



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 359 494**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/38 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02739838 .7**
(96) Fecha de presentación : **14.06.2002**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1404365**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

(54) Título: **Procedimientos y composiciones para inhibir, prevenir o reducir el crecimiento celular tumoral en los pacientes resistentes a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrogénica.**

(30) Prioridad: **15.06.2001 US 880842**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2011

(73) Titular/es: **A & G PHARMACEUTICALS, Inc.**
600 E. Lombard Street, Suite 509
Baltimore, Maryland 21202, US

(72) Inventor/es: **Serrero, Ginette**

(74) Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones para inhibir, prevenir o reducir el crecimiento celular tumoral en los pacientes resistentes a los efectos antineoplásicos de la terapia antiestrogénica.

Antecedentes de la invención

La proliferación y la diferenciación de las células en los organismos pluricelulares están sujetas a un proceso muy regulado. Una característica distintiva de las células cancerosas es la ausencia de control sobre este proceso; la proliferación y la diferenciación se desregulan, provocando un crecimiento incontrolado. Se han realizado importantes esfuerzos investigadores para mejorar la comprensión de esta diferencia entre las células normales y las células tumorales. Un área de investigación se centra en los factores de crecimiento y, más concretamente, en la estimulación autocrina del crecimiento.

Los factores de crecimiento son polipéptidos portadores de mensajes a las células sobre el crecimiento, la diferenciación, la migración y la expresión génica. Por lo general, los factores de crecimiento se producen en una célula y actúan sobre otra distinta estimulando la proliferación. Sin embargo, algunas células malignas, en cultivo, presentan una dependencia mayor o absoluta de un mecanismo autocrino de crecimiento. Las células malignas que siguen este comportamiento autocrino eluden la regulación de la producción del factor de crecimiento por otras células y, por lo tanto, no están reguladas en su crecimiento.

El estudio del control autocrino del crecimiento facilita la comprensión de los mecanismos de crecimiento celular y da lugar a importantes avances en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. Con este fin, se han estudiado una serie de factores de crecimiento, incluidos los factores de crecimiento similares a la insulina ("IGF1" e "IGF2"), el péptido liberador de gastrina ("GRP"), los factores de crecimiento alfa y beta transformantes ("TGF-a" y "TGF-b") y el factor de crecimiento epidérmico ("EGF").

La presente invención se refiere a un factor de crecimiento descubierto recientemente. Dicho factor de crecimiento fue descubierto por primera vez en el medio de cultivo de "células PC" altamente oncógeno, una variante independiente de la insulina aislada a partir de la línea celular adipógena 1246 derivada de teratoma. Se hace referencia a este factor de crecimiento como "GP88" en la presente memoria. El GP88 se ha purificado y caracterizado estructuralmente. La secuenciación de aminoácidos del GP88 indica que el GP88 presenta similitudes en la secuencia de aminoácidos con el precursor de granulina/epitelina de ratón.

Las granulinas/epitelinas ("grn/epi") son polipéptidos de 6 kDa y pertenecen a una nueva familia de polipéptidos ricos en cisteína doble. La patente US n° 5.416.192 (Shoyab *et al.*) se refiere a epitelinas de 6 kDa, particularmente epitelina 1 y epitelina 2. Según Shoyab, las dos epitelinas están codificadas por un precursor común de 63,5 kDa, que se procesa en formas menores en cuanto se sintetiza, de tal modo que los únicos productos naturales que se encuentran en las muestras biológicas son las formas de 6 kDa. Shoyab *et al.* dan a conocer que el precursor de la epitelina es biológicamente inactivo.

Contrariamente a las tesis de Shoyab *et al.*, el laboratorio de los presentes inventores ha demostrado que el precursor no siempre se procesa en cuanto se sintetiza. Los estudios, realizados en parte por el presente inventor, han demostrado que, en realidad, el precursor (es decir, el GP88) se secreta como una glicoproteína de 88 kDa con un resto de hidrato de carbono enlazado a N de 20 kDa. El análisis de la secuencia N-terminal del GP88 indica que el GP88 se inicia en el aminoácido 17 del precursor de grn/epi, lo que demuestra que los primeros 17 aminoácidos de la secuencia proteínica deducida a partir del ADNc del precursor corresponden a un péptido señal compatible con el direccionamiento para localización de la membrana o para secreción. Contrariamente a las tesis de Shoyab *et al.*, el GP88 es biológicamente activo y tiene una actividad promotora del crecimiento, particularmente como un factor de crecimiento autocrino para las células productoras.

El documento WO98/52607 identifica el GP88 como un factor de crecimiento oncógeno.

Lu *et al.* (PNAS (2001) 98:142-147) han demostrado que el GP88 modifica los efectos mitógenos de los estrógenos en las células MCF-7.

El cáncer de mama es una causa importante de morbilidad y mortalidad entre las mujeres en todo el mundo. Es conocido que los estrógenos son un estimulador importante del crecimiento celular en el cáncer de mama humano positivo para receptores de estrógeno (ER⁺) *in vivo* e *in vitro*. Aunque inicialmente los estrógenos son necesarios para el establecimiento y la proliferación de los tumores de mama, el desarrollo de tumores independientes a los estrógenos durante el curso del cáncer de mama es indicativo de mal pronóstico. Se ha postulado que el efecto mitógeno de los estrógenos en las células de cáncer de mama está mediado, por lo menos parcialmente, por factores de crecimiento autocrinos, incluidos factores de crecimiento regulados por estrógenos. Por lo tanto, la identificación y caracterización de los genes sensibles a los estrógenos, particularmente los genes que codifican los factores de crecimiento, contribuye a la comprensión de los efectos de los estrógenos en las células de cáncer de mama.

El citrato de tamoxifeno ("tamoxifeno") es un antiestrógeno no esteroide recetado habitualmente a los pacientes que sufren un cáncer de mama que ha demostrado potentes propiedades antiestrogénicas y antineoplásicas, tal como se detalla en la patente US nº 4.536.516. El tamoxifeno es un antagonista de los receptores de estrógeno que compete con el estrógeno para enlazarse a los receptores de estrógeno. Otros antiestrógenos incluyen raloxifeno, inhibidores de la aromatasa (por ejemplo, Arimidex® (anastrozol), Femera®), y los reguladores de disminución de los receptores de estrógeno (por ejemplo, Faslodex®). Los efectos antiestrogénicos del tamoxifeno pueden estar relacionados con su capacidad para competir con los estrógenos por los sitios de unión en los tejidos diana. Otros antiestrógenos, como los inhibidores de la aromatasa, inhiben o reducen la cantidad de estrógenos disponibles. Por ejemplo, los inhibidores de la aromatasa impiden la conversión de los andrógenos en estrógenos, con lo que se reduce la cantidad de estrógenos disponibles. Los reguladores de disminución de los receptores de estrógenos inhiben o reducen el número de receptores de estrógenos en la célula.

Actualmente, el tamoxifeno está disponible en comprimidos de 10 y 20 mg a través de los laboratorios AstraZeneca y Barr con el nombre comercial Nolvadex®, y está indicado para el cáncer de mama metastásico, la terapia adyuvante del cáncer de mama, el carcinoma ductal *in situ* y la reducción de la incidencia de cáncer de mama en mujeres con riesgo elevado de padecer cáncer de mama. Así, el tamoxifeno se puede utilizar para tratar y prevenir diversos tipos de cáncer, y particularmente el cáncer de mama.

Sin embargo, la administración de tamoxifeno conlleva riesgos potencialmente graves para el paciente. Por ejemplo, la administración de tamoxifeno se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de ovario. Además, algunos pacientes muestran resistencia a los efectos previsiblemente beneficiosos del tamoxifeno. Por lo tanto, la administración de tamoxifeno a un paciente resistente a sus beneficios provoca daños innecesarios en el mismo, aumentando el riesgo de que padezca cáncer de ovario y, al mismo tiempo, retrasando u obligándole a renunciar a tratamientos más eficaces.

En consecuencia, la administración de tamoxifeno se debe limitar a los pacientes que presentan más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con el mismo. La determinación precisa de si un paciente va a ser susceptible o resistente a los efectos antineoplásicos de la administración de tamoxifeno antes de iniciar dicho tratamiento puede constituir una valiosa herramienta de diagnóstico.

En la actualidad, la técnica nos muestra que la ausencia de receptores de estrógenos en un paciente se corresponde con la resistencia al tamoxifeno. Los pacientes de cáncer son sometidos rutinariamente a pruebas con el fin de detectar la presencia o ausencia de receptores de estrógenos para tratar de predecir si el paciente va a ser resistente o sensible a la terapia con tamoxifeno. Sobre la base de dichas pruebas, a los pacientes de cáncer que dan positivo a la presencia de receptores de estrógenos ("ER+" o "pacientes positivos para receptores de estrógenos") se les prescribe tamoxifeno.

Sin embargo, un número significativo de pacientes ER+ son, de hecho, resistentes al tamoxifeno. Por lo tanto, la prescripción rutinaria de tamoxifeno a los pacientes ER+ puede resultar perjudicial y hacer aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de ovario u otros tipos de cáncer.

Sumario de la invención

Se ha descubierto inesperadamente que una glicoproteína (GP88), que se expresa de una manera bien regulada en las células normales, se sobreexpresa y no está regulada en las células muy oncógenas derivadas de las células normales, que el GP88 actúa como un estimulador del crecimiento estrictamente necesario para las células oncógenas y que la inhibición de la expresión o la acción del GP88 en las células oncógenas da lugar a una inhibición de las propiedades oncógenas de las células hiperproductoras. Además, la cantidad de GP88 presente en una célula se correlaciona directamente con su oncogenicidad.

La presente invención da a conocer un anticuerpo neutralizante anti-GP88, o fragmento de unión al antígeno del mismo, o polinucleótido antisentido de GP88, en combinación con una terapia antiestrogénica, para su uso en el tratamiento del cáncer de mama en pacientes que presentan un tumor resistente a la terapia antiestrogénica.

"Neoplasia" hace referencia al crecimiento de células anormales o tumorales que persiste en ausencia del estímulo de crecimiento original. El término "efecto antineoplásico" se refiere a la propiedad de reversión o inhibición de la neoplasia. El término "cáncer" se refiere a cualquier enfermedad causada por células anormales. El término "oncogenicidad" se refiere al grado hasta el cual una célula o tejido presenta características de neoplasia.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "ER" se refiere a receptores de estrógenos, a menos que se indique lo contrario. "PR" se refiere a receptores de progesterona, a menos que se indique lo contrario.

Los términos "células positivas a GP88" o "células teñidas con GP88" se refieren a las células en las que se detecta GP88. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "células negativas a GP88" se refiere a las células en las que no se detecta GP88. El hecho de que una célula sea positiva o negativa a GP88 puede depender, en parte,

de la sensibilidad al método de detección (por ejemplo, inmunotinción, hibridación *in situ*, diagnóstico por imagen). El término “número total de células” se refiere al número total de células analizadas en una muestra biológica y puede incluir todas o algunas de las células presentes en una parte determinada de una muestra biológica.

5 El término “muestra biológica” se refiere a materia procedente del cuerpo de un animal vertebrado, que comprende de manera no limitativa, sangre, suero, plasma, orina, aspirado de pezón, líquido cefalorraquídeo, hígado, riñón, mama, hueso, médula ósea, testículos u ovarios y cerebro, colon y pulmones.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, un sujeto “resistente a” la terapia antiestrogénica es un paciente que no responde o ha reducido o limitado su respuesta a los efectos antineoplásicos de la misma.

15 El término “terapia antiestrogénica” se refiere a la administración de compuestos que impiden la formación de estrógenos o análogos de los mismos, o interfieren con la función de los estrógenos o análogos de los mismos. Se hace referencia a los ejemplos de compuestos utilizados para la terapia antiestrogénica en la presente memoria como “antiestrógenos”, y comprenden de manera no limitativa, tamoxifeno, raloxifeno, inhibidores de la aromatasas (por ejemplo, Arimidex[®], Femera[®]), e inhibidores de disminución de los receptores de estrógenos (por ejemplo, Faslodex[®]).

20 El uso del término “GP88” en la presente memoria se refiere a un precursor de epitelina/granulina en extractos celulares y fluidos extracelulares, y pretende incluir no solo el GP88 según las secuencias de aminoácidos incluidas en las figuras 8 ó 9, que proceden de ratón y de humano, sino también el GP88 de otras especies. Además, el término también incluye los derivados funcionales de los mismos que tienen componentes adicionales, como un resto de hidratos de carbono que incluye una glicoproteína u otras estructuras modificadas. También se incluye en el término “GP88” cualquier fragmento de polipéptido que presenta, por lo menos, 10 aminoácidos en las secuencias anteriores. Las secuencias de esta longitud son útiles como antígenos y para preparar conjugados inmunogénicos con portadores para la producción de anticuerpos específicos para diversos epítomos de la proteína completa. Dichos polipéptidos son útiles en la detección de dichos anticuerpos y en los métodos dirigidos a la detección de GP88 en fluidos biológicos. Es bien conocido en la técnica que los péptidos son útiles en la generación de anticuerpos para proteínas mayores. En una forma de realización de la presente invención, se muestra que se han utilizado con éxito péptidos de 12-19 aminoácidos de longitud para desarrollar anticuerpos que reconocen el GP88 de longitud completa.

35 El polipéptido según la presente invención puede existir enlazado covalente o no covalentemente a otra molécula. Por ejemplo, se puede fusionar con uno o más polipéptidos distintos a través de uno o más enlaces peptídicos, tales como glutatión-transferasa, polihistidina, proteína verde fluorescente, etiqueta myc, u otros compuestos marcados (por ejemplo, biotina).

40 El polipéptido es lo suficientemente grande para comprender un determinante o epítipo antigénicamente distinto que se puede utilizar como inmunógeno para reproducir o someter a ensayo a anticuerpos frente al GP88 o un derivado funcional del mismo.

45 Una forma de realización incluye el polipéptido sustancialmente desprovisto de otros péptidos de mamíferos. El GP88 según la presente invención se puede purificar bioquímica o inmuoquímicamente a partir de células, tejidos o fluidos biológicos. Alternativamente, el polipéptido se puede preparar por medios recombinantes en un sistema de expresión procariota o eucariota y en células del huésped.

50 Un “fragmento” de GP88 se refiere a cualquier subconjunto de la molécula que es un péptido más corto. Esto corresponde, por ejemplo, aunque sin limitarse a ello, a regiones tales como K19T y S14R para GP88 de ratón, y E19V y A14R (equivalente a K19T y S14R murino, respectivamente) para GP88 humano (véanse las figuras 8, 9A y 9B).

55 Una “variante” del GP88 se refiere a una molécula sustancialmente similar al péptido completo o a un fragmento del mismo. Dichas variantes peptídicas se pueden preparar por síntesis química directa de la variante peptídica mediante métodos conocidos en la técnica.

60 Alternativamente, se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos del péptido mediante la modificación del ADN que codifica la proteína o péptido sintetizados. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones, inserciones o sustituciones de los residuos dentro de la secuencia de aminoácidos del GP88. También se puede llevar a cabo cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución hasta llegar al constructo final, siempre y cuando el mismo posea la actividad deseada. La mutación que se realiza en el ADN que codifica la variante del péptido no debe alterar el marco de lectura y, preferentemente, no debe crear regiones complementarias que puedan producir estructuras secundarias de ARNm. En el plano genético, estas variantes se preparan por mutagénesis dirigida al sitio (8) de nucleótidos en el ADN que codifica la molécula de péptido, produciendo así el ADN que codifica la variante y, posteriormente, expresando el ADN en un cultivo celular recombinante. Típicamente, la variante presenta la misma actividad biológica cualitativa que el péptido no variante.

Un “análogo” de la proteína GP88 se refiere a una molécula no natural sustancialmente similar a la molécula completa o a un fragmento de la misma.

