



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 339 524**

② Número de solicitud: 200802503

⑤ Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01) **A61K 31/711** (2006.01)

A61K 38/02 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01) **C07K 16/40** (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01) **A61P 35/04** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **28.08.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2010**

Fecha de la concesión: **10.03.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **22.03.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
22.03.2011

⑰ Titular/es:
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
c/ Etxesakan, 28 - Oficina 5 - Planta Baja
31180 Zizur Mayor, Navarra, ES

⑱ Inventor/es: **Lecanda Cordero, Fernando y**
Luis-Ravelo Salazar, Diego

⑳ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

㉔ Título: **Nuevo biomarcador como diana terapéutica en cáncer de pulmón.**

㉖ Resumen:

Nuevo biomarcador como diana terapéutica en cáncer de pulmón.

La presente invención se refiere a un procedimiento de pronóstico de la evolución de la enfermedad en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón que comprende:

- la medición de la expresión del gen de RhoB; o
- la medición del número de copias del gen de RhoB;

en una muestra de dicho sujeto con adenocarcinoma de pulmón, caracterizado porque la detección de la sobreexpresión o aumento en el número de copias del gen de RhoB en relación con la expresión o el número de copias del mismo gen en una muestra de control es indicativa del riesgo de metástasis, o reaparición o reincidencia de actividad neoplásica.

La presente invención proporciona además procedimientos de cribado para fármacos activos contra adenocarcinoma de pulmón, para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento terapéutico en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón, así como inhibidores de la sobreexpresión del gen de RhoB para su uso como medicamento o para su uso en el tratamiento de cánceres de pulmón no microcíticos (NSCLC).

ES 2 339 524 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nuevo biomarcador como diana terapéutica en cáncer de pulmón.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al área del diagnóstico y terapia del cáncer. En particular, se refiere a la sobreexpresión del gen RhoB y su impacto clínico en el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de pulmón es la causa principal de las muertes relacionadas con el cáncer a nivel mundial. Dado que tiende a extenderse, o producir metástasis, de manera muy temprana en su evolución, es un cáncer con alta letalidad y uno de los cánceres de más difícil tratamiento. El cáncer de pulmón se puede extender a ciertos órganos - particularmente las glándulas adrenales, el hígado, el cerebro, y los huesos - los órganos más habituales para la metástasis. A pesar de los avances en la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, la tasa de supervivencia ha mejorado poco en la última década, y la supervivencia a largo plazo es muy baja. Se ha establecido que el cáncer de pulmón surge como consecuencia de la acumulación de múltiples cambios genéticos en genes críticos que controlan la motilidad, proliferación, diferenciación y apoptosis celular. La identificación y caracterización de estos cambios genéticos que ocasionan el desarrollo y progresión del cáncer de pulmón es de gran interés para mejorar el diagnóstico precoz y el desarrollo de una terapia dirigida novedosa (Mazieres *et al.* 2004).

Los cánceres de pulmón, también conocidos como carcinomas broncogénicos, se clasifican ampliamente en dos tipos: cánceres de pulmón de célula pequeña o microcíticos (SCLC) y cánceres de pulmón de célula no pequeña o no microcíticos (NSCLC). Esta clasificación se basa en la apariencia microscópica de las propias células tumorales. Los NSCLC son los cánceres de pulmón más habituales, representando aproximadamente el 80% de todos los cánceres de pulmón. Existen tres tipos principales de NSCLC que se denominan en base al tipo de células que se encuentran en el tumor: adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas, carcinomas de células grandes y también se observan mezclas de diferentes tipos de NSCLC. Entre los cánceres de pulmón y particularmente NSCLC, el adenocarcinoma de pulmón es el más frecuente, representando un 30-35% de todos los casos de cáncer de pulmón. El adenocarcinoma de pulmón se define por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “un tumor epitelial maligno con patrones de crecimiento tubular, acinar, o papilar, y/o la producción de mucosidad por las células tumorales”. Actualmente la OMS reconoce cuatro categorías de adenocarcinomas: acinar, papilar, bronquioloalveolar, y carcinoma sólido con formación de mucosidad. La mayoría de los adenocarcinomas aparecen en la periferia del pulmón, y, como resultado son frecuentemente asintomáticos en gran parte de su evolución. Frecuentemente se localizan a nivel subpleural y provocan una retracción pleural y un engrosamiento mediante radiografías.

Muchos estudios han examinado la potencial utilidad de marcadores moleculares en el diagnóstico precoz y la terapia dirigida. Una familia particularmente interesante de marcadores son las proteínas Ras, las cuales regulan importantes funciones celulares que varían desde la diferenciación hasta la proliferación celular. Funcionan como interruptores moleculares, entre los estados de unión a GDP inactivo y los estados de unión a GTP activo. El oncogén *ras* juega un papel fundamental en la transformación maligna. Ras se encuentra mutado dando lugar a una forma deficiente de GTPasa que conduce a su activación constitutiva dando lugar a la proliferación descontrolada en aproximadamente el 50% del adenocarcinoma de pulmón. Los miembros estrechamente relacionados de la familia de Ras, tales como guanosina trifosfatasa pequeñas (GTPasas) homologas de Ras (Rho), también están implicados en la regulación de una serie de procesos celulares, tales como la organización del citoesqueleto de actina, señalización inducida por estrés genotóxico, y la transformación celulares. Estudios recientes han confirmado adicionalmente el papel de las proteínas Rho en el cáncer al demostrar su implicación en la transformación, supervivencia, invasión, metástasis, y angiogénesis celulares. Además, los análisis en tumores humanos demuestran la sobreexpresión de varias proteínas Rho en cánceres de mama, de RhoA en tumores de células germinales testiculares, y de RhoC en adenocarcinoma pancreático, en melanoma, y en cáncer de mama (Mazieres *et al.* 2004).

Mientras que la mayoría de las proteínas Rho han demostrado tener una función positiva en la proliferación y la transformación de tumores malignos, la función específica de RhoB en estos procesos parece ser más divergente.

Por un lado, Mazieres *et al.* (2004) mostraron que la proteína RhoB se expresaba en pulmón normal y disminuyó bruscamente a lo largo de la progresión del cáncer de pulmón en estadios iniciales, concluyendo que la pérdida de expresión de RhoB ocurre muy frecuentemente en carcinogénesis de pulmón, reforzando su actividad potencial como un gen supresor de tumores.

Sato *et al.* (2007) analizaron las alteraciones en NSCLC de RhoB, demostrando que la expresión de RhoB está frecuentemente regulada de manera negativa en NSCLCs mediante múltiples mecanismos, y sugiriendo que RhoB es un gen supresor de tumores en NSCLC.

US7135463 describe el uso de la proteína RhoB y sus variantes para inhibir el crecimiento, migración, invasión, metástasis de células cancerosas, la transformación de células tumorales, y/o para modular la señalización oncogénica, en el que la introducción de RhoB directa o indirectamente a través de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica RhoB, en una célula tumoral transformada o una célula cancerosa disminuye la fosforilación de las proteínas Erk y

ES 2 339 524 B1

Akt que inhiben el mecanismo de supervivencia celular PI3-quinasa/Akt e impulsan la muerte celular programada o apoptosis.

5 De manera similar, WO2007011415 describe el uso de variantes de la proteína RhoB para inhibir el crecimiento, metástasis, invasión, migración de células cancerosas, la transformación de células tumorales, y/o para modular la señalización oncogénica. Los polipéptidos variantes de RhoB se introducen directa o indirectamente a través de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido variante de RhoB, en una célula tumoral transformada o una célula cancerosa, en el que el polipéptido variante de RhoB suprime el crecimiento tumoral e impulsa la apoptosis.

10 Por otro lado, el documento WO2008031910 describe varias líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico que pueden experimentar metástasis hasta el hueso con gran eficacia. Particularmente, describe líneas celulares específicas derivadas de una línea celular de carcinoma bronquioalveolar (A459) que comparten un patrón de expresión génica común caracterizado en la sobreexpresión de por lo menos 3, 4, 5, ó 6 genes seleccionados entre IL11, PITX1, HDAC4, RHOB, ROBO1, y SLC26A2.

15 La detección precoz del cáncer de pulmón ha sido desde hace tiempo un objetivo perseguido por los profesionales sanitarios y los patólogos. Actualmente, la etapa de la enfermedad, en base al sistema TNM (tumor primario / nódulo linfático/metástasis distante), es el factor individual más importante en la determinación de la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón. La identificación de pacientes con una mayor probabilidad de metástasis, reaparición o reincidencia del cáncer es un foco principal en la investigación molecular del cáncer. Como tal, y el conocimiento de cambios moleculares iniciales puede tener fines predictivos, ya que reflejan frecuentemente la duración de la supervivencia del paciente o la sensibilidad a la terapia. En este contexto, existe la necesidad de marcadores adicionales que pueden servir para el pronóstico en pacientes con NSCLC, particularmente pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Además, existe la necesidad de biomarcadores validados que se puedan aplicar directamente y utilizar en oncología clínica.

20 En un esfuerzo por identificar y caracterizar los genes diana claves implicados en la evolución del NSCLC, particularmente del adenocarcinoma de pulmón, los inventores han hallado sorprendentemente que RhoB juega un papel crítico en la metástasis ósea, al aumentar la motilidad celular e impulsar la colonización ósea. La sobreexpresión de RhoB en el adenocarcinoma de pulmón representa un biomarcador de pronóstico nuevo y potente potencialmente útil en el tratamiento clínico del cáncer de pulmón.

25 Dado que actualmente los resultados del tratamiento estándar del adenocarcinoma de pulmón son generalmente escasos, existe la necesidad de agentes terapéuticos nuevos que puedan prolongar o mejorar la tasa de respuesta (RR), la respuesta completa (CR), la respuesta parcial (PR), la enfermedad estable (SD), el tiempo hasta progresión (TTP), la supervivencia libre de progresión (PFS), la supervivencia global (GS), o el beneficio clínico, en pacientes afectados.

30 Los bisfosfonatos están indicados para una amplia variedad de enfermedades relacionadas con el metabolismo óseo, incluyendo la osteoporosis, la enfermedad de Paget, mieloma múltiple, y metástasis óseas secundarias a tumores sólidos avanzados. En pacientes con tumores, las metástasis óseas pueden dar lugar a eventos relacionados con el esqueleto (SREs), incluyendo fracturas patológicas, compresión de la columna vertebral, hipercalcemia, dolor óseo que requiere radioterapia paliativa, y cirugía ortopédica. Estas complicaciones esqueléticas conducen frecuentemente a la pérdida de independencia funcional y a la disminución de la calidad de vida y, de este modo, el objetivo de la terapia es prevenir o retrasar la aparición de SREs para preservar la independencia. Los bisfosfonatos son el medicamento de elección para el tratamiento de lesiones osteolíticas y osteoblásticas asociadas con la metástasis ósea y se ha observado que reducen significativamente el riesgo de SREs. (Costa *et al.* 2007).

35 En particular, Li *et al.* (2008) han demostrado que el ácido zoledrónico, un bifosfonato nitrogenado de tercera generación, es incapaz de inducir la apoptosis, pero ralentiza el crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia para los cánceres de pulmón de célula no pequeña.

40 Turner *et al.* (2007) discuten los efectos de la lovastatina, que pertenece al grupo de las estatinas, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa sobre la expresión, actividad de la isoforma de Rho, y la asociación con inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina, proporcionando de esta manera un mecanismo molecular en el que las estatinas provocan una acumulación de Rho-GTP no prenilado.

45 Hawk *et al.* (1996) sugirieron que la lovastatina podía suprimir la formación de tumores de pulmón inducidos por el carcinógeno químico NNK, posiblemente en una fase promocional inicial, aunque esta supresión no parecía estar relacionada con la presencia de K-ras mutadas o a cambios en la expresión de K-ras.

50 WO2004024165 describe una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos, en particular el mieloma múltiple (MM), comprendiendo dicha composición en combinación con un bisfosfonato, por ejemplo ácido zoledrónico o una sal o éster, un inhibidor de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, para el uso simultáneo, secuencial o separado.

55 WO2000016809 describe compuestos antisentido, composiciones y procedimientos para modular la expresión de RhoB. Las composiciones comprenden compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos antisentido, dirigi-

dos a ácidos nucleicos que codifican RhoB. Se proporcionan procedimientos de utilización de estos compuestos para la modulación de la expresión de RhoB y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de RhoB.

5 Como parte del estudio exhaustivo sobre la diana terapéutica de la presente invención, es decir la sobreexpresión de RhoB en NSCLC, tal como el adenocarcinoma de pulmón, los inventores han observado sorprendentemente que una combinación que comprende lovastatina y ácido zoledrónico mejora significativamente la supervivencia global cuando se compara con la administración de ácido zoledrónico solo.

10 Además, los inventores también han observado que la administración de células de pulmón transducidas lenti-viralmente con varios ARNsh contra RhoB (shRhoB) a ratones inmunodeprimidos daba lugar a un descenso de su actividad prometastática, incluyendo una reducción muy acusada de las lesiones osteolíticas y la carga del tumor, en comparación con las células control.

15 Como tal, la combinación que comprende lovastatina y ácido zoledrónico, así como agentes de ARNi basados en shRhoB, han demostrado ser útiles en el tratamiento de NSCLC, tal como el adenocarcinoma de pulmón, por ejemplo en la ralentización de la progresión de la metástasis ósea.

Descripción resumida de la invención

20 La presente invención se refiere a un procedimiento de pronóstico de la evolución de la enfermedad en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón que comprende:

- la medición de la expresión del gen de RhoB; o
- 25 • la medición del número de copias del gen de RhoB;

30 en una muestra de dicho sujeto con adenocarcinoma de pulmón, caracterizado porque la detección de la sobreexpresión o aumento en el número de copias del gen de RhoB en relación con la expresión o el número de copias del mismo gen en una muestra de control es indicativa del riesgo de metástasis, o reaparición o reincidencia de actividad neoplásica.

En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de screening para fármacos activos contra el adenocarcinoma de pulmón, comprendiendo dicho procedimiento:

- 35 a) la medición de la expresión del gen de RhoB, o la medición del número de copias del gen de RhoB, en una muestra con células de adenocarcinoma de pulmón en presencia de un fármaco, o la medición de la afinidad de unión ente un fármaco y un polipéptido RhoB;
- 40 b) la comparación de la expresión o números de copias medidas del gen de RhoB, o la afinidad de unión de la etapa a) a una muestra de control;

45 caracterizada porque una expresión o número de copias reducido del gen de RhoB, o una mayor afinidad de unión en la etapa a), en relación con la expresión o el número de copias del mismo gen o la afinidad de unión del mismo polipéptido en una muestra de control es indicativa de la actividad del fármaco contra el adenocarcinoma de pulmón.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento terapéutico en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón, comprendiendo dicho procedimiento

- 50 a) la medición de la expresión del gen de RhoB, o la medición del número de copias del gen de RhoB, en una muestra con células de adenocarcinoma de pulmón de dicho sujeto, generando de este modo un nivel inicial;
- 55 b) la medición de la expresión del gen de RhoB, o la medición del número de copias del gen de RhoB, en una segunda muestra con células de adenocarcinoma de pulmón del mismo sujeto en un momento posterior a la administración de la pauta de tratamiento, obteniendo de este modo un nivel de prueba; y
- c) la comparación de los niveles inicial y de prueba;

60 caracterizada porque una expresión o número de copias reducido del gen de RhoB en el nivel de prueba en relación con el nivel inicial es indicativa de que la pauta de tratamiento es eficaz en el sujeto.

Se proporcionan además inhibidores de la sobreexpresión del gen de RhoB para su uso como medicamento o para su uso en el tratamiento de NSCLC. Particularmente, estos inhibidores se seleccionan entre:

- 65 • un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína RhoB, o un polipéptido que comprende una región de unión a RhoB;
- un péptido mimético del polipéptido Rhob;

- un ácido nucleico inhibidor del gen de RhoB seleccionado entre un oligonucleótido antisentido, un ribozima, y un agente ARNi seleccionado entre ARNds y ARNsh; o
- una combinación que comprende lovastatina y ácido zoledrónico, y/o sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

5

Más particularmente, se proporciona una molécula de ARNsh que tiene por lo menos un 70% de homología con la SEC ID No. 3, preferiblemente en forma de un vector retroviral, para su uso en la terapia génica de adenocarcinoma de pulmón. También particularmente, se proporciona la combinación que comprende lovastatina y ácido zoledrónico, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso en el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón.

10

Descripción de los dibujos

Figura 1

15

Aislamiento de poblaciones metastáticas hacia el hueso

Se inocularon células de adenocarcinoma A549 por vía intracardiaca en ratones inmunodeprimidos. Después de la detección radiográfica de la metástasis ósea, se aislaron esas subpoblaciones, se expandieron en un cultivo, y se volvieron a inocular. Este procedimiento se repitió hasta obtener las subpoblaciones altamente metastáticas M1M1, M1M4, y M1M3. Éstas se volvieron a inocular en otros grupos de ratones, así como la población parental. Su capacidad metastática se evaluó mediante el análisis de imágenes de microrradiografías de los huesos largos, y curvas de supervivencia libre metástasis de Kaplan-Meier.

20

Figura 2

25

Identificación de RhoB en subpoblaciones metastáticas

Mediante microarrays de expresión, se identificó RhoB como uno de los genes sobreexpresados en todas las subpoblaciones metastáticas. La sobreexpresión se validó mediante RT-PCR y mediante análisis Western blot.

30

Figura 3

35

Preparación de inhibidor de RhoB en células de cáncer de pulmón

a. Preparación de la inhibición de RhoB mediante un vector lentiviral con ARNsh específico para RhoB. Para el gen sobreexpresado se utilizó un vector retroviral.

b. Efecto sobre la proliferación *in vitro* del inhibidor de RhoB y el vector de control negativo ("scramble"). No se observaron cambios en la proliferación *in vitro* mediante MTT entre el inhibidor de RhoB y el vector "scramble".

40

Figura 4

45

La inhibición de RhoB disminuye la metástasis in vivo

Se inocularon células con ARNsh contra RhoB y con un vector de control ("Scramble"). Después de 35 días tras la inoculación, se observó un descenso significativo del área radiográfica mediante el análisis de imágenes. Además, se verificó la disminución de la carga del tumor mediante bioluminiscencia.

50

Figura 5

Curvas de la tasa de supervivencia para pacientes con niveles altos y bajos de RhoB

Se realizó una inmunohistoquímica de biopsias de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma con un anticuerpo específico contra RhoB.

55

Figura 6

60

Efecto farmacológico de una combinación de lovastatina y ácido zoledrónico en pacientes con adenocarcinoma de pulmón y células tratadas in vitro

A. Pauta de administración de vehículo, lovastatina (Lov), ácido zoledrónico (ZA), y una combinación de lovastatina y ácido zoledrónico (Lov+ZA).

B. Curvas de supervivencia global a los 40 días Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia global 40 días después de la inoculación celular de los diferentes grupos tratados: Vehículo (control), Lovastatina (Lov) (10 mg/Kg/d), Ácido zoledrónico (ZA) (3 µg/Kg/d), o una combinación (Lov+ZA). * p < 0,05, *** p < 0,001 vs control; † p < 0,01 vs ZA (Test Mantel-Cox). No hubo diferencias entre los grupos de Control y Lovastatina.

65

ES 2 339 524 B1

C. Tratamiento con A549 TM M1M1 en cultivo. Células MTT de A54 9 TM M1M1 24 h después de los diferentes tratamientos farmacológicos: vehículo (Control); Lovastatina (Lov) 1 μM ; Ácido zoledrónico (ZA) 10 μM o combinación (Lov+ZA) (Lov 1 μM + ZA 10 μM) diluidos en medio de cultivo. La densidad de siembra 10.000 cels/ml; tratamiento 72 h después de la siembra en placas de cultivo de 96 pocillos. ** $p < 0,001$ vs. control; † $p < 0,001$ vs. Lov o ZA (ANOVA de una vía ANOVA seguido de test de Sheffé). Valores, medias +/- SEM.

Figura 7

Se trataron células TM M1M1 metastáticas de adenocarcinoma A549 durante 4 días con un vehículo (Control); lovastatina (Lov) 1 μM y 0,5 μM ; ácido zoledrónico (ZA) 10 μM y 5 μM ; y las combinaciones Lov 1 μM + ZA 10 μM ; y Lov 0,5 μM + ZA 5 μM diluidos en medio de cultivo. La inoculación duró 2 días y la densidad fue 2500 células/pocillo. Las fotografías tomadas de los cultivos que siguieron los diferentes tratamientos mencionados muestran la eficacia de las combinaciones Lov 1 μM + ZA 10 μM y Lov 0,5 μM + ZA 5 μM .

Figura 8

Después de 24 horas se midió la viabilidad celular de células TM M1M1 metastáticas de adenocarcinoma A54 9 en presencia de diferentes tratamientos farmacológicos. Los tratamientos fueron con vehículo (Control), lovastatina (Lov) 1 μM , ácido zoledrónico (ZA) 10 μM , y la combinación Lov 1 μM + ZA 10 μM (Lov+ZA) diluidos en medio de cultivo, y se aplicaron durante 72 h después de la siembra en placas de cultivo de 96 pocillos. La viabilidad celular se determinó midiendo la concentración de MTT, un colorante tetrazolio amarillo soluble en agua que se transforma en formazán violeta insoluble en agua únicamente en las mitocondrias de células vivas. Después de la solubilización de los cristales de formazán resultantes con isopropanol, la absorbancia de la solución se controló a 540 nm. Los valores se correlacionan directamente con el número de células vivas que permanecen en el cultivo al completar la incubación. Densidad de inoculación 1000 células/pocillo; ** $p < 0,001$ vs. control; † $p < 0,001$ vs. Lov o ZA (ANOVA de una vía seguido posteriormente de test Tamhane y contraste). Valores, medias +/- SEM.

Figura 9

Se trataron células TM M1M1 metastáticas de adenocarcinoma A54 9 durante 24 h con: vehículo (Control); Lovastatina 1 μM (Lov); Ácido zoledrónico 10 μM (ZA); y la combinación Lov 1 μM + ZA 10 μM (Lov+ZA) diluidos en medio de cultivo. El test se realizó en una placa de 96 pocillos; las células se sembraron (1000 células/pocillo) y se mantuvieron durante 72 h después del tratamiento. Se determinó la actividad de caspasa-3 mediante el ensayo con caspasa-Glo 3/7 luminiscente. Los ensayos se realizaron sobre 12 réplicas para cada tratamiento. ** $p < 0,001$ vs. control, Lov o ZA (ANOVA de una vía seguido posteriormente de test Tamhane y contraste). Valores, medias +/- SEM. Los resultados demuestran que la combinación de lovastatina y ácido zoledrónico aumenta la actividad de caspasa 3/7.

Figura 10

Se trató la línea celular humana de cáncer de pulmón no microcítico H727 derivada de tumor carcinoide durante 24 h con un vehículo (Control); lovastatina (Lov) 1 μM ; ácido zoledrónico (ZA) 10 μM ; y la combinación Lov 1 μM + ZA 10 μM diluidos en medio de cultivo. La incubación duró 6 días y la densidad fue de 5000 células/pocillo. Las fotografías tomadas de los cultivos que experimentan los diferentes tratamientos anteriores demuestran la eficacia de la combinación Lov 1 μM + ZA 10 μM .

