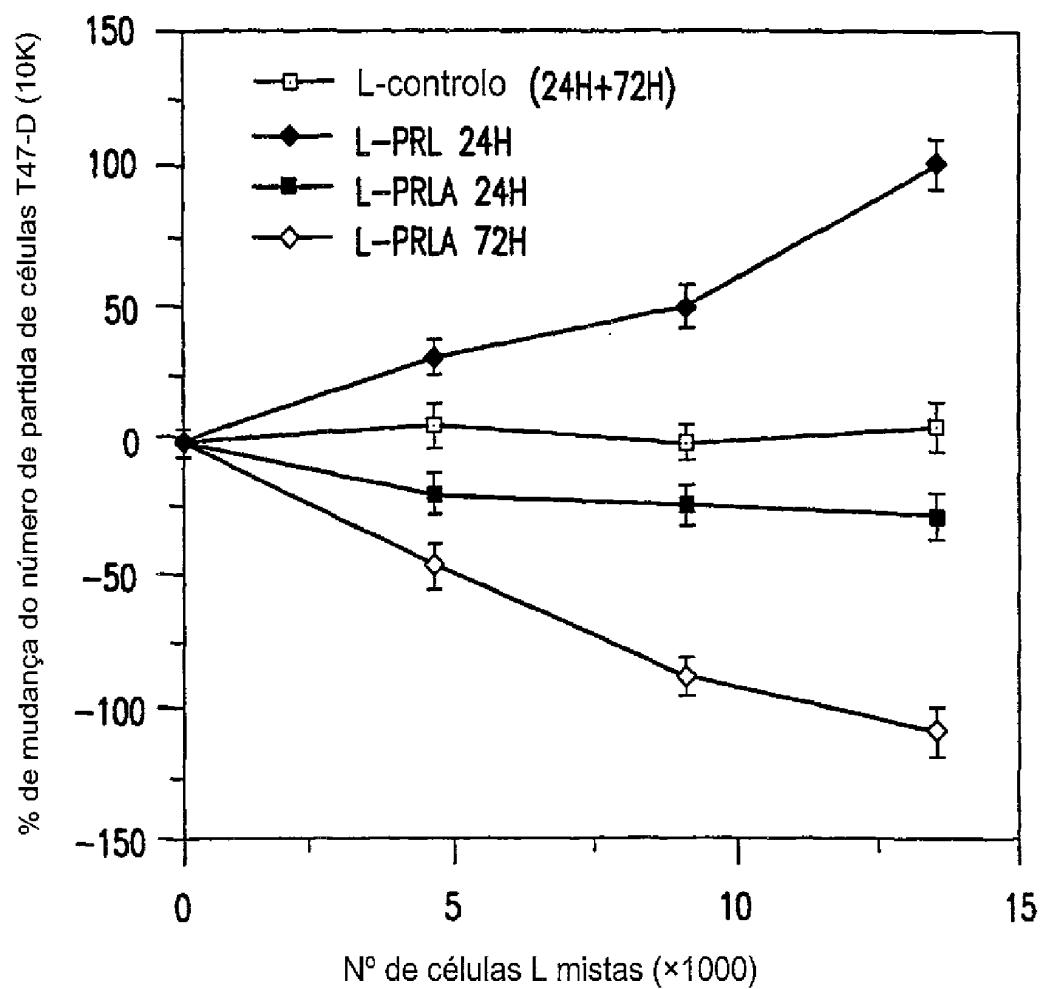


FIG.7

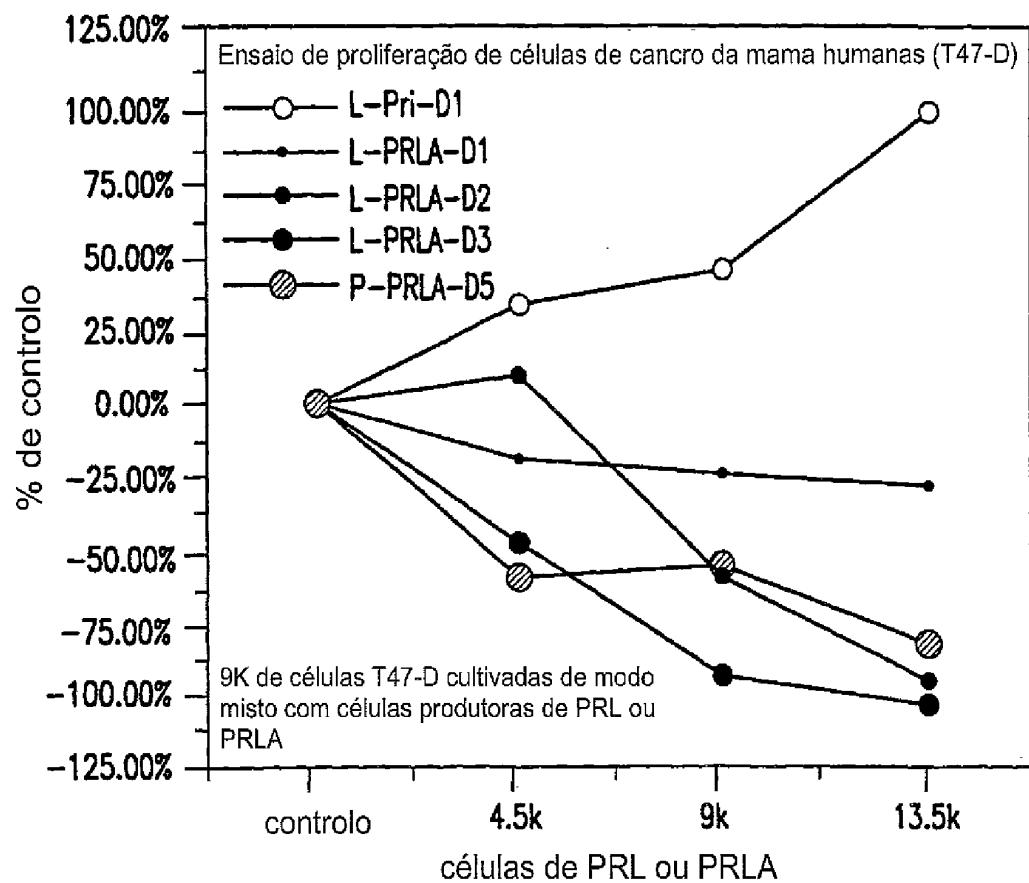


FIG.8

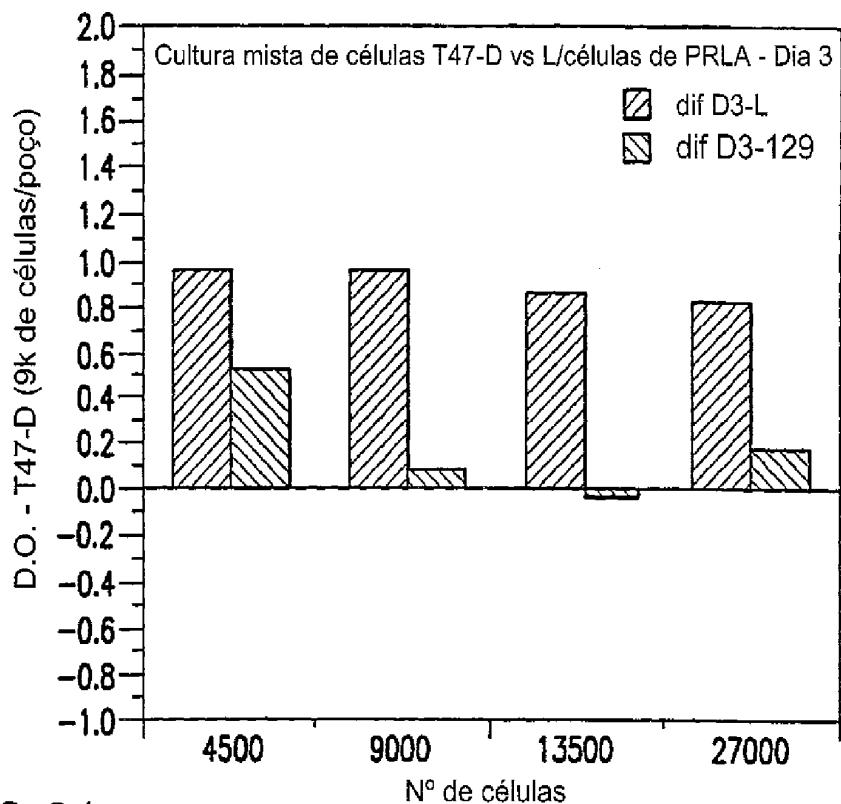


FIG.9A

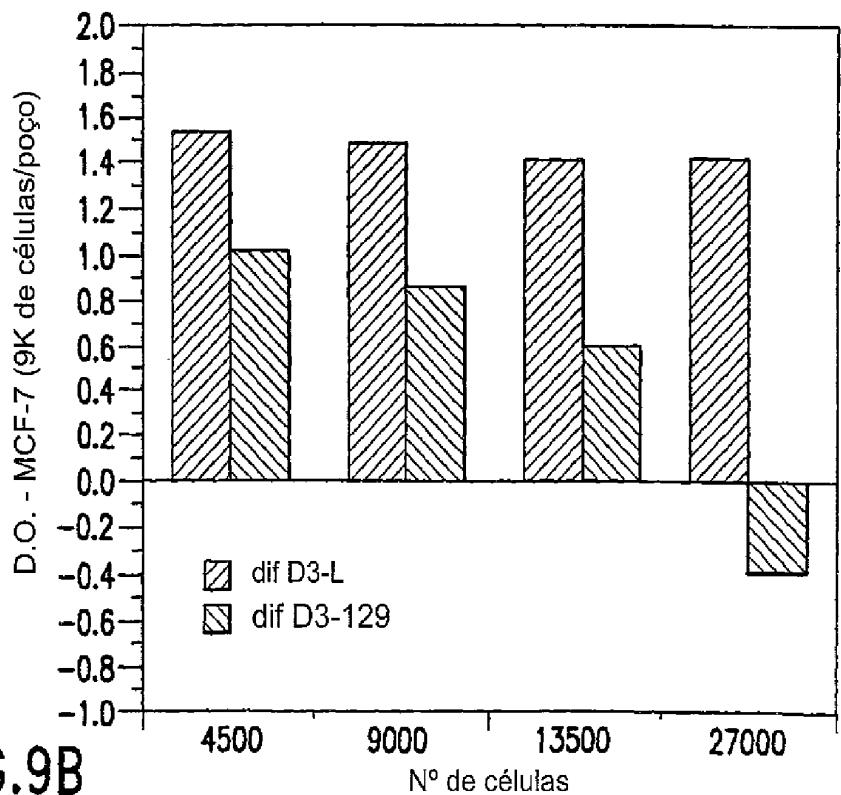


FIG.9B

FIG. 10A

95	PLP-L de trato	WKO-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
96	PLP-L de trato	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
97,98	PLP-L de ovelha	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
99,100	PLP-Alanina de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
101	PLP-L de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
102	PLP-L de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
103	PLP-L de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
104	PLP-L de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
105	PLP-L de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
106	PLP-L de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
107	PLP-L de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
108	PLP-L de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
109	PLP-L de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
110	PLP-L de gado	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
111	SP-PCWANGAC	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
112	SP-PCWANGAC	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
113	SP-PCWANGAC	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
114	SP-PCWANGAC	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL
115	SP-PCWANGAC	ITQ-AFPLCIIA BAPHTPENLE HETKEDIL-SIINVS - SWKEPL