Los anticuerpos neutralizantes según la invención se utilizan en el tratamiento del cáncer de mama en células que presentan una mayor expresión de GP88. El término “neutralizante” se refiere a que el anticuerpo tiene la capacidad de inhibir o bloquear la actividad biológica normal del GP88, que comprenden de manera no limitativa, la capacidad del GP88 de estimular la proliferación celular, aumentar la supervivencia celular, bloquear la apoptosis o inducir el crecimiento de tumores en animales experimentales y en humanos. Se administra a un animal, incluido el ser humano, una cantidad eficaz de anticuerpo anti-GP88 por distintas vías.

Debe apreciarse que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o entorno específicos resultará evidente para el experto en la materia a partir de las enseñanzas contenidas en la presente memoria. Las figuras adjuntas, que se incorporan y que forman parte de la presente descripción, ilustran las formas de realización de la invención y, junto con la descripción, se proporcionan para explicar los principios de la misma. En los ejemplos siguientes se proporcionan los ejemplos de los productos según la presente invención y procesos para su utilización.

Breve descripción de las figuras

La figura 1A compara el nivel de expresión de la proteína GP88 en las líneas celulares 1246, 1246-3A y PC. Las células han sido cultivadas en medio DME-F12 complementado con un 2% de suero fetal bovino (FBS). Los niveles de expresión de GP88 se midieron por inmunoprecipitación y análisis de transferencia Western con el anticuerpo anti-K19T.

La figura 1B compara el nivel de expresión de ARNm de GP88 en las líneas celulares 1246, 1246-3A y PC. El ARNm para RPL32 se utiliza como control interno para cantidades iguales de carga de ARN.

La figura 1C compara la expresión de ARNm de GP88 en células 1246 (izquierda) y en las células PC (derecha) en medio sin suero y medio con suero. Los resultados muestran que la expresión de GP88 en las células 1246 es inhibida por la adición de suero fetal bovino, mientras que dicha inhibición no se observa en las células PC altamente oncógenas.

La figura 2 representa el efecto del tratamiento de las células PC altamente oncógenas con concentraciones crecientes de anticuerpo neutralizante anti-GP88.

La figura 3 representa los ratones C3H inyectados por vía subcutánea con 10^6 células PC transfectadas con GP88 antisentido (parte inferior) y con células PC de control transfectadas con vector vacío (parte superior).

La figura 4 representa los niveles de expresión de GP88 *in vivo* en los tejidos tumorales de ratones C3H y en los tejidos circundantes normales.

La figura 5 representa los niveles de expresión de ARNm de GP88 en líneas celulares de carcinoma de mama humano positivo para receptores de estrógeno y negativo para receptores de estrógeno.

La figura 6 representa el efecto de las concentraciones crecientes de GP88 en el crecimiento de la línea celular epitelial mamaria C57 de ratón.

La figura 7 representa las propiedades de crecimiento y la capacidad oncogénica de las células PC transfectadas con un vector de expresión controlado por el promotor de citomegalovirus que contienen GP88 en orientación antisentido y de las células PC transfectadas con un vector vacío.

La figura 8 representa la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos del GP88 de ratón. Se subrayan las regiones peptídicas utilizadas como antígenos para generar anticuerpos anti-GP88 K19T y S14R. La región clonada en la orientación antisentido del vector de expresión de mamíferos pCMV4 se indica entre paréntesis.

La figura 9A representa la secuencia de nucleótidos del ADNc de GP88 humano. Se indica entre paréntesis la región clonada en la orientación antisentido en el sistema de expresión de mamíferos pADNc3; y

la figura 9B representa la secuencia deducida de aminoácidos del GP88 humano. Se subraya la región E19V utilizada como antígeno para generar anticuerpos neutralizantes anti-GP88 humanos. También se indica la región A14R, equivalente a la región S14R de ratón.

La figura 10 representa la secuencia de aminoácidos del GP88 de ratón dispuesta con el fin de mostrar las 7 y media repeticiones definidas como granulinas g, f, B, A, C, D y e (derecha). Esta representación pone de manifiesto que la región K19T y S14R utilizada para generar anticuerpos GP88 para desarrollar anticuerpos neutralizantes anti-GP88 se encuentra entre dos repeticiones de epitilina/granulina, en lo que se considera una región variante. Se indica en el lado derecho la clasificación de granulinas de las repeticiones de acuerdo con Bateman y otros (6). La granulina B

y la granulina A también se definen como epitelina 2 y epitelina 1, respectivamente, según Labrador y otros, 1992 (5).

La figura 11 representa una representación esquemática de pCMV4 y un clon de ADNc de GP88 que indica los sitios de restricción utilizados para clonar ADNc de GP88 antisentido en el vector de expresión.

La figura 12 representa el entrecruzamiento de ^{125}I -rGP88 con los receptores de superficie celular de GP88 en células CCL-64. La reacción de entrecruzamiento se llevó a cabo con suberato de disuccinimidilo (DSS). Los productos de reacción se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 7%.

La figura 13 representa el entrecruzamiento de ^{125}I -rGP88 con los receptores de superficie celular de GP88 en fibroblastos 3T3, células PC y células epiteliales mamarias C57MG. Los resultados ponen de manifiesto que estas líneas celulares presentan receptores de superficie celular de GP88 de peso molecular similar a los de las células CCL-64 (figura 12).

La figura 14 representa los niveles de expresión de GP88 en células MCF 10A no oncógenas y en células epiteliales mamarias malignas humanas (MCF-7, MDA-MB-468).

La figura 15 representa que la expresión de GP88 es inhibida por la transfección de ADNc de GP88 antisentido en las células MDA-MB-468 de carcinoma de mama humano negativo para receptores de estrógeno.

La figura 16 representa el efecto del GP88 en la proliferación de las células MCF-7. La figura 16(A) representa que el GP88 estimula la síntesis de ADN de las células MCF-7 en ausencia de 17β -estradiol (E2). La figura 16(B) representa que el anticuerpo anti-GP88 inhibe específicamente el efecto mitógeno del E2. Los resultados se expresan como promedio $\pm$ desviación estándar de las determinaciones por triplicado.

La figura 17 representa el efecto de inhibir la expresión de GP88 sobre el efecto mitógeno del E2. La figura 17(A) ilustra la inhibición de la expresión de GP88 mediante transfección de ADNc de GP88 en células MCF-7. La figura 17(B) representa que la inhibición de la expresión de GP88 en células MCF-7 inhibe la actividad mitógena del E2.

La figura 18 representa que la sobreexpresión de GP88 en las células MCF-7 da lugar a células capaces de proliferar en ausencia de E2 y que son resistentes al tamoxifeno. La figura 18(A) representa la expresión de GP88 en células O4 y células MCF-7C de control. La figura 18(B) representa la proliferación de células O4 y MCF-7 de control en medio PFMEM empobrecido en estrógenos. La figura 18(C) representa una comparación de la respuesta de las células MCF-7 y las células O4 al tamoxifeno. Los resultados se expresan como promedio $\pm$ desviación estándar.

La figura 19 representa la determinación de la vía de señalización del GP88 en células MCF-7. La figura 19(A) representa el efecto del inhibidor de la MAP cinasa en el efecto mitógeno del GP88. La figura 19(B) ilustra la activación de la MAP cinasa por el GP88.

La figura 20 representa el efecto del GP88 sobre la ciclina D1 y la expresión de c-myc en células MCF-7. La figura 20(A) representa la estimulación de la expresión de ciclina D1 por parte del GP88. La figura 20(B) representa el efecto del E2 y el GP88 en la expresión de c-myc.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se hace una referencia en detalle a las formas de realización de la realización preferidas actualmente, que, junto con los ejemplos siguientes, se proporcionan para explicar los principios de la invención.

Actividad biológica del GP88

La presente invención se refiere a las composiciones de GP88 y antitumorales útiles para el tratamiento del cáncer de mama relacionado con la alteración (aumento) de la expresión de GP88. Utilizando un sistema de modelo murino constituido por tres líneas celulares, se ha demostrado que las células que sobreexpresan GP88 forman tumores. La línea celular madre 1246 es una línea celular adipogénica de ratón C3H que prolifera y se diferencia en adipocitos en un medio definido bajo una regulación estricta por parte de la insulina. Las células 1246 no pueden formar tumores en un animal singénico (ratón C3H), incluso cuando se inyectan con una elevada densidad celular. Se aisló una línea celular independiente de insulina, 1246-3A, a partir de células 1246 mantenidas en medio sin insulina. Las células 1246-3A perdieron la capacidad de diferenciarse y formar tumores cuando se inyectaron 10^6 por vía subcutánea en ratones singénicos. Se desarrolló una línea celular altamente oncógena, PC, a partir de células 1246-3A mediante una técnica de lanzadera *in vitro-in vivo*. Las células PC formaron tumores cuando se inyectaron 10^4 células en ratones singénicos.

El GP88 está sobreexpresado en las líneas celulares oncógenas independientes de la insulina en relación con la línea celular madre no oncógena dependiente de la insulina. Además, el grado de sobreexpresión del GP88 se

correlaciona positivamente con el grado de oncogenicidad de dichas células, lo que demuestra por primera vez que el GP88 es importante en la oncogénesis (figura 1). Haciendo referencia a la figura 1, dado que el GP88 es sintetizado por células, pero también se secreta en el medio de cultivo, el nivel de GP88 se determinó en lisados celulares y en el medio de cultivo (CM). Todas las células se cultivaron en un medio con nutrientes DME/F12 complementado con un 2% de suero fetal bovino. Cuando las células alcanzaron la fase de confluencia, se recogió el medio de cultivo (CM) y se prepararon los lisados celulares por incubación en tampón con detergente seguida de centrifugación a 10.000 g. El lisado celular y el medio acondicionado se normalizaron por el número de células. Las muestras de lisado celular y medio acondicionado se analizaron por transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-GP88, tal como se describe a continuación.

El desarrollo de un anticuerpo neutralizante confirmó el papel clave del GP88 en la oncogénesis. Cuando se añadió al medio de cultivo un anticuerpo anti-GP88 dirigido a la región K19T del GP88 de ratón, el crecimiento de células PC altamente oncogénicas se inhibió de un modo dependiente de la dosis (figura 2). Haciendo referencia a la figura 2, las células PC se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en medio DME/F12 complementado con fibronectina humana (2 µg/ml) y transferrina humana (10 µg/ml). Se añadieron concentraciones crecientes de fracción de IgG anti-GP88 a los pocillos después de la fijación de las células. Las células de control se trataron con concentraciones equivalentes de IgG no inmune. Tras dos días, se añadieron 0,25 mCi de ^3H -timidina por pocillo durante 6 horas. A continuación, las células se recogieron con el fin de contar la ^3H -timidina incorporada en el ADN como medida de la proliferación celular.

Además, cuando la expresión de GP88 se inhibió específicamente mediante ADNc de GP88 antisentido en células PC, la producción de GP88 se redujo y dichas células PC ya no pudieron formar tumores en ratones C3H singénicos. Además, dichas células PC recuperaron la sensibilidad a la insulina. Haciendo referencia a la figura 3 y las tablas 1 y 2, los ratones hembra C3H se inyectaron por vía subcutánea con 10^6 células PC transfectadas con GP88 antisentido (tal como se explica a continuación) o 10^6 células PC transfectadas con un vector vacío. Se controló diariamente la aparición de tumores en los ratones. Se realizaron fotografías 45 días después de la inyección de las células. Los resultados muestran que los ratones inyectados con células PC transfectadas con GP88 antisentido no desarrollan tumores, al contrario que los ratones inyectados con células PC transfectadas con un vector vacío, utilizados como control.

Tabla 1: Comparación de propiedades oncógenas de células transfectadas con GP88 antisentido, células transfectadas de control y células PC

CÉLULAS INYECTADAS	DÍA PROMEDIO DE DETECCIÓN DE TUMORES	NÚMERO DE RATONES CON TUMORES	PESO TUMORAL PROMEDIO (g)
PC	15 ± 3,0	5/5	9,0 ± 3,2
P14	15 ± 3,7	5/5	7,8 ± 2,7
ASGP88	---	0/5	---

PC: células no transfectadas de control

P-14: células PC transfectadas con vector vacío

ASGP88: células PC transfectadas con vector de expresión que contiene ADNc de GP88 antisentido

Los tumores se extirparon y se pesaron a los 45 días. -- indica sin formación de tumor

Tabla 2: Comparación de propiedades de células 1246, PC y células antisentido con GP88

Células 1246	Células PC	Células con GP88 antisentido
Sensible a insulina para el crecimiento y la diferenciación	Independiente de la insulina para deficiencia de crecimiento y diferenciación	Recuperación de sensibilidad a la insulina para el crecimiento (¿diferenciación?)
Expresión alta de receptor de insulina de superficie celular	Producción autocrina de factor relacionado con insulina	Expresión elevada de receptor de insulina de superficie celular
Expresión de GP88 baja	Expresión muy baja de receptor de insulina de superficie celular	Expresión de GP88 inhibida por antisentido
Expresión de GP88 inhibida por suero	Expresión de GP88 constitutivamente alta	
Expresión de GP88 regulada por insulina	No inhibición por suero	
No oncógeno	Expresión de GP88 constitutiva	Recuperación de regulación de insulina para expresión de GP88 endógeno
	Muy oncógeno	No oncógeno

La comparación de la expresión de GP88 indica que los niveles de GP88 *in vivo* en los tumores son mucho más elevados que en los tejidos normales (figura 4). Los ratones C3H se inyectaron con 10^6 células PC. Los ratones que presentaban un tumor fueron sacrificados. Se recogieron los tumores, los panículos adiposos y el tejido conjuntivo. Se prepararon lisados celulares por incubación en tampón que contenía detergente, tal como se ha descrito

anteriormente para la figura 1. Se determinó la concentración de proteínas de los extractos de tejido y se analizaron cantidades equivalentes de proteínas para cada muestra por SDS-PAGE seguido de análisis por transferencia Western utilizando anticuerpos anti-GP88 para medir el contenido de GP88 en los extractos de tejidos. Los resultados mostraron que el nivel de GP88 en los extractos tumorales son, por lo menos, 10 veces más elevados que en los tejidos conjuntivo y adiposo circundantes.

En las células normales (células 1246, fibroblastos), la expresión de GP88 es regulada, particularmente por la insulina, y es inhibida por el suero fetal bovino. En las células oncógenas, una pérdida de la regulación del crecimiento normal conduce a una mayor expresión de GP88 y a la adquisición de dependencia del GP88 para el crecimiento. En consecuencia, la inhibición de la expresión y/o la acción de GP88 es un enfoque efectivo para la supresión de la oncogénesis. La detección de una expresión elevada de GP88 en biopsias proporciona un análisis diagnóstico de los tumores que responden a la terapia de inhibición del GP88.

El GP88 es también un factor inductor de tumores en los cánceres humanos. Tal como se ha observado en la línea celular 1246-3A, se ha documentado (13, 14) una pérdida de la sensibilidad a la insulina (o al IGF-I) y un aumento simultáneo de la malignidad en varios cánceres humanos, que comprenden de manera no limitativa, los cánceres de mama. En concreto, el carcinoma de mama está acompañado por la adquisición de un bucle autocrino de insulina/IGF-I que es también el punto de partida del desarrollo de propiedades oncógenas en el sistema de modelo de ratón mencionado anteriormente. Además, la expresión de GP88 es elevada en los carcinomas de mama humanos. Más concretamente, haciendo referencia a la figura 5, el GP88 humano presenta niveles elevados de expresión en las células altamente malignas independientes de insulina/IGF-I positivas para receptores de estrógeno y también negativas para receptores de estrógeno. Además, el GP88 es un potente factor de crecimiento para las células epiteliales mamarias (figura 6). Los datos de la figura 5 se obtuvieron mediante el cultivo de células MCF-7, MDA-MB-453 y MDA-MB-468 en medio DME/F12 complementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS). Se extrajo el ARN de cada línea celular por el método ARNzol y se preparó poli-A⁺ ARN. La expresión de ARNm de GP88 se examinó mediante análisis por transferencia Northern con 3 µg de poli-A⁺ ARN para cada línea celular utilizando una sonda de ADNc de GP88 marcada con ³²P.