Se midió la viabilidad celular con MTT de la misma línea celular humana H727 en presencia de los mismos tratamientos. Las células se sembraron y se trataron durante 24 h con vehículo (Control); Lovastatina (Lov) 1 μM ; Ácido zoledrónico (ZA) 10 μM o la combinación Lov 1 μM + ZA 10 μM (Lov+ZA) diluidos en medio de cultivo. Densidad de siembra 1000 células/pocillo; ** $p < 0,001$ vs. control; † $p < 0,001$ vs. Lov o ZA (ANOVA de una vía seguido posteriormente de test Tamhane y contraste). Valores, medias +/- SEM.

Figura 11

Se trató la línea celular H727 durante 24 h con un vehículo (Control); lovastatina (Lov) 5 μM ; ácido zoledrónico (ZA) 5 μM ; y la combinación Lov 5 μM + ZA 5 μM diluidos en medio de cultivo. La incubación duró 6 días y la densidad fue de 5000 células/pocillo. Las fotografías tomadas de los cultivos que experimentan los diferentes tratamientos anteriores demuestran la eficacia de la combinación Lov 5 μM + ZA 5 μM .

Se midió la viabilidad celular con MTT de la misma línea celular humana de cáncer de pulmón no microcítico H727 derivada de tumor carcinoide en presencia de los mismos tratamientos. Las células se sembraron y trataron durante 24 h con vehículo (Control); Lovastatina (Lov) 5 μM ; Ácido zoledrónico (ZA) 5 μM o la combinación Lov 5 μM + ZA 5 μM (Lov+ZA) diluidos en medio de cultivo. Densidad de siembra 1000 células/pocillo; ** $p < 0,001$ vs. control; † $p < 0,001$ vs. Lov o ZA (ANOVA de una vía seguido posteriormente de test Tamhane y contraste). Valores, medias +/- SEM.

ES 2 339 524 B1

Figura 12

Se trató la línea celular H727 durante 72 h con un vehículo (Control); lovastatina (Lov) 5 μ M; ácido zoledrónico (ZA) 5 μ M; y la combinación Lov 5 μ M + ZA 5 μ M diluidos en medio de cultivo. La incubación duró 4 días y la densidad fue de 5000 células/pocillo. Las fotografías tomadas de los cultivos que experimentan los diferentes tratamientos anteriores demuestran la eficacia de la combinación Lov 5 μ M + ZA 5 μ M.

Se midió la viabilidad celular con MTT de la misma línea celular H727 en presencia de los mismos tratamientos. Las células se sembraron y trataron durante 72 h con vehículo (Control); Lovastatina (Lov) 5 μ M; Ácido zoledrónico (ZA) 5 μ M o la combinación Lov 5 μ M + ZA 5 μ M (Lov+ZA) diluidos en medio de cultivo. Densidad de siembra 1000 células/pocillo; ** p < 0,001 vs. control; † p < 0,001 vs. Lov o ZA (ANOVA de una vía seguido posteriormente de test Tamhane y contraste). Valores, medias +/- SEM.

Figura 13

Se trató la línea celular humana de cáncer de pulmón no microcítico H4 60 derivada de un carcinoma de células grandes durante 24 h con un vehículo (Control); lovastatina (Lov) 1 μ M; ácido zoledrónico (ZA) 10 μ M; y la combinación Lov 1 μ M + ZA 10 μ M diluidos en medio de cultivo. La incubación duró 5 días y la densidad fue de 1500 células/pocillo. Las fotografías tomadas de los cultivos que experimentan los diferentes tratamientos anteriores demuestran la eficacia de la combinación Lov 1 μ M + ZA 10 μ M.

Se midió la viabilidad celular con MTT de la misma línea celular H460 en presencia de los mismos tratamientos. Las células se sembraron y trataron durante 24 h con vehículo (Control); Lovastatina (Lov) 1 μ M; Ácido zoledrónico (ZA) 10 μ M o la combinación Lov 1 μ M + ZA 10 μ M (Lov+ZA) diluidos en medio de cultivo. Densidad de siembra 1000 células/pocillo; ** p < 0,001 vs. control; † p < 0,001 vs. Lov o ZA (ANOVA de una vía seguido posteriormente de test Tamhane y contraste). Valores, medias +/- SEM.

Figura 14

Se trató la línea celular H460 durante 24 h con un vehículo (Control); lovastatina (Lov) 5 μ M; ácido zoledrónico (ZA) 5 μ M; y la combinación Lov 5 μ M + ZA 5 μ M diluidos en medio de cultivo. La incubación duró 5 días y la densidad fue de 1500 células/pocillo. Las fotografías tomadas de los cultivos que experimentan los diferentes tratamientos anteriores demuestran la eficacia de la combinación Lov 5 μ M + ZA 5 μ M.

Se midió la viabilidad celular con MTT de la misma línea celular H460 en presencia de los mismos tratamientos. Las células se sembraron y trataron durante 24 h con vehículo (Control); Lovastatina (Lov) 5 μ M; Ácido zoledrónico (ZA) 5 μ M o la combinación Lov 5 μ M + ZA 5 μ M (Lov+ZA) diluidos en medio de cultivo. Densidad de siembra 1000 células/pocillo; ** p < 0,001 vs. control; † p < 0,001 vs. Lov o ZA (ANOVA de una vía seguido posteriormente de test Tamhane y contraste). Valores, medias +/- SEM.

Figura 15

Se trató la línea celular H460 durante 72 h con un vehículo (Control); lovastatina (Lov) 5 μ M; ácido zoledrónico (ZA) 5 μ M; y la combinación Lov 5 μ M + ZA 5 μ M diluidos en medio de cultivo. La incubación duró 3 días y la densidad fue de 1500 células/pocillo. Las fotografías tomadas de los cultivos que experimentan los diferentes tratamientos anteriores demuestran la eficacia de la combinación Lov 5 μ M + ZA 5 μ M.

Se midió la viabilidad celular con MTT de la misma línea celular H460 en presencia de los mismos tratamientos. Las células se sembraron y trataron durante 72 h con vehículo (Control); Lovastatina (Lov) 5 μ M; Ácido zoledrónico (ZA) 5 μ M o la combinación Lov 5 μ M + ZA 5 μ M (Lov+ZA) diluidos en medio de cultivo. Densidad de siembra 1000 células/pocillo; ** p < 0,001 vs. control; † p < 0,001 vs. Lov o ZA (ANOVA de una vía seguido posteriormente de test Tamhane y contraste). Valores, medias +/- SEM.

55 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de pronóstico de la evolución de la enfermedad en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón que comprende:

- 60 a) la medición de la expresión del gen de RhoB; o
- b) la medición del número de copias del gen de RhoB;

65 en una muestra de dicho sujeto con adenocarcinoma de pulmón, caracterizado porque la detección de la sobreexpresión o el aumento en el número de copias del gen de RhoB en relación con la expresión o el número de copias del mismo gen en una muestra control es indicativa de riesgo para la metástasis, o reaparición o reincidencia de actividad neoplásica.

ES 2 339 524 B1

El término “pronóstico de la evolución de la enfermedad” se refiere a proporcionar información con respecto al impacto de la presencia de adenocarcinoma de pulmón, por ejemplo, según se determina mediante los procedimientos de la presente invención, en la futura salud de un sujeto, o en otras palabras, el pronóstico de la evolución de la enfermedad proporciona una predicción de cómo progresará la enfermedad en un sujeto y si existe la posibilidad de recuperación. Como tal, los procedimientos de la presente invención, tal como se describirá a continuación, se pueden utilizar para determinar la progresión del cáncer; por ejemplo, de carcinoma de pulmón *in situ* a metástasis, en particular al hueso, o reaparición o reincidencia de la actividad neoplásica.

En una realización de la presente invención, el pronóstico de la evolución de la enfermedad comprende la determinación de un resultado clínico seleccionado del grupo que consiste en velocidad de respuesta (RR), respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), enfermedad estable (SD), tiempo hasta la progresión (TTP), supervivencia global (OS), y beneficio clínico, que comprende respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), y enfermedad estable (SD).

El término “velocidad de respuesta (RR)” se refiere al porcentaje de pacientes cuyo cáncer disminuye o desaparece después del tratamiento.

El término “respuesta completa (CR)” se refiere a la desaparición de todos los signos del cáncer en respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se haya curado. También se denomina remisión completa.

El término “respuesta parcial (PR)” se refiere a un descenso en el tamaño de un tumor, o en la extensión del cáncer en el cuerpo, en respuesta al tratamiento. También se denomina remisión parcial.

El término “enfermedad estable (SD)” se refiere a un cáncer que no crece ni decrece en extensión o gravedad.

El término “tiempo hasta la progresión (TTP)” es un sinónimo para “supervivencia libre de progresión (PFS)” y se refiere a una medición del tiempo después de que se haya diagnosticado o tratado una enfermedad, hasta que la enfermedad empieza a empeorar. Aquí la medición para cada paciente es igual al tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento en un paciente en una prueba -tal como se define en el protocolo de pruebas- hasta la detección de una progresión tumoral -tal como se define en el protocolo de pruebas - o la aparición de cualquier fatalidad, lo que sea primero. Si se detuvo la observación del paciente (por ejemplo, al final del estudio) después de un periodo y no se observó ningún evento, entonces este tiempo de observación se denomina “censurado”.

El término “supervivencia global (OS)” es un sinónimo para “tiempo hasta la muerte (TTD)” o “tasa de supervivencia” y se refiere al porcentaje de sujetos en un estudio que han sobrevivido durante un periodo definido de tiempo. Este porcentaje se indica habitualmente junto con el periodo de tiempo desde la fecha del diagnóstico o tratamiento. Habitualmente, la supervivencia global se mide desde el día de la cirugía hasta la muerte relacionada con el tumor. Aquí, la medición para cada paciente es igual al tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento de un paciente en una prueba -tal como se define en el protocolo- hasta la aparición de cualquier fatalidad. Si se detuvo la observación del paciente, por ejemplo, al final del estudio, después de un periodo t y el paciente sobrevivió a este tiempo, entonces este tiempo de observación t se denomina “censurado”.

El término “sujeto” se refiere a un organismo afectado de cáncer de pulmón, particularmente cáncer de pulmón de célula no pequeña, más particularmente adenocarcinoma de pulmón. Este sujeto puede ser un mamífero, preferiblemente un humano, rata, ratón, o un primate no humano. Habitualmente el sujeto es un paciente.

El término “metástasis” se refiere al movimiento o expansión de células cancerígenas de un órgano o tejido a otro. Las células cancerígenas se expanden normalmente a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático. El término “metástasis” se refiere también a la formación de focos de tumores secundarios en crecimiento progresivo en puntos discontinuos a la lesión primaria. El proceso metastático es un mecanismo con múltiples etapas en que una célula de cáncer metastático se escapa del tumor primario, entra en la circulación, invade un punto de tejido distante y desarrolla un tumor macroscópico en el sitio diana.

El término “actividad neoplásica” se refiere a una proliferación celular no regulada o anormalmente regulada y el proceso de angiogénesis o la formación de nueva vasculatura que da soporte a un neoplasma en el microambiente endotelial alrededor del neoplasma. El término “neoplasma” se refiere a células tumorales, células que presentan una proliferación no regulada o anormalmente regulada como resultado de la inestabilidad o mutación genética, y un endotelio en el que las células endoteliales presentan una proliferación no regulada o anormalmente regulada como resultado de un estado patogénico.

El término “muestra”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una composición que se obtiene o deriva de un sujeto de interés que contienen una entidad celular y/u otra entidad molecular que va a caracterizarse y/o identificarse en base a, por ejemplo, características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Cualquier muestra adecuada en la que se puede determinar la sobreexpresión del gen de RhoB o el número de copias del mismo está incluida en el alcance de la presente invención.

En una realización, la muestra es un material biológico obtenido de un sujeto, y puede ser cualquier muestra orgánica, muestra de tejido, muestra de célula, fluido corporal, precipitado de fluido corporal, o una muestra de lavado aislada de un sujeto que tiene un cáncer de pulmón o con el riesgo de un cáncer de pulmón (por ejemplo, en base al historial familiar o al historial personal, tal como fumador crónico). Una muestra se puede obtener de un sujeto de

ES 2 339 524 B1

cualquiera de las maneras utilizadas en dispositivos clínicos para obtener una muestra que comprende la célula o ácido nucleico requerido, es decir ADN o ARN. Por ejemplo, las muestras se pueden obtener a partir de muestras quirúrgicas recientes, congeladas o muestras en parafina o biopsias de un órgano o tejido que comprenden el ácido nucleico o célula adecuados a ensayar. Las muestras adecuadas utilizadas en procedimientos para la detección o pronóstico del cáncer se pueden obtener a partir de una muestra de mama, conductos o lóbulos de los tejidos mamarios, muestra del tracto gastrointestinal (por ejemplo, una biopsia de un pólipo), una muestra de hígado, una muestra de tejido pancreático, una muestra de médula ósea, una muestra de piel, una muestra de nódulo linfático, una muestra de riñón, una muestra de pulmón, una muestra de músculo, una muestra de hueso, una muestra de cerebro, o similar. La muestra puede derivar de un fluido biológico, por ejemplo, sangre, médula ósea, fluido cerebrospinal, fluido peritoneal, fluido pleural, fluido linfático, suero, plasma, jugo pancreático, orina, quilo, heces, eyaculado, esputo, aspirado de los pezones, fluido de los conductos, saliva, muestras obtenidas con hisopos de conductos orgánicos, muestras de lavado de colon, y muestras de cepillado. Los tejidos y fluidos corporales se pueden recoger utilizando cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica. Si es apropiado, la muestra se puede obtener mediante la utilización de un procedimiento de aspiración.

Entre las muestras habituales para la detección o el pronóstico de adenocarcinoma de pulmón se incluyen, sin limitación, células o tejido (por ejemplo, de una biopsia o autopsia), tumores de pulmón sólidos, esputo, tos, lavado broncoalveolar, cepillados bronquiales, mucosa bucal, sangre periférica, sangre completa, concentrados de glóbulos rojos, concentrados de plaquetas, concentrados de leucocitos, proteínas de glóbulos rojos, plasma sanguíneo, plasma rico en plaquetas, un concentrado de plasma, un precipitado de cualquier fracción del plasma, un sobrenadante de cualquier fracción del plasma, fracciones de proteínas del plasma sanguíneo, proteínas u otros componentes sanguíneos purificados o parcialmente purificados, suero, tejido o muestras de biopsia con aguja fina y fluido pleural, etc. aislados de un sujeto con un cáncer de pulmón, o cualquier otro tumor, o cualquier otro extracto del mismo, obtenidos de un sujeto de prueba, voluntario sano o animal experimental.

En algunas realizaciones, puede ser deseable separar las células de cáncer de pulmón de las células que no son de cáncer de pulmón en una muestra. En algunas realizaciones, puede ser deseable no separar las células de cáncer de pulmón de las células que no son de cáncer de pulmón en una muestra. En algunas realizaciones, una muestra puede estar sustancialmente libre de células tumorales, por ejemplo, contiene menos de un 1, 5, 10, 20, 30, 40, ó 50% de células tumorales en comparación con las células no tumorales en la muestra. En algunas realizaciones, las células no tumorales pueden ser células epiteliales o linfocitos. En el caso de evaluar el pronóstico de un sujeto con cáncer de pulmón, es preferible utilizar una muestra que contiene la célula de cáncer de pulmón. La muestra pueden ser células purificadas a partir de un tejido. Además, las muestras biológicas se pueden obtener de un sujeto o un sujeto en diferentes puntos de tiempo, incluyendo antes, durante y/o después de un tratamiento.

Una muestra también puede incluir, sin limitación, productos producidos en cultivos celulares por células normales o transformadas, por ejemplo, a través de tecnología de ADN recombinante o anticuerpos monoclonales. Una muestra también puede ser una célula o una línea celular creada en condiciones experimentales que no se aíslan directamente de un sujeto. Una muestra también puede estar libre de células, derivada o sintetizada artificialmente. Una muestra puede ser de una células o tejido conocido por ser canceroso, sospechoso de ser canceroso, o que se cree que no es canceroso (por ejemplo, normal o control).

El término “expresión” del gen de RhoB se refiere al proceso de conversión de información genética codificada en el gen de RhoB en ARN, por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, o ARNsn, a través de la transcripción del gen, es decir, a través de la acción enzimática de una ARN polimerasa, y para genes que codifican proteínas, en la proteína a través de la traducción del ARNm maduro. La expresión génica se puede regular en muchas etapas del proceso. La “regulación positiva” o “activación” se refiere a la regulación que aumenta la producción de los productos de expresión génica, es decir, ARN o proteína, mientras que la “regulación negativa” o “represión” se refiere a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas, por ejemplo, factores de transcripción, que están implicados en la regulación positiva o la regulación negativa se denominan frecuentemente “activadores” y “represores”, respectivamente.

La expresión del gen de RhoB se puede medir a nivel de proteína, a nivel de ARNm, o a nivel de ADNc.

Medición a nivel de proteína

La expresión de la proteína derivada de RhoB se puede medir utilizando cualquiera de los inmunoensayos disponibles por la técnica. Entre los ejemplos de inmunoensayos útiles en la determinación del nivel de expresión de la proteína se incluyen, pero no se limitan a, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, ensayo de transferencia mediante Western, ensayo inmunofluorescente, inmunoensayo enzimático, ensayo quimioluminiscente, ensayo inmunohistoquímico, y ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Además, los inmunoensayos anteriores se pueden utilizar combinados, tales como inmunoprecipitación seguido de transferencia mediante Western. Los procedimientos anteriores se describen en *Principles and Practice of Immunoassay*, Price y Newman, eds., Stochton Press, última ed. Dichos ensayos pueden ser inmunoensayos directos, indirectos, competitivos, o no competitivos tal como se describen por la técnica (Oelbrick, N. (1984) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 22:895-904). La proteína a analizar mediante dichos procedimientos se puede obtener directamente de la muestra. Alternativamente, la proteína se puede obtener como un lisado crudo o se puede purificar adicionalmente mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo la cromatografía de inmunoafinidad utilizando anticuerpos para la proteína RhoB (Sambrook, J. *et al* (2001) en “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.). Alternativamente, los niveles de proteína RhoB se pueden detectar mediante inmunohistoquímica de secciones de tumores fijadas o congeladas.

ES 2 339 524 B1

Para la detección de proteína RhoB mediante inmunoensayo, se pueden utilizar anticuerpos policlonales o monoclonales anti-RhoB. Si se desean anticuerpos policlonales, se puede utilizar suero que contiene anticuerpos policlonales para la proteína RhoB o los anticuerpos policlonales se pueden purificar de antígenos presentes en el suero mediante cromatografía de inmunoafinidad. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra RhoB pueden ser producidos fácilmente por un experto en la materia. Los procedimientos de producción de anticuerpos monoclonales o policlonales son conocidos por un experto en la materia (Goding, J. W. (1996) *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*, Plodermic Press, Inc., NY, N.Y., pág. 56-97; Hurn, B. A. L. *et al.* (1980) *Meth. Enzymol.*, 70:104-141).

Entre los inmunógenos adecuados que se pueden utilizar para producir anticuerpos policlonales o monoclonales se incluyen Usados celulares preparados a partir de células transfectadas con una proteína RhoB recombinante, una proteína RhoB recombinante o nativa parcial o sustancialmente purificada, o péptidos derivados de la secuencia de aminoácidos de RhoB. Los vectores y su uso en la producción de proteínas recombinantes es conocida por los expertos en la materia (Sambrook, J. *et al.* (2001) in "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.).

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también se pueden producir mediante ingeniería genética. La tecnología para la expresión de los genes de tanto la cadena pesada como la cadena ligera en *E. coli* es la materia de las solicitudes de patente PCT; publicación número WO 901443, WO 901443, y WO 9014424 y en Huse *et al.* (1989) *Science*, 246:1275-1281.

Alternativamente, los anticuerpos anti-RhoB se pueden inducir mediante la administración de anticuerpos antiidiotipos como inmunógenos. De forma práctica, se utiliza un anticuerpo anti-RhoB purificado para inducir un anticuerpo antiidiotipo en un animal huésped.

Alternativamente a los inmunoensayos, los anticuerpos se pueden utilizar *in situ* para detectar la proteína RhoB en la muestra. Los anticuerpos se pueden utilizar en inmunofluorescencia directa o indirecta. Alternativamente, la proteína RhoB se puede detectar *in situ* mediante el uso de anticuerpo anti-RhoB radiomarcado o mediante el uso de un anticuerpo anti-RhoB no marcado seguido de un segundo anticuerpo radiomarcado reactivo al anticuerpo anti-RhoB.

Los anticuerpos también se pueden utilizar para inmunoprecipitar la proteína RhoB a partir de una mezcla de proteínas. El uso de la inmunoprecipitación como técnica sensible y específica para detectar y cuantificar antígenos diana en mezclas de proteínas es bien conocida para los expertos en la materia (véase, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Edition, (2001) Cold Spring Harbor Press).

Los anticuerpos también se pueden fijar a soportes sólidos para su uso en el aislamiento de la proteína RhoB mediante cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para la cromatografía de inmunoafinidad son bien conocidas en la técnica (Harlow, E. y Lañe, D. (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) e incluyen técnicas para fijar anticuerpos a soportes sólidos, de manera que mantienen su actividad inmunoselectiva; las técnicas utilizadas pueden ser aquellas en las que los anticuerpos se adsorben al soporte, así como aquellas en las que los anticuerpos están unidos covalentemente al soporte.

Un anticuerpo adecuado para la medición de la expresión del gen de Rho B a nivel de proteína es Rho B (119) sc-180 disponible comercialmente de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Rho B (119) es un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad desarrollado contra un péptido que se mapea en una región interna de Rho B de origen humano.

Los anticuerpos descritos anteriormente y los fragmentos de unión a los mismos se pueden suministrar en un kit de diagnóstico útil para la detección de alteraciones en la expresión de proteína RhoB.

50 *Medición a nivel de ARN*

La expresión del gen de RhoB se puede controlar a nivel de ARN mensajero (ARNm) según los procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos que utilizan la hibridación de sondas de ácido nucleico al transcrito de RhoB, incluyendo la tecnología de microarray, visualización en gel, y transferencia mediante Northern, se pueden utilizar para medir la presencia y/o nivel de ARNm de RhoB. El ARNm también se puede evaluar utilizando técnicas de amplificación, tales como RT-PCR o RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

El análisis de hibridación, que se basa en la especificidad de las interacciones de nucleótidos, utiliza oligonucleótidos o ADNc para identificar de manera selectiva o capturar ADN o ARNm de la composición específica de secuencias. La cantidad de ARNm o ADNc hibridada a una secuencia de captura conocida se puede determinar cuantitativa o cualitativamente, proporcionando de este modo la información sobre la representación relativa de la proteína RhoB. También se puede realizar la hibridación a arrays o chips tanto de ADN, ADNc, oligonucleótidos o ARN, donde éstos se pueden producir según cualquier procedimiento adecuado conocido por técnica. Por ejemplo, los procedimientos de producción de grandes arrays de oligonucleótidos se describen en US5.134.854, y US5.445.934 utilizando técnicas de síntesis dirigidas por luz. Utilizando un sistema controlado por ordenador, se convierte un array heterogéneo de monómeros, a través del acoplamiento simultáneo en un número de sitios de reacción, en un array heterogéneo de polímeros.

ES 2 339 524 B1

Alternativamente, los microarrays se generan mediante la deposición de oligonucleótidos presintetizados sobre un sustrato sólido, por ejemplo tal como se describe en WO95/35505.