FIG. 10B

FIG. 10C

FIG. 10D

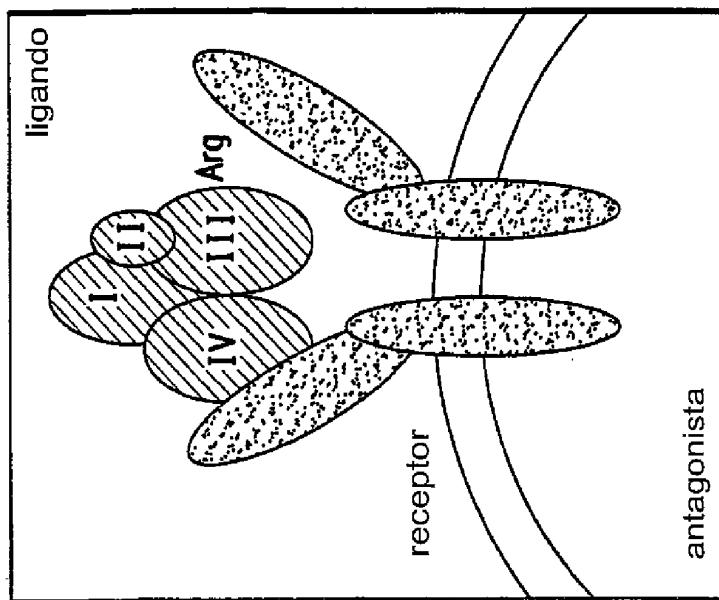


FIG. 11B

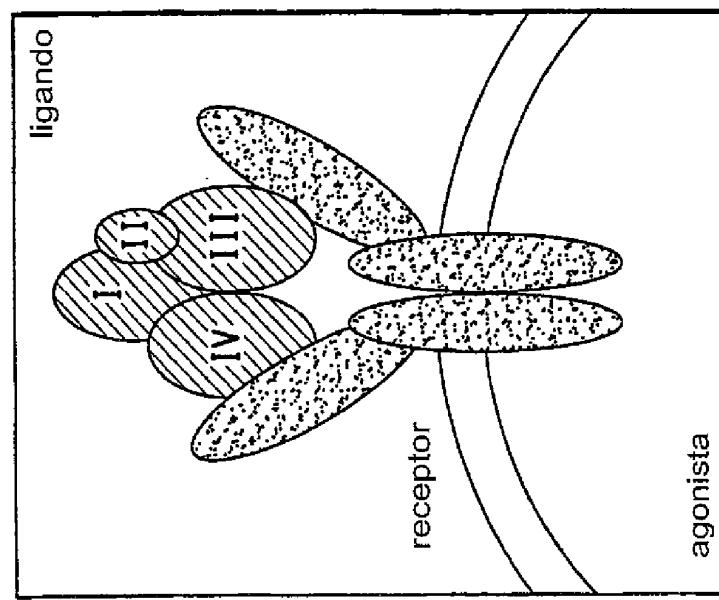


FIG. 11A

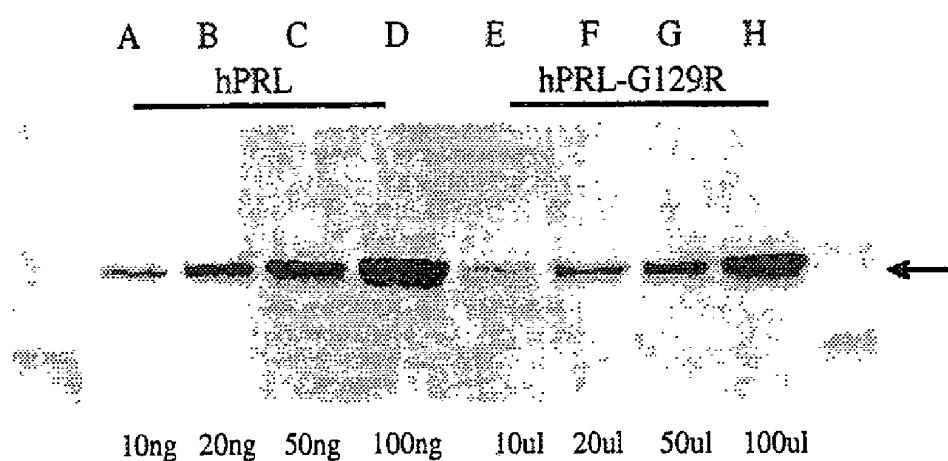


FIG.12

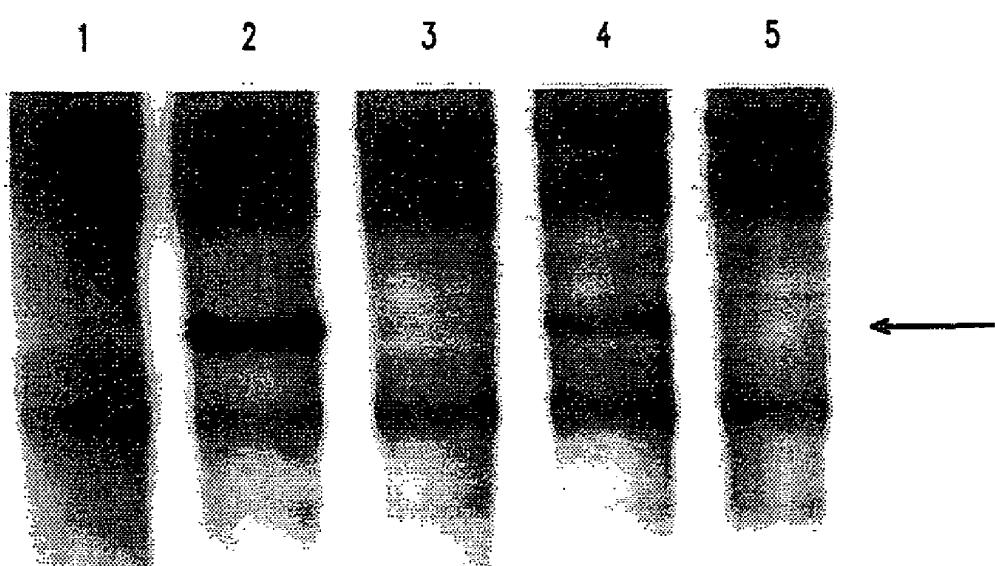


FIG.13

Controlo



FIG.14A