Para el análisis por transferencia Northern de la expresión de ARNm de GP88 en las células o tejidos de roedores (ratones y ratas), se utilizó una sonda de ADNc de GP88 de ratón de 311 bp de longitud a partir de los nucleótidos 551 a 862 (que corresponden a la secuencia de aminoácidos 160 a 270). El ARN se puede extraer por diversos métodos (Sambrook, Molecular Biology Manual: 35), bien conocidos por los expertos en la materia. El método seleccionado fue la extracción de ARN utilizando las soluciones ARNzol (Cinnabiochem) o Trizol (Gibco-BRL), que consisten en una extracción de una sola etapa mediante isotiocianato de guanidina y fenol-cloroformo.

Para el análisis por transferencia Northern de la expresión de ARNm de GP88 en líneas celulares humanas, se desarrolló una sonda de ADNc de GP88 humano de 672 bp correspondiente al nucleótido 1002 a 1674 (que corresponde a la secuencia de aminoácidos 334 a 558) del GP88 humano.

Con respecto a la figura 6, se cultivaron células C57MG en presencia de concentraciones crecientes de GP88 purificado a partir de medio condicionado por células PC (parte superior), y GP88 recombinante expresado en células de insecto (parte inferior), con el fin de demostrar el efecto de estimulación del crecimiento de las concentraciones crecientes de GP88 en el crecimiento de la línea celular epitelial mamaria C57MG.

También se estableció una buena correlación entre la producción autocrina de IGF-1 y el aumento de la malignidad para glioblastomas, teratocarcinomas y carcinomas de mama. En estos tipos de cáncer, la expresión de GP88 también es elevada en los tumores humanos, en comparación con los fibroblastos humanos no oncógenos y otras líneas celulares humanas. El GP88 promueve el crecimiento de las células de carcinoma mamario.

Anticuerpos anti-GP88

La presente invención da a conocer composiciones para el tratamiento del cáncer de mama en pacientes que presentan un tumor resistente a la terapia antiestrogénica relacionado con una mayor expresión de GP88. Las composiciones según la presente invención incluyen anticuerpos anti-GP88 que neutralizan la actividad biológica del GP88.

Para su uso como antígeno para el desarrollo de anticuerpos, la proteína GP88 de procedencia natural o expresada en forma recombinante o de derivado funcional de la misma, que presenta por lo menos 9 aminoácidos, se obtiene y se utiliza para inmunizar un animal para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales. Se cree que un anticuerpo puede enlazarse a una molécula si es capaz de reaccionar con la misma, enlazando la molécula con el anticuerpo. La expresión "reacción específica" se refiere a que el antígeno reacciona de un modo altamente selectivo con su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser provocados por otros antígenos.

En la presente memoria, el término "anticuerpo" comprende de manera no limitativa anticuerpos policlonales humanos y no humanos, anticuerpos monoclonales humanos y no humanos (mAb), anticuerpos quiméricos,

anticuerpos antiidiotípicos (anti-IdAb) y anticuerpos humanizados. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de sueros de animales inmunizados con un antígeno o de huevos de gallina. Los anticuerpos monoclonales ("mAb") son esencialmente poblaciones homogéneas de anticuerpos con antígenos específicos. Los mAb se pueden obtener por métodos conocidos por los expertos en la materia, tal como los descritos en la patente US nº 4.376.110. Dichos anticuerpos pueden pertenecer a cualquier clase inmunológica, incluidas IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce anticuerpos humanos y no humanos para el GP88 se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. Para la producción de una gran cantidad de mAb, el método de producción preferido actualmente es el método *in vivo*. En pocas palabras, las células de los hibridomas individuales se inyectan por vía intraperitoneal en ratones Balb/c inoculados con pristano o ratones lampiños para producir líquido ascítico con altas concentraciones del mAb deseado. El mAb se puede purificar a partir de dichos líquidos ascíticos o a partir de los sobrenadantes del cultivo mediante métodos cromatográficos estándares bien conocidos por los expertos en la materia.

El Ab monoclonal humano para GP88 humano se puede preparar mediante la inmunización de ratones transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana. El hibridoma producido mediante el uso de linfocitos de estos animales transgénicos produce inmunoglobulina humana en lugar de inmunoglobulina de ratón.

Dado que la mayor parte de los anticuerpos monoclonales se derivan de una fuente murina y otras fuentes no humanas, su eficacia clínica puede ser limitada debido a la inmunogenicidad de los mAb de roedores administrados a los seres humanos, a la débil incorporación de la función efectora y a su rápida eliminación del suero. Para evitar estos problemas, las propiedades de enlazamiento de antígeno de los anticuerpos murinos se pueden trasladar a los anticuerpos humanos mediante un proceso conocido como humanización. Un anticuerpo humanizado contiene las secuencias de aminoácidos de las 6 regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los mAb murinos precursores, que se injertan en un marco de anticuerpos humanos. El bajo contenido de secuencias no humanas en anticuerpos humanizados (de aproximadamente 5%) ha demostrado ser eficaz en la reducción de la inmunogenicidad y en el prolongamiento de la vida media del suero en humanos. Actualmente, los métodos tales como los que utilizan expresión de fagos monovalentes y estrategia de biblioteca combinatoria para la humanización de anticuerpos monoclonales están ampliamente extendidos para la humanización de diversos anticuerpos y son conocidos por los expertos en la materia. Dichos anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos desarrollados con animales transgénicos, tal como se ha descrito anteriormente, son de gran utilidad terapéutica para diversas enfermedades, que comprenden de manera no limitativa el cáncer.

Se analiza en los sobrenadantes de hibridoma y sueros la presencia de anticuerpos específicos para el GP88 mediante una serie de inmunoensayos, incluidos el ensayo por transferencia puntual e inmunoensayos estándar (EIA o ELISA), bien conocidos en la técnica. Una vez se ha identificado en un sobrenadante la presencia de un anticuerpo de interés, el mismo se puede analizar adicionalmente por transferencia Western con el fin de identificar el tamaño del antígeno al que se enlaza el anticuerpo. El experto en la materia sabe cómo preparar y analizar dichos hibridomas sin experimentación innecesaria con el fin de obtener el anticuerpo policlonal o el mAb deseados.

Los anticuerpos quiméricos presentan diferentes partes derivadas de diferentes especies animales. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede tener una región variable procedente de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su preparación son también conocidos por los expertos en la materia.

Un anticuerpo antiidiotípico ("anti-IdAb") es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos, generalmente asociados con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Se puede preparar un anti-IdAb mediante la inmunización de un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, una cepa de ratón) que la fuente del mAb, que presenta el mAb para el que se está preparando un anti-IdAb. El animal inmunizado reconoce y responde a los determinantes idiotípicos del anticuerpo de inmunización mediante la producción de anticuerpos contra estos determinantes idiotípicos (el anti-IdAb). El anti-IdAb también se puede utilizar como inmunógeno para desencadenar una respuesta inmune en otro animal, obteniéndose de este modo un así llamado anti-anti-IdAb. Dicho anti-anti-IdAb puede ser epitópicamente idéntico al mAb original que ha inducido el anti-IdAb. Así, mediante el uso de anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos con una especificidad idéntica.

De este modo, el mAb generado contra el GP88 se puede utilizar para inducir anti-IdAb humanos y no humanos en animales adecuados. Las células del bazo de dichos ratones inmunizados se utilizan para producir hibridomas secretores de un mAb anti-Id humano o no humano. Además, el mAb anti-Id se puede acoplar a un portador, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) o albúmina de suero bovino (BSA), y utilizarse para inmunizar ratones adicionales. Los sueros de estos ratones contienen anti-anti-IdAb humanos o no humanos que tienen las propiedades de enlazamiento del mAb original específico para un epítipo polipeptídico del GP88. Así, los mAb anti-Id tienen sus propios epítipos idiotípicos o idiotipos, estructuralmente similares al epítipo que se está evaluando.

El término "anticuerpo" también incluye moléculas intactas y fragmentos de las mismas, tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂, pueden unirse al antígeno. A los fragmentos de Fab y F(ab')₂ les falta el fragmento Fc de anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden presentar menos enlazamiento a tejido no

específico que un anticuerpo intacto. Dichos fragmentos se producen típicamente por escisión proteolítica, utilizando enzimas como la papaína (para generar fragmentos Fab) y la pepsina (para generar fragmentos F(ab')₂). Se apreciará que los Fab y F(ab')₂, y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención, se pueden utilizar para el tratamiento del cáncer de mama en un paciente que presenta un tumor resistente a la terapia antiestrogénica, de acuerdo con los métodos dados a conocer en la presente memoria para las moléculas intactas de anticuerpo.

Según la presente invención, los anticuerpos que neutralizan la actividad del GP88 *in vitro* se pueden utilizar para neutralizar la actividad del GP88 *in vivo* con el fin de tratar el cáncer de mama en un paciente que presenta un tumor resistente a la terapia antiestrogénica. Se trata a un sujeto, preferentemente un sujeto humano, que sufre cáncer de mama y presenta un tumor resistente a la terapia antiestrogénica, asociado con una mayor expresión de GP88, con un anticuerpo neutralizante del GP88 en combinación con una terapia antiestrogénica. Un régimen típico comprende la administración de una cantidad efectiva del anticuerpo neutralizante del GP88 junto con una terapia antiestrogénica durante un período de una o varias semanas, e incluyendo entre aproximadamente uno y seis meses. El anticuerpo neutralizante según la presente invención se puede administrar por cualesquier medios que alcancen el objetivo propuesto. Por ejemplo, la administración se puede realizar por varias vías, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas, las vías subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal y oral. La administración parenteral se puede llevar a cabo por inyección intravenosa rápida o por perfusión gradual en el tiempo. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones, que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la técnica. También se pueden preparar composiciones farmacéuticas, como comprimidos y cápsulas, según métodos de rutina. Debe apreciarse que la dosis depende de la edad, el sexo y el peso del paciente, del tipo de tratamiento simultáneo, en su caso, de la frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado. Los intervalos de dosis efectiva indicados a continuación no pretenden limitar la invención y representan únicamente los intervalos preferidos. Sin embargo, la dosis más preferida se adaptará a la persona en cuestión, como apreciará y podrá determinar el experto en la materia. La dosis total necesaria para cada tratamiento se puede administrar en dosis múltiples o en una sola dosis. Son cantidades adecuadas de anticuerpos de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal y, preferentemente, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 mg/kg.

Según la presente invención, y en relación con el anticuerpo neutralizante, se pueden utilizar anticuerpos neutralizantes del GP88 en todos los casos terapéuticos en los que es necesario inhibir la actividad biológica del GP88, a pesar de que puede no producirse necesariamente un cambio en la expresión de GP88, incluyendo los casos en los que existe una sobreexpresión de receptores de superficie celular de GP88 y esto, a su vez, da lugar a una mayor actividad biológica, o cuando existe una alteración en las vías de señalización o receptores del GP88, con la consecuencia de que las vías de señalización están siempre "activadas". Los anticuerpos neutralizantes de factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento se han utilizado con éxito para inhibir el crecimiento de células cuya proliferación depende de dichos factores de crecimiento. Éste ha sido el caso del receptor de IGF-I en células de carcinoma de mama humano y de la bombesina en el cáncer de pulmón.

Una región que permite a un antígeno desarrollar un anticuerpo neutralizante del GP88 es la región de 19 aminoácidos definida como K19T en el GP88 de ratón, y E19V en el GP88 humano, que no se encuentra dentro de las repeticiones de epitelina/granulina de 6 kDa, sino entre dichas repeticiones, específicamente entre la granulina A (epitelina 1) y la granulina C (5), en lo que se considera una región variante (véase figura 10). Sin vincularse a la teoría, se cree que la región importante para la actividad biológica del GP88 se encuentra fuera de las repeticiones de epitelina.

Componentes de GP88 antisentido

La presente invención da a conocer también componentes de GP88 antisentido. Se ha puesto de manifiesto que la expresión constitutiva de ARN antisentido en las células inhibe la expresión de más de 20 genes, y la lista sigue creciendo. Los posibles mecanismos de los efectos antisentido son el bloqueo de la traducción o la prevención del empalme, los cuales se han observado *in vitro*. La interferencia con el empalme permite el uso de secuencias intrónicas que se deberían conservar menos y, por lo tanto, dar lugar a una mayor especificidad, inhibiendo la expresión de un producto génico de una especie, pero no su homólogo en otra especie.

El término "componente antisentido" corresponde a una secuencia de ARN, así como a la correspondiente secuencia de ADN que la codifica, que es lo suficientemente complementaria a una molécula de ARNm, para la que el ARN antisentido es específico, para provocar la hibridación molecular entre el ARN antisentido y el ARNm, de tal modo que se inhibe la traducción del ARNm. Dicha hibridación puede producirse en condiciones *in vivo*. La acción del ARN antisentido da lugar a la inhibición específica de la expresión génica en las células.

Según la presente invención, la transfección de células oncógenas con ADN antisentido respecto al ADNc de GP88 inhibe la expresión endógena de GP88 y la oncogenicidad de las células transfectadas con ADNc antisentido. Este ADN antisentido debe presentar una complementariedad suficiente, de aproximadamente 18-30 nucleótidos de longitud, con el gen de GP88, para que el ARN antisentido se pueda hibridar con el gen de GP88 (o ARNm) e inhibir la expresión génica del GP88, independientemente de si dicha acción tiene lugar en el empalme, la transcripción o la

traducción. El grado de inhibición es fácilmente evaluable por parte del experto en la materia sin ninguna experimentación innecesaria a partir de la descripción de la presente memoria y, preferentemente, es suficiente para inhibir el crecimiento de las células cuya proliferación depende de la expresión de GP88. El experto en la materia apreciará que el enfoque basado en el ARN antisentido no es sino uno de entre los varios mecanismos conocidos que se pueden utilizar para bloquear la expresión de genes específicos.

Los componentes antisentido según la presente invención se pueden hibridar con cualquiera de entre varias porciones del ADNc de GP88 diana, incluida la secuencia de codificación, las regiones no traducidas en 3' o 5', u otras secuencias intrónicas, o con el ARNm de GP88. Tal como podrá comprender fácilmente el experto en la materia, la cantidad mínima de homología requerida por la presente invención es la suficiente para dar lugar a la hibridación con el ADN o ARNm de GP88 y a la inhibición de la transcripción del ADN, o de la traducción o la función del ARNm, preferentemente sin afectar la función de otras moléculas de ARNm ni la expresión de otros genes no relacionados.

El ARN antisentido se suministra a una célula por transformación o transfección a través de un vector, incluidos vectores retrovirales y plásmidos, en los que se ha insertado ADN que codifica el ARN antisentido con las secuencias reguladoras adecuadas, incluido un promotor, para dar lugar a la expresión del ARN antisentido en una célula huésped. Se ha llevado a cabo la transfección estable de diversos vectores de expresión antisentido que contienen fragmentos de ADNc de GP88 en orientación antisentido. También se pueden suministrar componentes antisentido a las células utilizando un vector retroviral. Dicho suministro también se puede alcanzar mediante liposomas.

Para la tecnología antisentido para la terapia *in vivo*, según la presente invención, se utilizan oligonucleótidos antisentido. Resultan preferidos los oligonucleótidos antisentido que tienen una longitud de 15-30 bases y secuencias hibridables con cualquiera de entre diversas partes del ADNc de GP88 diana, incluida la secuencia de codificación, las regiones no traducidas en 3' o 5', u otras secuencias intrónicas, o con el ARNm de GP88. Las secuencias para los oligonucleótidos antisentido con respecto al GP88 se seleccionan preferentemente como las que tienen los efectos antisentido más potentes. Los factores que dirigen un sitio diana para la secuencia oligonucleótida antisentido están relacionados con la longitud del oligonucleótido, la afinidad de enlace y la accesibilidad de la secuencia diana. Se pueden analizar las secuencias *in vitro* para determinar la potencia de su actividad antisentido midiendo la inhibición de la traducción proteínica del GP88 y del fenotipo relacionado con el GP88, por ejemplo, la inhibición de la proliferación celular en células en cultivo. En general, es conocido que la mayoría de las regiones del ARN (regiones no traducidas en 5' y 3', iniciación con AUG, codificación, uniones de empalme e intrones) se pueden alcanzar como dianas utilizando oligonucleótidos antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido de GP88 preferidos son los oligonucleótidos estables, que tienen una alta resistencia a las nucleasas (enzimas que pueden degradar los oligonucleótidos), poseen una farmacocinética adecuada para permitirles el transporte a los tejidos afectados en dosis no tóxicas y tienen la capacidad de atravesar membranas.