5 Los procedimientos basados en secuenciación son una alternativa. Estos procedimientos empezaron con el uso de marcadores de secuencia expresada (ESTs), y ahora incluyen procedimientos basados en marcadores cortos, tales como el análisis en serie de la expresión génica (SAGE) y la MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing). Como tal, los niveles de expresión de ARNm en una muestra de prueba se pueden determinar mediante la generación de una biblioteca de ESTs a partir de dicha muestra de prueba. La enumeración de la representación relativa de ESTs en la biblioteca se puede utilizar para aproximar la representación relativa de un transcrito génico en la muestra de partida.
10 Los resultados de los análisis de EST de una muestra de prueba se puede entonces comparar con el análisis de EST de una muestra de referencia que comprende células de control para determinar los niveles de expresión relativos de un polinucleótido que codifica RhoB.

15 El SAGE (Velculescu *et al.*, *Science* (1995) 270:484) implica el aislamiento de marcadores de secuencia cortos únicos de una localización específica en cada transcrito. Los marcadores de secuencia se concatenan, clonan y secuencian. La frecuencia de transcritos particulares en la muestra de prueba de partida está reflejada por el número de veces que el marcador de secuencia asociado se encuentra en la población de secuencias.

20 La MPSS, descrita por Brenner *et al.*, *Nature Biotechnology* 18:630-634 (2000), es una estrategia de secuenciación que combina secuenciación no basada en gel con la clonación *in vitro* de millones de plantillas en microesferas separadas de 5 μm de diámetro. En primer lugar, se construye mediante clonación *in vitro* una biblioteca de microesferas de plantillas de ADN. Esto va seguido del montaje de un array plano de las microesferas que contienen plantillas en una células de flujo a una densidad elevada (habitualmente superior a 3×10^6 microesferas/cm²). Los extremos libres de las plantillas clonadas en cada microesfera se analizan simultáneamente, utilizando un procedimiento de secuenciación
25 basado en fluorescencia que no requiere la separación de fragmentos de ADN. Esta técnica permite la identificación eficaz y el aislamiento de muchos cientos de miles de secuencias individuales, la generación de una “biblioteca” de ARNs pequeños. La abundancia o frecuencia de aparición de cada secuencia diferente de una “biblioteca” de ARNs pequeños es indicativo de la cantidad en la muestra original de la que se obtuvo el ARN. Además, mediante la comparación de las secuencias, que tienen habitualmente 17-20 nucleótidos de longitud, con una base de datos de ADN
30 genómico, es posible determinar los puntos en el ADN que actúan como origen para los ARNs pequeños. Las comparaciones con las anotaciones del genoma, bases de datos de ADNc, y otros datos se pueden utilizar frecuentemente para identificar los precursores de ARN más grandes de los ARNs pequeños. De manera más significativa, MPSS proporciona la capacidad para dirigir la biología del ARN pequeño a una escala amplia del genoma.

35 *Medición a nivel de ADNc*

La expresión del gen de RhoB también se puede controlar a nivel de ADNc. Los niveles de expresión del gen de RhoB se determinan utilizando la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR). La RT-PCR es una técnica bien conocida en el sector que se basa en que la enzima transcriptasa inversa transcribe de forma
40 inversa el ARNm para formar ADNc, que a continuación se puede amplificar en una reacción PCR estándar. Los protocolos y kits para llevar a cabo la RT-PCR son bien conocidos por los expertos en la materia y están disponibles comercialmente.

45 La RT-PCR se puede llevar a cabo de una manera no cuantitativa. Dicha RT-PCR de punto final mide los cambios en los niveles de expresión utilizando tres procedimientos diferentes: relativo, competitivo y comparativo. Estos procedimientos tradicionales son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, visualización del amplicón en una electroforesis en gel.

50 En una realización alternativa, la RT-PCR se lleva a cabo a tiempo real y de manera cuantitativa. La PCR a tiempo real es una técnica utilizada para controlar el progreso de una reacción PCR en tiempo real. Al mismo tiempo, se puede cuantificar una cantidad relativamente pequeña de producto de PCR (ADN, ADNc o ARN). La PCR a tiempo real se basa en la detección de la fluorescencia producida por una molécula informadora que aumenta a medida que progresa la reacción. Esto ocurre debido a la acumulación del producto de la PCR con cada ciclo de amplificación. Estas moléculas informadoras fluorescentes incluyen fluorocromos que se unen al ADN de doble cadena o sondas de
55 secuencia específica.

60 La RT-PCT cuantitativa a tiempo real o la PCR a tiempo real han sido descritas ampliamente en la bibliografía (véase, Gibson *et al* para un ejemplo inicial de la técnica) y son posibles una serie de técnicas para controlar el producto de PCR. Estas técnicas incluyen el uso de sondas hidrolíticas (Taqman[®]), sondas en horquilla (“hairpin”) (Molecular Beacons), parejas de sondas para la técnica de FRET (LightCycler), cebadores que incorporan una sonda en horquilla (Scorpion), sistema Plexor[™], cebadores en horquilla (Amplifluor), cebadores que incorporan secuencias complementarias de ADNzimas que dividen un sustrato informador incluido en la mezcla de reacción (DzyNA), o colorantes fluorescentes (SYBR Green etc.). Todas estas sondas, cebadores, o fluorocromos están disponibles comercialmente y están bien caracterizados.

65 En una realización, la presente invención proporciona cebadores con las SEC ID NO 4-6 para realizar la RT-PCR o PCR de tiempo real. Los cebadores con SEC ID NO 4 y 5 son particularmente adecuados para su uso en el perfil de expresión del gen de RhoB utilizando RT-PCR

ES 2 339 524 B1

SEC ID No.	descripción	secuencia
4	RhoB-F	TGGAGAACATCCCCGAGAAG
5	RhoB-R	TGCGCAGGTCTTTTTTGTTG
6	Sonda RhoB-Taq	5' -FAM- CACTTCTGTCCCAATGTGCCCATCATC- TAMRA3'

Tal como se ha mencionado en la presente invención, la RT-PCR cuantitativa a tiempo real o PCR a tiempo real produce una lectura de fluorescencia que se puede controlar de manera continua. Las técnicas de tiempo real son ventajosas porque mantienen la reacción en un "único tubo". Esto significa que no existe la necesidad de un análisis ulterior para obtener resultados, lo cual conduce a resultados obtenidos más rápidamente. Además, manteniendo la reacción en un medio de "único tubo" se reduce el riesgo de contaminación cruzada y permite una salida cuantitativa a partir de los procedimientos de la presente invención. Esto puede ser particularmente importante en la disposición clínica de la presente invención.

El reconocimiento de múltiples alteraciones de ADN puede aumentar la identificación eficaz del cáncer. Las sondas permiten que se midan múltiples tipos de ADN en la misma muestra (PCR multiplex), ya que los colorantes fluorescentes con diferentes espectros de emisión se pueden unir a las diferentes sondas. La PCR Multiplex permite que los controles internos se coamplifiquen. Estas sondas de hibridación permiten un nivel de discriminación imposible de obtener con SYBR Green, ya que solo se hibridarán a verdaderas dianas en una PCR y no a cebadores-dímeros u otros productos no específicos.

Las variantes de la técnica de PCR básica tales como PCR anidada, y similares también se incluyen en el alcance de la presente invención. Ente los ejemplos se incluyen técnicas de amplificación isotérmica tales como NASBA, 3SR, TMA, y triamplificación, todas ellas conocidas en el sector y disponibles comercialmente. Otros procedimientos adecuados de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barringer *et al*, 1990), ensayo de Amplificación de Sondas dependiente de Ligandos Múltiples Específico de Metilación (MS-MLPA) (Nygren *et al.*, Nucleic Acids Res. 2005; 33(14) e128; www.mlpa.com), amplificación selectiva de secuencias de polinucleótidos diana (US6,410,276), reacción en cadena de la polimerasa con cebado con secuencias de consenso (US4,437,975), reacción en cadena de la polimerasa con cebado arbitrario (WO90/06995), pirosecuenciación, y amplificación por desplazamiento de corte (WO2004/067726).

La expresión génica en una muestra de prueba también se puede analizar utilizando la metodología de "differential display" (DD). Esta familia de técnicas se basa en la amplificación aleatoria de fragmentos de ADNc generados mediante digestión por restricción, donde los fragmentos de ADNc se utilizan como identificadores únicos de genes, acoplados con la información sobre la longitud del fragmento o la localización del fragmento en el gen expresado. La representación relativa de un gen expresado en una muestra se puede entonces estimar en base a la representación relativa del fragmento asociado con el gen que está en el grupo de todos los posibles fragmentos. Los procedimientos y composiciones para llevar a cabo DD son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, US5.776.683; y US5.807.680.

Las secuencias del ADN genómico, proteína, ARNm, y ADNc del gen de RhoB, o una región de las mismas, se proporcionan a continuación. De la misma manera, los cebadores y sondas descritas en la presente invención se proporcionan como las SEC ID No. 4-6.

La secuencia de nucleótidos del ADN genómico de RhoB humana (NC_000002.10) (5'→3', 2367 pb) se proporciona en la siguiente secuencia SEC ID No. 1:

```

ATCTGCCACCGCAGTCTGGTTGGAGCTGTTGTCTTGTATGCTCAGCGAGGCCCGGAGA
GACCCGGGAGAGAGCTAGGCCGAGTCCACCGCCCGAGTCTGCTGCCCGAGCCCGCGTT
ACGCACAAAGCCGCCGATCCCCGGCCTGGGGTGAGCAGAGCGACCACCGCCCGGGAGC
AGCGCGGCGAGACGCACGGTGCGCCCTATGCCCCCGCGCCCCACCGCCCCCGCCGG
GCAGCCGAAGCGCAGCGAGAGAACGCGCCACCGCGGGGCCCGGGTGCAGCTAGCGACC
CTCTCGCCACCTGCGCGCAGCCCGAGGTGAGCAGTGAGCGGCGAGCGGGAGGGCAGCG
AGGCGTTTCGCGGGCCCCCTCCTGCTGCCCGGGCCCGGCCCGCTCATGGCGGCCATCCG
CAAGAAGCTGGTGGTGGTGGGCGACGGCGCGTGTGGCAAGACGTGCCTGCTGATCGTG
TTCAGTAAGGACGAGTTCGCCGAGGTGTACGTGCCACCGTCTTCGAGA ACTATGTGG
CCGACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCGCTGTGGGACACGGCGGGCCA

```

ES 2 339 524 B1

GGAGGACTACGACCGCCTGCGGCCGCTCTCCTACCCGGACACCGACGTCATTCTCATG
TGCTTCTCGGTGGACAGCCCGGACTCGCTGGAGAACATCCCCGAGAAGTGGGTCCCCG
5 AGGTGAAGCACTTCTGTCCCAATGTGCCCATCATCCTGGTGGCCAACAAAAAGACCT
GCGCAGCGACGAGCATGTCCGCACAGAGCTGGCCCCGCATGAAGCAGGAACCCGTGCGC
ACGGATGACGGCCGCGCCATGGCCGTGCGCATCCAAGCCTACGACTACCTCGAGTGCT
10 CTGCCAAGACCAAGGAAGGCGTGC GCGAGGTCTTCGAGACGGCCACGCGCGCCGCGCT
GCAGAAGCGCTACGGCTCCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGCAAGGTGCTATGAGGG
CCGCGCCCCGTGCGCCTGCCCTGCCGGCACGGCTCCCCCTCCTGGACCAGTCCCCCG
15 CGAGCCCCGAGAAGGGGAGACCCGTGTCCACAAGGACCCACCGGCCTGCCTGGCAT
CTGTCTGCTGACGCCTCTGGCTTGC GCCAGGACTTGGCGTGGGCACCGGGCGCCCCCA
TCCCAGTGTCTGTGTGCGTCCAGCTGTGTTGCACAGGCCTGGGCTCCCCACTGAGTGC
20 CAAGGGTCCCCTGAGCATGCTTTTCTGAAGAGCCGGGCCTCAGAGTGTGTGGCTGTGT
GTCTGTTGACTCCCCTCGCCCCATTTTCACCCACCCCCGCCTCTGATCCCCGGGGG
CGAGATTGGCGCGGGAGTGTGGCCGCGCCCCATCAGATGTTGCGCCTTCACCAGCGGG
25 AGCTTGATATCCCTTGTCTGTAACATAGACCCCGGGTACTGCGGGAGGGGAGGGCTGC
TGGGGAGGATGGGGGGATGTTATATAAATATAGATATAATTTTATTTTCGGAGCTAAG
ATGGTGTATTATTAAGGGTGGTGATGGGTGAGCGCTCTGGCCCAGGCTGGGCCAGACTC
30 CCGCCCAAGCATGAACAGGACTTGACCATCTTCCAACCCCTGGGGAAGACATTTGCA
ACTGACTTGGGGAGGACACAGCTTCAGCACAGCCTCTCCTGCGGGCCAGCCCGCTGCG
AACCCTCCACCAGCTACCGGAGGGAGGAGGGAGGATGCGCTGTGGGGTTGTTTTTGCC
35 ATAAGCGAACTTTGTGCCTGTCTTAGAAGTGAAAATTGTTTCAGTCCAAGAACTGATG
TTATTTGATTTATTTAAAGGCTAAAATTTGTTTTTTTTATTCTTTGCACAATTGTTTCA
40 TTGTTTGACACTTAATGCACTCGTCATTTGCATACGACAGTAGCATTCTGACCACACT
TGTACGCTGTAACCTCATCTACTTCTGATGTTTTTAAAAAATGACTTTTAACAAGGAG
AGGGAAAAGAAACCCACTAAATTTTGCTTTGTTTCCTTGAAGAATGTGGCAACACTGT
45 TTTGTGATTTTATTTGTGCAGGTCATGCACACAGTTTTGATAAAGGGCAGTAACAAGT
ATTGGGGCCTATTTTTTTTTTTTCCACAAGGCATTCTCTAAAGCTATGTGAAATTTTC
TCTGCACCTCTGTACAGAGAATACACCTGCCCTGTATATCCTTTTTTCCCCTCCCCT
50 CCCTCCCAGTGGTACTTCTACTAAATTGTTGTCTTGTTTTTTATTTTTTAAATAAACT
GACAAATGACAAAATGGTGAGCTTATGATGTTTACATAAAAGTTCTATAAGCTGTGTA
TACAGTTTTTTATGTAAAATATTAAGACTATGATGATGACATTTA

55

La secuencia de aminoácidos de la proteína RhoB humana (NP_004031.1) (196 aa) se proporciona en la siguiente secuencia SEC ID No. 2:

60

MAAIRKKLVVVGDGACGKTCLLIVFSKDEFPEVYVPTVFFENYVADIEVDGKQVELALW
DTAGQEDYDRLRPLSYPD TDVILMCFVSDSPDSLENIPEKWVPEVKHFCPNVPIILVA
65 NKKDLRSDEHVRTELARMKQEPVRTDDGRAMAVRIQAYDYLECSAKTKEGVREVFETA
TRALQKRYGSQNGCINCKVL

ES 2 339 524 B1

La secuencia de nucleótidos del ARNm de RhoB humana (NM_004040.2) (5'→3', 2384 pb) se proporciona en la siguiente secuencia SEC ID No. 7:

5 ATCTGCCACCGCAGTCTGGTTGGAGCTGTTGTCTTGTATGCTCAGCGAGGCCCGGAGA
GACCCGGGAGAGAGCTAGGCCGAGTCCACCGCCCGAGTCTGCTGCCCCGAGCCCGCGTT
10 ACGCACAAAGCCGCCGATCCCCGGCCTGGGGTGAGCAGAGCGACCACCGCCCGGGAGC
AGCGCGGCGAGACGCACGGTGCGCCCTATGCCCCCGCGCCCCACCGCCCCGCGCG
GCAGCCGAAGCGCAGCGAGAGAACGCGCCACCGCGGGGCCCGGGTGCAGCTAGCGACC
15 CTCTCGCCACCTGCGCGCAGCCCGAGGTGAGCAGTGAGCGGCGAGCGGGAGGGCAGCG
AGGCGTTCGCGGGCCCCCTCCTGCTGCCCGGGCCCGGCCGCTCATGGCGGCCATCCG
CAAGAAGCTGGTGGTGGTGGGCGACGGCGCGTGTGGCAAGACGTGCCTGCTGATCGTG
20 TTCAGTAAGGACGAGTTCGCCGAGGTGTACGTGCCACCGTCTTCGAGAACTATGTGG
CCGACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCGCTGTGGGACACGGCGGGCCA
GGAGGACTACGACCGCCTGCGGCCGCTCTCCTACCCGGACACCGACGTCATTCTCATG
25 TGCTTCTCGGTGGACAGCCCGGACTCGCTGGAGAACATCCCCGAGAAGTGGGTCCCCG
AGGTGAAGCACTTCTGTCCCAATGTGCCCATCATCCTGGTGGCCAACAAAAAGACCT
GCGCAGCGACGAGCATGTCCGCACAGAGCTGGCCCGCATGAAGCAGGAACCCGTGCGC
30 ACGGATGACGGCCGCGCCATGGCCGTGCGCATCCAAGCCTACGACTACCTCGAGTGCT
CTGCCAAGACCAAGGAAGGCGTGC GCGAGGTCTTCGAGACGGCCACGCGCGCCGCGCT
GCAGAAGCGCTACGGCTCCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGCAAGGTGCTATGAGGG
35 CCGCGCCCGTTCGCGCCTGCCCTGCCCGCACGGCTCCCCCTCCTGGACCAGTCCCCCG
CGAGCCCGGAGAAGGGGAGACCCGTGTCCACAAGGACCCACCGGCCTGCCTGGCAT
CTGTCTGCTGACGCCTCTGGCTTGCGCCAGGACTTGGCGTGGGCACCGGGCGCCCCCA
40 TCCCAGTGTCTGTGTGCGTCCAGCTGTGTTGCACAGGCCTGGGCTCCCCACTGAGTGC
CAAGGGTCCCCTGAGCATGCTTTTCTGAAGAGCCGGGCCTCAGAGTGTGTGGCTGTGT
GTCTGTTGACTCCCCTCGCCCCATTTTACCCCCACCCCGCCTCTGATCCCCGGGGG
45 CGAGATTGGCGCGGGAGTGTGGCCGCGCCCCATCAGATGTTCTCCCTTACCAGCGGG
AGCTTGATATCCCTTGTCTGTAACATAGACCCCGGGTACTGCGGGAGGGGAGGGCTGC
TGGGGAGGATGGGGGGATGTTATATAAATATAGATATAATTTTATTTTCGGAGCTAAG
50 ATGGTGTTATTTAAGGGTGGTGTGATGGGTGAGCGCTCTGGCCCAGGCTGGGCCAGACTC

55

60

65

ES 2 339 524 B1

CCGCCAAGCATGAACAGGACTTGACCATCTTCCAACCCCTGGGGAAGACATTTGCA
ACTGACTTGGGGAGGACACAGCTTCAGCACAGCCTCTCCTGCGGGCCAGCCCGCTGCG
5 AACCTCCACCAGCTACCGGAGGGAGGAGGGAGGATGCGCTGTGGGGTTGTTTTTGCC
ATAAGCGAACTTTGTGCCTGTCCTAGAAGTGAAAATTGTTTCAGTCCAAGAACTGATG
TTATTTGATTTATTTAAAGGCTAAAATTTGTTTTTTTATTCTTTGCACAATTGTTTCA
10 TTGTTTGACACTTAATGCACTCGTCATTTGCATACGACAGTAGCATTCTGACCACACT
TGTACGCTGTAACCTCATCTACTTCTGATGTTTTTAAAAATGACTTTTAAACAAGGAG
AGGGAAAAGAAACCCACTAAATTTTGCTTTGTTTCCCTTGAAGAATGTGGCAACACTGT
15 TTTGTGATTTTATTTGTGCAGGTCATGCACACAGTTTTGATAAAGGGCAGTAACAAGT
ATTGGGGCCTATTTTTTTTTTTTCCACAAGGCATTCTCTAAAGCTATGTGAAATTTTC
TCTGCACCTCTGTACAGAGAATACACCTGCCCTGTATATCCTTTTTTCCCCTCCCCT
20 CCTCCCAGTGGTACTTCTACTAAATGTTGTCTTGTTTTTTATTTTTTAAATAAACT
GACAAATGACAAAATGGTGAGCTTATGATGTTTACATAAAAGTTCTATAAGCTGTGTA
TACAGTTTTTTATGTAAAATATTTAAAAGACTATGATGATGACATTTAAAAA
25 AAAAAA
AAAAAA

La secuencia de nucleótidos del ADNc de RhoB humana (CCDS1699.1) (5'→3', 591 pb) se proporciona en la
siguiente secuencia SEC ID No. 8:

ATGGCGGCCATCCGCAAGAAGCTGGTGGTGGTGGGCGACGGCGCGTGTGGCAAGACGT
GCCTGCTGATCGTGTTTCAGTAAGGACGAGTTCCCCGAGGTGTACGTGCCACCGTCTT
35 CGAGAACTATGTGGCCGACATTGAGGTGGACGGCAAGCAGGTGGAGCTGGCGCTGTGG
GACACGGCGGGCCAGGAGGACTACGACCGCCTGCGGCCGCTCTCCTACCCGGACACCG
40 ACGTCATTCTCATGTGCTTCTCGGTGGACAGCCCGGACTCGCTGGAGAACATCCCCGA
GAAGTGGGTCCCCGAGGTGAAGCACTTCTGTCCCAATGTGCCATCATCCTGGTGGCC
AACAAAAAGACCTGCGCAGCGACGAGCATGTCCGCACAGAGCTGGCCCGCATGAAGC
45 AGGAACCCGTGCGCACGGATGACGGCCGCGCCATGGCCGTGCGCATCCAAGCCTACGA
CTACCTCGAGTGCTCTGCCAAGACCAAGGAAGGCGTGCGCGAGGTCTTCGAGACGGCC
ACGCGCGCCGCGCTGCAGAAGCGCTACGGCTCCCAGAACGGCTGCATCAACTGCTGCA
50 AGGTGCTATGA

Las secuencias del ADN genómico, proteína, ARNm, ADNc, cebadores, y sondas presentadas en la presente
invención también comprenden aquellas secuencias que tienen por lo menos un 70% de homología con respecto a las
55 secuencias en SEC ID NO. 1-8, preferiblemente por lo menos un 80%, y más preferiblemente por lo menos un 90%,
95%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología. Alternativamente, las formas generadas por splicing alternativo, también
están comprendidas en el alcance de la presente invención.

El término “homología” se refiere al nivel de similitud entre las secuencias de ácido nucleico o aminoácidos
60 en términos de porcentaje de identidad posicional de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, es decir, la simi-
litud o identidad de las secuencias. El porcentaje de homología entre dos secuencias se puede calcular según los
algoritmos FASTA o BLAST (Altschul *et al.* “Basic local alignment search tool” J. Mol. Biol. 1990, 215, 403-410,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>; Lipman *et al.* “Rapid and sensitive protein similarity searches”. Science 1985, 227,
1435-1441. <http://www.ebi.ac.uk>), que se incorporan en la presente invención por referencia.

Cualquier otra técnica adecuada para medir la expresión del gen de RhoB a nivel de proteína, ARNm, o ADNc
también está comprendida en el alcance de la presente invención.

ES 2 339 524 B1

En una realización alternativa de la presente invención, el procedimiento de pronóstico de la evolución de la enfermedad en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón comprende la medición del número de copias del gen de RhoB.