hPRL

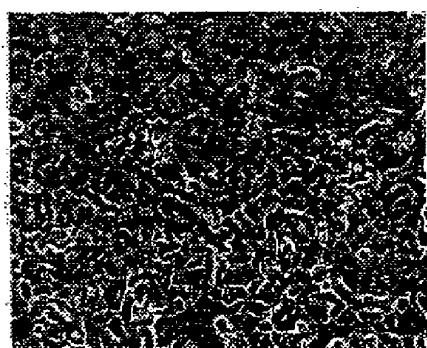


FIG.14B

hPRL-G129R

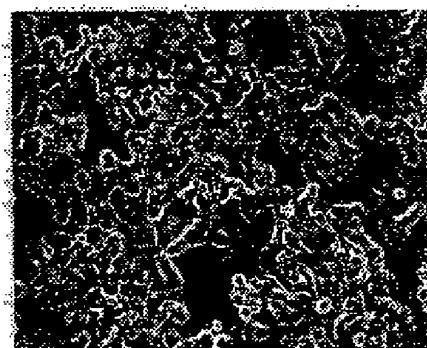


FIG.14C

E2

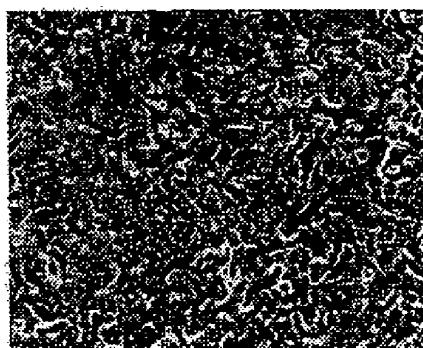


FIG.14D

4-OH-Tamoxifeno

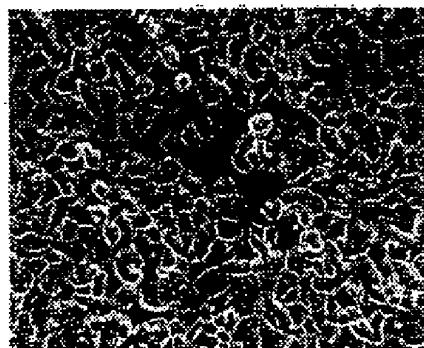


FIG.14E