Se pueden utilizar oligonucleótidos fosforotioato antisentido. Las modificaciones del enlace fosfodiéster, así como del heterociclo o el azúcar, pueden aumentar la eficacia. Con respecto a la modificación del enlace fosfodiéster, se puede utilizar el fosforotioato. Se ha descrito un enlace fosforamidato N3'-P5' como capaz de estabilizar los oligonucleótidos frente a las nucleasas y aumentar el enlazamiento al ARN. El enlazamiento de ácidos nucleicos peptídicos (ANP) es una sustitución completa del esqueleto de ribosa y fosfodiéster y es estable frente a las nucleasas, aumenta la afinidad de enlace al ARN y no permite la escisión por parte de la RNasa H. Su estructura básica es también susceptible de modificaciones que permitan su optimización como componente antisentido. Con respecto a las modificaciones del heterociclo, ciertas modificaciones del mismo han demostrado aumentar los efectos antisentido sin interferir con la actividad de la RNasa H. Un ejemplo de dicha modificación es la modificación del tiazol C-5. Por último, también se puede plantear la modificación del azúcar. Las modificaciones de 2'-O-propil y 2'-metoxietoxi ribosa estabilizan los oligonucleótidos frente a las nucleasas en cultivo celular e *in vivo*. Los experimentos tumorales en cultivo celular e *in vivo* utilizando este tipo de oligonucleótidos dirigidos a c-raf-1 dieron lugar a una mayor potencia.

La vía de administración debe ser la que proporcione el mejor efecto antisentido, medido de acuerdo con los criterios descritos anteriormente. Los ensayos de crecimiento tumoral en cultivos celulares *in vitro* e *in vivo* utilizando oligonucleótidos antisentido han puesto de manifiesto que la administración mediada por liposomas catiónicos mediante vectores retrovirales y la administración directa son eficientes. Otro modo de administración posible consiste en el direccionamiento utilizando anticuerpos frente a marcadores de superficie celular para las células tumorales. Los anticuerpos frente al GP88 o su receptor pueden servir para este propósito.

La presente invención da a conocer composiciones para el tratamiento del cáncer de mama en un paciente que presenta un tumor resistente a la terapia antiestrogénica, que comprenden una combinación de un compuesto antiestrogénico y un antagonista del GP88. Dado que los niveles elevados de GP88 contribuyen al desarrollo de la resistencia a la terapia antiestrogénica, la coadministración de antagonistas anti-GP88 y un antiestrogénico reduce o evita la resistencia a la terapia antiestrogénica y aumenta la eficacia de la misma. Los tumores resistentes a la

terapia antiestrogénica son tumores que presentan un crecimiento independiente de los estrógenos y/o presentan niveles elevados de GP88.

Según una forma de realización de la presente invención, la terapia antiestrogénica se selecciona de entre el grupo constituido por el tamoxifeno, el raloxifeno y los inhibidores de la aromatasas, los antagonistas del GP88 se seleccionan entre anticuerpos neutralizantes o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, y anticuerpos anti-GP88 o polinucleótidos antisentido de GP88. Los antagonistas del GP88 se pueden preparar y administrar tal como se ha descrito anteriormente y tal como se describe con detalle en la patente US nº 6.309.826. Están fácilmente disponibles orientaciones sobre la administración de terapia antiestrogénica a un paciente y las mismas son conocidas por el médico responsable del tratamiento.

Debe apreciarse que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o entorno específico resultará evidente para el experto en la materia a partir de las enseñanzas contenidas en la misma. La presente invención se ilustra con mayor detalle en los ejemplos no limitativos siguientes.

Ejemplo 1

Mediación del efecto mitógeno de los estrógenos en células MCF-7 de cáncer de mama humano por factor de crecimiento derivado de células PC (GP88).

En las células positivas para receptores de estrógeno, el 17-β-estradiol (E2), un compuesto de reemplazo de estrógenos, estimula transcripcionalmente la expresión de GP88 de un modo dependiente de la dosis y la duración del tratamiento. La presente invención demuestra que el GP88 interviene en el efecto mitógeno del estradiol (E2) en las células MCF-7. El GP88 se sustituyó por E2 para estimular la síntesis de ADN. El efecto mitógeno del E2 se inhibió de un modo dependiente de la dosis mediante anticuerpos neutralizantes anti-GP88. La inhibición de la expresión de GP88 en las células MCF-7 mediante transfección antisentido también inhibió el efecto mitógeno del E2. En cambio, la sobreexpresión de GP88 en las células MCF-7 dio lugar a células que pueden proliferar en ausencia de estrógenos y resistentes al tamoxifeno. Al igual que el E2, el GP88 estimuló la actividad potenciada por mitógenos de la proteína cinasa. El GP88 podría sustituir al E2 en la estimulación de la expresión de ciclina D1. La estimulación de la ciclina D1 por parte del E2 se inhibió en un 50% mediante anticuerpos anti-GP88. En cambio, el GP88 no estimuló la expresión de c-myc, otra diana molecular del E2. La conclusión es que el GP88 autocrino afecta al efecto mitógeno del E2 mediante la estimulación de la ciclina D1.

La prueba de detección de expresión de GP88 en líneas celulares tumorales humanas indicó que el mismo estaba altamente expresado en carcinomas de mama humanos negativos para receptores de estrógeno (ER⁻). La inhibición de la expresión de GP88 en dichas células por transfección de ADNc antisentido de GP88 dio lugar a una inhibición del 90% de la incidencia de tumores y del tamaño del tumor cuando se inyectaron en ratones lampiños. Estos datos implicaron el GP88 en el mantenimiento del fenotipo tumoral. Tal como se ha indicado anteriormente, en células ER⁺ el GP88 producido en respuesta a la estimulación de los receptores de estrógenos afecta a la actividad mitógena del E2. Cuando se sobreexpresa el GP88, las células resultan independientes de los estrógenos y resistentes a los efectos antineoplásicos de los antiestrogénos.

Resultados

El GP88 estimula la síntesis de ADN de las células MCF-7 en ausencia de estrógenos

En primer lugar, se analizó si la adición de GP88 estimulaba la síntesis de ADN de las células MCF-7 mantenidas en ausencia de E2. En estas condiciones, la producción endógena de GP88 fue muy baja. Se observó un aumento en un factor de 2 de la incorporación de ³H-timidina con respecto al control (las células se mantuvieron en ausencia de E2 y GP88) (P < 0,01) a 10 ng/ml de GP88 (figura 16A). La figura 16A muestra que el GP88 estimula la síntesis de ADN de las células MCF-7 en ausencia de E2. Se colocaron en placas las células MCF-7 (10⁵ células por pocillo) en una mezcla 1:1 de DMEM y medio Ham F-12 más un 5% de FBS. Tras 48 h, el medio fue reemplazado por PFMEM, y al cabo de 24 horas por medio α-MEM sin suero. Se añadieron concentraciones crecientes de GP88 humano por triplicado al medio. Se utilizaron solo EtOH (CON) o E2 10⁻⁹ M (E2) como control positivo y negativo, respectivamente. 24 h más tarde, se añadió ³H-timidina (1 µCi/ml) durante 5 h. Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar de las determinaciones por triplicado. Se observó una estimulación máxima en un factor de 4 con 100 ng/ml de GP88 (P < 0,001), similar a la observada con E2 10⁻⁹ M. El GP88 estimuló la síntesis de ADN de otra línea celular ER⁺, la T47D. Se observó una estimulación en un factor de 2,9 ± 0,3 de la síntesis de ADN con 100 ng/ml de GP88.

El efecto mitógeno del E2 es inhibido mediante el tratamiento de las células con anticuerpos anti-GP88. Sobre la base de estos resultados, y considerando que el E2 estimula la expresión de GP88 en las células MCF-7, se determinó si el GP88 endógeno podía afectar al efecto mitógeno del E2 a través de un bucle autocrino. Para ello, en primer lugar se examinó si el tratamiento con anticuerpos anti-GP88 que bloquean el GP88 producido por las células MCF-7 inhibiría la actividad mitógena del E2. La adición de anticuerpo anti-GP88 humano purificado por afinidad inhibió de un modo dependiente de la dosis el crecimiento de las células estimuladas por el E2 (figura 16B). La figura

16B muestra que el anticuerpo anti-GP88 inhibe específicamente el efecto mitógeno del E2. Se trataron células MCF-7 con E2 10^{-9} M (E2), solo o con concentraciones crecientes de anticuerpos anti-GP88 purificados por afinidad: 50 µg/ml (Ab1), 100 µg/ml (Ab2), 200 µg/ml (Ab3) y 300 µg/ml (Ab4). Se utilizaron como controles células tratadas con E2 10^{-9} M y 300 µg/ml de IgG preinmune (preIgG) y células tratadas con 10 ng/ml de IGF-II (IGF), solas o en presencia de 300 µg/ml de anticuerpo anti-GP88 (Ab+IGF). Los resultados se expresan en la figura como promedio $\pm$ desviación estándar de las determinaciones por triplicado. Se observó una inhibición del 74% del efecto mitógeno del E2 con 300 µg/ml de anticuerpos anti-GP88 ($P < 0,003$), mientras que una concentración similar de IgG no inmune no tuvo ningún efecto. Esta concentración de anticuerpos no puso de manifiesto ninguna toxicidad celular. La adición de GP88 (200 ng/ml) restauró la proliferación de las células tratadas con anticuerpos anti-GP88. La especificidad del efecto de los anticuerpos anti-GP88 también se puso de manifiesto porque no podía inhibir el efecto estimulante del factor de crecimiento similar a la insulina II, un estimulador conocido del crecimiento de las células MCF-7. Estos resultados ponen de manifiesto que el GP88 actúa como un factor de crecimiento autocrino que afecta al efecto mitógeno del E2 en las células MCF-7.

La inhibición de la expresión de GP88 inhibe el crecimiento de células MCF-7 en presencia de E2. A continuación, se trató de determinar si la inhibición de la expresión de GP88 en las células MCF-7 impedía el efecto estimulante del crecimiento de E2. Con este fin, se examinó el efecto mitógeno del E2 en las células MCF-7, en las que se había inhibido la expresión de GP88 por transfección de ADNc antisentido de GP88. Los niveles de GP88 en dos clones antisentido representativos As13 y As22, y en células MCF-7 de control transfectadas con vector vacío (MCF-7C) se determinaron mediante análisis por transferencia Western de muestras preparadas utilizando números idénticos de células (figura 17A). La figura 17A ilustra la inhibición de la expresión de GP88 mediante transfección de ADNc de GP88 en células MCF-7. La expresión de GP88 en células antisentido (As13 y As22) y en células de control transfectadas con vector vacío (MCF-7C) se examinó por análisis por transferencia Western. Se trataron las células As13 (calle 1), AS22 (calle 2) y MCF-7C (calle 3) con E2 10^{-9} M en PFMEM. Los medios acondicionados se recogieron tras 24 horas y se normalizaron al mismo número de células (4×10^5 células) para medir la expresión de GP88. Las células AS13 mostraron una inhibición del 80% de la expresión de GP88, mientras que las AS22 mostraron una inhibición del 50% en comparación con las células MCF-7C.

A continuación, se estudió el efecto del E2 sobre la síntesis de ADN en estas células MCF-7C antisentido y de control. Un ensayo de incorporación de [3 H]timidina puso de manifiesto que el efecto estimulante del E2 en las células MCF-7C se reducía en AS13 y AS22 en correlación con el grado de inhibición de la expresión de GP88 (figura 17B). La figura 17B ilustra que la inhibición de la expresión de GP88 en las células MCF-7 inhibe la actividad mitógena del E2. El efecto mitógeno del E2 se examinó en células MCF-7C antisentido y de control. Se trataron células AS13 (barras llenas), AS22 (barras rayadas) y MCF-7C (barras vacías) con E2 10^{-9} M (E2), 100 ng/ml de GP88 recombinante (GP88) o 0,1% de EtOH solo (Con). La incorporación de 3 H-timidina se midió tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados se expresan en la figura como promedio $\pm$ desviación estándar. AS13 mostró la mayor inhibición del efecto del E2. La síntesis de ADN mediada por E2 fue solo del 25% ($P < 0,001$) en AS13 y del 60% ($P < 0,001$) en AS22, respectivamente, con respecto a la observada en las células MCF-7C. La adición de GP88 restauró la proliferación de los clones antisentido al nivel observado en las células MCF-7 de control cultivadas en presencia de E2.

La sobreexpresión de GP88 conduce a la no dependencia de los estrógenos y a la resistencia al tamoxifeno.

Sobre la base de los resultados anteriores, se examinó el efecto de la sobreexpresión constitutiva del GP88 en células MCF-7 ER⁺ sobre la respuesta a los estrógenos y al tamoxifeno. Las células MCF-7 se transfectaron con un vector de expresión pADNc3 que contenía ADNc de GP88 bajo el control del promotor de citomegalovirus. Se obtuvieron diversos clones de sobreexpresión de GP88, incluido un clon representativo denominado O4. La figura 18A muestra que las células O4 produjeron niveles elevados de GP88 en comparación con las células MCF-7C de control en medio empobrecido en E2. La figura 18A muestra la expresión de GP88 en células O4 y células MCF-7C de control. Se cultivaron células O4 y células MCF-7 de control con vector vacío en PFMEM. Los medios acondicionados se recogieron tras 24 horas para determinar la expresión de GP88.

La incorporación de timidina en las células O4 fue 2,2 veces más alta que en las células MCF-7C ($P < 0,01$), lo que demuestra la capacidad de las células O4 para proliferar en ausencia de E2 (figura 18B). La figura 18B muestra la proliferación de las células O4 y MCF-7 de control en medio PFMEM empobrecido en estrógenos. Las células se colocaron en placas por triplicado en medio PFMEM empobrecido en estrógenos. Las células se mantuvieron en ausencia de E2 (controles: Con) o se trataron durante 24 horas con E2 10^{-9} M o con 200 ng/ml de GP88. A continuación, se añadió 3 H-timidina para medir la síntesis de ADN. Los resultados se expresan como promedio $\pm$ desviación estándar. Además, no se produjo ninguna diferencia significativa entre el nivel de incorporación de timidina en las células O4 en medio empobrecido en E2 y en las células MCF-7C tratadas con GP88 o E2 ($P > 0,05$). La adición de E2 o GP88 a las células O4 no presentó ningún efecto adicional significativo, a diferencia de las células MCF-7C. En ensayos de crecimiento a largo plazo, mientras que las células MCF-7C no pudieron crecer en ausencia de E2, las células O4 proliferaron con un tiempo de duplicación de 42 h, próximo a las 36 h de tiempo de duplicación de las células MCF-7C en presencia de E2. Estos datos indican que la sobreexpresión de GP88 proporciona una ventaja de crecimiento en ausencia de E2.

Sobre la base de estos resultados, se estudió la capacidad de respuesta de las células O4 y MCF-7C al tamoxifeno. La figura 18C muestra una comparación de la respuesta de las células MCF-7 y las células O4 al tamoxifeno. Las células MCF-7C (barras llenas) y las células O4 (barras vacías) recibieron $E2\ 10^{-9}\ M$ solo o en presencia de concentraciones crecientes de tamoxifeno. También se estudiaron células MCF-7C tratadas con 200 ng/ml de GP88 humano y tamoxifeno $1\ \mu M$ (T+P). La síntesis de ADN se midió tal como se describe en la figura 16. Los resultados se expresaron como porcentaje de los valores de síntesis de ADN en las células tratadas con E2 solamente. El tamoxifeno inhibió la proliferación de las células MCF-7C de un modo dependiente de la dosis, con una inhibición del 60% del efecto del E2 para tamoxifeno 100 nM, una inhibición del 80% para tamoxifeno 500 nM y una inhibición máxima del 90% para tamoxifeno $1\ \mu M$ (figura 18C). En cambio, las células O4 mostraron una marcada disminución de respuesta al tamoxifeno en la medida en que su proliferación no resultó afectada por el tamoxifeno 100 nM, mientras que se observó únicamente una inhibición del 20% y del 55% del efecto del E2 para tamoxifeno 500 nM y $1\ \mu M$, respectivamente ($P < 0,001$). Curiosamente, la adición de GP88 a células MCF-7 redujo la inhibición de tamoxifeno del 90% al 38% ($p < 0,0001$). Estos datos muestran que el GP88 puede superar la inhibición de tamoxifeno y que el aumento de la expresión de GP88 en las células MCF-7 provoca resistencia al tamoxifeno.

