

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 347 619**

21 Número de solicitud: 200801371

51 Int. Cl.:

**A61K 31/395** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**C07D 225/06** (2006.01)

**C07D 401/04** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **13.05.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2010**

Fecha de la concesión: **02.09.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **15.09.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**15.09.2011**

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 50 %)  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**  
**Universidad de Salamanca** (Titular al 50 %)

72 Inventor/es: **Alava Casado, Enrique de y**  
**Da Silva Martins, Ana Sofia**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Procedimiento para diseñar una terapia individual antitumoral basado en la detección de los niveles de proteína HSP90, el uso de inhibidores de la proteína HSP90 para la elaboración de composiciones farmacéuticas, las composiciones así obtenidas y sus aplicaciones.**

57 Resumen:

Procedimiento para diseñar una terapia individual antitumoral basado en la detección de los niveles de proteína HSP90, el uso de inhibidores de la proteína HSP90 para la elaboración de composiciones farmacéuticas, las composiciones así obtenidas y sus aplicaciones.

La presente invención describe un procedimiento para diseñar una terapia individual antitumoral a un sujeto basado en la detección de los niveles de proteína HSP90 responsable de la resistencia a un medicamento o a una mezcla de medicamentos antitumorales inhibidores de los receptores IGF1R/KIT. Igualmente, describe el uso de inhibidores de la proteína HSP90 para la elaboración de medicamentos para el tratamiento de tumores resistentes a los inhibidores de IGF1R/KIT, las composiciones farmacéuticas así obtenidas y sus aplicaciones en tumores como el sarcoma de Ewing.

ES 2 347 619 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para diseñar una terapia individual antitumoral basado en la detección de los niveles de proteína HSP90, el uso de inhibidores de la proteína HSP90 para la elaboración de composiciones farmacéuticas, las composiciones así obtenidas y sus aplicaciones.

**Sector de la técnica**

Biomedicina, tratamiento de tumores, más concretamente tratamiento de Sarcomas de Ewing. Selección de terapias específicas.

**Estado de la técnica**

El Sarcoma de Ewing es una neoplasia que afecta a niños y adultos jóvenes, con una supervivencia a los cinco años que se mantiene alrededor del 50% (1, 2). Este sarcoma expresa de manera de-regulada varios bucles autocrinos que contribuyen a su patogénesis. Los receptores Insulin-like growth factor 1 (IGF1R) y KIT son receptores transmembrana que median dos de estos bucles (3-13). Estudios *in vitro* han mostrado resultados prometedores mediante la inhibición del IGF1R, y, podría decirse, la inhibición de KIT, (5, 9, 12-14), sugiriendo potenciales usos en ensayos clínicos.

La sensibilidad a las drogas depende de varios mecanismos moleculares, incluyendo la respuesta al estrés. Las moléculas involucradas en la respuesta a estrés son las proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP). Estas proteínas son chaperonas que actúan, de una manera global, como “guardianes” del proteoma, facilitando el correcto plegamiento proteico, manteniendo la estabilidad de sus proteínas cliente (PC), renaturalizando las proteínas desplegadas ó induciendo su degradación (15-17). Muchas de ellas están implicadas en rutas de señalización que controlan el crecimiento, supervivencia y diferenciación celulares, estando así relacionadas con la patogénesis de diversos tumores humanos (18, 19) y por lo tanto, la inhibición de las proteínas HSP se ha convertido en una nueva estrategia terapéutica para inhibir múltiples vías de receptores. Las proteínas HSP protectoras del estrés a menudo se encuentran sobreexpresadas en tumores y en líneas celulares cancerígenas (18-22). En adición a su actividad de ensamblaje proteico, ellas están también involucradas en la regulación de la apoptosis, del crecimiento celular y de la resistencia a fármacos anti-cancerígenos, habiéndose demostrado una correlación directa entre los niveles de las HSP y la progresión tumoral (19). Entre las HSP, la proteína HSP90 es una de las principales chaperonas cuya expresión se encuentra incrementada en situaciones de estrés, teniendo entre sus proteínas clientes/dianas a las siguientes: AKT, HIF, p53, ErbB2 y Raf-1 (20-22). En la actualidad, están disponibles varios inhibidores específicos de HSP90, como la Geldanamycin o sus derivados, como el 17-alilamino-17-demetoxigeldanamycin (17-AAG), el cual se está utilizando en ensayos clínicos con buenos resultados como antitumorales (23-27).