5 *Medición del número de copias del gen de RhoB*

Una metodología para determinar el número de copias del gen de RhoB en una muestra es la hibridación *in situ*, por ejemplo, hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) (véase, Angerer, 1987 Meth. Enzymol 152: 649).

10 Generalmente, la hibridación *in situ* comprende las siguientes etapas principales: (1) fijación del tejido o estructura biológica a analizar; (2) tratamiento de prehibridación de la estructura biológica para aumentar la accesibilidad al ADN diana, y para reducir la unión no específica; (3) hibridación de la mezcla de ácidos nucleicos al ácido nucleico en la estructura biológica o tejido; (4) lavados posteriores a la hibridación para eliminar los fragmentos de ácidos nucleicos no unidos en la hibridación, y (5) la detección de los fragmentos de ácido nucleico hibridados. Las sondas
15 utilizadas en dichas aplicaciones habitualmente se marcan, por ejemplo, con radioisótopos o informadores fluorescentes. Las sondas preferidas son suficientemente largas, por ejemplo, de aproximadamente 50, 100, ó 200 nucleótidos hasta aproximadamente 1000 o más nucleótidos, para permitir la hibridación específica con el ácido o ácidos nucleicos diana en condiciones rigurosas.

20 Otra metodología alternativa para determinar el número de copias de ADN es la hibridación genómica comparativa (CGH). En los procedimientos de hibridación genómica comparativa, se marca un grupo de “prueba” de ácidos nucleicos con un primer marcador, mientras que un segundo grupo de prueba (por ejemplo, de una célula o tejido normal) se marca con un segundo marcador. La proporción de hibridación de los ácidos nucleicos se determina mediante la proporción de la unión del primer y segundo marcadores a cada sonda de un grupo. Se detectan las diferencias en
25 la proporción de las señales de los dos marcadores, por ejemplo, debido a la amplificación de genes en el grupo de prueba, y la proporción proporciona una medición del número de copias del gen de RhoB, correspondiente a la sonda específica utilizada. Se puede generar una representación citogenética de la variación del número de copias de ADN mediante CGH, lo cual proporciona unas relaciones de fluorescencia a lo largo de la longitud de los cromosomas de los ADN de prueba marcados de manera diferencial y ADN genómico de referencia.

30 Los protocolos de hibridación adecuados para su uso con los procedimientos de la presente invención se describen, por ejemplo, en Albertson (1984) EMBO J. 3:1227-1234; Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9138-9142; 430402EPAE PO Pub. No. 430:402; Methods in Molecular Biology, Vol. 33: *In Situ* Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, NJ (1994).

35 Los ensayos basados en la amplificación también se pueden utilizar para medir el número de copias del gen de RhoB. En dichos ensayos, la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos de RhoB actúa como plantilla en una reacción de amplificación (por ejemplo, Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR). En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de amplificación será proporcional a la cantidad de plantilla en la muestra original. La comparación con controles apropiados proporciona una medición del número de copias del gen de RhoB, correspondiente a la sonda específica utilizada, según el principio descrito anteriormente. Los procedimientos de PCR cuantitativa a tiempo real que utilizan sondas Taqman son conocidos en la técnica. Se proporcionan protocolos detallados para PCR cuantitativa a tiempo real, por ejemplo, para ARN en: Gibson *et al.*, 1996, A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res. 10:995-1001; y para ADN en: Heid *et al.*, 1996, Real time quantitative PCR. Genome Res.
40 10:986-994.

45 La transferencia Southern también se puede utilizar para medir el número de copias del gen de RhoB. Con esta metodología, se analiza el ADN en geles de agarosa o acrilamida para fraccionar el ADN según el tamaño seguido de la transferencia del ADN desde el gel hasta un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o una membrana de nylon. A continuación, el ADN inmovilizado se hibrida con una sonda marcada para detectar las muestras de ADN complementarias a la sonda utilizada. El ADN se puede dividir con enzimas de restricción antes de la electroforesis. Después de la electroforesis, el ADN se puede despurinar parcialmente y desnaturalizar antes o durante la transferencia al soporte sólido. Las transferencias Southern son una herramienta habitual de los biólogos moleculares (J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY, pág. 9.31-9.58 [1989]).

50 Un procedimiento potente para la determinación del número de copias de ADN utiliza plataformas basadas en microarrays. La tecnología de microarrays se puede utilizar porque ofrece una resolución elevada. Por ejemplo, la CGH tradicional tiene generalmente una resolución del mapeo limitada a 20 Mb; mientras que en CGH basada en arrays, las relaciones de fluorescencia de los ADN de prueba marcados de manera diferencial y ADN genómico de referencia proporcionan una medición “locus por locus” de la variación el número de copias de ADN, consiguiendo de esta manera una mayor resolución de mapeo. Los detalles de un procedimiento de microarray se puede hallar en la bibliografía. Véase, por ejemplo, 6232068USB US 6,232,068; Pollack *et al.*, Nat Genet, 1999, 23(1):41-6.

55 Cualquier otra técnica adecuada para medir el número de copias del gen de RhoB también está comprendida en el alcance de la presente invención.

60 Se ha observado que la sobreexpresión o aumento en el número de copias del gen de RhoB en relación con la expresión o el número de copias del mismo gen en una muestra de control son marcadores útiles para el pronóstico de

adenocarcinoma de pulmón. En particular, dicha sobreexpresión o aumento en el número de copias del gen de RhoB es indicativo del riesgo de metástasis, o reaparición o reincidencia de actividad neoplásica.

5 La “sobreexpresión” de un gen de RhoB o un “mayor” nivel o un nivel “elevado” de un polinucleótido o proteína RhoB se refiere a un nivel de polinucleótido o proteína RhoB que, en comparación con el nivel de control de RhoB, es de forma detectable más elevado. De manera similar, un “aumento” en el número de copias del gen de RhoB se refiere a un nivel del número de copias de RhoB que, en comparación con un nivel de control de RhoB, es de forma detectable más elevado.

10 La sobreexpresión o aumento en el número de copias del gen de RhoB son términos relativos que significan que se encuentra una diferencia detectable (más allá de la contribución del ruido en el sistema utilizado para medirlo) en la cantidad de expresión o número de copias del gen de RhoB relativo a cierta línea base. En la presente invención, la línea base es la expresión génica medida o el número de copias de una muestra de control, cuyo término se define a continuación.

15 La comparación se puede llevar a cabo mediante análisis estadístico sobre las mediciones numéricas de la expresión o número de copias del gen de RhoB; o, se puede realizar a través del examen visual de los resultados experimentales por investigadores cualificados.

20 Por ejemplo, las intensidades de expresión génica de un tejido enfermo se pueden comparar con las intensidades de expresión generadas de tejido normal del mismo tipo (por ejemplo, muestra de tejido de pulmón enfermo vs. muestra de tejido de pulmón normal). Una relación de estas intensidades de expresión indica las veces que cambia la expresión génica entre las muestras de prueba y de control.

25 En una realización de la presente invención, la sobreexpresión del gen de RhoB se determina cuando existe por lo menos una diferencia de 1,5 veces en su expresión en relación con la expresión del mismo gen en una muestra de control. En otra realización de la presente invención, un aumento en el número de copias del gen de RhoB se determina cuando existe por lo menos una diferencia de 1,5 veces en su número de copias en relación con el número de copias del mismo gen en una muestra de control.

30 El test t de Student es un ejemplo de test estadístico robusto que se puede utilizar para buscar diferencias significativas entre dos grupos. Cuanto más bajo es el valor de p, es más concluyente la evidencia de que el gen muestra una diferencia entre los diferentes grupos. Un valor de p inferior a 0,05 mediante el test t pone de manifiesto que el gen es significativamente diferente. Una evidencia más concluyente es un valor de p inferior a 0,05 después de tener en cuenta la corrección de Sidak. Para un número amplio de muestras en cada grupo, un valor de p inferior a 0,05 después del test de aleatorización/permutación es la evidencia más concluyente de una diferencia significativa.

35 Una “muestra de control” se refiere a una muestra de material biológico representativo de sujetos sanos sin cáncer. El nivel de expresión del gen de RhoB o el número de copias del gen de RhoB en una muestra de control es de manera deseable habitual de la población general de sujetos normales sin cáncer de la misma especie. Esta muestra se puede recoger de un sujeto con el objetivo de ser utilizada en los procedimientos descritos en la presente invención o, puede ser cualquier material biológico representativo de sujetos normales sin cáncer obtenido para otras razones, pero sin embargo, adecuado para su uso en los procedimientos de la presente invención. También se puede obtener una muestra de control a partir de tejido normal del sujeto que tiene cáncer o es sospechoso de tener cáncer. Una muestra de control también se puede referir a un nivel determinado de expresión del gen de RhoB o el número de copias del gen de RhoB representativos de la población sin cáncer, que se han establecido previamente en base a las mediciones de sujetos normales sin cáncer. Como tal, una muestra de control no necesita ser un material, sino que pueden ser datos o información relacionada con una muestra de control. Estos datos o información se almacenan habitualmente en forma electrónico o papel. Alternativamente, una muestra biológica de control puede referirse a una muestra que se obtiene de un individuo diferente o puede ser un valor normalizado basado en los valores de la línea base hallados en una población. Además, una muestra de control se puede definir mediante una edad, sexo, etnia u otros parámetros demográficos específicos. En algunas situaciones, el control está implícito en la medición concreta. Por ejemplo, se considera un procedimiento de detección que sólo puede detectar RhoB o el número de copias del gen de RhoB cuando está presente un nivel más elevado de lo habitual en un sujeto normal sin cáncer, por ejemplo, un ensayo inmunohistoquímico, para evaluar el nivel de RhoB o el número de copias del gen de RhoB en comparación con el nivel de control o el número de copias del gen RhoB, ya que el nivel de control o el número de copias es natural y conocidos en el ensayo.

40 La presente invención se refiere además al uso de un gen de RhoB, o una región del mismo, como marcador de pronóstico de la metástasis, o la reaparición o la reincidencia de actividad neoplásica en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón.

45 La presente invención proporciona además un procedimiento para el screening de fármacos activos contra el adenocarcinoma de pulmón, comprendiendo dicho procedimiento:

50 a) la medición de la expresión del gen de RhoB, o la medición del número de copias del gen de RhoB, en una muestra con células de adenocarcinoma de pulmón en presencia de un fármaco, o la medición de la afinidad de unión ente un fármaco y un polipéptido RhoB;

ES 2 339 524 B1

- b) la comparación de la expresión o números de copias medidas del gen de RhoB, o la afinidad de unión de la etapa a) a una muestra de control;

caracterizado porque una expresión o número de copias reducido del gen de RhoB, o una mayor actividad enzimática en la etapa a), en relación con la expresión o el número de copias del mismo gen o la afinidad de unión del mismo polipéptido en una muestra de control es indicativa de la actividad del fármaco contra el adenocarcinoma de pulmón.

Como tal, la presente invención proporciona procedimientos para identificar compuestos o agentes que se pueden utilizar para tratar trastornos caracterizados por, o asociados con una expresión o número de copias reducido del gen de RhoB. Estos procedimientos incluyen habitualmente la etapa de screening de un candidato, compuesto de prueba o agente para identificar compuestos que son un agonista o antagonista de un polipéptido RhoB, y específicamente por la capacidad de interactuar con (por ejemplo, unirse a) un polipéptido RhoB, para modular la interacción de un polipéptido RhoB y una molécula diana, y/o para modular la expresión de ácido nucleico de RhoB y/o la actividad del polipéptido RhoB. Los candidatos, compuestos de prueba o agentes que tienen una o más de estas capacidades se pueden utilizar como fármacos para tratar trastornos caracterizados por una expresión o número de copias reducido del gen de RhoB.

Una expresión o número de copias reducida del marcador del gen de RhoB en un adenocarcinoma de pulmón también puede servir para predecir la respuesta de ese cáncer a terapias específicas. Este marcador molecular se puede utilizar para seleccionar la terapia más apropiada para el sujeto.

Como tal, la presente invención proporciona además un procedimiento para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento terapéutico en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón, comprendiendo dicho procedimiento

- a) la medición de la expresión del gen de RhoB, o la medición del número de copias del gen de RhoB, en una muestra con células de adenocarcinoma de pulmón de dicho sujeto, generando de este modo un nivel inicial;
- b) la medición de la expresión del gen de RhoB, o la medición del número de copias del gen de RhoB, en una segunda muestra con células de adenocarcinoma de pulmón del mismo sujeto en un momento posterior a la administración de la pauta de tratamiento, obteniendo de este modo un nivel de prueba; y
- c) la comparación de los niveles inicial y de prueba;

caracterizado porque una expresión o número de copias reducido del gen de RhoB en el nivel de prueba en relación con el nivel inicial es indicativa de que la pauta de tratamiento es eficaz en el sujeto.

La presente invención se refiere además al uso de una molécula de nucleótido o anticuerpo que interactúan con ADN, ARN, proteína de RhoB, o un fragmento de los mismos, para el pronóstico de la evolución de la enfermedad en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón, para el screening de fármacos activos contra el adenocarcinoma de pulmón, o para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento terapéutico en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón. Dicha molécula de nucleótido es un nucleótido que tiene por lo menos un 70% de homología con respecto a la SEC ID NO. 4-6, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% de homología con respecto a la SEC ID NO. 4-6. La molécula de anticuerpo que interactúa con ADN, ARN, proteína de RhoB, o un fragmento de los mismos, puede ser monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico, o está conjugado a un segundo anticuerpo, o un fragmento del mismo. Particularmente, la molécula de anticuerpo es el anticuerpo policlonal Rho B (119), o una molécula de anticuerpo que tiene preferiblemente por lo menos un 80% y más preferiblemente por lo menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de homología con el anticuerpo policlonal Rho B (119).

Un "fragmento" es una parte de una secuencia de RhoB madura natural, nativa o endógena de longitud completa que tiene uno o más residuos de aminoácidos eliminados. El residuo o residuos de aminoácidos eliminados pueden estar en cualquier parte del polipéptido, incluyendo en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal, o internamente. Dicho fragmento tendrá por lo menos una propiedad biológica en común con RhoB. Los fragmentos de RhoB tendrán habitualmente una secuencia consecutiva de por lo menos 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ó 60 residuos de aminoácidos que son idénticos a las secuencias de la RhoB aislada de un mamífero, incluyendo RhoB de SEC ID NO: 2.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "anticuerpo" es intercambiable con "inmunoglobulina" y se refiere a inmunoglobulinas de la forma general hallada en especies vertebradas, incluyendo mamíferos, tales como humanos, primates, roedores, conejos y muchas otras especies en las que se han identificado dichas inmunoglobulinas. "Anticuerpo" significa moléculas que corresponden a inmunoglobulinas completas, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, y Fv, que son capaces de unirse al determinante epitópico.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de inmunoreaccionar con un epitopo particular de un antígeno, mientras que el término "anticuerpo policlonal" se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen múltiples especies de sitios de unión a antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. De este modo,

una composición con anticuerpos monoclonales muestra habitualmente una única afinidad de unión para un antígeno particular con el que inmunorreacciona.

Los procedimientos para producir y cribar anticuerpos específicos utilizando tecnología de hibridomas son rutinarios y conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitante, se pueden inmunizar ratones con un polipéptido de la presente invención o una célula que expresa dicho péptido. Una vez se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero de ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. A continuación, los esplenocitos se fusionan mediante técnicas conocidas a cualquier célula de mieloma adecuada. Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante dilución limitada. A continuación, los clones de hibridomas se ensayan mediante procedimientos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la presente invención. Los fluidos ascíticos, que contienen en general niveles elevados de anticuerpos, se pueden generar mediante la inmunización de ratones con clones de hibridomas positivos.

Los anticuerpos policlonales se producen habitualmente mediante la inmunización de un mamífero adecuado, tal como un ratón, conejo o cabra. Frecuentemente se prefieren mamíferos más grandes, ya que la cantidad de suero que se puede recoger es mayor. Se inyecta un antígeno al mamífero. Esto induce a que los linfocitos B produzcan inmunoglobulinas IgG específicas para el antígeno. Esta IgG policlonal se purifica del suero de mamífero. En cambio, los anticuerpos monoclonales derivan de una única línea celular.

El término “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que la región constante proviene de un anticuerpo de una especie (habitualmente humana) y la región variable proviene de un anticuerpo de otra especie (habitualmente roedor). Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica.

El término “anticuerpo humanizado” tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a moléculas de anticuerpo en las que se han sustituido aminoácidos en las regiones que no son de unión a antígeno con el fin de que se asemeje lo más posible a un anticuerpo humano, mientras mantiene aún la capacidad de unión original. Dependiendo del contexto, esta expresión también puede incluir anticuerpos “de primate”, en los que un primer anticuerpo obtenido de un organismo que no es primate ha sido modificado para asemejarse lo más posible a una inmunoglobulina de primate.

Un anticuerpo “biespecífico” o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos parejas de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una serie de procedimientos incluyendo la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

Una realización adicional de la presente invención proporciona un kit para el pronóstico de la evolución de la enfermedad en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón que comprende reactivos para medir la expresión o el número de copias del gen de RhoB. Dicho kit puede comprender adicionalmente reactivos adecuados para realizar un análisis con microarray. En particular, el kit según la presente invención comprende Rho B (119):sc-180 Santa Cruz Biotechnology, Inc. Rho B (119) es un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad desarrollado contra un péptido que se mapea en una región interna de RhoB de origen humano. Alternativamente, el kit según la presente invención comprende cebadores con SEC ID No. 4-6 para realizar la RT-PCR o PCR cuantitativa a tiempo real.

La presente invención proporciona además un amplicón de gen de RhoB aislado, donde el amplicón comprende más de una copia de un polinucleótido seleccionado entre:

- a) un polinucleótido que codifica el polipéptido establecido en la SEC ID NO. 2;
- b) un polinucleótido establecido en la SEC ID NO. 1;
- c) un polinucleótido que tiene por lo menos un 70% de homología con el polinucleótido de a) o b); y
- d) un polinucleótido que se sobreexpresa en células de adenocarcinoma de pulmón que tiene por lo menos un 70% de homología con el polinucleótido de a) o b).

La presente invención se refiere además a inhibidores de la sobreexpresión del gen de RhoB para su uso como medicamento. Dicho uso como medicamento o método de tratamiento comprende la administración a sujetos con NSCLC o a sujetos susceptibles de desarrollar NSCLC incluyendo adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, o carcinoma de células grandes de una cantidad eficaz de un inhibidor de la sobreexpresión del gen de RhoB para combatir las afecciones asociadas con NSCLC, en particular para evitar el desarrollo posterior a metástasis ósea, o la reaparición o reincidencia de actividad neoplásica.

La presente invención también se refiere al uso de los inhibidores de la sobreexpresión del gen de RhoB o cualquier subgrupo de los mismos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de NSCLC incluyendo adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, o carcinoma de células grandes, en particular para evitar el desarrollo posterior en metástasis ósea, o la reaparición o reincidencia de actividad neoplásica. Dicho de otra manera, la presente invención proporciona inhibidores de la sobreexpresión del gen de RhoB para su uso en el tratamiento de NSCLC incluyendo adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, o carcinoma de células grandes, en particular para evitar el desarrollo posterior a metástasis ósea, o la reaparición o reincidencia de actividad neoplásica.

ES 2 339 524 B1

El término “tratar”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a invertir, aliviar o inhibir el progreso del trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dichos trastornos o afección. El término “tratamiento” se refiere al hecho de tratar, lo cual se ha definido anteriormente.

5 El término “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” tal como se utilizan en la presente invención, significan la cantidad de compuesto o componente o agente farmacéutico activo que obtiene la respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, animal o humano que se está buscando, a la luz de la presente invención, por un investigador, veterinario, doctor u otro profesional clínico, que incluye la mejora de los síntomas de la enfermedad en tratamiento.

10 Dado que la presente invención incluye combinaciones que comprenden dos o más agentes, la “cantidad terapéuticamente eficaz” es aquella cantidad de los agentes tomados en conjunto, de manera que el efecto combinado proporciona la respuesta biológica o médica deseada.

15 El término “inhibidor” pretende incluir antagonistas y, se refiere a una molécula que directa o indirectamente reduce la sobreexpresión del gen de RhoB, o la actividad biológica de un polipéptido o proteína RhoB. Los inhibidores de la sobreexpresión del gen de RhoB pueden incluir anticuerpos, ácidos nucleicos, u otras moléculas.

20 En una realización, los inhibidores de la sobreexpresión del gen de RhoB se pueden seleccionar entre:

- a) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína RhoB, o un polipéptido que comprende una región de unión a RhoB;
- 25 b) un péptido mimético del polipéptido Rhob;
- c) un ácido nucleico inhibidor del gen de RhoB seleccionado entre un oligonucleótido antisentido, un ribozima, y un agente ARNi seleccionado entre ARNs y ARNsh; o
- 30 d) una combinación que comprende lovastatina y ácido zoledrónico, y/o sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

La molécula de anticuerpo que se une específicamente a una proteína RhoB puede ser monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico, tal como se describe anteriormente en la presente invención.

35 El término “fragmento de anticuerpo” se refiere más específicamente a estos fragmentos y/o polipéptidos de tipo inmunoglobulina que no comprenden una inmunoglobulina completa.

40 Un “polipéptido que comprende una región de unión específica a RhoB” significa un polipéptido que incorpora una o más regiones de unión que se unen específicamente a la proteína RhoB de la SEC ID NO. 2. Un tipo clásico de región de unión específica a antígeno es una región determinante de complementariedad (CDR) hallada en una inmunoglobulina. Las CDRs son secuencias de aminoácidos cortas que se unen específicamente al antígeno en cuestión y proporcionan la base de la selectividad de unión del polipéptido en el que reside. Las CDRs se identifican habitualmente a partir de inmunoglobulinas, pero se pueden generar mediante otros medios.

45 Las regiones de unión específica a antígeno también incluyen secuencias de aminoácidos relativamente cortas que se unen a un antígeno, incluso si estas secuencias no derivan de CDRs. WO2004/044011, incorporada en la presente invención por referencia, proporciona un ejemplo de cómo dichas regiones de unión específica a antígeno (que no son CDRs) se pueden identificar y desarrollar. Existen otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Una vez desarrollada, la región de unión específica a RhoB se puede utilizar en una amplia variedad de estructuras y armazones conocidas y futuribles, incluyendo cualquier isotipo de inmunoglobulina o fragmento de la misma, y otros polipéptidos de estructura o armazón que no son inmunoglobulinas para proporcionar la especificidad de unión a antígeno. Todos estos polipéptidos se consideran en la presente invención como “polipéptidos que comprenden una región de unión específica a RhoB”.

55 Un “péptido mimético” es un agente no peptídico derivado de manera sintética creados en base al conocimiento de los residuos críticos del polipéptido de un sujeto que puede mimetizar la función normal del polipéptido. Los miméticos de péptido pueden romper la unión de un polipéptido a su receptor o a otras proteínas y, de este modo, interferir con la función normal de un polipéptido. Por ejemplo, un mimético de RhoB interferiría con la función normal de RhoB.

60 “Secuencia de ácidos nucleicos”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, y fragmentos o partes de los mismos, cuyos componentes poliméricos pueden ser ADN, ARN, nucleótidos modificados, miméticos de nucleótidos, o combinaciones de los mismos; y pueden ser de origen genómico o sintético, y pueden ser cadena simple o doble, y representan la cadena de sentido o antisentido.