Se evaluó en todas las células transfectadas el estado de otros parámetros asociados con la capacidad de respuesta a los estrógenos, tal como la expresión de los receptores de estrógenos, la activación de un elemento de respuesta a los estrógenos por parte del E2 y la estimulación de la expresión de ARNm del receptor de progesterona por parte del E2. No se observó ninguna diferencia en estos ensayos entre células antisentido, células de control y células con sobreexpresión de GP88 (datos no representados). Estos datos indican que los cambios en la respuesta proliferativa a E2 observada en las células antisentido o con sobreexpresión no se deben a una alteración general en el número o función de los ER, sino que más bien correlacionan con los cambios en la expresión de GP88.

El GP88 estimula la síntesis de ADN en las células MCF-7 a través de la vía Proteína Activada por Mitógeno cinasa ("MAP cinasa").

A continuación, se examinaron las vías de transducción de señales estimuladas por GP88 en las células MCF-7 en comparación con E2. Se puso de manifiesto que el E2 estimula la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular. Ahora se han dilucidado algunas de las dianas moleculares subyacentes. Es conocido que el E2 estimula la actividad de la MAP cinasa en las células MCF-7. Más tarde, el E2 activa la vía de c-myc y los complejos ciclina de tipo D/cdk. Estudios recientes han postulado que las vías de c-myc y ciclina D1 son activadas independientemente por el E2 en las células de cáncer de mama. Por lo tanto, se intentó determinar si el GP88 podía sustituir al E2 en la estimulación de las vías MAP cinasa, ciclina D1 y/o c-myc en las células MCF-7.

Dos enfoques pusieron de manifiesto la participación de la MAP cinasa en la mediación de la acción del GP88 en las células MCF-7. En primer lugar, el efecto estimulador del GP88 sobre la síntesis de ADN fue inhibido de un modo dependiente de la dosis por el inhibidor de MEK PD098059 (figura 19A). La figura 19A muestra el efecto del inhibidor de la MAP cinasa sobre el efecto mitógeno del GP88. Se cultivaron células MCF-7 tal como se describe en la figura 16. Las células fueron pretratadas durante 60 min con $10\ \mu M$ (PD10) o $30\ \mu M$ (PD30) de PD098059 antes de la adición de solo vehículo (Con) o de 100 ng/ml de GP88 humano recombinante solo (P). Los datos de incorporación de timidina se presentan como promedio $\pm$ desviación estándar. El efecto del GP88 resultó eliminado casi completamente por PD098059 $10\ \mu M$. La inhibición completa se observó con PD098059 $30\ \mu M$, una concentración que es conocido que inhibe completamente la actividad de la MAP cinasa en otros sistemas. En segundo lugar, utilizando un ensayo de MAP cinasa *in vitro*, se puso de manifiesto que el GP88 (200 ng/ml) provoca un aumento en un factor de tres de la actividad de la MAP cinasa en las células MCF-7 (figura 19B). Este efecto fue anulado por PD098059 ($30\ \mu M$). La figura 19B ilustra la activación de la MAP cinasa por el GP88. Se cultivaron células en medio PFMEM durante 24 horas, seguido de medio α -MEM sin suero. Las muestras examinadas fueron: células MCF-7 tratadas durante 10 minutos con 0,50 ng/ml y 200 ng/ml de GP88 humano, (calles 1-3, respectivamente); y células MCF-7 tratadas durante 10 minutos con 200 ng/ml de GP88 y PD098059 $30\ \mu M$ (calle 4). El ensayo de cinasa se llevó a cabo tal como se describe en la presente memoria. La intensidad de las bandas de MBP fosforilada se analizó por densitometría de barrido. Se utilizó una misma cantidad de sobrenadante original para comprobar la expresión de MAP cinasa (Erk1 y Erk2) como control interno para normalizar la actividad de la MAP cinasa.

El GP88 estimula la expresión de ciclina D1, pero no la de c-myc, en las células MCF-7

Se llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto del GP88 en la expresión de ciclina D1. El GP88 estimuló de un modo dependiente del tiempo la expresión de ciclina D1 en las células MCF-7 con un máximo de 4 veces superior con respecto a los controles no tratados tras 5 h (figura 20A). El efecto estimulador de la ciclina D1 fue eliminado por PD98095 de un modo idéntico a su inhibición del efecto mitógeno del GP88. La figura 20A muestra la estimulación de la expresión de ciclina D1 por parte del GP88. Se cultivaron por triplicado células MCF-7 en medio PFMEM y se sincronizaron mediante tratamiento con tamoxifeno $1\ \mu M$. El medio se reemplazó por medio fresco complementado con 200 ng/ml de GP88 solo o con PD98095 $30\ \mu M$ (parte superior) o con $E2\ 10^{-9}\ M$ (parte inferior). Las células fueron lisadas en los tiempos indicados para determinar la expresión de ciclina D1 por análisis de transferencia Western con 60 μg de lisados de células enteras utilizando anticuerpos anti-ciclina D1. Las muestras eran células MCP-7 tratadas con 200 ng/ml de GP88 a las 0 h (calle 1), 3 h (calle 2), 5 h (calle 3) y 12 h (calle 4);

células MCF-7 sin tratar a las 5 h (calle 5); células MCF-7 tratadas con 200 ng/ml de GP88 y PD08950 a las 5 h (calle 6); y células MCF-7 tratadas con $E2\ 10^{-9}$ M a las 0 h, 3 h y 5 h (calles 7-9, respectivamente).

La estimulación de la expresión de ciclina D1 por parte del GP88 estuvo acompañada por el aumento de la fosforilación y la expresión de pRb, estrictamente necesarias para la progresión de la fase G1. Tras 6 horas de tratamiento con GP88, la pRb se volvió hiperfosforilada. Tras 24 horas, toda la pRb se encontraba en forma hiperfosforilada con un aumento de 5 veces en la expresión de proteínas en comparación con las células no tratadas. Este efecto también se vio bloqueado por PD98095 (datos no representados).

A continuación, se comparó la capacidad del E2 y del GP88 para estimular la expresión de c-myc, otra diana para la acción de los estrógenos en las células MCF-7. Tal como se muestra en la figura 20B, el E2 (10^{-9} M) estimuló un rápido aumento de la expresión de c-myc en células MCF-7 desprovistas de esteroides con una inducción máxima de 4 veces en 3 horas. El nivel de inducción de c-myc por parte del E2 se mantuvo durante más de 10 horas. Por el contrario, el GP88 no ejerció ningún efecto sobre la expresión de la proteína c-myc en el mismo período de tiempo (figura 20B). La figura 20B ilustra el efecto del E2 y el GP88 sobre la expresión de c-myc. Las células MCF-7 se sincronizaron mediante tratamiento con tamoxifeno 1 μ M. A continuación, las células se trataron con $E2\ 10^{-9}$ M (parte superior) o con 200 ng/ml de GP88 (parte inferior) durante los períodos indicados. La detección por transferencia Western de la expresión de c-myc se llevó a cabo utilizando 60 μ g de lisados de células enteras y anticuerpos policlonales anti-myc.

Dado que el GP88 indujo la expresión de ciclina D1, pero no de c-myc, se determinó si el aumento de GP88 endógeno estaba implicado en la capacidad del E2 de estimular la expresión de ciclina D1. El tratamiento de las células MCF-7 con anticuerpos neutralizantes anti-GP88 (300 μ g/ml) dio lugar a una inhibición del $52 \pm 8\%$ de la estimulación de la ciclina D1 por parte del E2 5 horas después de la adición de los anticuerpos. Este grado de inhibición se mantuvo durante 12 horas después de la adición de los anticuerpos. Estos datos ponen de manifiesto que la capacidad del E2 para estimular la ciclina D1 en las células MCF-7 está mediada, por lo menos parcialmente, por el GP88 de producción endógena.

Discusión

Se ha informado anteriormente de que las células de carcinoma mamario humano ER^+ expresan GP88 y que el E2 estimula la expresión de GP88 de un modo dependiente de la dosis y el tiempo. En la presente memoria, se demuestra que el GP88 afecta al efecto estimulante del crecimiento del E2. También se pone de manifiesto que el GP88 estimula la proliferación de las células MCF-7 y T47D de cáncer de mama humano mantenidas en ausencia de E2. A continuación, se ha puesto de manifiesto que el bloqueo de la vía autocrina del GP88 con anticuerpos anti-GP88 inhibe el efecto mitógeno del E2. Este efecto fue específico para el GP88, dado que los anticuerpos no pudieron inhibir el efecto mitógeno de IGF-II. La participación del GP88 en el efecto mitógeno del E2 se demostró adicionalmente al ponerse de manifiesto que la inhibición de la expresión de GP88 por la transfección de ADNc antisentido reducía el efecto mitógeno del E2 sobre las células MCF-7 en correlación con el grado de inhibición de la expresión de GP88. La adición de GP88 exógeno restauró la proliferación de estas células antisentido. Además, el aumento de la expresión de GP88 en las células MCF-7 dio lugar a células que pueden proliferar en ausencia de E2 y resistentes al tamoxifeno. El hecho de que no se produjera ningún cambio en otros parámetros de la capacidad de respuesta del E2, tal como la expresión de ER, la activación del gen reportero luciferasa de respuesta a estrógenos, o la estimulación de la expresión de receptores de progesterona, indica que la alteración del efecto mitógeno del E2 en las células transfectadas no se debía a un cambio en los receptores de E2, sino específicamente a un cambio en la expresión de GP88.

Estos resultados ponen de manifiesto que el GP88 aumenta la expresión de ciclina D1, modificando el efecto mitógeno del E2 en las células de cáncer de mama humano. Confirmando esta hipótesis, el E2 inhibió la estimulación de la expresión de ciclina D1 en un 52% en las 5-12 horas posteriores al tratamiento de las células MCF-7 con anticuerpos neutralizantes anti-GP88. Como conclusión, los estudios descritos en la presente memoria identifican el GP88 como un nuevo mediador, por lo menos en parte, del efecto mitógeno del E2 en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano.

La descripción anterior y las figuras adjuntas son únicamente ilustrativas de las formas de realización ejemplificativas que pueden alcanzar las características y ventajas de la presente invención. Las formas de realización descritas con detalle en la presente memoria no se proporcionan de manera limitativa. La invención se puede modificar con el fin de incorporar cualquier cantidad de variaciones, modificaciones, sustituciones o disposiciones equivalentes no descritas en la presente memoria, pero que están comprendidas en el espíritu y el alcance de la presente invención. La invención está limitada únicamente por el alcance de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo neutralizante anti-GP88, o fragmento de unión al antígeno del mismo, o polinucleótido antisentido de GP88, en combinación con una terapia antiestrogénica, para su utilización en el tratamiento del cáncer de mama en pacientes que presentan un tumor resistente a la terapia antiestrogénica.
- 10 2. Anticuerpo neutralizante anti-GP88, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en combinación con una terapia antiestrogénica, para su utilización en el tratamiento del cáncer de mama en pacientes que presentan un tumor resistente a la terapia antiestrogénica según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento está humanizado o quimerizado.
- 15 3. Anticuerpo neutralizante anti-GP88, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en combinación con una terapia antiestrogénica, para su utilización en el tratamiento del cáncer de mama en pacientes que presentan un tumor resistente a la terapia antiestrogénica según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento es monoclonal.
- 20 4. Anticuerpo neutralizante anti-GP88, o fragmento de unión al antígeno del mismo, o polinucleótido antisentido de GP88, en combinación con una terapia antiestrogénica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tumor de cáncer de mama es un tumor de cáncer de mama positivo para receptores de estrógeno.
5. Anticuerpo neutralizante anti-GP88, o fragmento de unión al antígeno del mismo, o polinucleótido antisentido de GP88, en combinación con una terapia antiestrogénica, según la reivindicación 4, en el que dicha terapia antiestrogénica se selecciona de entre el grupo constituido por tamoxifeno, raloxifeno e inhibidores de la aromatasa.