La búsqueda de nuevas formas de tratar los sarcomas es una necesidad urgente. El bloqueo de IGF1R (12, 13) es una posibilidad prometedora en la terapia del SE (14, 32-38). Basándonos en esto, y teniendo en consideración nuestra experiencia previa con los efectos sinérgicos de la combinación *in vitro* del bloqueo de las rutas de IGF1R/KIT con vincristina ó doxorubicina (14), hemos estudiado los cambios proteómicos globales inducidos por el tratamiento con estos fármacos y realizado una validación molecular de las posibles dianas del tratamiento.

**Descripción de la invención****Descripción breve**

Un aspecto de la presente invención lo constituye un procedimiento para diseñar una terapia individual antitumoral a un sujeto, en adelante procedimiento de la invención, basado en la detección de los niveles de proteína HSP90 responsable de la resistencia a un medicamento o a una mezcla de medicamentos antitumorales inhibidores de los receptores IGF1R/KIT y que comprende:

- a) Determinación *ex vivo* de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 en una muestra biológica tumoral,
- b) comparación de los niveles de a) con respecto a una muestra biológica control,
- c) determinación de resistencia a inhibidores de los receptores IGF1R/KIT cuando los niveles de a) son mayores que los obtenidos en b), y
- d) selección de un inhibidor de la proteína HSP90 como medicamento antitumoral coadyugante de un antitumoral inhibidor de los receptores IGF1R/KIT.

Un aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la muestra biológica tumoral de a) pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: sarcoma de Ewing, tumor del estroma gastrointestinal (GIST) y dermatofibrosarcoma protuberans.

## ES 2 347 619 B1

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 se llevan a cabo con o sin la inducción de un estrés de las células de la muestra biológica tumoral mediante un compuesto antitumoral inhibidor de los receptores IGF1R/KIT.

5 Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 tal como se menciona en el paso a) se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles del RNAm del gen Hsp90 y que comprende:

- 10 i) la extracción de RNAm de la muestra biológica tumoral,
- ii) amplificación del RNAm del gen Hsp90, y
- 15 iii) determinación de los niveles de RNAm del gen Hsp90.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 tal como se menciona en el paso a) se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP90 y que comprende:

- 20 i) la extracción de las proteínas de la muestra biológica tumoral, y
- ii) determinación de los niveles de la proteína HSP90, ya sea por un método inmunológico (anticuerpos, ya sean monoclonales o no) o no inmunológico.

25 Otro aspecto de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína HSP90, ya sea humana o animal, en adelante uso de un compuesto inhibidor de la presente invención, en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica útil para el tratamiento de un tumor, humano o animal, resistente al tratamiento con inhibidores de los receptores IGF1/KIT.

30 Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en el que el inhibidor de la proteína HSP90 pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: geldanamicina, 17-AAG, 17-DMAG, retaspimicina (IPI-504), ansamicina No-benzoquinona, compuestos diarilpirazoles (CCCT018159 y CCCT0129397/VER49009) y novobiocina.

35 Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de HSP90 de la invención en el que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína HSP90, ya sea humana o animal, y que incluye al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- 40 a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína HSP90,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína HSP90,
- 45 c) un aptámero específico del mRNA de la proteína HSP90,
- d) un RNA de interferencia (siRNA o shRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90, y
- 50 e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90.