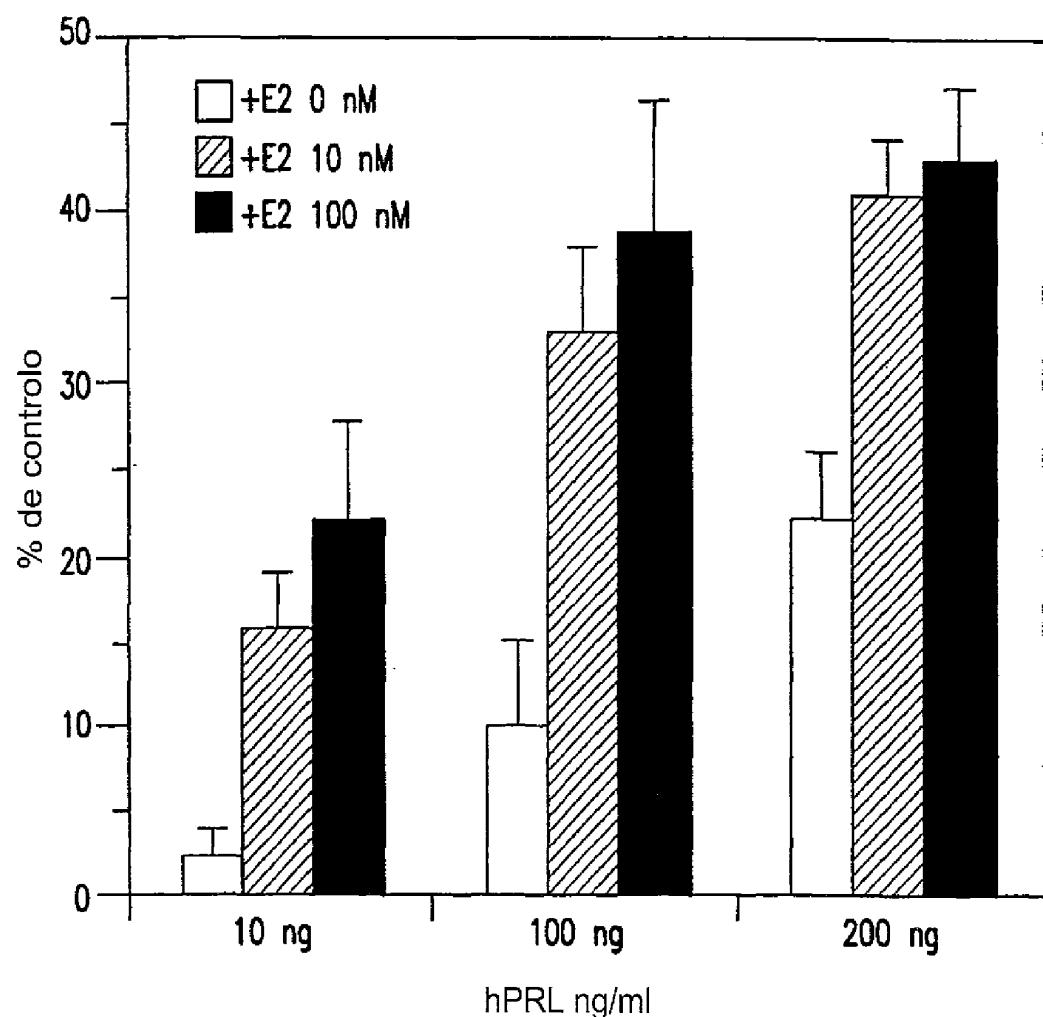


FIG.15

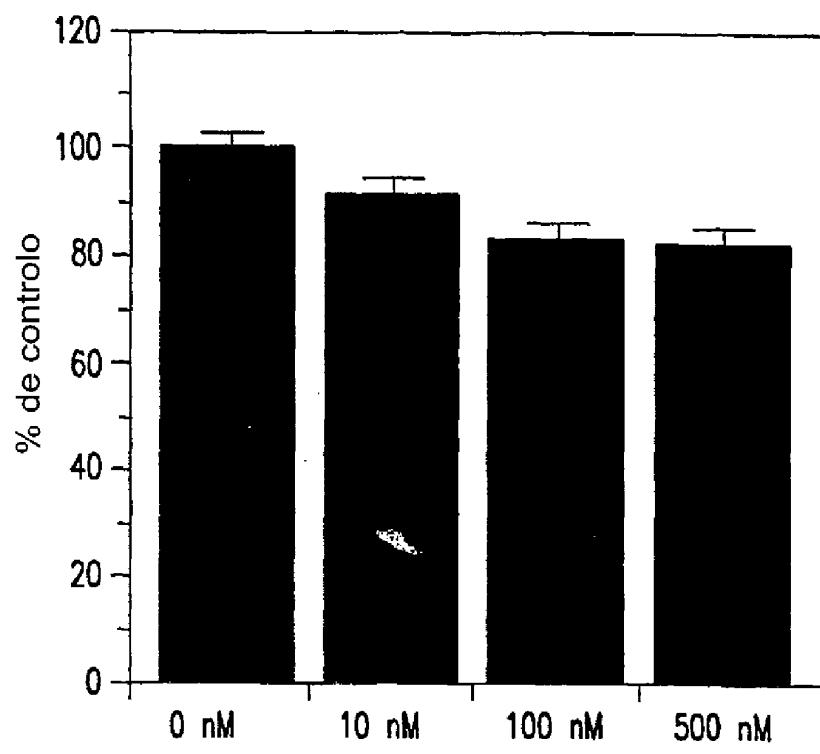


FIG.16A 4-OH-Tamoxifeno

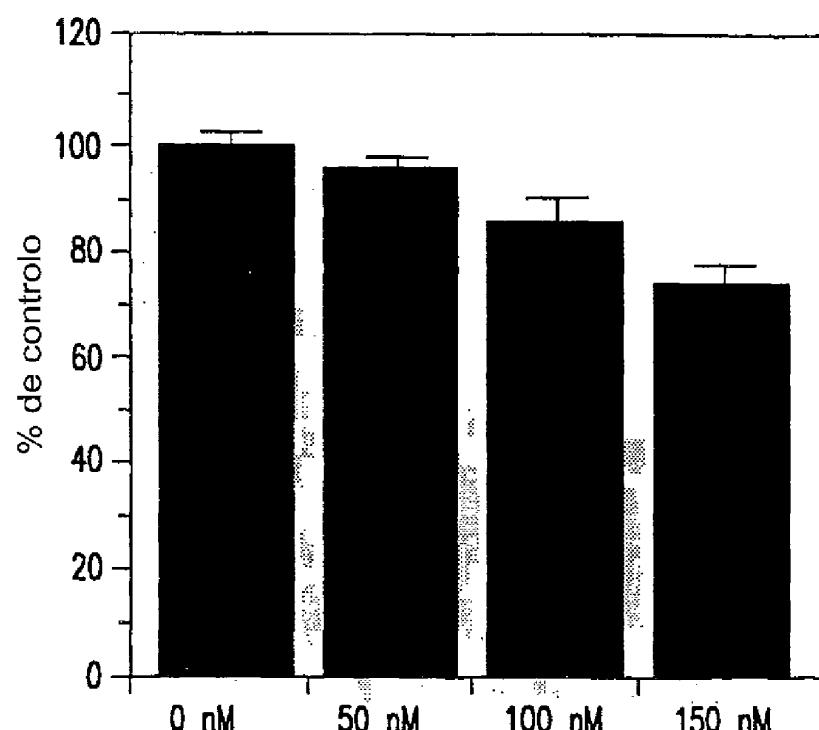


FIG.16B 4-OH-Tamoxifeno

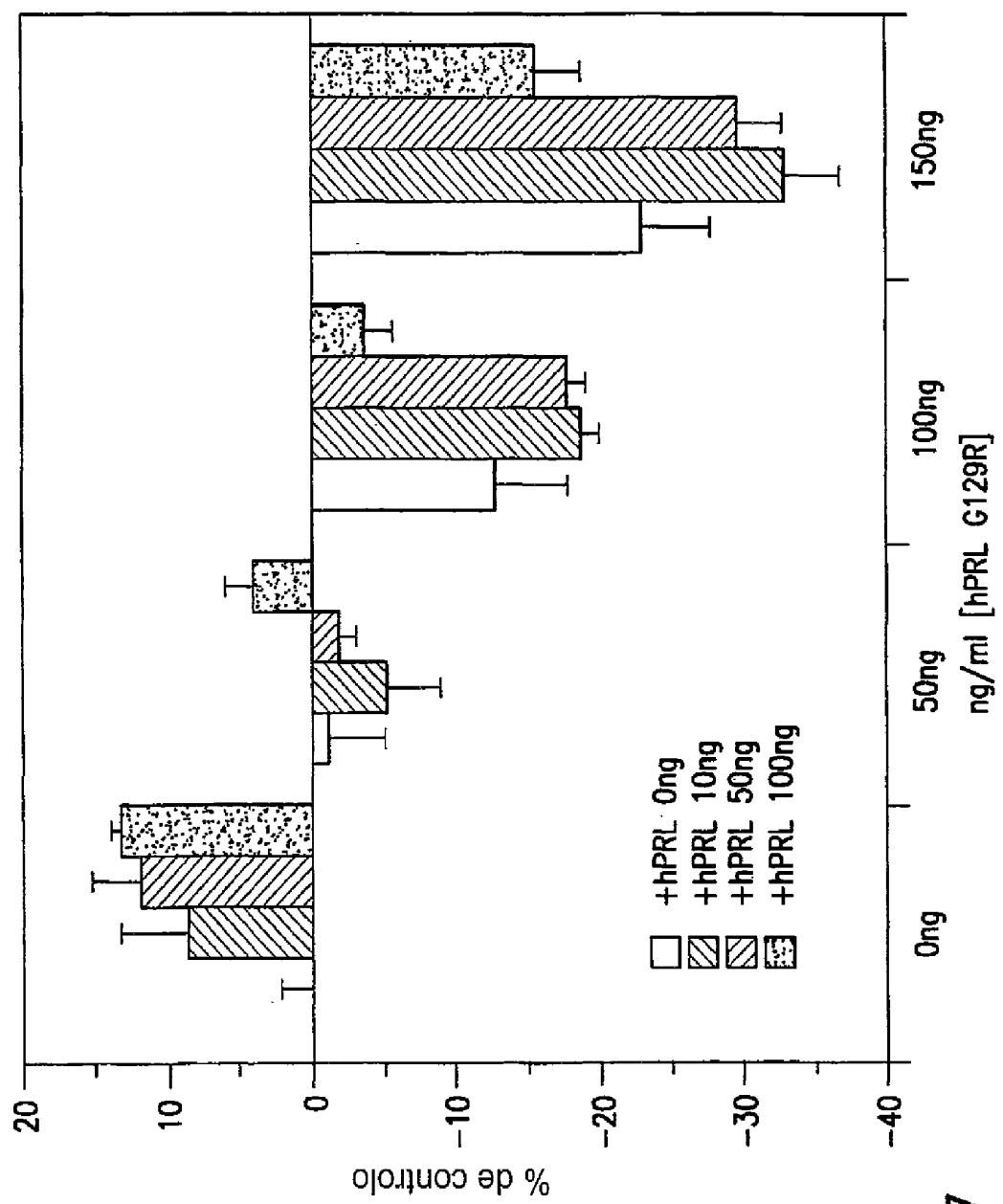
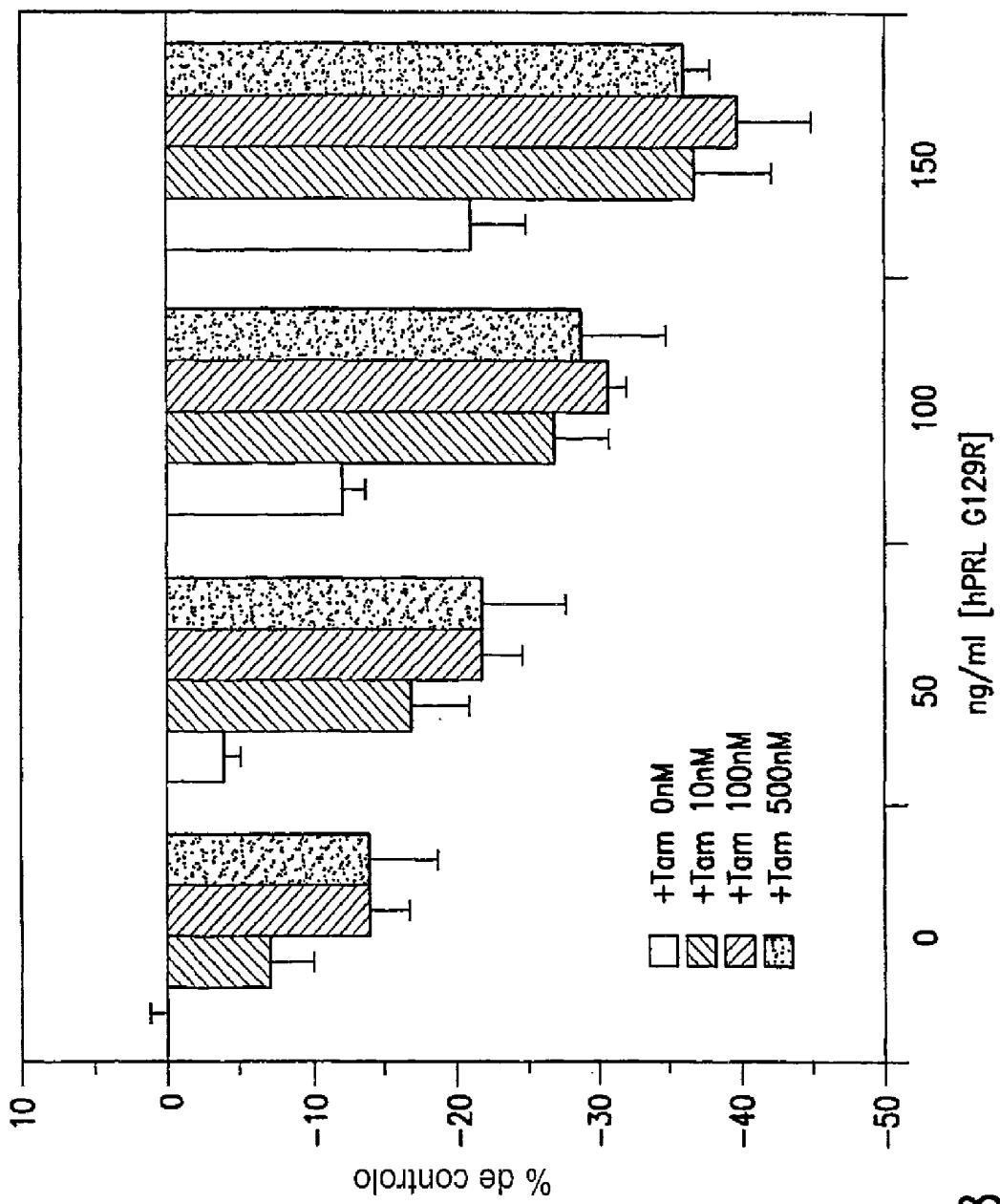