65 El término “antisentido” tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de ADN o ARN específica, habitualmente un ARNm diana. Se unen a ARNm mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick, e inhiben su mensaje diana a través de la degradación mediante

ES 2 339 524 B1

ribonucleasa (RNasa) H o mediante interferencia con la maquinaria de traducción. Los oligonucleótidos antisentido se pueden estabilizar opcionalmente con fosforotioatos, metilfosfonatos, nanopartículas de polialquilcianoacrilato, y modificaciones en 2' de los azúcares. El término "cadena antisentido" se utiliza en referencia a una cadena de ácido nucleico que es complementaria a la "cadena de sentido". Las moléculas antisentido se pueden producir mediante cualquier procedimiento, incluyendo la síntesis mediante unión del gen de interés en orientación inversa a un promotor viral que permite la síntesis de una cadena complementaria. La designación "negativa" se utiliza algunas veces en referencia a la cadena antisentido, y "positiva" se utiliza algunas veces en referencia a la cadena de sentido.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "ribozima" significa una molécula de ARN que tiene una actividad enzimática que es capaz de dividir o empalmar otras moléculas de ARN separadas en una secuencia de bases de nucleótidos de una manera específica. En referencia a una molécula de ARN catalítica o enzimática se entiende una molécula de ARN que tiene complementariedad en una región de unión a sustrato con el ARNm de RhoB, y también tiene actividad enzimática que es activa para dividir y/o empalmar ese ARNm, alterándolo de esta manera.

El término "agente ARNi" tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a compuestos y composiciones que pueden actuar a través de un mecanismo de interferencia de ARN (véase, para una referencia general, He y Hannon, (2004) Nat. Genet. 5:522-532). Habitualmente se utilizan agentes ARNi tales como ARN de corta interferencia (ARNsi), ARN de doble cadena (ARNds), ARN en horquilla corta (ARNsh), también denominado algunas veces como ARN en horquilla pequeña, otros están en desarrollo. Cuando se introducen en una célula o se sintetizan en una célula, los agentes ARNi se incorporan en un complejo macromolecular que utiliza cadenas del agente ARNi para marcar y dividir cadenas de ARN que contienen la secuencia complementaria (o sustancialmente complementaria).

Tal como se contempla en la presente invención, se diseñan oligonucleótidos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ARN, agentes ARNi tales como ARNsi, ARNds, y ARNsh, ribozimas y ARN de cadena simple para inhibir la expresión de RhoB, de manera que se diseña la secuencia de nucleótidos elegida de la molécula inhibidora para provocar la inhibición de la síntesis endógena de proteína RhoB.

Por ejemplo, en base a la presente descripción, se puede utilizar el conocimiento de la secuencia de nucleótidos de RhoB para diseñar una molécula de ARNsi que inhiba la expresión de RhoB sin demasiada experimentación. De manera similar, los ribozimas se pueden sintetizar para reconocer secuencias de nucleótidos específicas de una proteína de interés y dividirla (Cech. J. Amer. Med Assn. 260:3030 (1988)). Las técnicas para el diseño de dichas moléculas para su uso en la inhibición dirigida de la expresión génica son bien conocidas por los expertos en la materia.

En una realización de la presente invención, el inhibidor de la sobreexpresión del gen de RhoB es una molécula ARNsh que tiene por los menos un 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de homología con la SEC ID NO. 3, tal como se proporciona a continuación.

SEC ID No.	secuencia
3	TTACTGAACACGATCAGCAGG

Los oligonucleótidos antisentido, ribozimas, y agentes ARNi se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ácidos nucleicos. Se incluyen técnicas para la síntesis química, tal como síntesis química de fosoramidita en fase sólida. Alternativamente, los oligonucleótidos antisentido, ribozimas, y agentes ARNi se pueden generar mediante transcripción *in vitro* de secuencias de ADN que codifican la molécula pertinente. Dichas secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores con promotores de ARN polimerasa adecuados.

Los oligonucleótidos antisentido, ribozimas, y agentes ARNi se pueden liberar a células mediante aplicación directa, tal como transfección o formuladas en liposomas. Las técnicas de transfección convencionales incluyen una variedad de técnicas reconocidas en el sector para introducir ácido nucleico exógeno (por ejemplo, ADN o ARN) en una célula huésped, incluyendo coprecipitación con fosfato cálcico o cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, (micro)inyección, o electroporación.

Los liposomas se pueden preparar utilizando técnicas convencionales incluyendo sonicación, diálisis con quelatos, homogeneización, infusión de disolvente acoplado con extrusión, extrusión por congelación-descongelación, microemulsificación, y otros. Los reactivos utilizados para reticular un liposoma u otro agente que contenga lípidos con oligonucleótidos antisentido, ribozimas, y agentes ARNi comprenden un derivado fosfolípido para anclarse a un extremo de la reticulación en la capa lipídica y un grupo reactivo en el otro extremo para proporcionar un punto de unión a la biomolécula diana. También se pueden utilizar liposomas polimerizados o liposomas recubiertos con polímero. Dichos polímeros pueden estabilizar el liposoma, reducir su depuración del cuerpo, y/o reducir su inmunogenicidad. El liposoma se puede cargar con un residuo funcional tal como un agente de diagnóstico o terapéutico durante o después de su formación. El agente puede estar contenido en el núcleo acuoso del liposoma o se puede incorporar o unir a su membrana circundante.

Alternativamente, la liberación de oligonucleótidos antisentido, ribozimas, y agentes ARNi se realiza a través de una estrategia de terapia génica en la que los vectores, incluyendo plásmidos, cósmidos, bacteriófagos, o vectores

virales, particularmente vectores retrovirales, lentivirales, o adenovirales, se liberan a una célula o sujeto; o células que dirigen la expresión de las moléculas, por ejemplo, células en las que se ha introducido un vector que dirige la expresión de la molécula, se administran al sujeto. Los vectores que dirigen la síntesis *in vivo* de oligonucleótidos antisentido, ribozimas, y agentes ARNi se pueden introducir en líneas celulares, células o tejidos de manera constitutiva o inducible.

Una molécula "vector" es una molécula de ácido nucleico en la que se puede insertar ácido nucleico heterólogo que entonces se puede introducir en una célula huésped apropiada. Los vectores tienen preferiblemente uno o más orígenes de replicación, y uno o más sitios en los que se puede insertar el ADN recombinante. Los vectores frecuentemente tienen medios adecuados mediante los cuales se pueden seleccionar las células con vectores de aquellas sin vectores, por ejemplo, que codifican genes de resistencia fármacos.

Una "célula huésped", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una célula procariota o eucariota que contiene ADN heterólogo que ha sido introducido en la célula mediante cualquier medio, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, transformación, infección viral, y similares.

"Heterólogo" tal como se utiliza en la presente invención significa "de origen natural diferente" o representa un estado no natural. Por ejemplo, si se transforma una célula huésped con un ADN o gen derivado de otro organismo, particularmente de otra especie, ese gen es heterólogo con respecto a la célula huésped y también con respecto a los descendientes de la célula huésped que portan ese gen. De forma similar, heteróloga se refiere a una secuencia de nucleótidos derivada de e insertada en el mismo tipo de células natural original, pero que está presente en un estado no natural, por ejemplo un número de copias diferentes, o bajo el control de diferentes elementos reguladores.

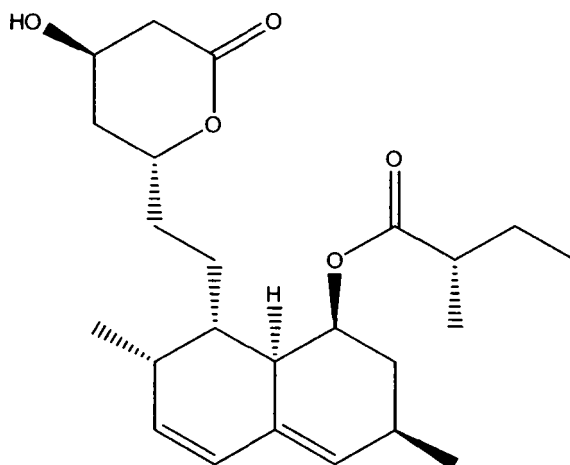
Los protocolos adicionales de terapia génica pueden implicar aislar una población de células, por ejemplo, células madre o células del sistema inmune de un sujeto, opcionalmente expandir las células en cultivo de tejido, y administrar un vector de terapia génica a las células *in vitro*. A continuación, las células se pueden devolver al sujeto. Opcionalmente, se pueden seleccionar *in vitro* células que expresan el oligonucleótido antisentido, ribozima, o agente ARNi deseados, antes de introducirlos en el sujeto. Alternativamente, se puede utilizar una población de células, que pueden ser células de una línea celular o de un individuo que no es el sujeto. Los procedimientos de aislamiento de células madre, células del sistema inmune, etc., de un sujeto son bien conocidos en la técnica. Dichos procedimientos se utilizan, por ejemplo, para el trasplante de médula ósea, trasplante de células madre de sangre periférica, etc., en individuos que está realizando quimioterapia.

En una realización adicional de la presente invención, el inhibidor de la sobreexpresión de gen de RhoB es una combinación que comprende lovastatina y ácido zoledrónico, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "y/o" se refiere a un "o" no exclusivo, es decir, "A y/o B" incluye "A y B", así como "A o B". Como tal, la expresión "lovastatina y ácido zoledrónico, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos", se refiere a las siguientes combinaciones:

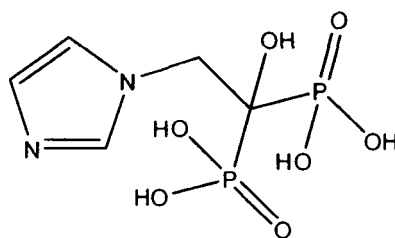
- a) lovastatina y ácido zoledrónico;
- b) una sal farmacéuticamente aceptable de lovastatina y ácido zoledrónico;
- c) lovastatina y una sal farmacéuticamente aceptable de ácido zoledrónico; y
- d) una sal farmacéuticamente aceptable de lovastatina y una sal farmacéuticamente aceptable de ácido zoledrónico.

La lovastatina es un producto comercial que puede ser proporcionado por las compañías TCI Europe NV, Sigma Aldrich, entre otras. El número de registro CAS de lovastatina es 75330-75-5, y su fórmula estructural es:



ES 2 339 524 B1

Ácido zoledrónico, al que también se hace referencia como zoledronato, es un producto comercial que puede ser proporcionado por las compañías Interchim Ambinter, ACIC Europe Limited, entre otras. El número de registro CAS del ácido zoledrónico es 118072-93-8, y su fórmula estructural es:



El término “farmacéuticamente aceptable” significa que un compuesto o combinación de compuestos deben ser compatibles con los otros ingredientes de una formulación, y no ser perjudiciales para el paciente. Para el uso terapéutico, las sales de lovastatina o ácido zoledrónico son aquellas en las que el contraión es farmacéuticamente aceptable.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables tal como se han mencionado anterior pretenden comprender las formas de sales de adición de ácidos no tóxicos terapéuticamente activas que la lovastatina y el ácido zoledrónico son cada uno capaces de formar. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden obtener de manera adecuada mediante el tratamiento de la forma básica de lovastatina y el ácido zoledrónico con dicho ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como hidrácidos, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico y ácidos similares; u ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acético, propanoico, hidroxiaético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico (es decir, ácido hidroxibutanodioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, benenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico, pamoico y ácidos similares. A la inversa, dichas formas de sales se pueden convertir mediante el tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

En una realización de la presente invención, la combinación que comprende lovastatina y ácido zoledrónico, y/o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas se pueden administrar de manera simultánea, por separado o de una manera secuencial.

Como tal, la presente invención se refiere además a una combinación de formulaciones farmacéuticas separadas en forma de kit. Por ejemplo, un kit puede comprender dos formulaciones farmacéuticas separadas que comprenden: 1) lovastatina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma; y 2) ácido zoledrónico o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. El kit puede comprender también un recipiente para las formulaciones separadas, tal como una botella compartimentada o un recipiente de papel de aluminio compartimentado. Ejemplos adicionales de recipientes incluyen jeringas, cajas, bolsas y similares. Habitualmente, un kit comprende instrucciones para la administración de los componentes separados. La forma kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferiblemente en formas de dosificación diferentes (por ejemplo, oral y parenteral), se administran a diferentes intervalos de dosificación, o cuando se desea el ajuste de los componentes individuales de la combinación por profesional clínico.

En general, se contempla que se puede utilizar una cantidad diaria eficaz de ácido zoledrónico de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2000 mg. Una cantidad diaria eficaz de lovastatina puede variar desde aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 400 mg.

La dosis exacta y la frecuencia de administración de los inhibidores de la sobreexpresión del gen de RhoB dependen del compuesto concreto o la combinación utilizada, la afección concreta en tratamiento, la gravedad de la afección en tratamiento, la edad, el peso, el sexo, la extensión del trastorno y la condición física general del paciente concreto, así como otra medicación que el individuo puede estar tomando, tal como es bien sabido por los expertos en la materia. Además, es evidente que dicha cantidad diaria eficaz puede disminuir o aumentar dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescribe los compuestos de la presente invención. Las variaciones de la cantidad diaria eficaz mencionada anteriormente sirven por tanto únicamente como guías.

Los siguientes ejemplos no limitativos ayudan a ilustrar los principios de la invención.

Ejemplos

Animales y cultivos celulares. Se adquirieron ratones desnudos atímicos de cuatro semanas de vida de Harlan (Barcelona, España) y se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos. La línea celular de adenocarcinoma A549 fueron obtenidas del Dr. Gazdar. Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal.

ES 2 339 524 B1

Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc e hibridación con microarrays

Se extrajo ARN utilizando Reactivo TRIzol (Life Technologies) de tres placas de cultivo de 10 cm por línea celular y se purificó utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). La pureza y calidad se evaluó utilizando nanochips RNA 6000 (Agilent Technologies, Alemania). A continuación, se utilizó el ADN para sintetizar sondas complementarias (ADNc) utilizando el kit de síntesis de ADNc de un ciclo (Affimetrix). Posteriormente, se sintetizó ARNc y se marcó con ADNc como plantilla utilizando el kit de marcado IVT (Affimetrix), y se purificó mediante GeneChip Sample Cleanup Module (Affimetrix). Los ARNc marcados se fragmentaron y se hibridaron a microarrays de oligonucleótidos de alta densidad de GeneChip de Affimetrix Human Genome U133 2.0 según los protocolos descritos en Gene Expression Analysis Technical Manual (<http://www.affimetrix.com>). Se hibridaron 3 microarrays con 3 réplicas biológicas independientes por línea celular de 3 líneas diferentes (denominadas M1M1, M1M3, y M1M4). Para cada línea celular, se utilizó un grupo de tres extracciones de ARNm independientes para hibridar cada microarray de oligonucleótidos de alta densidad humanos de GeneChip. Como controles se utilizaron 6 líneas de células tumorales parentales: 3 transfectadas con el vector de luciferasa y 3 no transfectadas. En total, se hibridó un conjunto de 15 muestras: 6 controles y 9 líneas metastáticas.

PCR cuantitativa a tiempo real

Se aisló el ARN total del 70-80% de cultivos confluentes utilizando Trizol RNA (2 μ g) y DNasa I, se trató y transcribió de forma inversa utilizando la transcriptasa inversa Superscript II y cebadores oligo(dT). Se realizó un Assay-on-Demand™ (Applied Biosystems) utilizando un sistema de detección de secuencias Gene Amp 7300 (Applied Biosystems) para RHOB según las recomendaciones del fabricante. El valor promedio de ciclo umbral (Ct) de las muestras por triplicado se utilizó para calcular la expresión génica. Los productos de PCR se normalizaron hasta los niveles de β -actina. El experimento se repitió tres veces con resultados idénticos.

Análisis de los datos de microarray: normalización, cálculo de la señal, expresión diferencial significativa y agrupación de los perfiles de muestra/gen

El análisis de los datos de microarrays se realizó utilizando la estrategia y procedimientos descritos en la bibliografía (Castellano *et al.* 2007). En resumen, se utilizó el algoritmo de RMA para la corrección de la base, la normalización intra- e intermicroarrays y el cálculo de la señal de expresión (2-4). Una vez calculada la señal de expresión absoluta para cada gen (es decir, el valor de la señal para cada conjunto de sondas) en cada microarray, se aplicó un procedimiento (denominado SAM) (Tusher *et al.* 2001) para calcular la expresión diferencial significativa y encontrar los conjuntos de sondas para genes que caracterizan las muestras altamente metastáticas. El procedimiento utiliza permutaciones para proporcionar una inferencia estadística robusta de los genes más significativos y proporciona valores de p ajustados a tests múltiples utilizando FDR (Benjamini *et al.* 1995). El test principal se realizó mediante el contraste de 4 muestras de control frente a 9 muestras altamente metastáticas. Sin embargo, con 3 líneas metastáticas diferentes (M1M1, M1M3, MM1M4) realizadas por triplicado, se realizaron análisis SAM múltiples para encontrar los genes que mostraban una expresión diferencial significativa que también eran estables en diferentes tests SAM. Se utilizó un corte de FDR < 0,20 para todos los cálculos de expresión diferencial. Se aplicaron todos estos procedimientos utilizando las herramientas estadísticas "R" y Bioconductor. Tras la identificación del conjunto de sondas para genes expresados de manera diferencial, se analizó la correspondiente matriz de valores de expresión para todas las hibridaciones de microarrays utilizando el algoritmo de agrupación "hclust" implementado en "R". Este algoritmo realiza un análisis de agrupación jerárquica con unión completa para buscar similitudes entre los conjuntos de sondas basados en sus valores de expresión en los diferentes microarrays de chips analizados. El algoritmo clasifica los conjuntos de sondas en grupos correlacionados que presentan perfiles de expresión o firmas de expresión similares. Esta estrategia global permitió la selección de genes claves significativos con perfiles de expresión similares.

Ensayos de metástasis: i.c. se realizó tal como se ha descrito anteriormente (González *et al.* 2007).

Creación de imágenes por bioluminescencia y análisis. Se anestesiaron ratones y se les inyectó intraperitonealmente 1,5 mg de D-Luciferina en 100 μ l de PBS. La imagen se completó a los 2 min exactamente para cada grupo de ratones con un sistema Xenogen IVIS acoplado un software de adquisición y análisis Living Image (Xenogen Inc.). El flujo de fotones se calculó para cada ratón mediante la utilización de una región circular de interés para cada pata trasera. Los valores base (de ratón inyectado con luciferina sin células tumorales) se restaron de cada medición.

Ensayo de proliferación

Se evaluó la proliferación celular mediante un ensayo MTT según las recomendaciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Los experimentos se repitieron tres veces y los datos se representaron como la media de los pocillos por sextuplicado \pm SEM.

ES 2 339 524 B1

Análisis radiográfico y tomográfico microcomputerizado (μ CT)

Se realizó una radiografía por rayos X bajo anestesia, en posición de cubito supino sobre una película radiográfica sensible (MIN-R, Eastman Kodak). Los ratones se expusieron a radiación X a 20 kV durante 20 s utilizando un instrumento Faxitron (modelo MX-20; Faxitron, Buffalo Grove, IL, USA). El área de metástasis osteolítica se evaluó con un sistema de análisis de imagen computerizada, AnalySIS[®] (sistema de obtención de imágenes suave GmbH, Münster, Alemania). Se capturaron imágenes escaneadas en una película de rayos X de alta resolución con doble aumento a 1.200 ppi utilizando un scanner Epson Expression 1680 Pro (Long Beach, CA, USA). La cuantificación del área metastásica se realizó dos veces después de la calibración por dos observadores independientes. Para las curvas de Kaplan-Meier la metástasis se valoró como el tiempo transcurrido hasta la primera aparición de signos de caquexia y dificultad para caminar.

Se analizaron todas las articulaciones femorotibial mediante un sistema μ CT (micro CAT[™] II, Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA) a 75,0 kVp y 250,0 uA. Los escaneados se realizaron a una resolución de 10 μ m. SE reconstruyeron imágenes 2D CT utilizando un procedimiento de proyección de retro-convolución estándar con un filtro Shepp-Logan. Las imágenes se almacenaron en grupos de 3D con un tamaño de vóxel de 19 μ m x 19 μ m x 23 μ m.

Construcciones “knock-down”

Se obtuvieron construcciones lentivirales para ARNsh de RhoB humana de Sigma (St. Louis, MO, USA). Para obtener partículas virales, se transfectaron células de empaquetamiento con 8 μ g de ADN para cada tipo de fusión mediante el procedimiento con fosfato clasicote según las recomendaciones del fabricante. Se utilizó el vector pLKO “scramble” como control (que contiene una secuencia shRHOB en la que se han cambiado aleatoriamente las bases nucleotídicas). Dos días después de la transfección, los sobrenadantes se centrifugaron durante 10 minutos a 600 g y se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μ m de poro. Para la infección por transducción, se sembraron A549 a 1×10^5 células y se incubaron durante toda la noche con sobrenadantes virales en presencia de 4 μ g/ml de polibreno (Sigma). Cuarenta y ocho horas después de la infección, se incubaron poblaciones de células en medio que contenía el antibiótico apropiado durante dos semanas adicionales. Los grupos resistentes a antibiótico se expandieron y se congelaron en cada pasaje celular.

Aislamiento de colonias derivadas de una única célula (SCC) de huesos largos

Se aislaron células metastásicas de la médula ósea de las extremidades inferiores. Los ratones se sacrificaron según los protocolos aprobados del Comité Local de Animales (Universidad de Navarra, protocolo 003-04). Se extirparon los huesos largos, y se lavaron de todos los tejidos blandos. Se liberaron las células de la médula mediante “flushing”, introduciendo 5-10 ml de medio α -MEM que contenía 2 x penicilina/estreptomicina con una aguja de calibre 27 en la epífisis distal a través del compartimento de la médula ósea. Las agrupaciones de células se desagregaron pasando el medio que contenía las células a través de la jeringa con aguja del calibre 27 G. Las células se sembraron en placas de 10 ó 15 cm expandidas durante 5 días en un medio que contenía 0,4 mg/ml de G-418. Este procedimiento se realizó por separado para cada fémur y tibia de 7 ratones por grupo. Se contaron las SCC bajo la luz de un microscopio después de tinción con violeta cristal.

Análisis histológico

Se extirparon las patas traseras, se extrajeron cuidadosamente tejidos blandos del fémur, se fijaron durante 24 h en formalina tamponada neutra al 10%, se deshidrataron y se descalcificaron en solución Osteosoft[®]. Después de la completa deshidratación con alcohol, los huesos se incluyeron en parafina y se tiñeron secciones de 5 μ m con H&E.

Expresión de RhoB y valor de predicción en pacientes con adenocarcinoma

Pacientes

Para este análisis, se seleccionaron 35 individuos que se separaron en dos grupos seleccionados en base al grupo de Enfermedad Progresiva (PD) comparado con un grupo Sin Enfermedad (DF) después de la cirugía. El grupo PD incluía pacientes con un historial de un cáncer de pulmón primario completamente reseccionado que reincidió (reaparición o metástasis) después de un periodo sin enfermedad de 6 meses después de la cirugía. Los pacientes DF fueron el resto de individuos con cáncer de pulmón primario completamente reseccionado sin signos de la enfermedad. Los pacientes que realizaron cualquier tratamiento, ya sea radioterapia o quimioterapia, después de la cirugía se excluyeron del análisis. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético Local. Para cada paciente se obtuvo un consentimiento y cuestionarios por escrito (antecedentes y seguimiento). Los criterios de inclusión fueron: histología (NSCLC: adenocarcinoma), y ausencia de cáncer en los 5 años previos a la intervención quirúrgica del cáncer de pulmón, excepto el melanoma o el cáncer de piel. El diagnóstico histológico se determinó según la clasificación WHO. El estadiaje patológico de los tumores se realizó según el sistema internacional para el cáncer de pulmón. El periodo de seguimiento continuó hasta el 31 de octubre del 2007. El tiempo de reincidencia se calculó desde la intervención quirúrgica hasta la fecha de reincidencia.