Otra realización particular de la invención lo constituye el uso de un RNAi tal como se menciona en el paso d) en el que el siRNA está constituido por la pareja de secuencias de nucleótidos específicos del siRNA de la forma beta siguiente: secuencia sentido: GGUGACAAUCUCCAUAUAGAtt (SEQ ID NO1) y secuencia antisentido: UCUAUUGGAGAUUGUCACcttde (SEQ ID NO2) (secuencias 5'->3, ver RefSeq: NM\_007355-siRNA ID: 119760; Ambion, Austin, TX).

60 Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de HSP90 de la invención que comprende el uso en combinación de un inhibidor de las proteínas IGF1R/KIT, y más concretamente en combinación con, al menos, el compuesto ADW742 (ADW), AEW541 (AEW) y Imatinib (IMA).

Otro aspecto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento útil para el tratamiento de un proceso tumoral resistente a inhibidores de IGF1/KIT, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína HSP90, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención que comprende un inhibidor de la proteína HSP90 perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: geldanamicina, 17-AAG, 17-DMAG, retaspimicina (IPI-504), ansamicina No-benzoquinona, compuestos diarilpirazoles (CCT018159 y CCT0129397/VER49009) y novobiocina.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención que comprende, además del inhibidor de la proteína HSP90, un inhibidor de las proteínas IGFR1/KIT, y más concretamente, al menos, un inhibidor perteneciente al siguiente grupo: ADW742 (ADW), AEW541 (AEW) y Imatinib (IMA).

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína HSP90 humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína HSP90,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína HSP90,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína HSP90,
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90, y
- e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90.

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el inhibidor de HSP90 es un siRNA constituido por la pareja de secuencias de nucleótidos específicos del siRNA de la forma beta siguiente: secuencia sentido: GGUGACAAUCUCCAAUAGAtt (SEQ ID NO1) y secuencia antisentido: UCUAUUGGAGAUUGUCACctde (SEQ ID NO2) (secuencias 5' ->3, ver RefSeq: NM\_007355-siRNA ID: 119760; Ambion, Austin, TX).

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por un proceso o enfermedad tumoral resistente a los inhibidores de los receptores IGF1/KIT, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso de tumoral.

### Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado, mediante un análisis proteómico, que sorprendentemente la proteína HSP90 se expresa de forma diferente en células tumorales de Ewing sensibles y resistentes a los inhibidores específicos de los receptores IGF1R/KIT (ADW/IMA). Más concretamente, la expresión de la proteína HSP90 se incrementó drásticamente en las líneas celulares A673 y TTC466 (ambas resistentes a ADW/IMA, (14)) a las 24 horas de tratamiento, mientras estuvo ligeramente reducida en las otras líneas celulares estudiadas (Ejemplo 1).

Con este hallazgo se podría explicar, al menos en parte, la resistencia de las líneas A673 y TTC466 a las drogas inhibidoras de KIT/IGF1R, sugiriendo que estas células han desarrollado un mecanismo de respuesta inducida por el estrés que les ayuda a contrarrestar el efecto del tratamiento con estas drogas, el cual es activado en las etapas iniciales del tratamiento (antes de las 24 h) y que las hace más resistentes que otras líneas celulares. Con objeto de corroborar lo anterior, se estudiaron los efectos de la inhibición específica de HSP90 usando un derivado de la geldanamicina, el 17-AAG en un panel de 5 líneas de SE. Este fármaco inhibió la proliferación de un modo dosis-dependiente en todas las líneas de SE y provocó un incremento de la apoptosis, especialmente en aquellas líneas resistentes al tratamiento (A673 y TTC466) (Figura 2), datos que confirmaron la hipótesis anterior.