FIG. 17



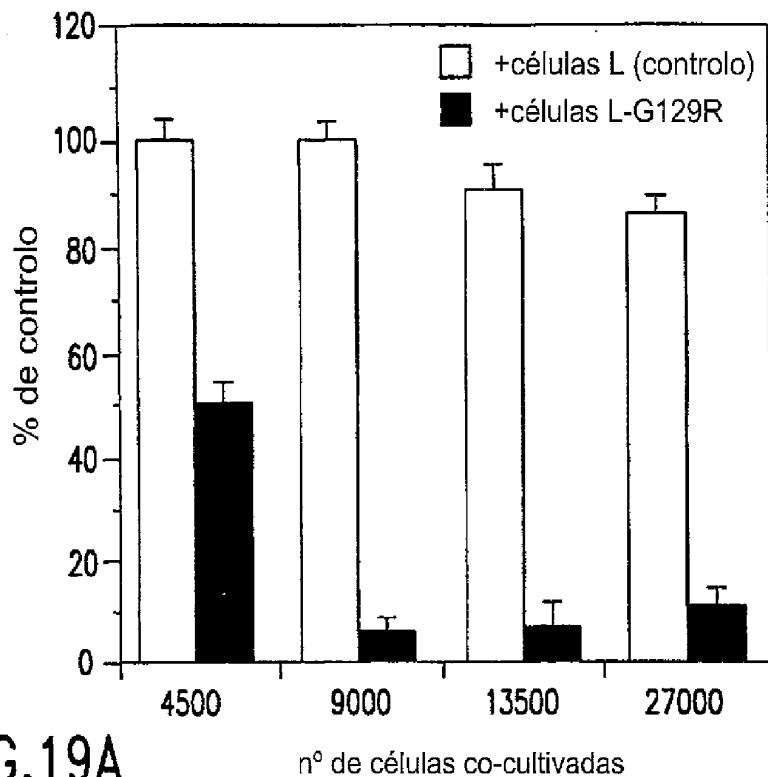


FIG.19A

nº de células co-cultivadas

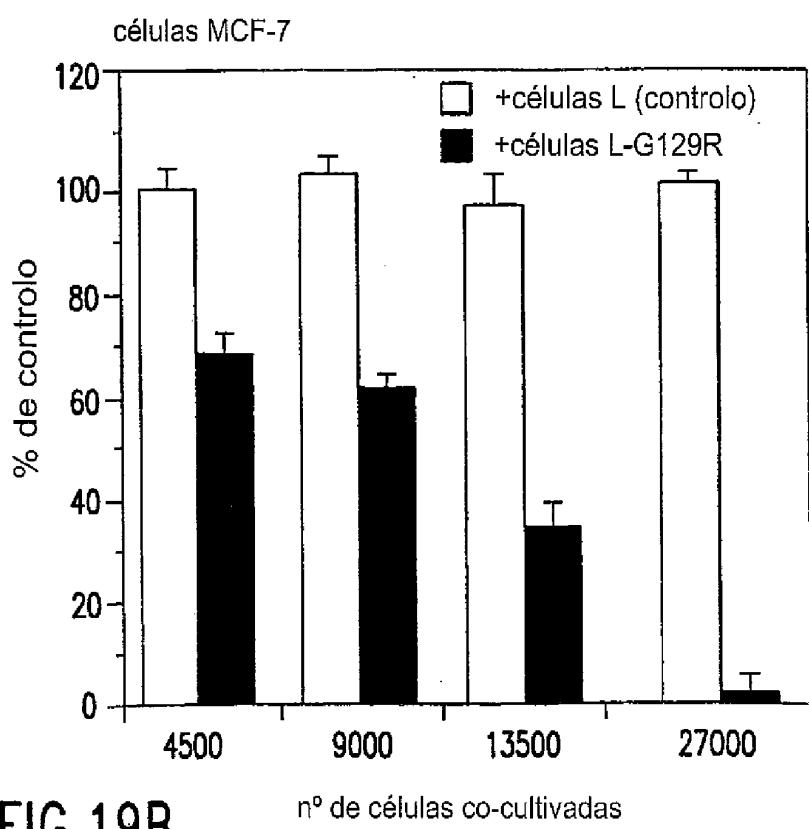
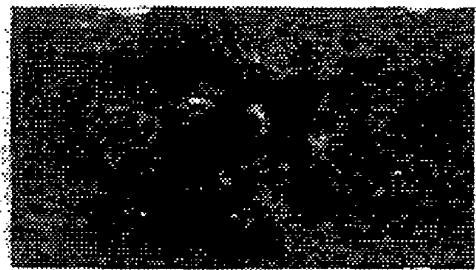