Immunohistoquímica (IHC)

Se utilizaron secciones de tejido fijados a formalina y embebidos en parafina para los procedimientos inmunohistoquímicos. La parafina se extrajo de los tejidos y las secciones se hidrataron a través de una serie graduada de etanol. La actividad de peroxidasa endógena se detuvo con hidrógeno peroxidasa al 3% durante 10 minutos. La extracción de antígeno por microondas se llevó a cabo con tampón EDTA (mM, pH 8) durante 2 x 15 min. Los sitios de unión no específica se bloquearon con suero normal de cabra al 5% en TBS-Tween (tampón de lavado, Dako) durante 30 minutos. Las secciones se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-RhoB (sc-180, Santa Cruz Biotechnology, Inc) durante toda la noche a 4°C. La dilución de trabajo fue: 1:75. Después de enjuagar con TBS, las secciones se incubaron con el complejo policlonal Envision (Dako). La actividad peroxidasa se demostró mediante diaminobencidina. Finalmente, las secciones se lavaron en agua, se contrastaron ligeramente con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron en DPX. Los tejidos que expresaban diferentes niveles de RhoB se incluyeron en cada banda inmunohistoquímica para unificar la posible discordancia de intensidad.

15 *Evaluación de la inmunotinción*

Dos observadores de manera independiente y a ciegas evaluaron la extensión e intensidad de la tinción en las muestras. Para RhoB, la extensión se puntuó como el porcentaje de células positivas (0-100%) y la intensidad de tinción se evaluó en comparación con un control positivo externo conocido (mareaje 1+, ligero; 2+, moderado y 3+, intenso). Las lecturas independientes discordantes se resolvieron mediante la revisión simultánea por ambos observadores.

Análisis estadístico. Se utilizó el test de log-rank para calcular la significancia estadística (valor de p) de las diferencias observadas entre las curvas de Kaplan-Meier. Para estudiar las diferencias en las velocidades de proliferación, crecimiento del tumor, se analizaron las diferencias en el área metastática mediante el test de Kruskal-Wallis con el test de comparación múltiple de Dunn. Los valores se expresaron como la media \pm SEM y la significancia estadística se definió como $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) . Métodos complementarios proporcionan una información adicional.

30 **Referencias**

- Mazieres et al.** (2004) Loss of RhoB Expression in Human Lung Cancer Progression. *Clinical Cancer Research* 10: 2742-2750.
- 35 **Sato et al.** (2007). RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer*. 120 (3):543-51.
- Li et al.** (2008). *Lung Cancer*. 2008 Feb; 59(2):180-91.
- 40 **Turner et al.** (2008). Effects of lovastatin on Rho isoform expression, activity, and association with guanine nucleotide dissociation inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 75, 405-413.
- Hawk et al.** (1996). Inhibition of lung tumor cell growth *in vitro* and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Letters*, 109(1,2), 217-222.
- 45 **Castellano E, De Las Rivas J, Guerrero C, Santos E.** Transcriptional networks of knockout cell lines identify functional specificities of H-Ras and N-Ras: significant involvement of N-Ras in biotic and defense responses. *Oncogene* 2007; 26:917-33.
- 50 **Tusher VG, Tibshirani R, Chu G.** Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:5116-21.
- Benjamini Y, Hochberg Y.** Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc* 1995; (Ser B) 57:289-300.
- 55 **González I, Vicent S, de Alava E, Lecanda F.** EWS/FLI-1 oncoprotein subtypes impose different requirements for transformation and metastatic activity in a murine model. *J Mol Med* 2007; 85:1015-29.
- 60 **Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, et al.** TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 1999; 103:197-206.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de pronóstico de la evolución de la enfermedad en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón que comprende:

- a) la medición de la expresión del gen de RhoB; o
- b) la medición del número de copias del gen de RhoB;

en una muestra de dicho sujeto con adenocarcinoma de pulmón, **caracterizado** porque la detección de la sobreexpresión o el aumento en el número de copias del gen de RhoB en relación con la expresión o el número de copias del mismo gen en una muestra de control es indicativo del riesgo de metástasis, o reaparición o reincidencia de actividad neoplásica.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pronóstico de la evolución de la enfermedad comprende la determinación de un resultado clínico seleccionado del grupo que consiste en velocidad de respuesta (RR), respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), enfermedad estable (SD), tiempo hasta la progresión (TTP), supervivencia global (OS), y beneficio clínico, que comprende respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), y enfermedad estable (SD).

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la medición de la expresión del gen de RhoB se determina a nivel de proteína, ARNm o ADNc.

4. Uso de un gen de RhoB, o una región del mismo, como marcador del pronóstico de metástasis, o reaparición o reincidencia de actividad neoplásica en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón.

5. Procedimiento para el screening de fármacos activos contra adenocarcinoma de pulmón, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) la medición de la expresión del gen de RhoB, o la medición del número de copias del gen de RhoB, en una muestra con células de adenocarcinoma de pulmón en presencia de un fármaco, o la medición de la afinidad de unión entre un fármaco y un polipéptido RhoB;
- b) la comparación de la expresión o números de copias medidas del gen de RhoB, o la afinidad de unión de la etapa a) a una muestra de control;

caracterizado porque una expresión o número de copias reducido del gen de RhoB, o una mayor afinidad de unión en la etapa a), en relación con la expresión o el número de copias del mismo gen o la afinidad de unión del mismo polipéptido en una muestra de control es indicativa de la actividad del fármaco contra el adenocarcinoma de pulmón.

6. Procedimiento para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento terapéutico en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) la medición de la expresión del gen de RhoB, o la medición del número de copias del gen de RhoB, en una muestra con células de adenocarcinoma de pulmón de dicho sujeto, generando de este modo un nivel inicial;
- b) la medición de la expresión del gen de RhoB, o la medición del número de copias del gen de RhoB, en una segunda muestra con células de adenocarcinoma de pulmón del mismo sujeto en un momento posterior a la administración de la pauta de tratamiento, obteniendo de este modo un nivel de prueba; y
- c) la comparación de los niveles inicial y de prueba;

caracterizado porque una expresión o número de copias reducido del gen de RhoB en el nivel de prueba en relación con el nivel inicial es indicativo de que la pauta de tratamiento es eficaz en el sujeto.

7. Uso de una molécula de nucleótido o anticuerpo que interacciona con ADN, ARN, proteína de RhoB, o un fragmento de los mismos, para el pronóstico de la evolución de la enfermedad en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón, para el screening de fármacos activos contra el adenocarcinoma de pulmón, o para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento terapéutico en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón.

8. Uso según la reivindicación 7, en el que la molécula de nucleótido es un nucleótido que tiene por lo menos un 70% de homología con la SEC ID NO. 4-6.

ES 2 339 524 B1

9. Uso según la reivindicación 7, en el que la molécula de anticuerpo es un anticuerpo que tiene por lo menos un 70% de homología con RhoB (119).

5 10. Kit para el pronóstico de la evolución de la enfermedad en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón que comprende un nucleótido que tiene por lo menos un 70% de homología con la SEC ID NO. 4-6, o una molécula de anticuerpo que tiene por lo menos un 70% de homología con RhoB (119).

11. Amplicón del gen de RhoB aislado, en el que el amplicón comprende más de una copia de un polinucleótido seleccionado entre:

- 10
- a) un polinucleótido que codifica el polipéptido establecido en la SEC ID NO. 2;
 - b) un polinucleótido establecido en la SEC ID NO. 1;
 - 15 c) un polinucleótido que tiene por lo menos un 70% de homología con el polinucleótido de a) o b); y
 - d) un polinucleótido que se sobreexpresa en células de adenocarcinoma de pulmón que tiene por lo menos un 70% de homología con el polinucleótido de a) o b).
- 20

12. Uso de inhibidores de la sobreexpresión del gen de RhoB, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), donde los inhibidores se seleccionan entre:

- 25
- a) un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína RhoB, o un polipéptido que comprende una región de unión a RhoB;
 - b) un péptido mimético del polipéptido RhoB;
 - 30 c) un ácido nucleico inhibidor del gen de RhoB seleccionado entre un oligonucleótido antisentido, un ribozima, y un agente ARNi seleccionado entre ARNds, ARNsi y ARNsh; o
 - d) una combinación que comprende lovastatina y ácido zoledrónico, y/o sales farmacéuticamente aceptables de la misma.
- 35

13. Uso de inhibidores de la sobreexpresión del gen de RhoB según la reivindicación 12, donde el inhibidor es una molécula de ARNsh que tiene por lo menos un 70% de homología con la SEC ID No. 3.

40 14. Uso del inhibidor de la sobreexpresión del gen de RhoB según la reivindicación 13, en el que el ARNsh está en forma de un oligonucleótido o vector.

15. Uso del inhibidor de la sobreexpresión del gen de RhoB según la reivindicación 14, en el que el vector es un plásmido, cósmido, bacteriófago, o un virus.

45 16. Uso de inhibidores según la reivindicación 12, en los que el inhibidor es una combinación que comprende lovastatina y ácido zoledrónico, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y dicha combinación es para la administración simultánea, separada o secuencial.

50 17. Uso de inhibidores según la reivindicación 16, donde el NSCLC se selecciona entre adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes.

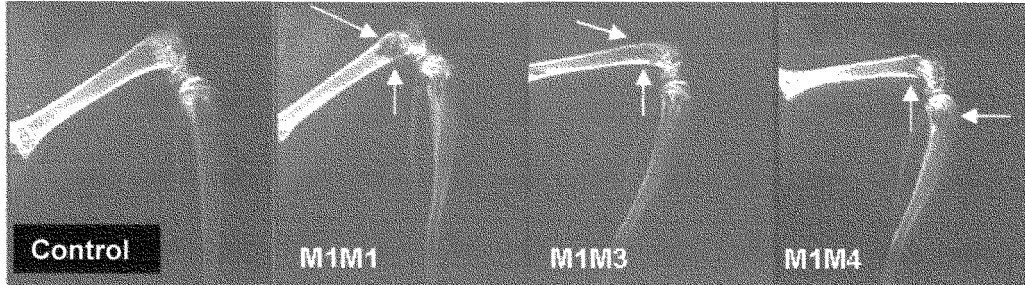
55

60

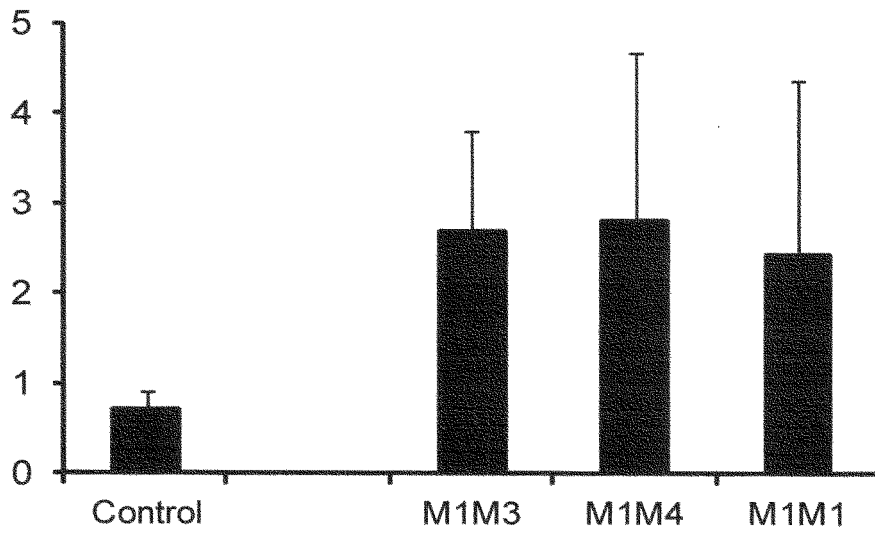
65

Figura 1

Actividad metastásica de subpoblaciones derivadas de la parental



Área radiográfica metastásica



Curvas de supervivencia

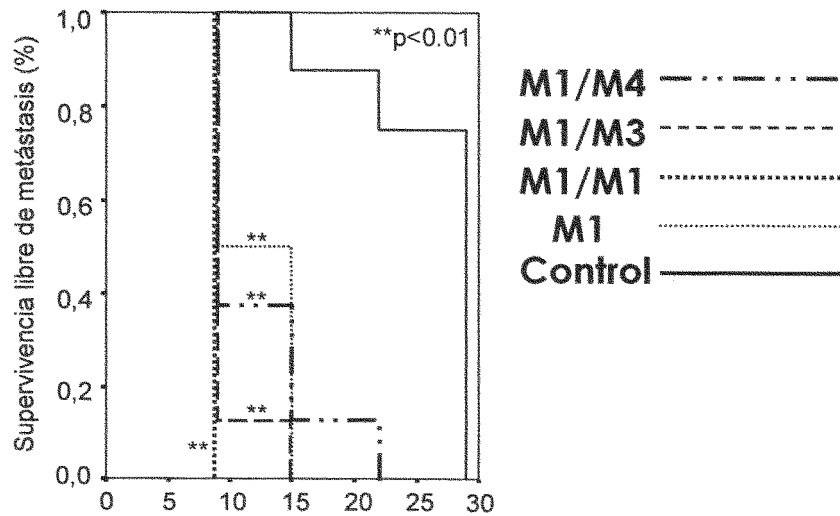


Figura 2

Expresión de RhoB en poblaciones metastáticas

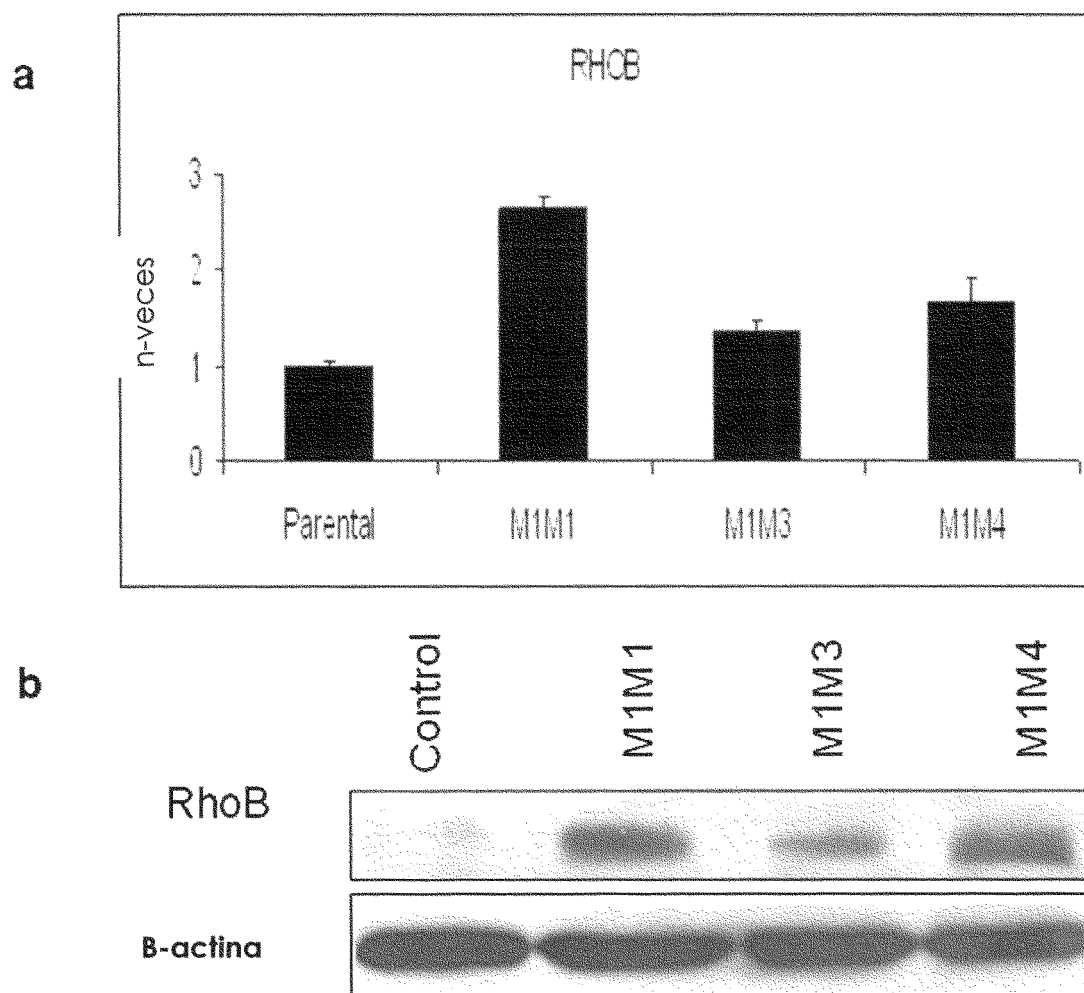


Figura 3

Inhibición de RhoB por ARNsh

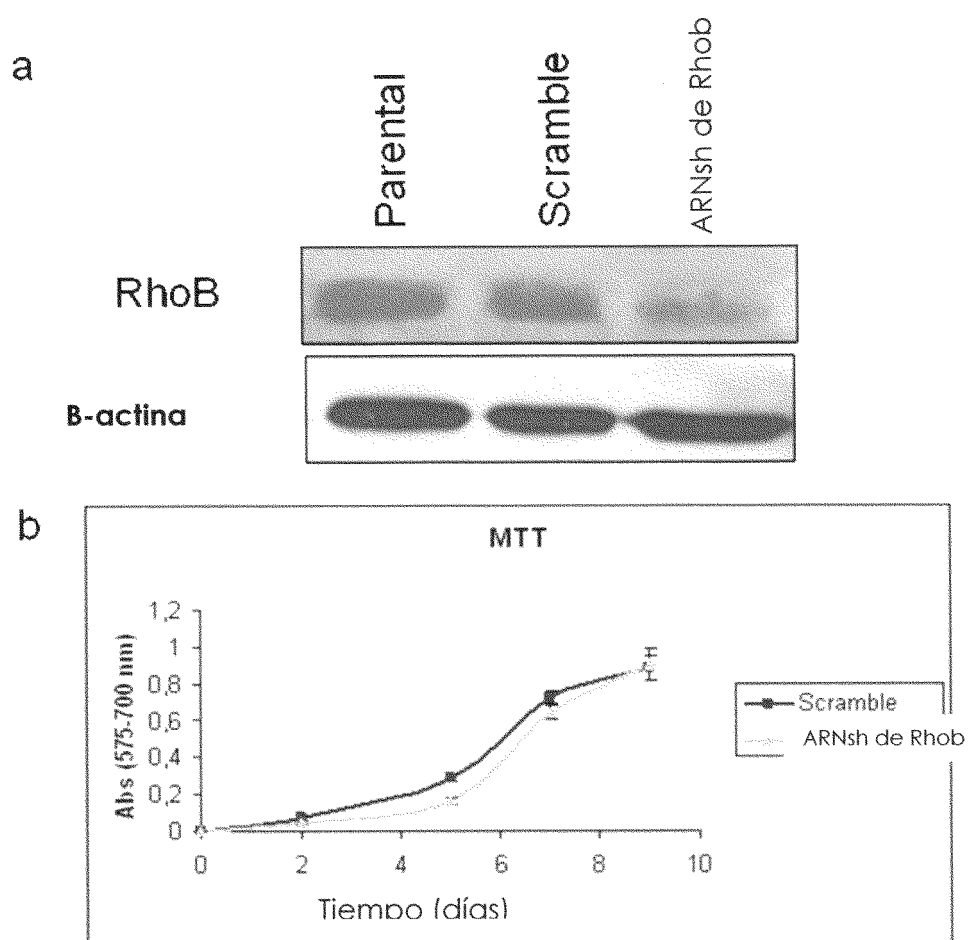
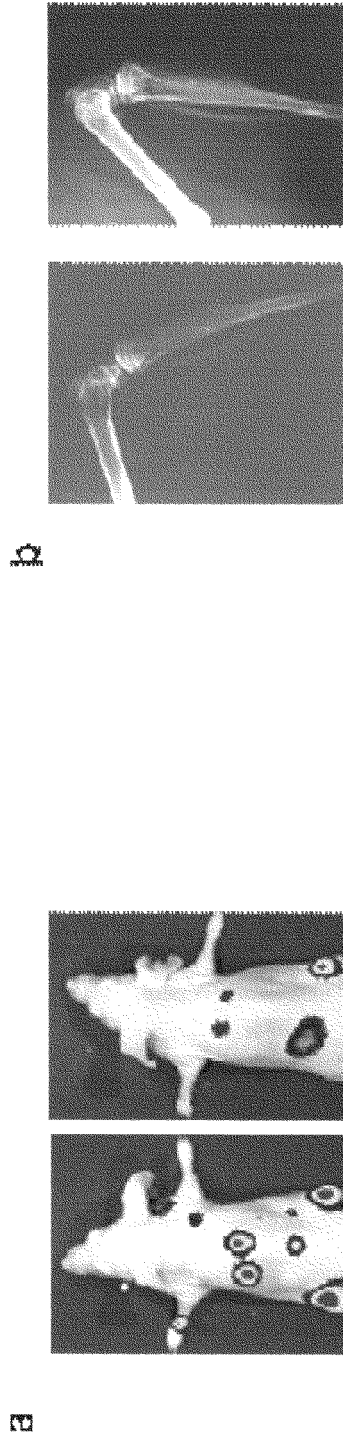


Figura 4

Carga de tumor determinada por bioluminiscencia y microrradiografía



Análisis microrradiográfico el día 35

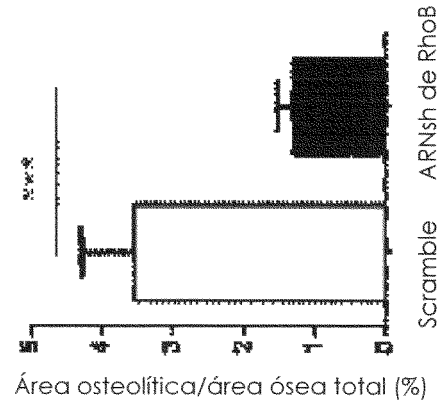


Figura 5

Supervivencia acumulada en biopsias de adenocarcinoma con niveles altos y bajos de RhoB