Se podría argumentar que las diferencias de sensibilidad al tratamiento se deberían al hecho de que, por ejemplo, A673 tenga una mutación en el gen BRAF (39); lo que le haría más sensible a la inhibición de HSP90. Sin embargo, TTC466 tiene una respuesta similar y no tiene ni esa mutación ni otro tipo de cambio (como la mutación de p53 (40) ó la pérdida de p16/INK4 (41)) que pueda explicar estos resultados y no se han encontrado tampoco en la bibliografía otro tipo de cambios que puedan explicar estos resultados, lo que sugiere independencia de cambios genéticos de estas líneas celulares. También se considera que estos resultados son independientes del tipo de transcrito, ya que TTC466 tiene un tipo de fusión diferente de la de A673, y tiene comportamiento similar, mientras que TC-71 tiene el mismo tipo de fusión que A673 y tiene comportamiento diferente de A673.

Por otro lado, al inhibirse la proteína HSP90 con 17-AAG y con siRNA se observó que se reducían el crecimiento y la supervivencia de las líneas de Ewing, especialmente en la línea celular resistente y que los datos observados inicialmente con 17-AAG se debían realmente a su acción sobre HSP90, transformando las células en sensibles al tratamiento. Por el contrario, la sobreexpresión inducida de HSP90 proporcionó resistencia en la línea celular sensible al tratamiento anti-IGF1R/KIT (compuestos ADW/IMA), alcanzándose niveles de completo bloqueo de la apoptosis,

y alta estimulación de la proliferación, confirmándose de nuevo la hipótesis de que el desarrollo de la respuesta al stress es un mecanismo de resistencia al tratamiento, algo que hasta el momento no se había descrito en el sarcoma de Ewing.

5 En la presente invención se observa que el tratamiento con 17-AAG indujo la degradación de proteínas clientes de HSP90, incluyendo IGF1R, KIT y AKT mediante la reducción de sus interacciones físicas con HSP90. También se ha reducido la fosforilación de AKT, mTOR y MAPK42/44 y, por lo tanto, la inhibición de la proliferación y la inducción de apoptosis, se han dado, por lo menos en parte, por la inhibición de estas rutas de señalización. La interacción física de HSP90 con KIT y AKT ha sido descrita con detalle anteriormente (22, 43), por lo que eran de esperar los resultados obtenidos (AKT es una proteína cliente de HSP90 y 17-AAG disminuye los niveles de expresión de KIT) (44). Sin embargo, aunque se hayan descrito muchos receptores hormonales ó TK como proteínas cliente de HSP90 (19, 21-23, 45, 46) y se haya demostrado la inhibición de IGF1R tras el tratamiento con inhibidores de HSP90 (47-49), hasta donde se conoce, no se ha descrito hasta la presente invención que IGF1R fuese una proteína cliente de HSP90. En la presente invención, se describe la interacción física mediante inmunoprecipitación entre HSP90 e IGF1R. Este hallazgo es de especial interés ya que la ruta de señalización de IGF1R es de gran relevancia en la patogénesis de los sarcomas (6-10, 14). Esto puede sugerir dos posibles vías de mecanismo de resistencia:

- 1) la función de IGF1R se mantiene después del tratamiento por su interacción con HSP90, y/ó
- 2) la proteína HSP90 confiere resistencia a las células de sarcoma de Ewing por otras vías relacionadas con la proliferación y apoptosis mediante la estabilización de las proteínas clientes como AKT ó KIT; y

por tanto, una nueva estrategia de tratamiento de estos tumores o de otros en los que la acción biológica de IGF1R participe en la etiopatogenia de los mismos.

25 El hecho de que los tumores malignos sean el resultado de un conjunto de múltiples cambios genéticos, hace que la mono-terapia sea ineficaz por la presencia de rutas de señalización colaterales. De este modo es interesante usar la inhibición de las HSP combinada con otro tipo de fármacos, de manera que reduzca la resistencia adquirida por las células tumorales a lo largo de la progresión maligna al tratamiento convencional. Así, se consideró que el tratamiento con 17-AAG podría mejorar la susceptibilidad de las células del SE al tratamiento con ADW/IMA, al inhibir vahás proteínas involucradas en la señalización de supervivencia y resistencia al tratamiento, especialmente en las líneas A673 y TTC466, ampliamente insensibles a ambos fármacos ADW/IMA.