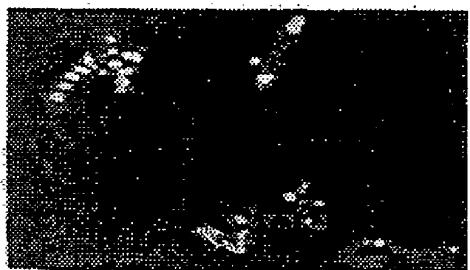
FIG.19B

nº de células co-cultivadas



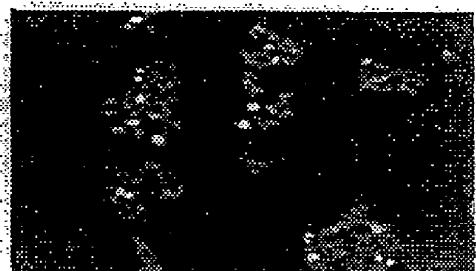
T-47D- CONTROL

FIG.20A



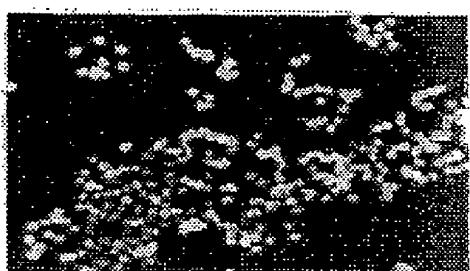
T-47D- 50ng G129R

FIG.20B



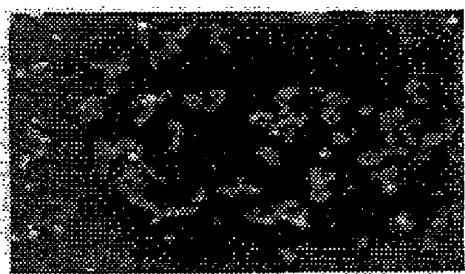
T-47D- G129R 125ng

FIG.20C



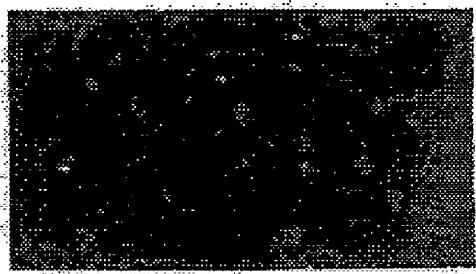
T-47D- 500ng G129R

FIG.20D



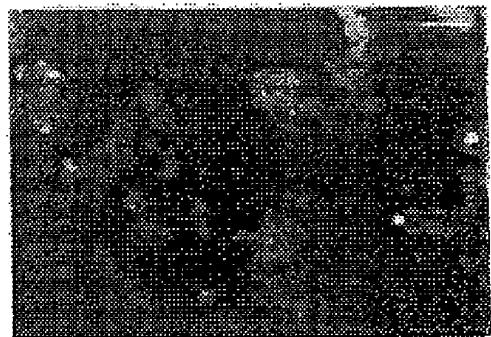
T-47D-125ng G129R+125ng hPRL

FIG.20E



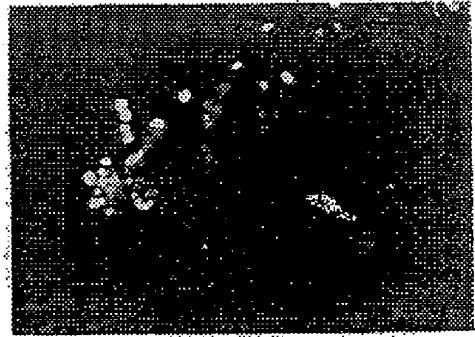
T-47D-125ng G129R+500ng hPRL

FIG.20F



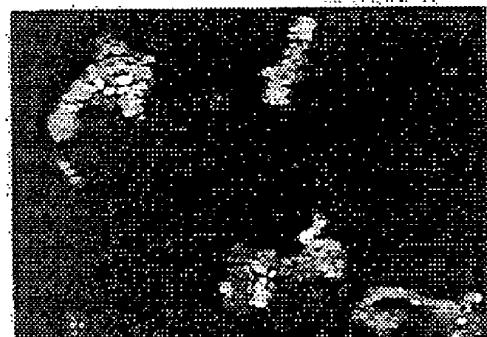
T-47D- CONTROLO

FIG.21A



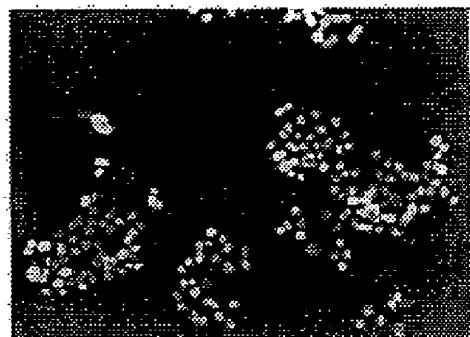
T-47D- 50ng G129R- 2h

FIG.21B



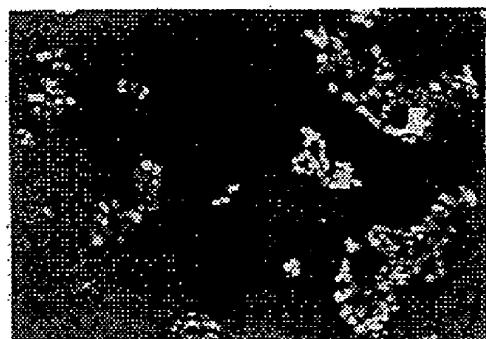
T-47D- 50ng G129R- 8h

FIG.21C



T-47D- 50ng G129R- 24h

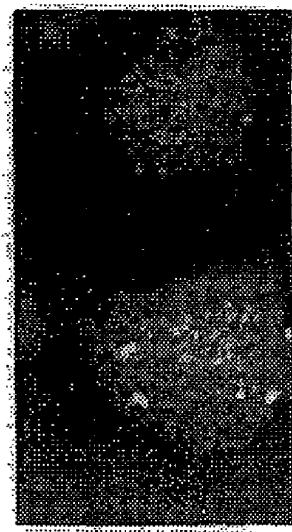
FIG.21D



T-47D- 50ng G129R- 48h

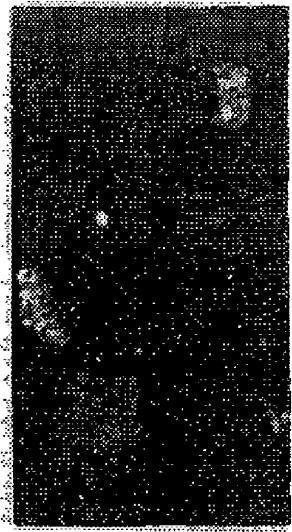