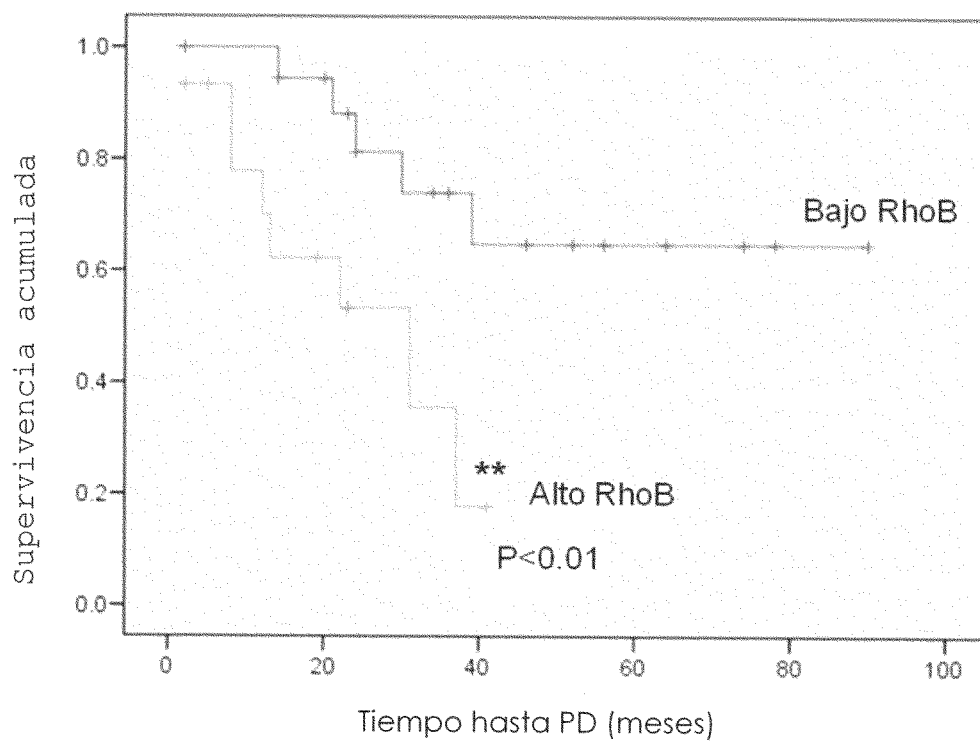
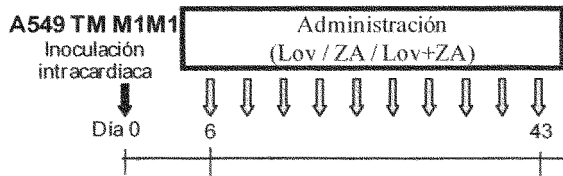
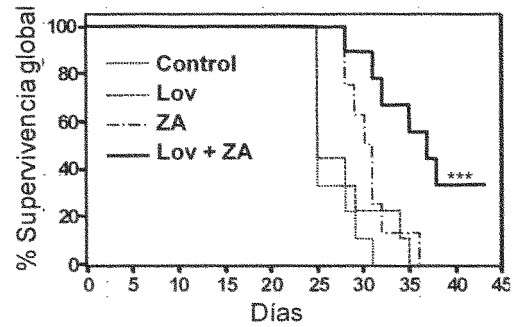


Figura 6

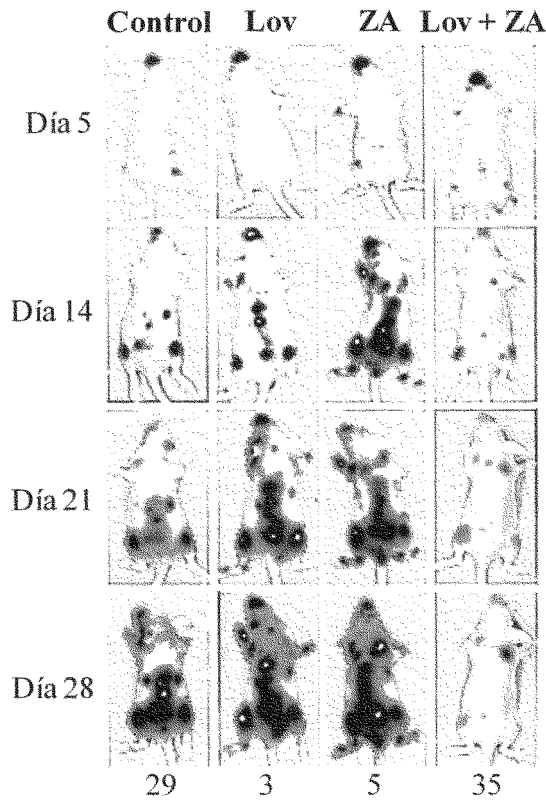
A



B



C



D

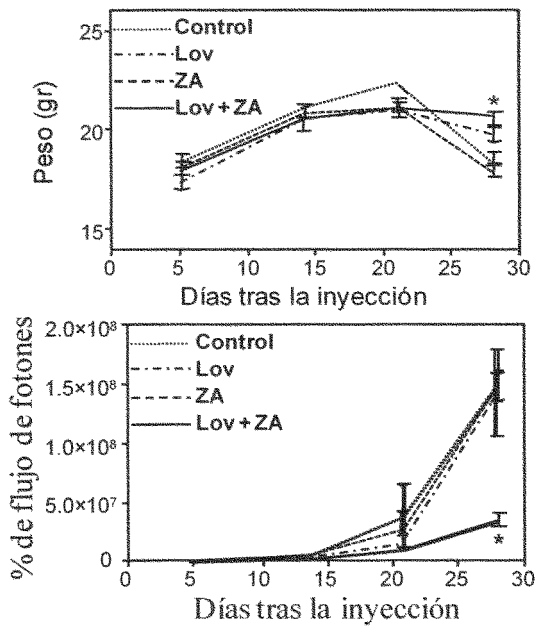


Figura 7

A549 TM M1M1 (cultivos)

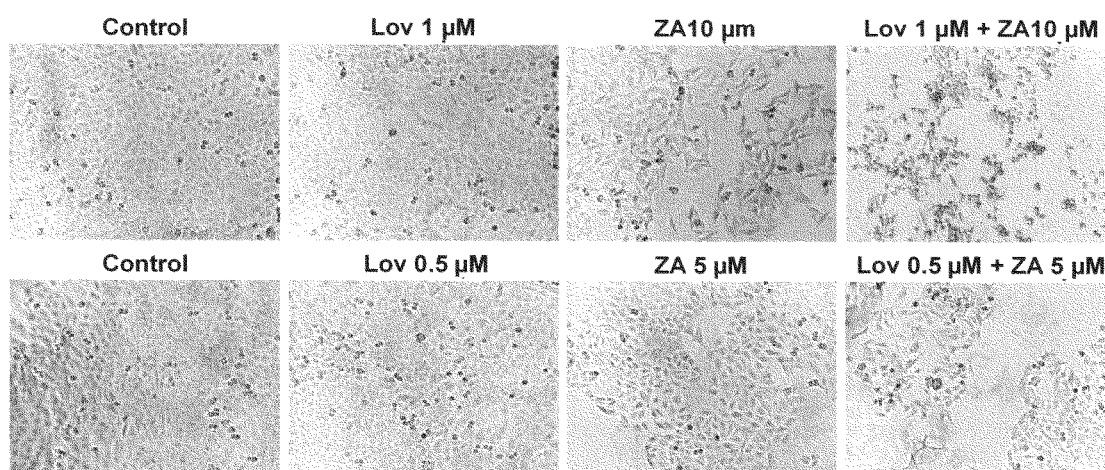


Figura 8

A549 TM M1M1 (MTT)

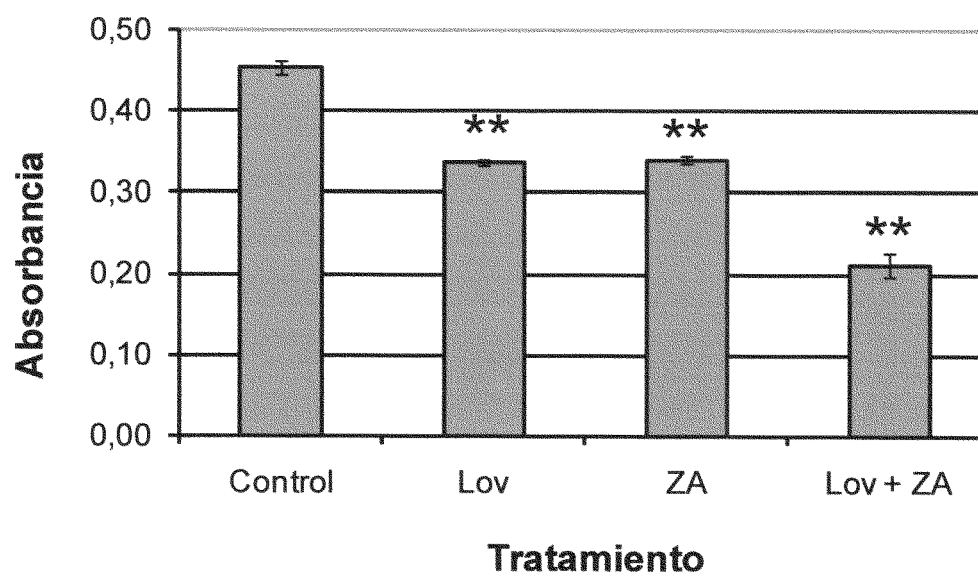


Figura 9

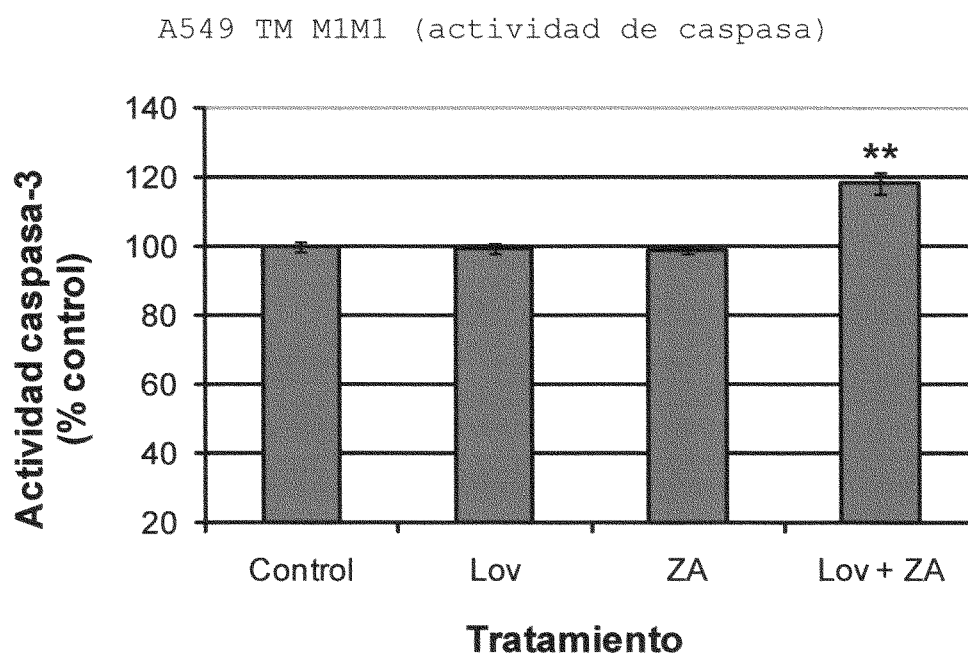


Figura 10

H727 TM (MTT) Tx 6d A

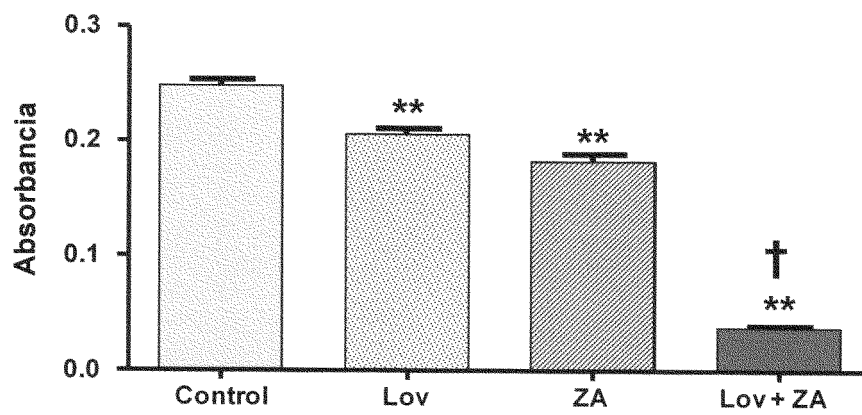
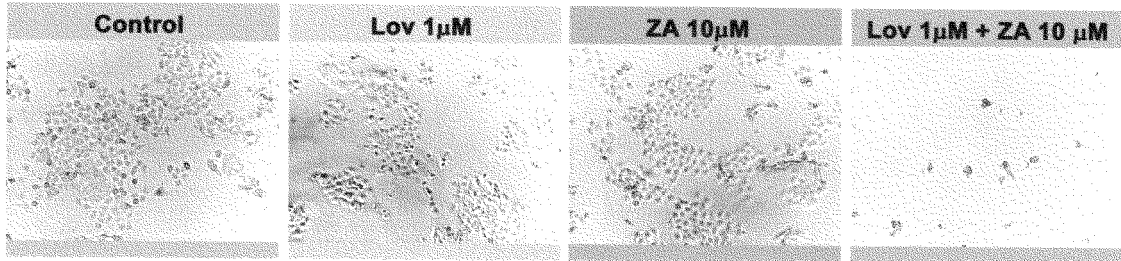


Figura 11

H727 TM (MTT) Tx 6d B

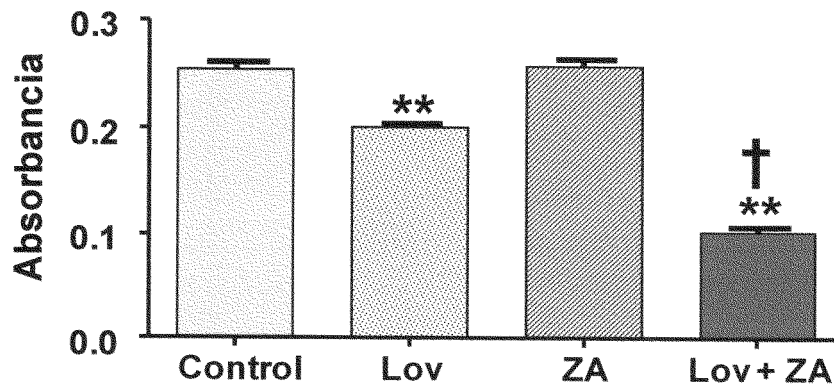
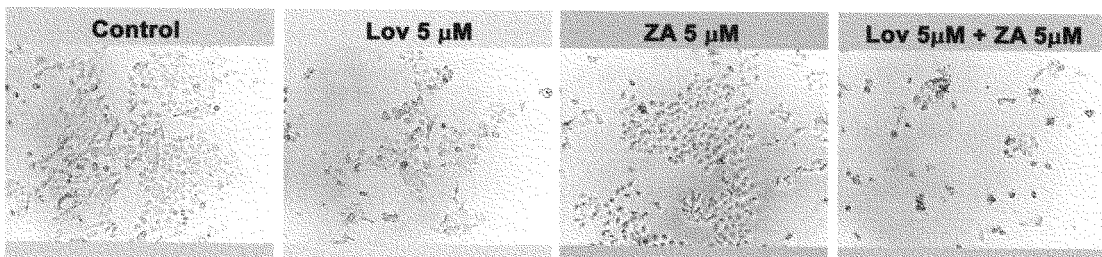


Figura 12

H727 TM (MTT) Tx 4d

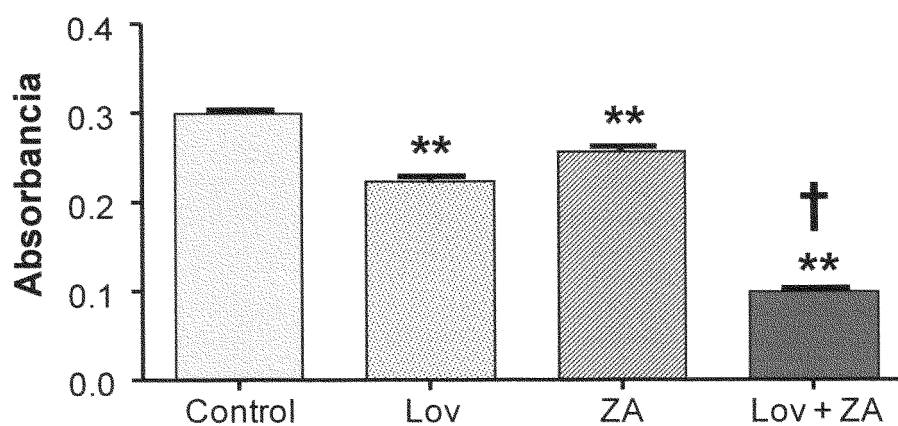
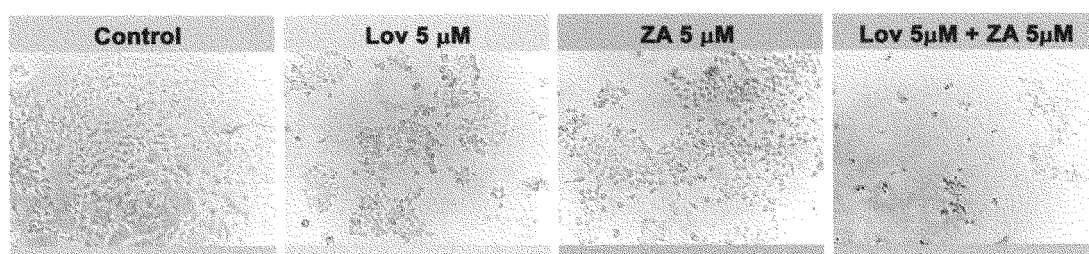


Figura 13

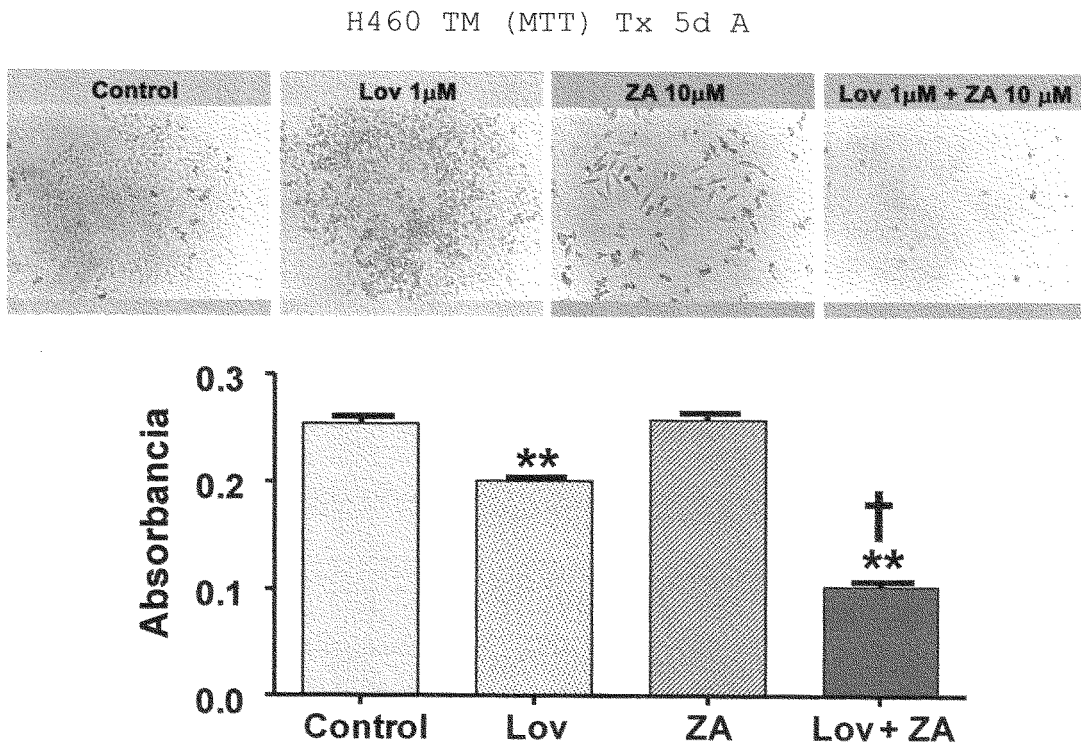


Figura 14

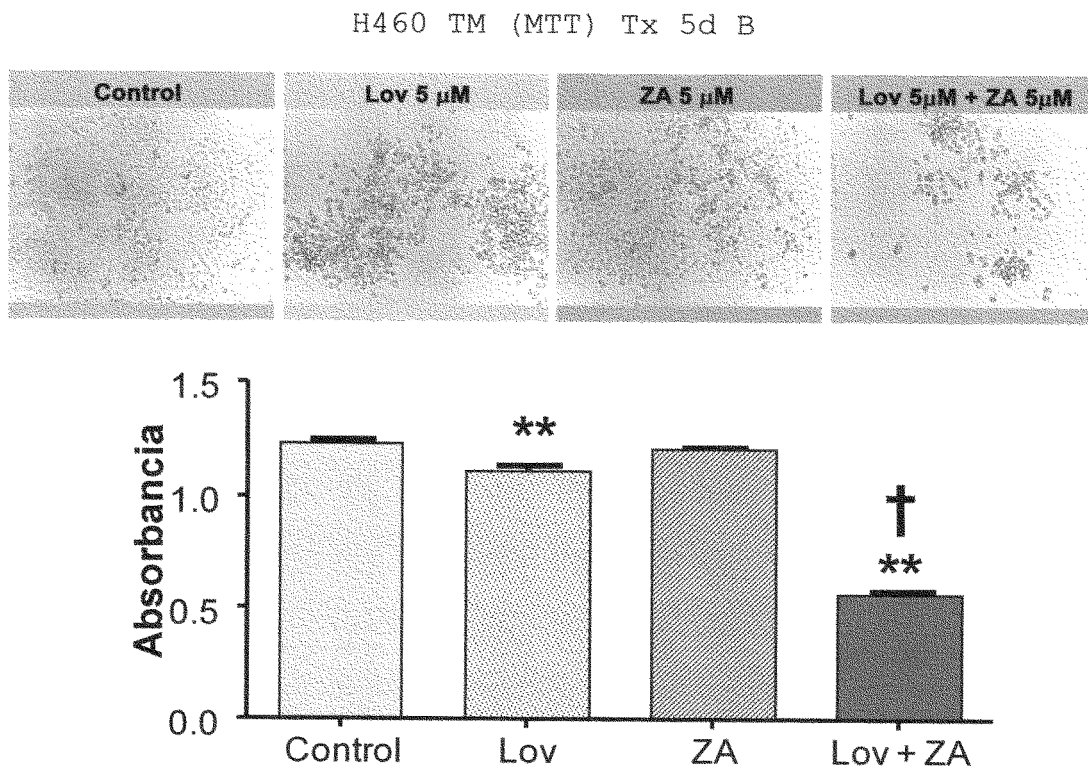
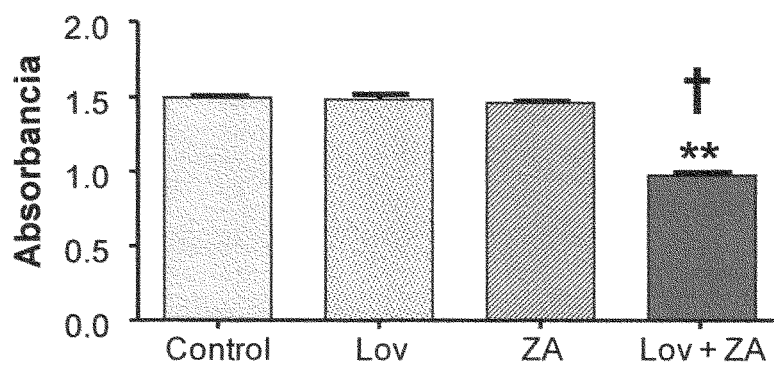
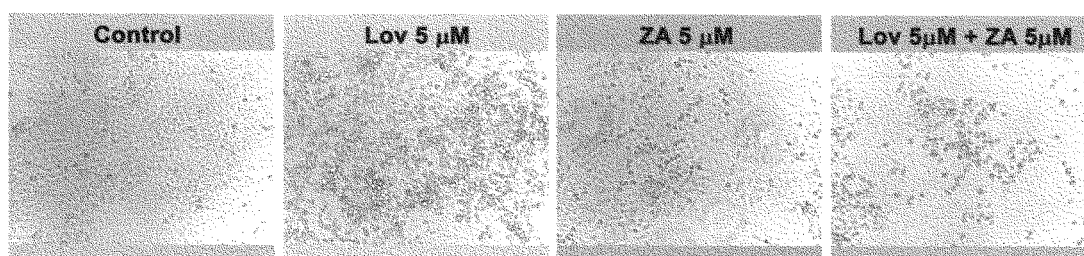


Figura 15

H460 TM (MTT) Tx 3d



ES 2 339 524 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Proyecto de Biomedicina Cima S.L.