35 Por esta razón, se decidió analizar el efecto de combinar 17-AAG con ADW o con IMA en la proliferación y la inducción de apoptosis de líneas celulares de sarcoma. Los resultados presentados en la presente invención confirman que el diseño de combinaciones de distintas terapias es más eficiente, y que esta combinación debe llevarse a cabo de una forma racional y específica de tejido/célula (Figura 2).

40 Aunque, la relevancia de KIT sea cuestionable en el SE (5), los resultados obtenidos sugieren que una posible combinación de IMA con 17-AAG podría tener una aplicación clínica interesante en estos casos. Además, podrá ser también aplicable más allá del SE, especialmente en los casos de tumor del estroma gastrointestinal (GIST) ó dermatofibrosarcoma protuberans resistentes a IMA, inhibiendo la acción de HSP90, lo que da aún más fuerza a los resultados obtenidos.

45 Modelos de xenotransplantes desarrollados con la línea celular A673 (resistente al tratamiento con ADW/IMA) confirmaron que la inhibición de HSP90 mediante 17-AAG, sola o combinada con la inhibición de IGF1R mediante AEW541 (un análogo de ADW742, más específico y menos tóxico), significativamente redujo el crecimiento tumoral y la expresión de las proteínas clientes.

50 Los estudios inmunohistoquímicos demostraron una posible degradación de las proteínas clientes de HSP90 tras el tratamiento, lo que explica el efecto del retraso en el crecimiento tumoral, como se ha descrito anteriormente (50). En el caso de la combinación, no tan solo se redujo la tasa del crecimiento tumoral sino que también se redujo el tamaño de los tumores durante el experimento, confirmando la sugerencia de una posible aplicación de la combinación de la inhibición de HSP90+IGF1R en el tratamiento del SE.

55 Hay que destacar, que utilizando dos grupos de muestras clínicas independientes, se encontró que cerca de la mitad de los tumores positivos a IGF1R mostraban además sobreexpresión difusa de HSP90. Esto no está obviamente relacionado con ningún tipo de respuesta al stress ya que estas biopsias se han tomado antes del tratamiento. De todos modos, este dato es importante ya que sugiere que los mecanismos de respuesta al stress ya están activos en algunos pacientes de SE en el momento del diagnóstico. En esos pacientes, la sobre-expresión de HSP90 podría ser un marcador de resistencia al tratamiento a esos mismos agentes bloqueantes. Todo esto delimita un subgrupo de pacientes que podrían beneficiarse de la combinación de agentes anti-HSP90 cuando se consideren terapias dirigidas a la diana IGF1R y subraya la importancia de estudiar los niveles de expresión de HSP90 en muestras de pacientes incluidos en los ensayos clínicos que usen agentes bloqueantes o inhibidores de IGF1R.

65 Hay que destacar que la sensibilidad a las drogas ADW/IMA depende no sólo de los niveles de expresión y de la activación basal de IGF1R/KIT, sino también, y por primera vez descrito en el sarcoma de Ewing, del desarrollo del mecanismo de respuesta al estrés a través de la proteína HSP90 que directamente interactúa con IGF1R.

## ES 2 347 619 B1

Resumiendo, se sugieren nuevos mecanismos de resistencia al tratamiento todavía no descritos en el SE., por lo que la sinergia entre la inhibición de HSP90 con el tratamiento con ADW/IMA tendría valor terapéutico en el SE. Por último, en vista de los recientes ensayos clínicos que usan inhibidores de IGF1R, la expresión de HSP90 podría ser evaluada como factor predictivo de la respuesta al tratamiento.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención lo constituye un procedimiento para diseñar una terapia individual antitumoral a un sujeto humano, en adelante procedimiento de la invención, basado en la detección de los niveles de proteína HSP90 responsable de la resistencia a un medicamento o a una mezcla de medicamentos antitumorales inhibidores de los receptores IGF1R/KIT y que comprende:

- a) Determinación *ex vivo* de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 en una muestra biológica tumoral,
- b) comparación de los niveles de a) con respecto a una muestra biológica control,
- c) determinación de resistencia a inhibidores de los receptores IGF1R/KIT cuando los niveles de a) son mayores que los obtenidos en b), y
- d) selección de un inhibidor de la proteína HSP90 como medicamento antitumoral coadyugante de un antitumoral inhibidor de los receptores IGF1R/KIT.