PRODUCCIÓN DE GP88 POR PARTE DE CÉLULAS ONCÓGENAS Y NO ONCÓGENAS

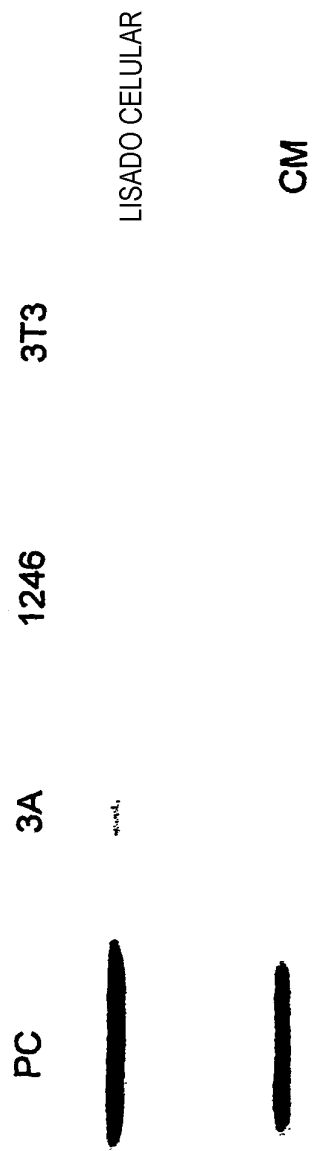


FIG.1A



FIG.1B

EXPRESIÓN DE ARNm DE GP88 EN DIVERSAS CONDICIONES DE CULTIVO

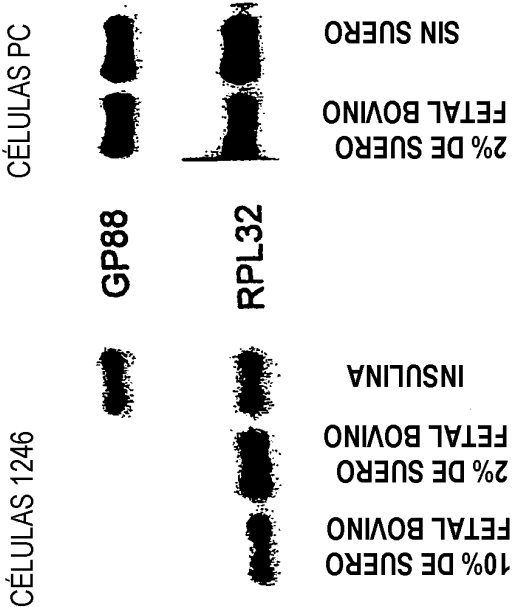


FIG.1C

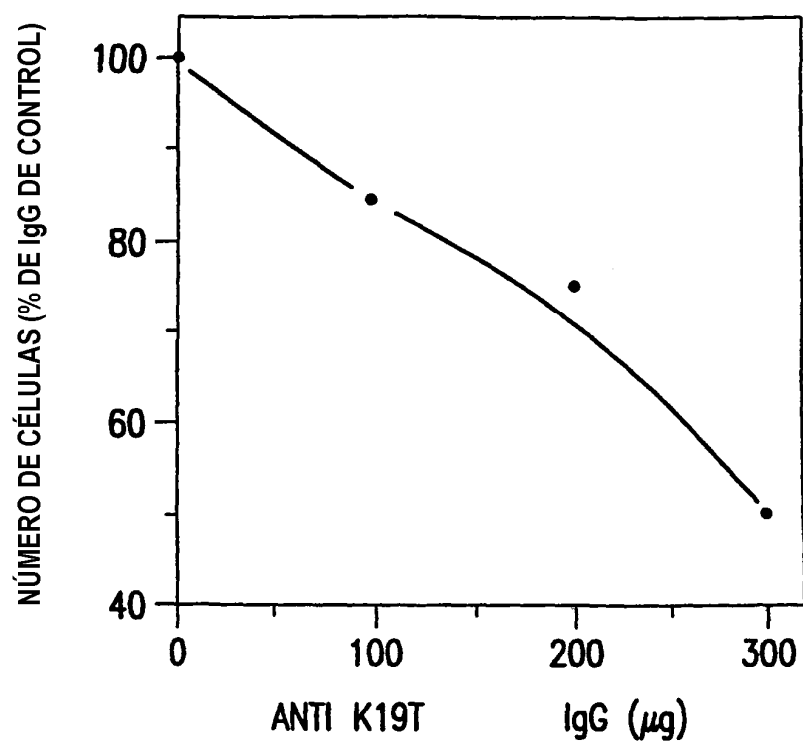


FIG.2

**AUSENCIA DE FORMACIÓN DE TUMOR EN RATONES C3H POR INHIBICIÓN DE
LA EXPRESIÓN DE GP88**

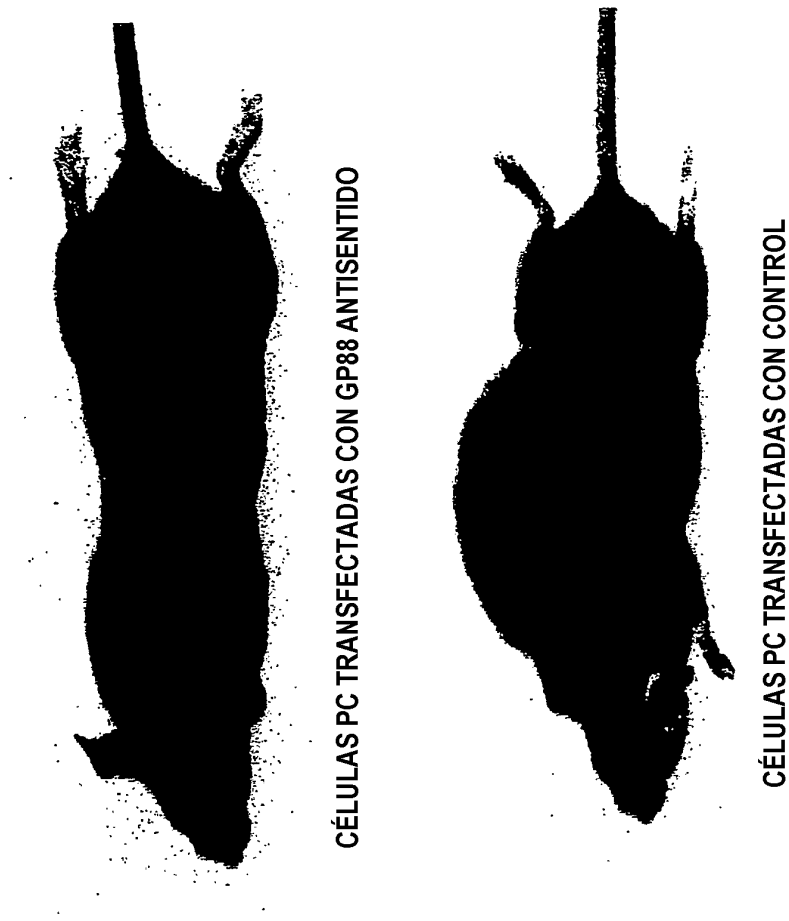


FIG.3

EXPRESIÓN DE PROTEÍNA GP88 EN LOS TEJIDOS TUMORALES Y CIRCUNDANTES

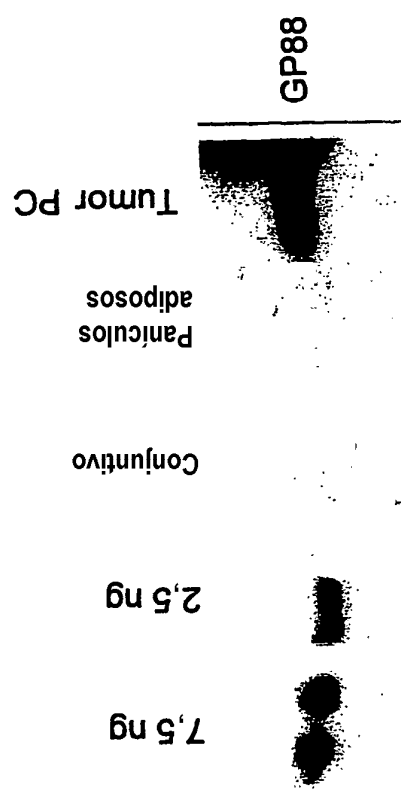


FIG.4

**EXPRESIÓN DE ARNm EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO
DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE ESTRÓGENOS**

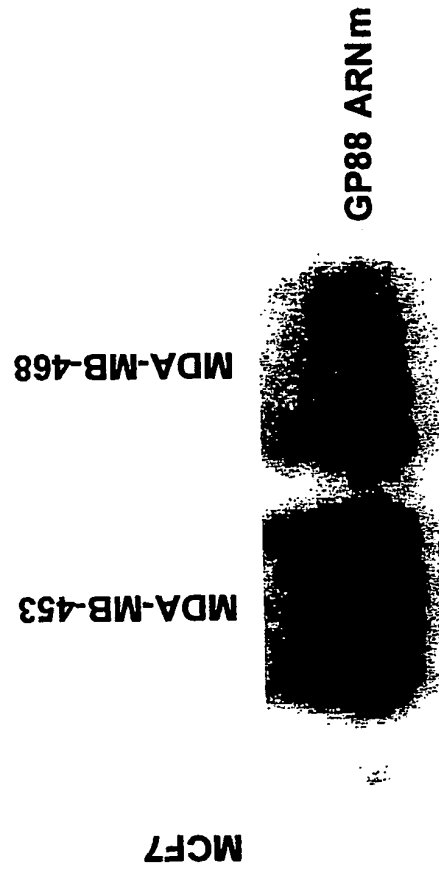


FIG.5

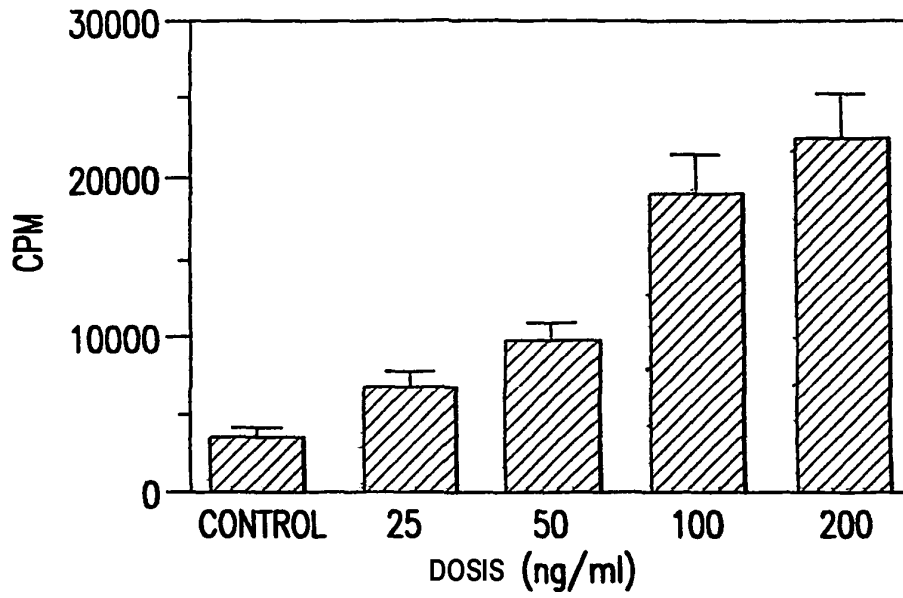


FIG. 6A

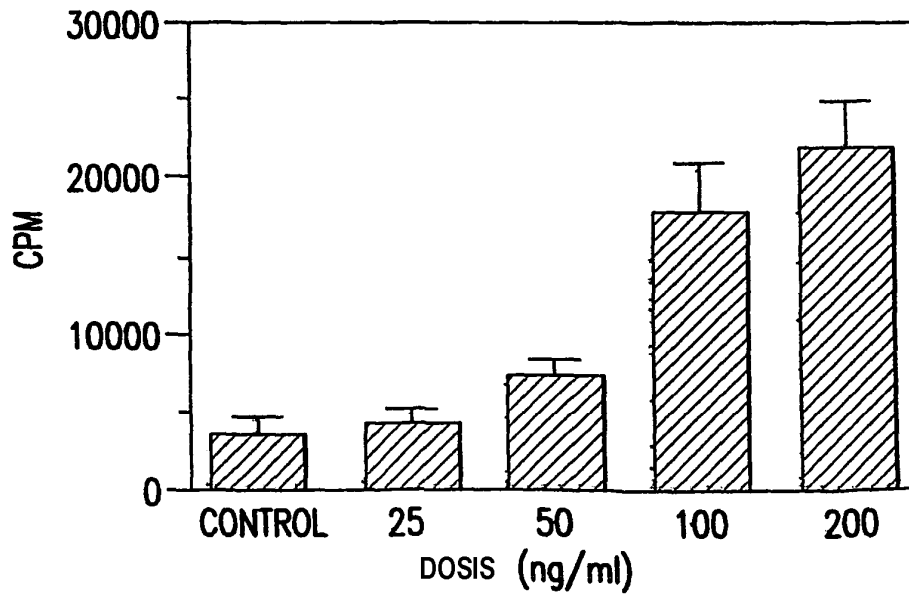


FIG. 6B

EXPRESIÓN DE GP88 EN CÉLULAS PC
TRANSFECTADAS ANTISENTIDO Y DE CONTROL

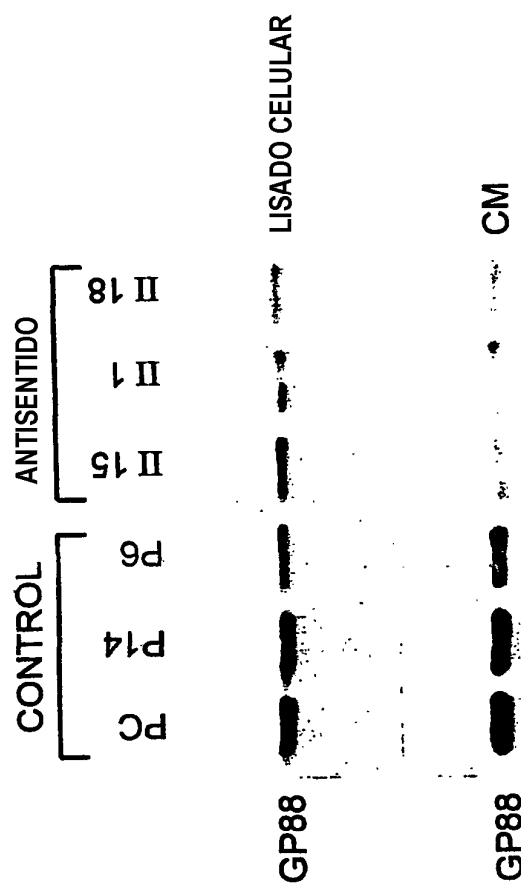


FIG.7

ADNc de GP88 de ratón

C GGA CCC CGA CGC AGA CAG ACC ATG TGG GTC CTG ATG AGC TGG CTG	46
M W V L M S W L	8
GCC TTC GCG GCA GGG CTG GTA GCC GGA ACA CAG TGT CCA GAT GGG CAG	94
A F A A G L V A G T Q C P D G Q	24
TTC TGC CCT GTT GCC TGC TGC CTT GAC CAG GGA GGA GCC AAC TAC AGC	142
F C P V A C C L D Q G G A N Y S	40
TGC TGT AAC CCT CTT CTG GAC ACA TGG CCT AGA ATA ACG AGC CAT CAT	190
C C N P L L D T W P R I T S H H	56
CTA GAT GGC TCC TGC CAG ACC CAT GGC CAC TGT CCT GCT GGC TAT TCT	238
L D G S C Q T H G H C P A G Y S	72
TGT CTT CTC ACT GTG TCT GGG ACT TCC AGC TGC TGC CCG TTC TCT AAG	286
C L L T V S G T S S C C P F S K	88
GGT GTG TCT TGT GGT GAT GGC TAC CAC TGC TGC CCC CAG GGC TTC CAC	334
G V S C G D G Y H C C P Q G F H	104
TGT AGT GCA GAT GGG AAA TCC TGC TTC CAG ATG TCA GAT AAC CCC TTG	382
C S A D G K S C F Q M S D N P L	120
GGT GCT GTC CAG TGT CCT GGG AGC CAG TTT GAA TGT CCT GAC TCT GCC	430
G A V Q C P G S Q F E C P D S A	136
ACC TGC TGC ATT ATG GTT GAT GGT TCG TGG GGA TGT TGT CCC ATG CCC	478
T C C I M V D G S W G C C P M P	152
CAG GCC TCT TGC TGT GAA GAC AGA GTG CAT TGC TGT CCC CAT GGG GCC	526
Q A S C C E D R V H C C P H G A	168
TCC TGT GAC CTG GTT CAC ACA CGA TGC GTT TCA CCC ACG GGC ACC CAC	574
S C D L V H T R C V S P T G T H	184
ACC CTA CTA AAG AAG TTC CCT GCA CAA AAG ACC AAC AGG GCA GTG TCT	622
T L L K K F P A Q K T N R A V S	200
TTG CCT TTT TCT GTC GTG TGC CCT GAT GCT AAG ACC CAG TGT CCC GAT	670
L P F S V V C P D A K T Q C P D	216

FIG.8A

ADNc de GP88 de ratón (continuación)

GAT TCT ACC TGC TGT GAG CTA CCC ACT GGG AAG TAT GGC TGC TGT CCA	718
D S T C C E L P T G K Y G C C P	232
ATG CCC AAT GCC ATC TGC TGT TCC GAC CAC CTG CAC TGC TGC CCC CAG	766
M P N A I C C S D H L H C C P Q	248
GAC ACT GTA TGT GAC CTG ATC CAG AGT AAG TGC CTA TCC AAG AAC TAC	814
D T V C D L I Q S K C L S K N Y	264
ACC ACG GAT CTC CTG ACC AAG CTG CCT GGA TAC CCA GTG AAG GAG GTG	862
T T D L L T K L P G Y P V K E V	280
AAG TGC GAC ATG GAG GTG AGC TGC CCT GAA GGA TAT ACC TGC TGC CGC	910
K C D M E V S C P E G Y T C C R	296
CTC AAC ACT GGG GCC TGG GGC TGC TGT CCA TTT GCC AAG GCC GTG TGT	958
L N T G A W G C C P F A K A V C	312
TGT GAG GAT CAC ATT CAT TGC TGC CCG GCA GGG TTT CAG TGT CAC ACA	1006
C E D H I H C C P A G F Q C H T	328
GAG AAA GGA ACC TGC GAA ATG GGT ATC CTC CAA GTA CCC TGG ATG AAG	1054
E K G T C E X G I L Q V P W M <u>K</u>	344
AAG GTC ATA GCC CCC CTC CGC CTG CCA GAC CCA CAG ATC TTG AAG AGT	1102
<u>K V I A P L R L P D P Q I L K S</u>	360
GAT ACA CCT TGT GAT GAC TTC ACT AGG TGT CCT ACA AAC AAT ACC TGC	1150
<u>D T</u> P C D D F T R C P T N N T C	376
TGC AAA CTC AAT TCT GGG GAC TGG GGC TGC TGT CCC ATC CCA GAG GCT	1198
C K L N S G D W G C C P I P E A	392
GTC TGC TGC TCA GAC AAC CAG CAT TGC TGC CCT CAG GGC TTC ACA TGT	1246
V C C S D N Q H C C P Q G F T C	408
CTG GCT CAG GGG TAC TGT CAG AAG GGA GAC ACA ATG GTG GCT GGC CTG	1294
L A Q G Y C Q K G D T M V A G L	424
GAG AAG ATA CCT GCC CGC CAG ACA ACC CCG CTC CAA ATT GGA GAT ATC	1342
E K I P A R Q T T P L Q I G D I	440