FIG.21E

**FIG.22A**



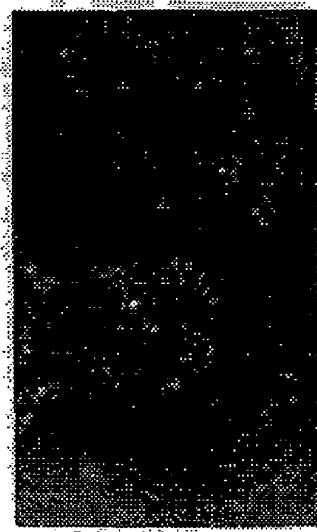
**BT-474- CONTROL**

**FIG.22B**



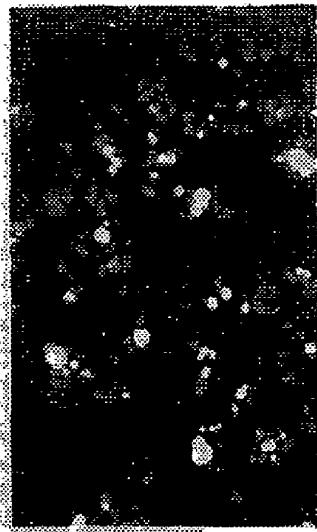
**BT-474- G129R 250ng**

**FIG.22C**



**MCF-7- CONTROL**

**FIG.22D**



**MCF-7- G129R 250ng**

FIG.22E



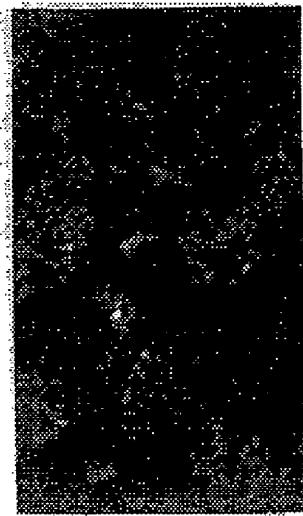
MDA-MB-134VI-CONTROL

FIG.22F



MDA-MB-134 VI- 250ng

FIG.22G



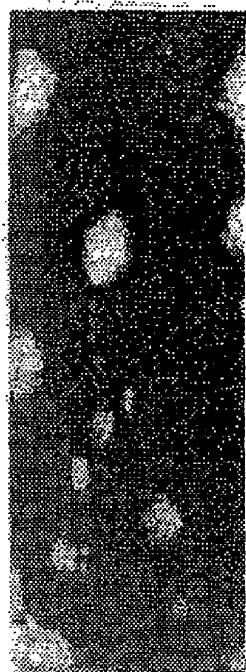
T-47D- CONTROL

FIG.22H



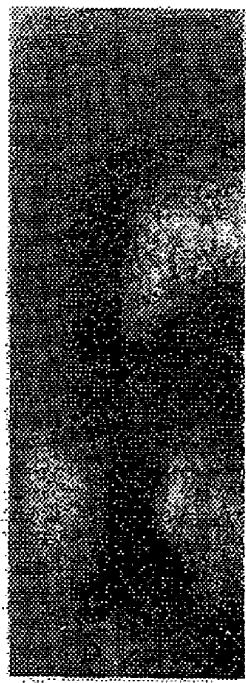
T-47D- G129R 250ng

**FIG. 23A**



BT-474-CONTROL

**FIG. 23B**



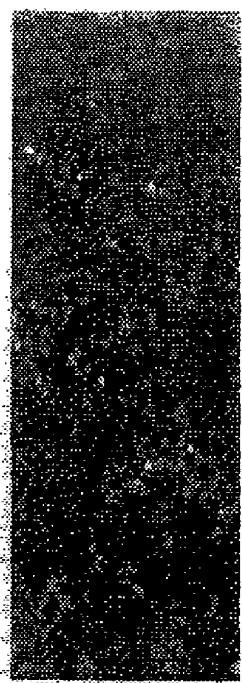
4-OHT 1  $\mu$ M

**FIG. 23C**



MCF-7-CONTROL

**FIG. 23D**



4-OHT 1  $\mu$ M

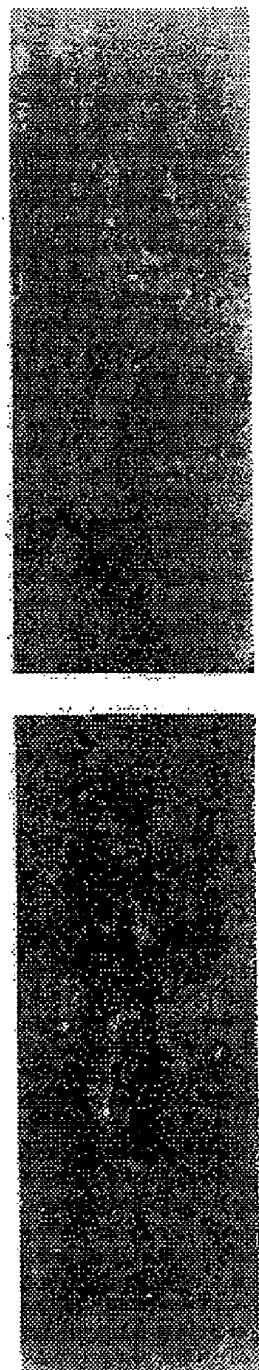


FIG.23F

FIG.23E

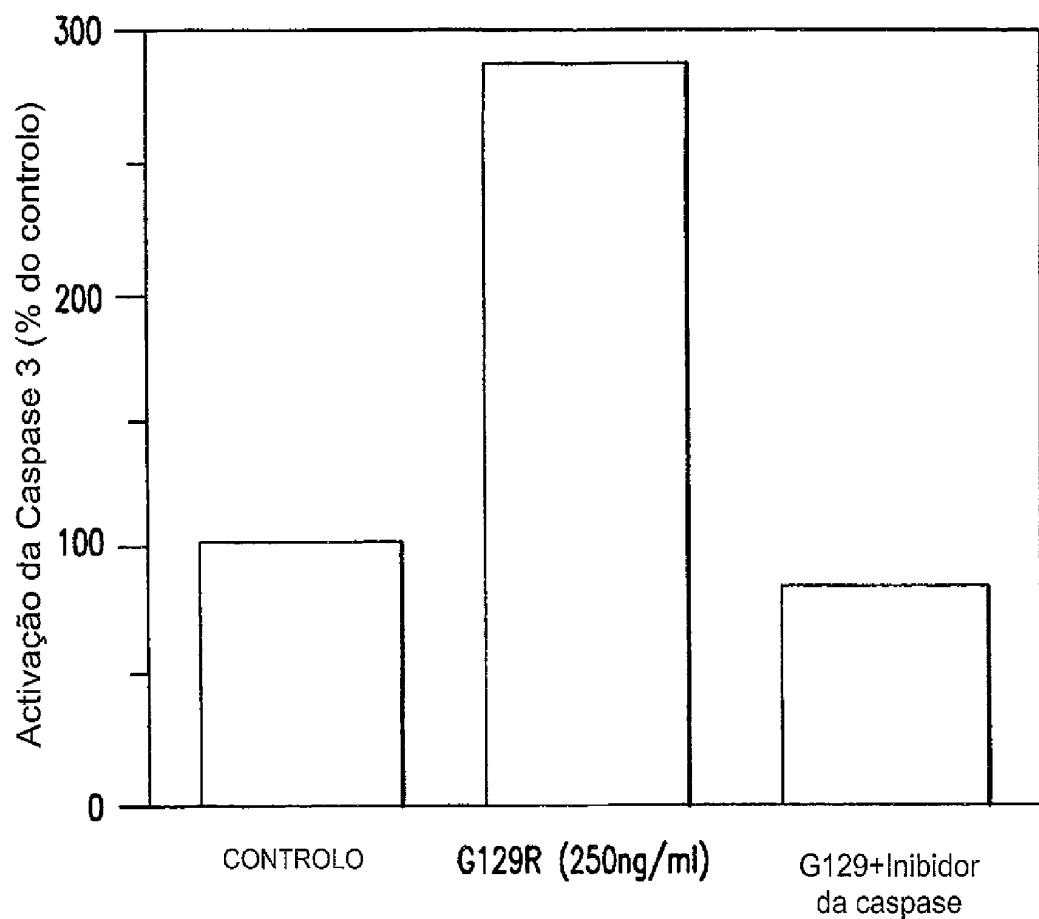


FIG.24

Controlo não tratado

Tratadas com hPRL-G129R (500 ng/ml)

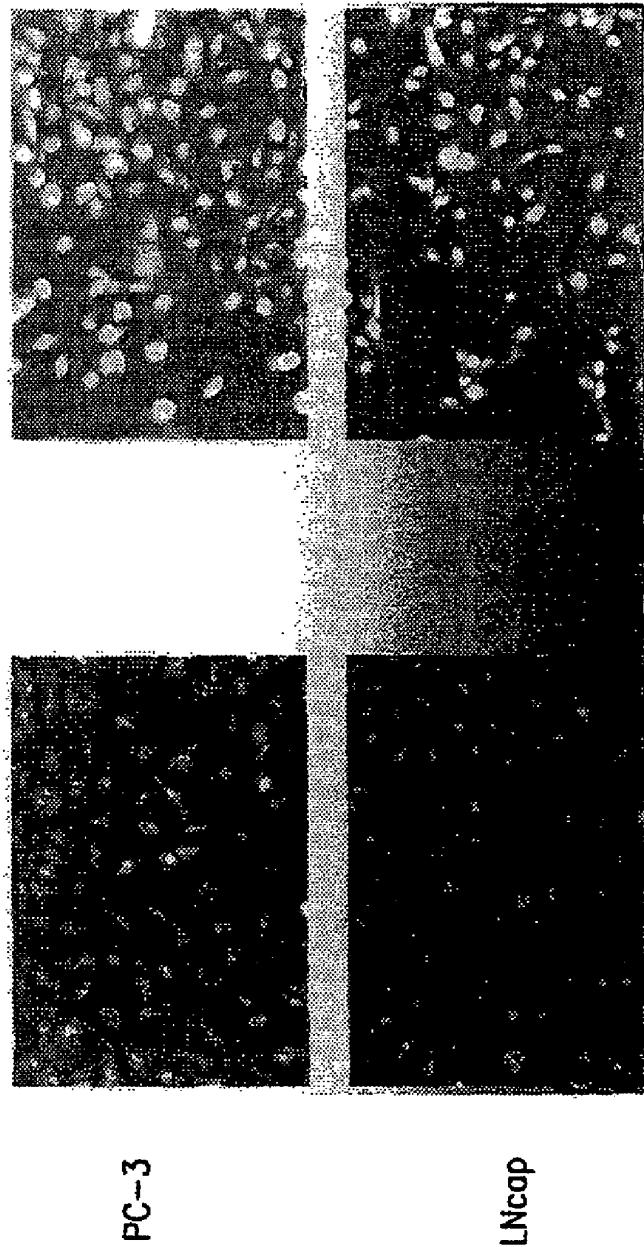


FIG. 25