En células de mamíferos existen 2 genes que codifican homólogos citosólicos de la proteína HSP90, resultando que la  $\alpha$ -HSP90 humana tiene un 85% de homología de secuencia con la  $\beta$ -HSP90. Se cree que las formas  $\alpha$ - y  $\beta$ - se deben a una duplicación génica que se habrá dado hace millones de años. Ambas proteínas, la proteína  $\alpha$ -HSP90 y/o la  $\beta$ -HSP90 forman dímeros para la constitución posterior del complejo proteico con otras proteínas que es el que se asocia con sus proteínas cliente, pudiéndose formar en la célula dímeros  $\alpha$ -HSP90/ $\alpha$ -HSP90,  $\alpha$ -HSP90/ $\beta$ -HSP90 o  $\beta$ -HSP90/ $\beta$ -HSP90, de tal forma que la el estudio de la expresión o inhibición de cualquiera de ambas proteínas forma parte del objeto de la presente invención, aunque de forma preferente se utiliza el estudio de la expresión o inhibición de la forma  $\beta$ -HSP90.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “proteína HSP90” o “gen codificante de la proteína HSP90” se refiere tanto a la forma  $\alpha$ -HSP90 o  $\beta$ -HSP90, ya sea de la forma proteica o ADN/RNAm, respectivamente.

Un aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la muestra biológica tumoral tal como se menciona en el paso a) pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: sarcoma de Swing, tumor del estroma gastrointestinal (GIST) y dermatofibrosarcoma protuberans.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 se llevan a cabo con o sin la inducción de un estrés de las células de la muestra biológica tumoral mediante un compuesto antitumoral inhibidor de los receptores IGF1R/KIT.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 tal como se menciona en el paso a) se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles del RNAm del gen Hsp90, ya sea de la forma beta o alfa, y que comprende:

- i) la extracción de RNAm de la muestra biológica tumoral,
- ii) amplificación del RNAm del gen Hsp90, y
- iii) determinación de los niveles de RNAm del gen Hsp90.

Otra realización más particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la amplificación del RNAm del gen Hsp90 consiste en la amplificación de la forma beta ( $\beta$ ) de dicho gen.

Otra realización más particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la amplificación del RNAm del gen Hsp90 consiste en la amplificación de la forma alfa ( $\alpha$ ) de dicho gen.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 de a) se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP90 y que comprende:

- i) la extracción de las proteínas de la muestra biológica tumoral, y
- iii) determinación de los niveles de la proteína HSP90, ya sea por un método inmunológico (anticuerpos, ya sean monoclonales o no) o no inmunológico.

## ES 2 347 619 B1

Otra realización más particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la determinación de los niveles de la proteína HSP90 consiste en la determinación de la forma beta ( $\beta$ ) de dicha proteína.

5 Otra realización más particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la determinación de los niveles de la proteína HSP90 consiste en la determinación de la forma alfa ( $\alpha$ ) de dicha proteína.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que el inhibidor de la proteína HSP90 seleccionado pertenece, a título ilustrativo, al siguiente grupo: geldanamicina, 17-AAG, 17-DMAG, retaspimicina (IPI-504), ansamicina No-benzoquinona, compuestos diarilpirazoles (CCT018159 y CCT0129397/VER49009) y novobiocina.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que el inhibidor de los receptores IGF1R/KIT se selecciona a título ilustrativo del siguiente grupo: ADW742 (ADW), AEW541 (AEW) y Imatinib (IMA).