FIG.8B

ADNc de GP88 de ratón (continuación)

GGT TGT GAC CAG CAT ACC AGC TGC CCA GTA GGG CAA ACC TGC TGC CCA	1390
G C D Q H T S C P V G Q T C C P	456
AGC CTC AAG GGA AGT TGG GCC TGC TGC CAG CTG CCC CAT GCT GTG TGC	1438
S L K G S W A C C Q L P H A V C	472
TGT GAG GAC CGG CAG CAC TGT TGC CCG GCC GGG TAC ACC TGC AAC GTG	1486
C E D R Q H C C P A G Y T C N V	488
AAG GCG AGG ACC TGT GAG AAG GAT GTC GAT TTT ATC CAG CCT CCC GTG	1534
K A R T C E K D V D F I Q P P V	504
CTC CTG ACC CTC GGC CCT AAG GTT GGG AAT GTG GAG TGT GGA GAA GGG	1582
L L T L G P K V G N V E C G E G	520
CAT TTC TGC CAT GAT AAC CAG ACC TGT TGT AAA GAC AGT GCA GGA GTC	1630
H F C H D N Q T C C K D S A G V	536
TGG GCC TGC TGT CCC TAC CTA AAG GGT GTC TGC TGT AGA GAT GGA CGT	1678
W A C C P Y L K G V C C R D G R	552
CAC TGT TGC CCC GGT GGC TTC CAC TGT TCA GCC AGG GGA ACC AAG TGT	1726
H C C P G G F H C <u>S A R G T K C</u>	568
TTG CGA AAG AAG ATT CCT CGC TGG GAC ATG TTT TTG AGG GAT CCG GTC	1774
<u>L R K K I P R</u> W D M F L R D P V	584
CCA ACA CCG CTA CTG TAA GGA AGG GCT ACA GAC TTA AGG AAC TCC ACA	1822
P R P L L *	589
GTC CTG GGA ACC CTG TTC CGA GGG TAC CCA CTA CTC AGG CCT CCC TAG	1870
CGC CTC CTC CCC TAA CGT CTC CCC GGC CTA CTC ATC CTG AGT CAC CCT	1918
ATC ACC ATG GGA GGT GGA GCC TCA AAC TAA AAC CTT CTT TTA TGG AAA	1966
GAA GGC TGT GGC CAA AAG CCC CGT ATC AAA CTG CCA TTT CTT CGG GTT	2014
TCT GTG GAC CTT GTG GCC AGG TGC TCT TCC CGA GCC ACA GGT GTT CTG	2062
TGA GCT TGC TTG TGT GTG TGT GCG CGT GTG CGT GTG TTG CTC <u>GAA TAA</u>	2110
<u>AGT</u> TTG TAC GCT TTC TGA AAA AAA AAA	2137

FIG.8C

Secuencia de nucleótidos de precursor de granulina/epitelina (GP88 humano).
Human Granulin Genbank M75161\$

```

[Cgcaggcaga ccatgtggac cttggtgagc tgggtggcct taacagcagg gctggtggct
ggaacgcggt gcccagatgg tcagttctgc cctgtggcct gctgcctgga ccccgaggga
gccagctaca gctgctgccg tccccttctg gacaaatggc ccacaacact gagcaggcat
ctgggtggcc cctgccaggt tgatgcccac tgctctgccg gccactcctg catctttacc
gtctcagggg cttccagttg ctgccccttc ccagaggccg tggcatgcgg ggatggccat
cactgctgcc cacggggcct cactgcagt gcagacggga gatcctgctt ccaaagatca
ggtaacaact ccgtgggtgc catccagtgc cctgatagtc agttcgaatg cccggacttc
tccacgtgct gtgttatggt cgatggctcc tgggggtgct gccccatgcc ccaggcttcc
tgctgtgaag acaggggtgca ctgctgtccg cacgggtgcct tctgcgaect ggttcacacc
cgctgcatca caccacggg caccaccccc ctggcaaaga agctccctgc ccagaggact
aacagggcag tggccttgtc cagctcggtc atgtgtccgg acgcacggtc ccggtgccct
gatggttcta cctgctgtga gctgcccagt gggaagtatg gctgctgccc aatgcccac
gccacctgct gctccgatca cctgcactgc tgcccccaag acactgtgtg tgacctgatc
cagagtaagt gcctctccaa ggagaacgct accacggacc tcctcactaa gctgcctgcg
cacacagtgg gcgatgtgaa atgtgacatg gaggtgagct gccagatgg ctatacctgc
tgccgtctac agtcgggggc ctggggctgc tgccctttta cccaggctgt gtgctgtgag
gaccacatac actgctgtcc cgcggggttt acgtgtgaca cgcagaaggg tacctgtgaa
caggggcccc accaggtgcc ctggatggag aaggccccag ctcacctcag cctgccagac
ccacaagcct tgaagagaga tgtcccctgt gataatgtca gcagctgtcc ctctccgat
acctgctgcc aactcacgtc tggggagtgg ggctgctgtc caatcccaga ggctgtctgc
tgctcggacc accagcactg ctgccccag cgatacacgt gtgtagctga ggggcagtgt
cagcgaggaa gcgagatcgt ggctggactg gagaagatgc ctgcccgcg cggttcctta
tcccaccca gagacatcgg ctgtgaccag cacaccagct gcccggtggg cggaacctgc
tgcccagacc aggggtgggag ctgggcctgc tgccagttgc cccatgctgt gtgctgcgag
gatcggcagc actgctgccc ggctggctac acctgcaacg tgaaggctcg atcctgcgag
aaggaagtgg tctctgcccc gcctgccacc ttcttgcccc gtagccctca cgtgggtgtg
aaggacgtgg agtgtgggga aggacacttc tgccatgata accagacctg ctgccgagac
aaccgacagg gctgggcctg ctgtccctac gccaggggcg tctgttgtgc tgatcggcgc
cactgctgtc ctgctggctt ccgctgcgca cgcaggggta ccaagtgtt gcgcagggag
gccccgcgct gggacgcccc tttgagggac ccagccttga gacagctgct gtgagggaca
gtactgaaga ctctgcagcc ctcgggaccc cactcggagg gtgccctctg ctcaggcctc
gtactgaaga ctctgcagcc ctcgggaccc cactcggagg gtgccctctg ctcaggcctc
cctagcacct cccctaacc aaattctccc tggacccat tctgagctcc ccatcaccat
gggaggtggg gcctcaatct aaggcccttc cctgtcagaa ggggggtttag gcaaaagccc
attacaagct gccatccct cccggttca gtggaccctg tggccagggt ctttcccta
tccacagggg tgtttgtgtg ttgggtgtgc tttcaataaa gtttgtcact ttctt*

```

FIG.9A

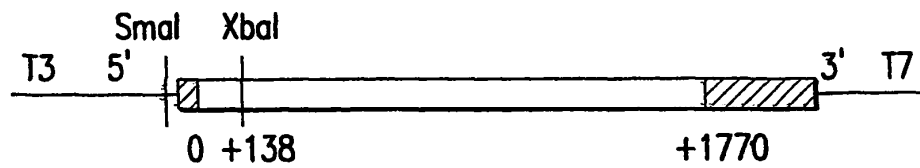
Secuencia de aminoácidos de precursor de granulina/epitelina (GP88 humano).

MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRP
 LLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRG
 FHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCED
 RVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDG
 STCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATDILLTYLPA
 HTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGT
 CEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIP
 EAVCCSDHQHCCPQRYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRGSLSHPRDIGCDQHTSC
 PVGGTCCPSQGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL
 ARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYAQGVCCADRRHCCPAGFRCA
RRGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL*

FIG.9B

FIG. 10

GP88 CLON DE ADNc en SK



ESTRUCTURA DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pCMV₄

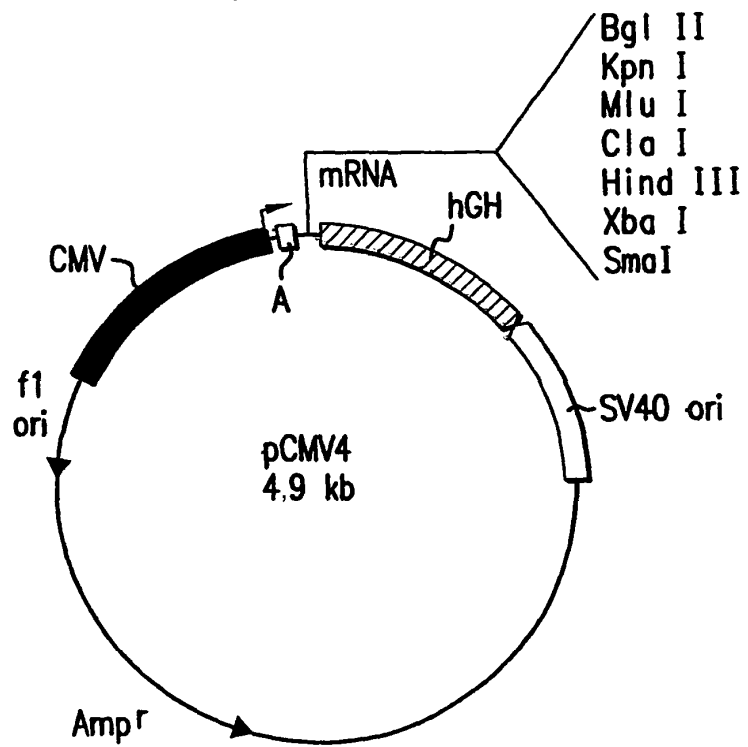


FIG.11

ENTRECruzAMIENTO DE ^{125}I -rGP88 CON CÉLULAS CCL64

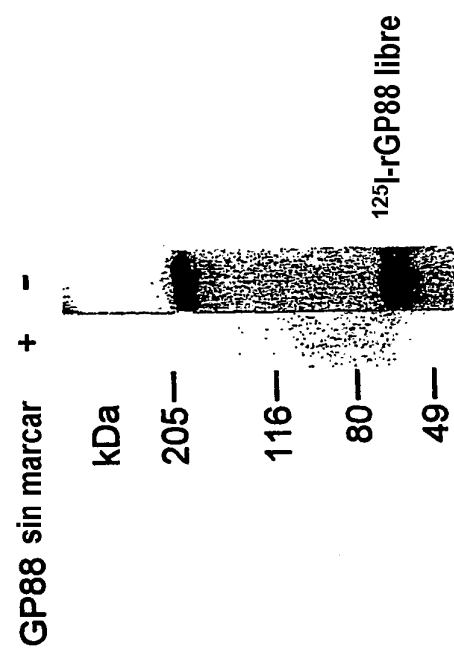
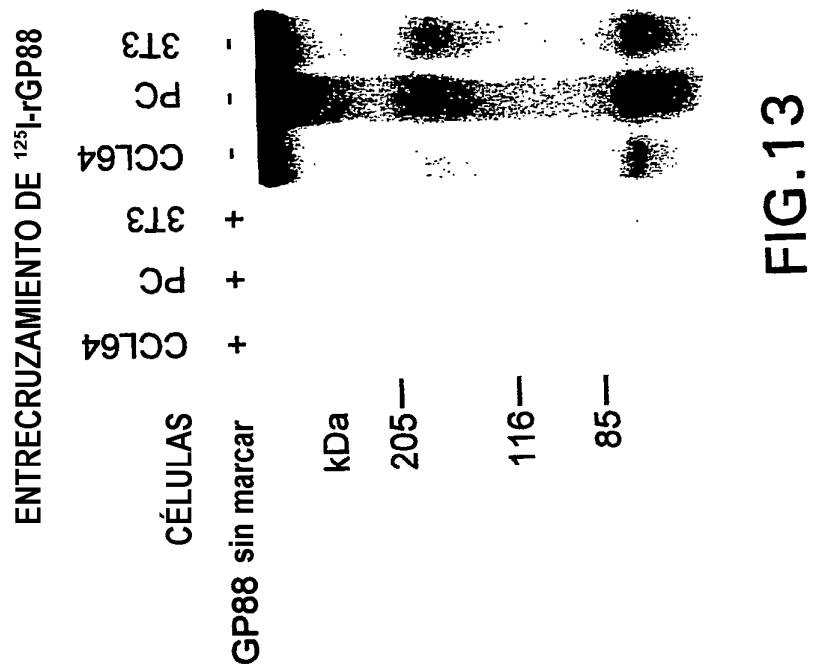