5 <120> NUEVO BIOMARCADOR COMO DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE PULMÓN

<130> 08014 (P0031)

10 <140> ES200802503

<141> 2008-08-28

15 <160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

20 <211> 2367

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

atctgccacc gcagtctggt tggagctggt gtcttgtatg ctcagcgagg cccggagaga 60

30

cccgggagag agctaggccg agtccaccgc ccgagtctgc tgcccagacc cgcgttacgc 120

35

aaaagccgc cgatccccgg cctggggtga gcagagcgac caccgcccgg gagcagcgcg 180

40

gcgagacgca cgggtgcgcc tatgcccccg cgccccacc gccccgccg cggcagccga 240

45

agcgcagcga gagaacgcgc caccgcgggg cccgggtgca gctagcgacc ctctcgccac 300

50

ctgcgcgag cccgaggtga gcagtgagcg gcgagcggga gggcagcgag gcgttcgcgg 360

gccccctcct gctgcccggg cccggcccgc tcatggcggc catccgcaag aagctggtgg 420

55

60

65

ES 2 339 524 B1

tgggtgggcga cggcgcgtgt ggcaagacgt gcctgctgat cgtgttcagt aaggacgagt 480
5 tccccgaggt gtacgtgccc accgtcttcg agaactatgt ggccgacatt gaggtggacg 540
gcaagcaggt ggagctggcg ctgtgggaca cggcgggcca ggaggactac gaccgcctgc 600
10 ggccgctctc ctacccggac accgacgtca ttctcatgtg cttctcggtg gacagcccgg 660
15 actcgctgga gaacatcccc gagaagtggg tccccgaggt gaagcacttc tgtcccaatg 720
20 tgcccatcat cctggtggcc acaaaaaaag acctgcgag cgacgagcat gtccgcacag 780
agctggcccc catgaagcag gaaccctgtc gcacggatga cggccgcgcc atggccgtgc 840
25 gcatccaagc ctacgactac ctcgagtgtc ctgccaagac caaggaaggc gtgctcgagg 900
30 tcttcgagac ggccacgcgc gccgcgctgc agaagcgcta cggctcccag aacggctgca 960
tcaactgctg caaggtgcta tgagggccgc gcccgctcgc cctgcccctg ccggcacggc 1020
35 tccccctcct ggaccagtcc cccgcgagcc cggagaaggg gagaccctg tcccacaagg 1080
40 accccaccgg cctgcctggc atctgtctgc tgacgcctct ggcttgcgcc aggacttggc 1140
gtgggcaccg ggcgccccca tcccagtgtc tgtgtgctc cagctgtgtt gcacaggcct 1200
45 gggctccccca ctgagtgtca agggctcccct gagcatgctt ttctgaagag ccgggcctca 1260
50 gagtgtgtgg ctgtgtgtct gttcgactcc cctcgccccca ttttcacccc acccccgcct 1320
ctgatccccg ggggcgagat tggcgcggga gtgtggccgc gccccatcag atgttcgccc 1380
55 ttcaccagcg ggagcttgat atcccttgtc tgtaacatag accccgggta ctgctggagg 1440

60

65

ES 2 339 524 B1

ggagggctgc tggggaggat ggggggatgt tatataaata tagatataat tttatnttcg 1500
5 gagctaagat ggtgnttattt aagggtggtg atgggtgagc gctctggccc aggctgggcc 1560
agactcccgc ccaagcatga acaggacttg accatctttc caacccttg ggaagacatt 1620
10 tgcaactgac ttggggagga cacagcttca gcacagcctc tcctgcgggc cagcccgctg 1680
15 cgaaccctcc accagctacc ggagggagga gggaggatgc gctgtggggt tgtntttgcc 1740
20 ataagcgaac tttgtgcctg tcctagaagt gaaaattgntt cagtccaaga aactgatgntt 1800
atntgattta tntaaaggct aaaatntgntt tntntattct ttgcacaatt gntntcattgnt 1860
25 ttgacactta atgcactcgt cattntgata cgacagtagc atntctgacca cactntgtacg 1920
30 ctgtaacctc atctactntct gatgntntnta aaaaatgact tnttaacaagg agagggaaaa 1980
gaaaccct actaatntgct ttgntntcctt gaagaatgntg gcaacctgnt tntgntgattnt 2040
35 tntntgtgca ggtcatgcac acagntntga taaagggcag taacaagntat tggggcctat 2100
40 tntntntntnt tccacaaggc atntctctaaa gctatgntgaa atntntctctg cacctctgnta 2160
cagagaatac acctgcccct gntatntcctt tntntcccctc cccctccctcc cagntgntact 2220
45 tctactaaat tgtntgtcctg tntntntatntt tnttaataaa ctgacaaatg acaaaatgnt 2280
50 gagctntatga tgtnttacata aaagntntctat aagctgntgnta tacagntntntt tatgntaaaat 2340
atntaaaagac tatgatgatg acatntta 2367

55

<210> 2

<211> 196

60 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 339 524 B1

<400> 2

5 Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Val Val Gly Asp Gly Ala Cys
1 5 10 15

10 Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Glu Phe Pro Glu
20 25 30

15 Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val
20 35 40 45

25 Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
50 55 60

30 Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile
65 70 75 80

35 Leu Met Cys Phe Ser Val Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro
40 85 90 95

45 Glu Lys Trp Val Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile
100 105 110

50 Ile Leu Val Ala Asn Lys Lys Asp Leu Arg Ser Asp Glu His Val Arg
55 115 120 125

60

65

ES 2 339 524 B1

5 Thr Glu Leu Ala Arg Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Thr Asp Asp Gly
 130 135 140

10 Arg Ala Met Ala Val Arg Ile Gln Ala Tyr Asp Tyr Leu Glu Cys Ser
 145 150 155 160

15 Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Thr Ala Thr Arg
 165 170 175

20

25 Ala Ala Leu Gln Lys Arg Tyr Gly Ser Gln Asn Gly Cys Ile Asn Cys
 180 185 190

30 Cys Lys Val Leu
 195

35 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

40 <220>
 <223> nucleótido relacionado con RhoB

45 <400> 3

ttactgaaca cgatcagcag g

21

50 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

55 <220>
 <223> nucleótido relacionado con RhoB

60 <400> 4

tggagaacat ccccgagaag

20

65 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 339 524 B1

<400> 7

5 atctgccacc gcagtctggt tggagctggt gtcttgtatg ctcagcgagg cccggagaga 60
cccgggagag agctaggccg agtccaccgc ccgagtctgc tgcccagacc cgcgttacgc 120
10 acaaagccgc cgatccccgg cctggggtga gcagagcgac caccgcccgg gagcagcgcg 180
15 gcgagacgca cgggtgcgcc tatgcccccg gccccccacc gccccgccc cggcagccga 240
agcgcagcga gagaacgcgc caccgcgggg cccgggtgca gctagcgacc ctctcgccac 300
20 ctgcgcgcag cccgaggtga gcagtgagcg gcgagcggga gggcagcgag gcgttcgagg 360
25 gccccctcct gctgcccggg cccggccccg tcatggcggc catccgcaag aagctgggtg 420
tggtgggcga cggcgcgtgt ggcaagacgt gcctgctgat cgtgttcagt aaggacgagt 480
30 tccccgaggt gtacgtgcc accgtcttcg agaactatgt ggccgacatt gaggtggacg 540
35 gcaagcaggt ggagctggcg ctgtgggaca cggcgggcca ggaggactac gaccgcctgc 600
ggccgctctc ctaccgggac accgacgtca ttctcatgtg cttctcggtg gacagcccgg 660
40 actcgtgga gaacatcccc gagaagtggg tccccgaggt gaagcacttc tgtcccaatg 720
45 tgcccatcat cctggtggcc acaaaaaag acctgcgag cgacgagcat gtccgcacag 780
agctggcccc catgaagcag gaaccctgc gcacggatga cggccgcgcc atggccgtgc 840
50 gcatccaagc ctacgactac ctcgagtgt ctgccaagac caaggaaggc gtgcgcgagg 900
55
60
65

ES 2 339 524 B1

tcttcgagac ggccacgcgc gccgcgctgc agaagcgcta cggctcccag aacggctgca 960
5 tcaactgctg caaggtgcta tgagggccgc gcccgctcgc cctgcccctg ccggcacggc 1020
tccccctcct ggaccagtcc cccgcgagcc cggagaaggg gagaccctg tcccacaagg 1080
10 accccaccgg cctgcctggc atctgtctgc tgacgcctct ggcttgccg ccaggactggc 1140
15 gtgggcaccg ggcgccccca tcccagtgtc tgtgtgcgtc cagctgtgtt gcacaggcct 1200
gggctccccca ctgagtgccca agggctcccct gagcatgctt ttctgaagag ccgggcctca 1260
20 gagtgtgtgg ctgtgtgtct gttcgactcc cctcgccccca ttttcacccc acccccgcct 1320
25 ctgatccccg ggggcgagat tggcgcggga gtgtggccgc gccccatcag atgttctccc 1380
ttcaccagcg ggagcttgat atcccctgtc tgtaacatag accccgggta ctgcgggagg 1440
30 ggagggctgc tggggaggat ggggggatgt tatataaata tagatataat tttattttcg 1500
35 gagctaagat ggtgttattt aaggggtgtg atgggtgagc gctctggccc aggctgggcc 1560
40 agactccccg ccaagcatga acaggacttg accatctttc caaccctgg ggaagacatt 1620
tgcaactgac ttggggagga cacagcttca gcacagcctc tcctgcgggc cagcccgctg 1680
45 cgaaccctcc accagctacc ggagggagga gggaggatgc gctgtggggg tgtttttgcc 1740
50 ataagcgaac tttgtgcctg tcctagaagt gaaaattggt cagtccaaga aactgatggt 1800
at ttgattta tttaaaggct aaaattggt tttttattct ttgcacaatt gtttcattgt 1860
55 ttgacactta atgcactcgt catttgcata cgacagtagc attctgacca cacttgtagc 1920
60
65

ES 2 339 524 B1

ctgtaacctc atctacttct gatgttttta aaaaatgact ttaacaagg agagggaaaa 1980
5 gaaaccctact aaattttgct ttgtttcctt gaagaatgtg gcaacactgt tttgtgattt 2040
tatttgtgca ggtcatgcac acagttttga taaagggcag taacaagtat tggggcctat 2100
10 tttttttttt tccacaaggc attctctaaa gctatgtgaa attttctctg cacctctgta 2160
cagagaatac acctgccctt gtatatcctt ttttcccctc cctcccctcc cagtgggtact 2220
15 tctactaaat tgttgtcttg ttttttattt tttaaataaa ctgacaaatg acaaaatggt 2280
gagcttatga tgtttacata aaagttctat aagctgtgta tacagttttt tatgtaaaat 2340
20 attaaaagac tatgatgatg acatttaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2384

25 <210> 8
<211> 591
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 8

35 atggcggcca tccgcaagaa gctggtggtg gtgggagcgc gcgctgtgga caagacgtgc 60
ctgctgatcg tgttcagtaa ggacgagttc cccgaggtgt acgtgcccac cgtcttcgag 120
40 aactatgtgg ccgacattga ggtggacggc aagcaggtgg agctggcgct gtgggacacg 180
45 gcgggcccagg aggactacga ccgcttgcgg ccgctctcct acccggacac cgacgtcatt 240
ctcatgtgct tctcgggtgga cagcccggac tcgctggaga acatccccga gaagtgggtc 300
50 cccgaggtga agcacttctg tccaatgtg cccatcatcc tgggtggccaa caaaaaagac 360
ctgctgcagc acgagcatgt ccgacagag ctggcccgca tgaagcagga acccgtgctc 420
55 acggatgacg gccgcgccat ggccgtgctc atccaagcct acgactacct cgagtgtctt 480
60 gccaaagacca aggaaggcgt gcgctgagtc ttcgagacgg ccacgcgctc cgcgctgcag 540
aagcgtctacg gctcccagaa cggctgctac aactgctgca aggtgctatg a 591
65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 339 524

② Nº de solicitud: 200802503

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.08.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20080167532 A1 (ROBERT C. SMALLRIDGE [US] y JOHN A. COPLAND [US]) 10.07.2008, página 1, párrafo 10; página 3, párrafo 31 - página 4, párrafo 34; página 5, párrafo 37; reivindicaciones 10,11.	4,7
X	US 5962672 A (LEX M. COSWERT [US]) 05.10.1999, página 2, líneas 36-46; página 11, línea 54 - página 12 líneas 11; reivindicaciones 1,2.	12
X	US 6040334 A (CHARLES MYERS et al. [US]) 21.03.2000, reivindicaciones 1,2.	12,16,17
X	ROSEN et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors. Cancer. 2004, Vol 100; páginas 2613-2621, especialmente página 2616-2617.	12,16,17
X	MAZIERES et al. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. Clinical Cancer Research. 2004, Vol. 10; páginas 2742-2750, especialmente página 2745-2747.	4,9-11
A	VICENT et al. A novel lung cancer signature mediates metastatic bone colonization by a dual mechanism. Cancer Research. 2008, Vol 68, páginas 2275-2285, especialmente página 2275-2281.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

06.05.2010

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, A61K, C07K, C07H, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, USPTO PATENT DATABASE, INVENES, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCIEDIRECT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.05.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-3, 5, 6, 8, 13-15	SÍ
	Reivindicaciones	4, 7, 9-12, 16, 17	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-3, 5, 6, 8, 13-15	SÍ
	Reivindicaciones	4, 7, 9-12, 16, 17	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20080167532 A1	10-07-2008
D02	US 5962672 A	05-10-1999
D03	US 6040334 A	21-03-2000
D04	ROSEN et al. Cancer. 2004, Vol 100; páginas 2613-2621.	2004
D05	MAZIERES et al. Clinical Cancer Research. 2004, Vol. 10; páginas 2742-2750.	2004
D06	VICENT et al. 2008, Vol 68, páginas 2275-2285.	01-04-2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un procedimiento de pronóstico de la evolución de la enfermedad en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón basado en la medición de la expresión o número de copias del gen RhoB como indicador del riesgo de metástasis o reaparición o reincidencia de actividad neoplásica (reivindicaciones 1-4). Asimismo, divulga un procedimiento de cribado de fármacos activos contra adenocarcinoma de pulmón. Dicho procedimiento comprende la medición de la expresión o número de copias del gen RhoB, o la medición de la afinidad de unión entre el fármaco en estudio y un polipéptido de RhoB en muestras tratadas con dicho fármaco y la comparación con valores control, siendo la diferencia entre dichos valores indicativa de la actividad del fármaco contra el adenocarcinoma de pulmón (reivindicación 5). Igualmente, divulga un procedimiento para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento terapéutico en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón que comprende la medición de la expresión o número de copias del gen RhoB en muestras con células de adenocarcinoma de pulmón antes y después del tratamiento y la comparación de ambos valores. Una menor expresión o número de copias de RhoB en la muestra post-tratamiento será indicativa de una pauta de tratamiento eficaz en el sujeto (reivindicación 6). La presente solicitud divulga también distintos usos de una molécula de nucleótido o anticuerpo que interacciona con RhoB, o un fragmento de los mismos, para el pronóstico de la evolución de la enfermedad de un sujeto con adenocarcinoma de pulmón o para determinar la eficacia de una pauta de tratamiento terapéutico en un sujeto con adenocarcinoma de pulmón (reivindicaciones 7-11). Por último, divulga el uso de inhibidores de la sobreexpresión del gen RhoB como medicamentos en el tratamiento de cánceres de pulmón no microcíticos (NSCLC). Estos inhibidores son seleccionados entre un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a RhoB, o un polipéptido que comprende una región de unión a RhoB, o un péptido mimético del polipéptido RhoB, o un ácido nucleico (oligonucleótido antisentido, ribozima y agente ARNi), o una combinación que comprende lovastatina y ácido zoledrónico, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos cuya administración puede ser simultánea, separada o secuencial (reivindicaciones 12-17).

El documento D01 divulga métodos y reactivos para el análisis de la efectividad de tratamientos de cáncer en mamíferos, entre ellos los humanos. En particular, el método comprende la medida del nivel de expresión de uno o varios biomarcadores de respuesta terapéutica, entre ellos RhoB, en muestras de un individuo con cáncer antes (valor control) y después del tratamiento terapéutico. Una diferencia entre ambos valores, ya sea mayor o menor, puede ser indicativa de la efectividad del tratamiento. El valor control puede ser, igualmente, un valor promedio de muestras de individuos con el mismo tipo de cáncer y que no han recibido el tratamiento cuya efectividad se está analizando. El nivel del biomarcador puede determinarse detectando niveles de ADN, ARN o polipéptidos, ya sean nativos, mutantes o fragmentos de los mismos (ver página 1, párrafo 10; página 3, párrafo 31 - página 4, párrafo 34; página 5, párrafo 37; reivindicaciones 10, 11).

Hoja adicional

El documento D02 divulga moléculas antisentido, composiciones y métodos para la modulación de la expresión de RhoB. Las composiciones comprenden moléculas antisentido, en particular oligonucleótidos, que reconocen ácidos nucleicos que codifican RhoB y que modulan la expresión de RhoB. Divulga también composiciones farmacéuticas con dichas moléculas antisentido. Asimismo, divulga métodos para modular la expresión de RhoB en células y tejidos que comprenden poner en contacto las células o tejidos con una o más de las moléculas antisentido o composiciones de la invención. Divulga también métodos para el tratamiento de animales, en particular humanos, sospechosos de tener una enfermedad asociada a la expresión de RhoB mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más de las moléculas antisentido o composiciones. Entre dichas enfermedades se encuentran diversos cánceres, como cáncer de mama o de pulmón (ver página 2, líneas 36-46; página 11, línea 54 - página 12 líneas 11; reivindicaciones 1 y 2).

El documento D03 divulga métodos de tratamiento de adenocarcinomas y sarcomas en humanos que comprenden la administración de una cantidad efectiva de un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG Co-A) u homólogos de dicho inhibidor. Entre los distintos adenocarcinomas a tratar se encuentran los adenocarcinoma de pulmón, de próstata, de mama y de estómago. Y entre los inhibidores de la HMG Co-A utiliza la lovastatina y sus análogos u homólogos (ver reivindicaciones 1 y 2).

El documento D04 divulga el uso del ácido zoledrónico para tratamiento de metástasis esquelética en pacientes con carcinoma de pulmón y otros tumores sólidos, sin incluir los carcinomas de mama y próstata. El estudio se llevó a cabo con un total de 773 pacientes, de los cuales aproximadamente el 50% tenían cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (ver página 2616 - página 2617).

El documento D05 divulga el papel de RhoB en cáncer de pulmón humano, mediante análisis de la expresión de RhoB en tejido humano de pulmón normal y con tumores en distintos estadios de invasividad. Dicho análisis reveló que la expresión de RhoB decrece durante la progresión del cáncer de pulmón. Asimismo, este documento divulga el efecto de la sobreexpresión de RhoB en un modelo celular de cáncer de pulmón (células A549) y en la tumorigenicidad en ratón. Dicha sobreexpresión de RhoB provoca una reducción significativa de la velocidad de crecimiento de las células A549. Además, el implante en ratones de células A549 expresando establemente RhoB resultó en tumores aproximadamente diez veces menores en tamaño que los que aparecen con células A549 transfectadas con el vector control (ver página 2745 - página 2747).

El documento D06 divulga la creación de un modelo de cáncer de pulmón murino para identificar y caracterizar funcionalmente genes que estén involucrados en el proceso de metástasis ósea de un cáncer primario de pulmón. Igualmente, aísla una serie de líneas celulares altamente metastásicas y divulga un patrón de expresión génica característico de la metástasis ósea (ver página 2275 - página 2281).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986).

1.1. Reivindicaciones 1-17.

Los documentos D01 y D02 se consideran los más cercanos al estado de la técnica en cuanto a la medición de la expresión de RhoB. El documento D01 anticipa el uso de la medición de la expresión de RhoB como biomarcador para el análisis de la efectividad de tratamientos de cáncer en humanos. Una diferencia entre la expresión de muestras tomadas antes y después del tratamiento, ya sea mayor o menor, es indicativa de la efectividad del tratamiento. El documento D02, a su vez, anticipa el uso de compuestos y composiciones para la modulación de la expresión de RhoB, en particular oligonucleótidos antisentido de RhoB. Asimismo, anticipa métodos de utilización de estos compuestos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de RhoB.

Por otro lado, los documentos D03 y D04 se consideran los más cercanos al estado de la técnica en relación al uso de los compuestos lovastatina y ácido zoledrónico para el tratamiento de adenocarcinoma de pulmón. El documento D03 anticipa el uso de lovastatina para el tratamiento de distintos cánceres, entre ellos de pulmón. A su vez, el documento D04 anticipa el uso de ácido zoledrónico para el tratamiento de la metástasis ósea que ocurre en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

Por último, el documento D05 anticipa la detección de la expresión de RhoB en muestras de pacientes con cáncer de pulmón.

Por el contrario, ninguno de estos documentos anticipa el uso de determinadas secuencias antisentido divulgadas en la presente invención, ni la caracterización de líneas metastásicas por altos niveles de expresión de RhoB.

Hoja adicional

En consecuencia, el objeto de la invención tal y como se reivindica en las reivindicaciones 4, 7, 9-12, 16 y 17 se encuentra anticipado en los documentos D01, D02, D03, D04 y D05. Por lo tanto, dichas reivindicaciones carecen de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

Sin embargo, las reivindicaciones 1-3, 5, 6, 8, 13-15 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.1. Reivindicaciones 1-3, 5, 6, 8, 13-15.

La diferencia entre el documento D01 y el objeto técnico de las reivindicaciones de la presente solicitud se encuentra en la especificación, en la presente invención, de que el nivel de expresión de RhoB aumenta con la progresión de la metástasis ósea en cáncer de pulmón, y sirve por tanto como biomarcador indicativo de riesgo de metástasis. Hasta el momento, RhoB se consideraba un supresor oncogénico en cánceres de pulmón, ya que sus niveles bajan con la progresión del cáncer. Hasta la presente invención no se habían proporcionado datos sobre el nivel de expresión de RhoB en líneas celulares metastásicas de cáncer de pulmón, ni se habían determinado las secuencias para la inhibición de la sobreexpresión de RhoB reivindicadas en la presente solicitud (secuencias ID: 3-6).

De acuerdo con lo expuesto, las reivindicaciones 1-3, 5, 6, 8, 13-15 cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).