FIG.12



**EXPRESIÓN DE GP88 EN CÉLULAS EPITELIALES
MAMARIAS HUMANAS NO ONCÓGENAS (MCF 10A)
Y MALIGNAS (MCF-7, MDA-468)**

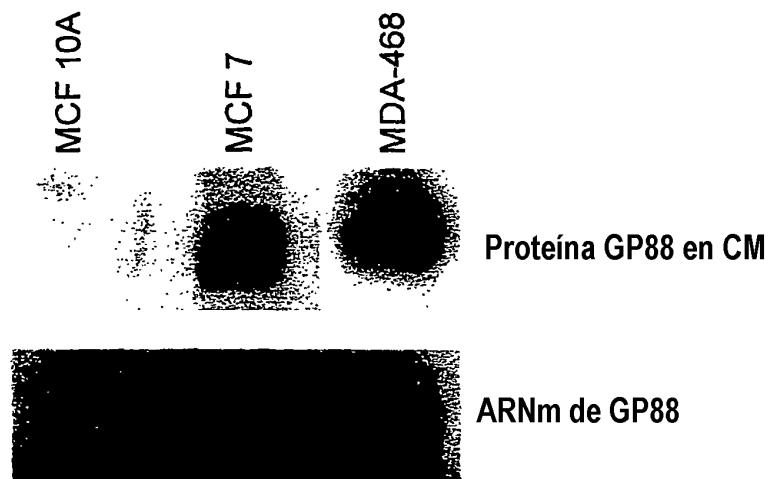


FIG. 14

**LA EXPRESIÓN DE GP88 ES INHIBIDA POR LA
TRANSFECCIÓN DE ADNc DE GP88 ANTISENTIDO
EN CARCINOMA DE MAMA HUMANO MDA-468**

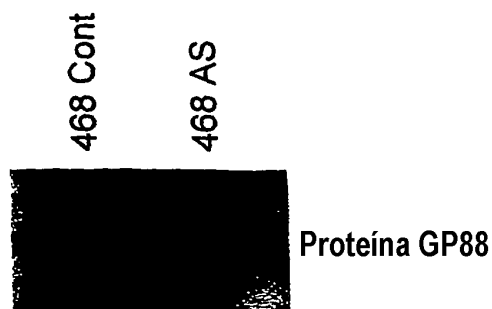


FIG. 15

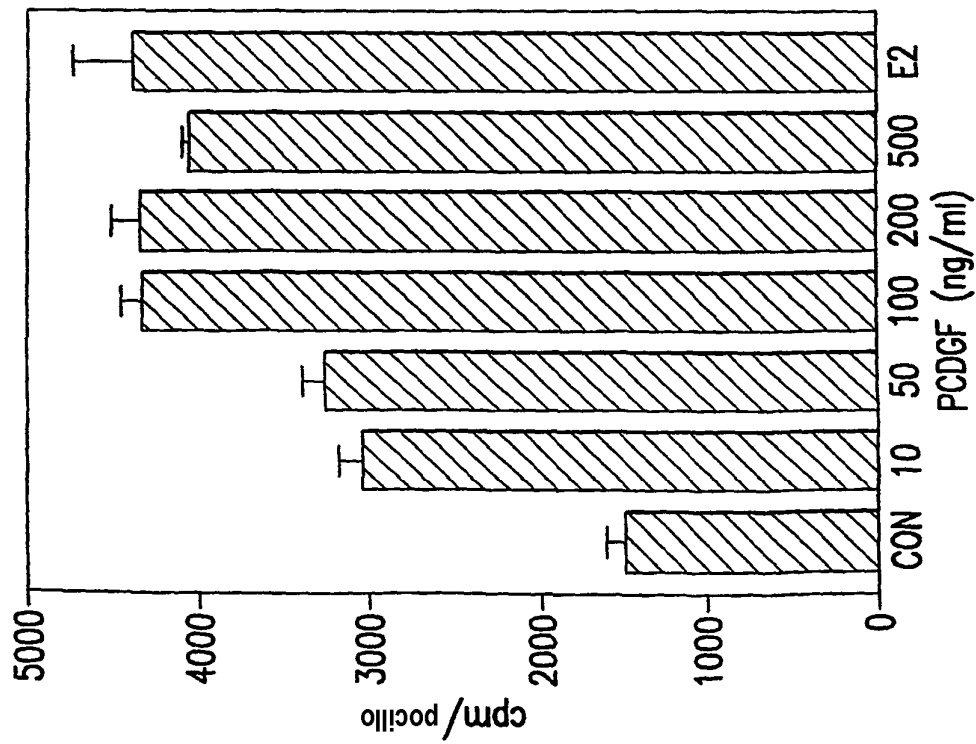


FIG. 16A

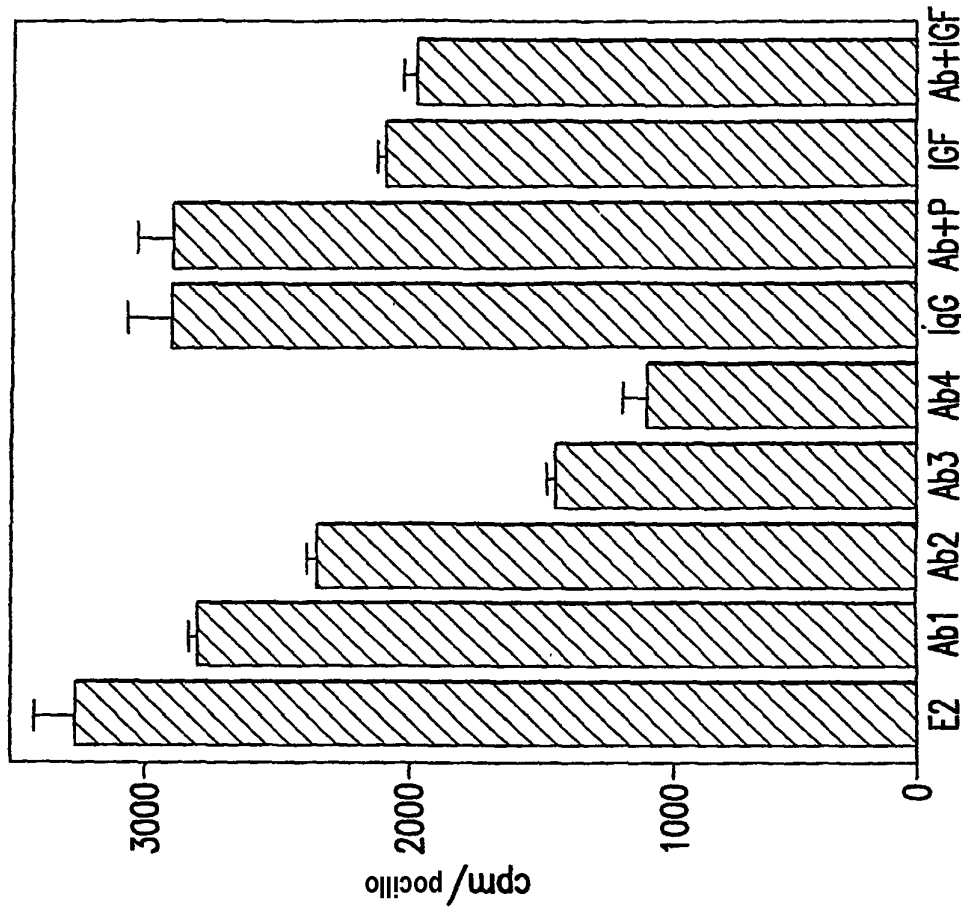


FIG. 16B

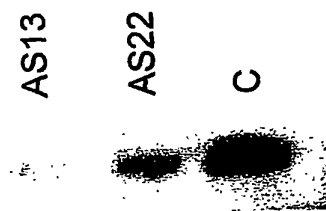


FIG.17A

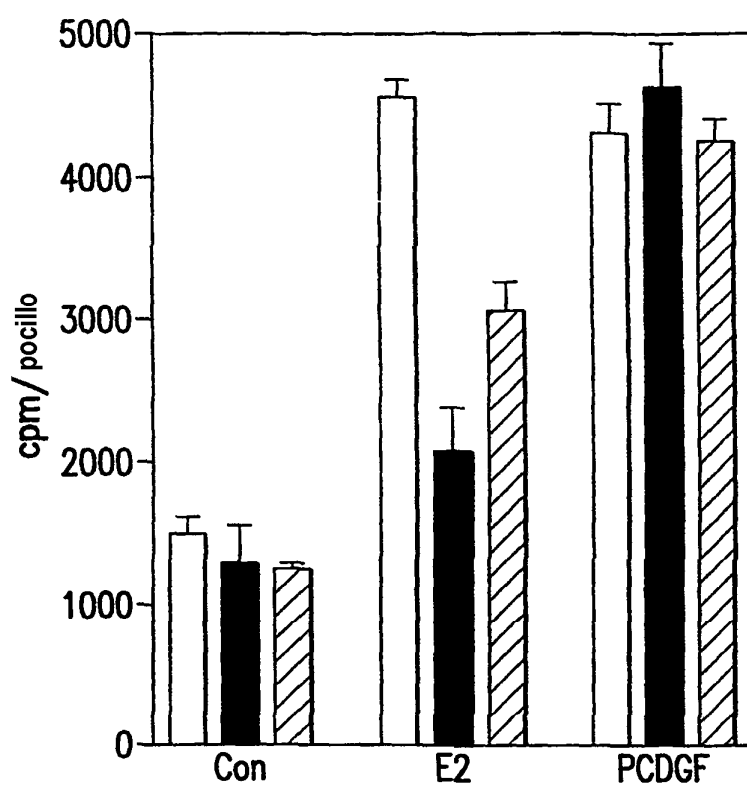


FIG.17B

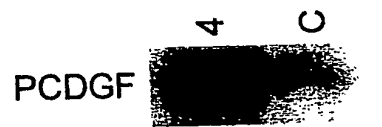
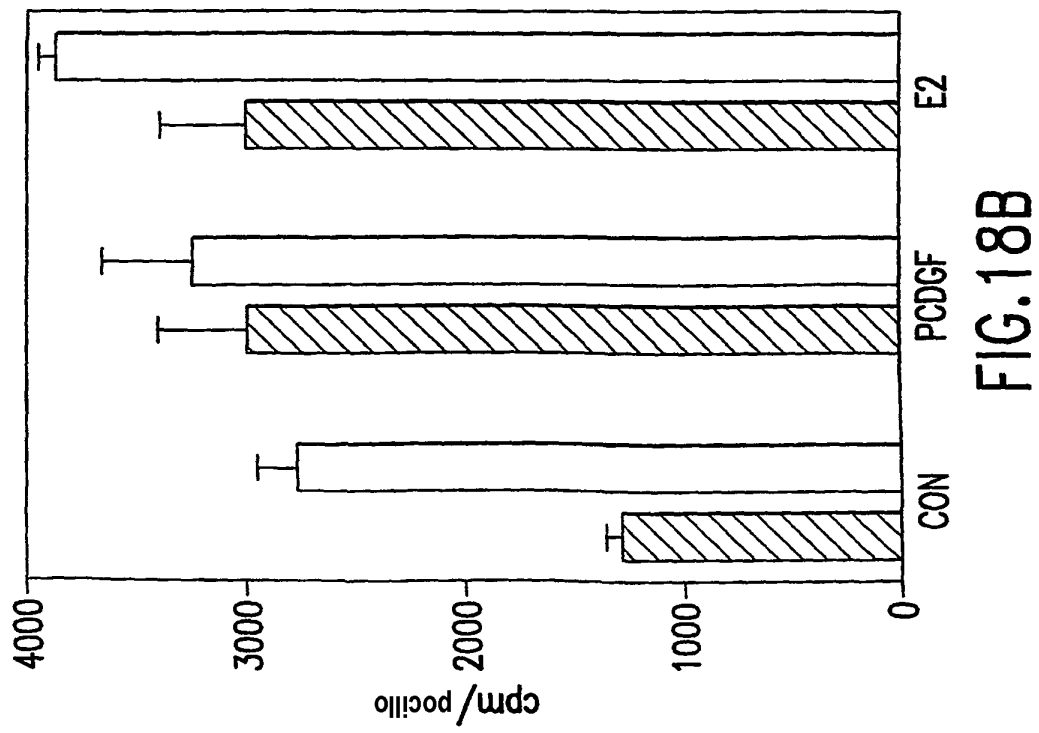
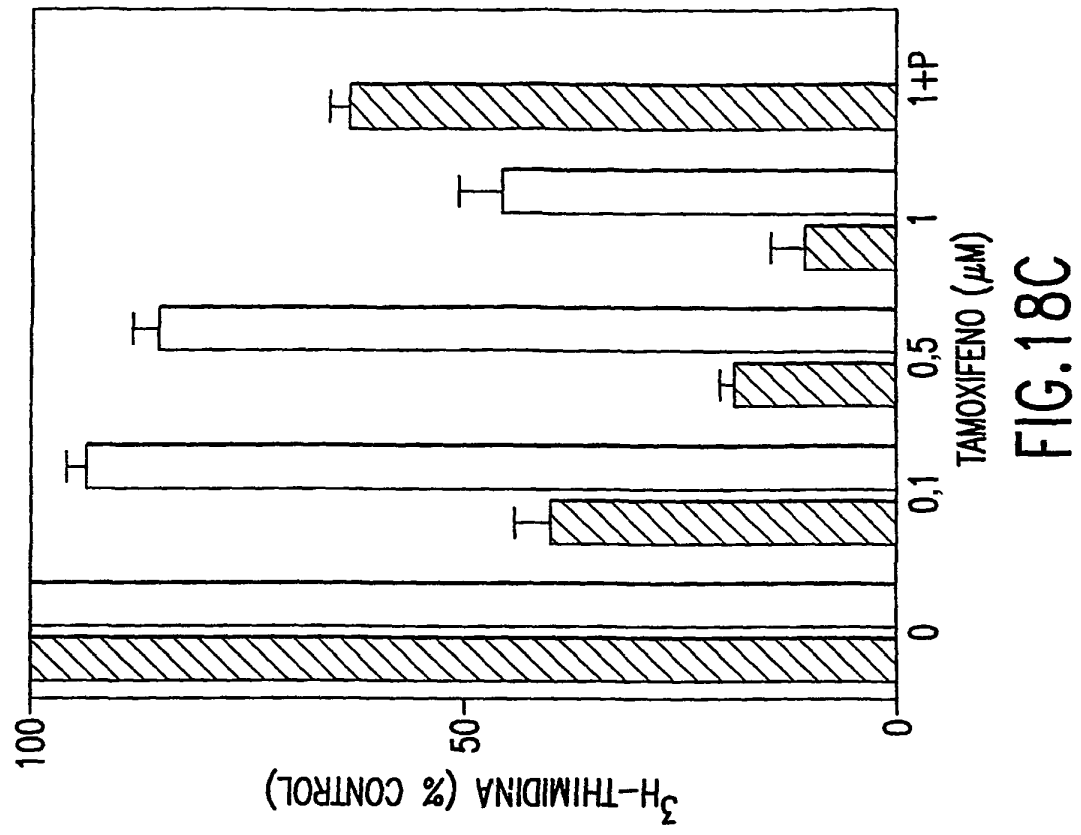


FIG.18A



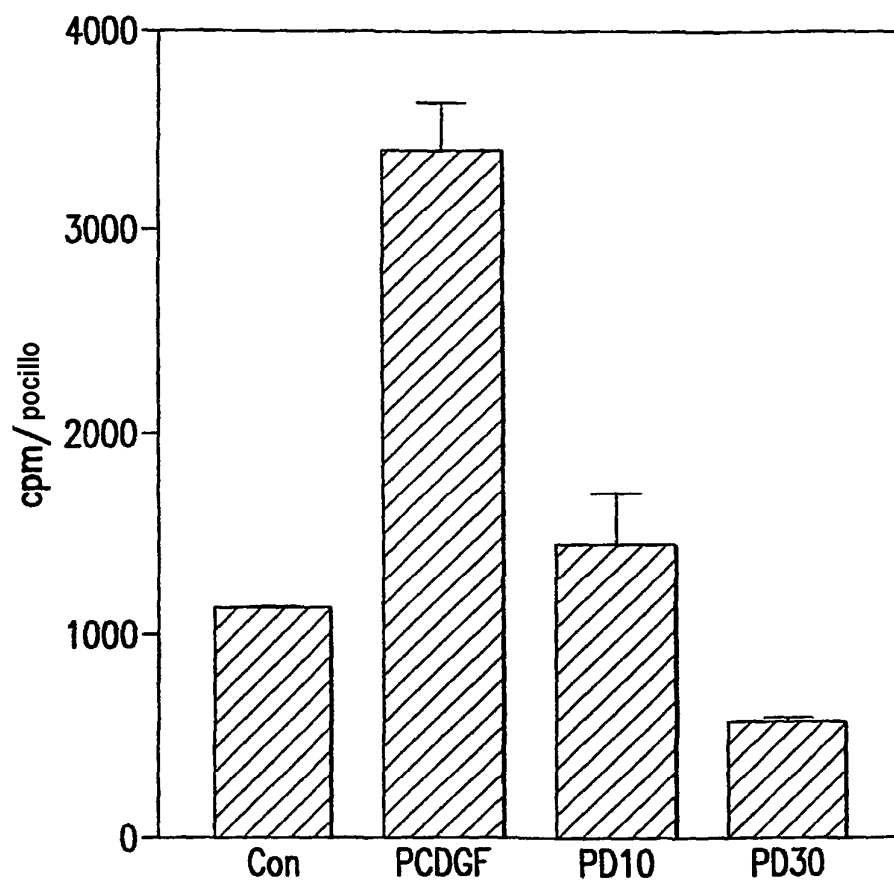


FIG.19A

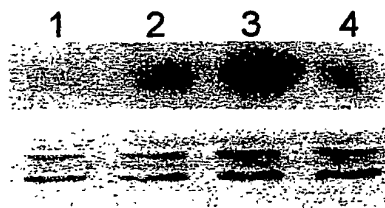


FIG.19B

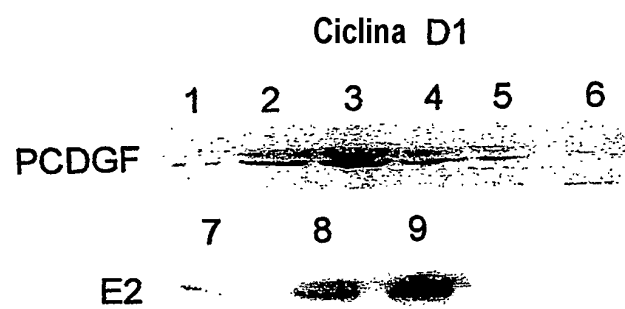


FIG.20A

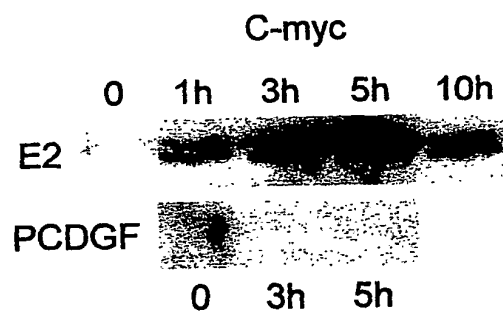


FIG.20B