15 Otra realización más particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que el inhibidor de la proteína HSP90 seleccionado es el compuesto 17-AAG coadyugante de un compuesto inhibidor de los receptores IGF1R/KIT perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: ADW742 (ADW), AEW541 (AEW) y Imatinib (IMA).

Otro aspecto de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína HSP90, ya sea humana o animal, en adelante uso de un compuesto inhibidor de la presente invención, en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica útil para el tratamiento de un tumor, humano o animal, resistente al tratamiento con inhibidores de los receptores IGF1/KIT.

25 Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto inhibidor” se refiere a una molécula que cuando se une o interactúa con la proteína HSP90, ya sea humana o de otro mamífero, disminuye o elimina la intensidad o la duración de la actividad biológica de dicha proteína. En esta definición se incluye además aquellos compuestos que impiden o disminuyen la expresión del gen codificante de la proteína HSP90, es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del RNAm, la traducción del RNAm, e incluso impida la modificación post-traduccional adecuada de la proteína. Un compuesto inhibidor puede estar constituido por un péptido, una proteína, un ácido nucleico o polinucleótido, un carbohidrato, un anticuerpo, un compuesto químico o cualquier otro tipo de molécula que disminuya o elimine el efecto y/o la función de la proteína HSP90.

35 Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en el que el inhibidor de la proteína HSP90 pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: geldanamicina, 17-AAG, 17-DMAG, retaspimicina (IPI-504), ansamicina No-benzoquinona, compuestos diarilpirazoles (CCT018159 y CCT0129397/VER49009) y novobiocina (para detalles y como ejemplos de compuestos véase: Swee Sharp and Paul Workman (2006). Inhibitors of the HSP90 Molecular Chaperone: Current Status. ADVANCES IN CANCER RESEARCH 95: 323-348; Solit DB, Chiosis G (2008). Development and application of Hsp90 inhibitors. DRUG DISCOVERY TODAY 13, 1-2: 38-43; Brough PA *et al* (2008). 4,5-diarilisoaxazole HSP90 chaperone inhibitors: Potential therapeutic agents for the treatment of cáncer. JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 51, 2: 196-218; Menzella H *et al* (2007). Potent non-benzoquinone ansamycin Hsp90 inhibitors from mutasynthesis, MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS 6 (12): 3602S-3602S).

45 Los inhibidores de la proteína HSP90 están siendo empleados en distintos tumores, más concretamente la retaspimicina (Infinity) está siendo utilizada para el tratamiento de tumores estromales gastrointestinales y de sarcomas de tejido blando; en pacientes en tumores de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en y pacientes con cáncer de próstata resistentes al tratamiento hormonal. Por otro lado, la tanespimicina ha demostrado actividad en tumores de mama metastásicos positivos a HER2, e incluso en el caso de la Ansamicina No-Benzoquinona se ha utilizado para el tratamiento en modelos animales de leucemias mielodes agudas, mieloma múltiple y cáncer de colon.

55 Por otro lado, y a modo ilustrativo, el mencionado polinucleótido puede ser un polinucleótido que codifica una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína HSP90, o bien un polinucleótido que codifica una ribozima específica del mRNA de la proteína HSP90, o bien un polinucleótido que codifica un aptámero específico del mRNA de la proteína HSP90, bien polinucleótido que codifica un RNA de interferencia (“small interference RNA” o siRNA o un shRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90 o bien un microRNA (miRNA).

60 Estos polinucleótidos mencionados pueden ser utilizados en un proceso de terapia génica en el que mediante cualquier técnica o procedimiento se permita la integración de los mismos en las células de un paciente humano o animal. Este objetivo puede conseguirse mediante la administración a estas células tumorales de una construcción génica que comprende, al menos, uno de los polinucleótidos mencionados con el fin de transformar dichas células permitiendo su expresión en el interior de las mismas de manera que se inhiba la expresión del gen de la proteína HSP90. Ventajosamente, dicha construcción génica puede estar incluida dentro de un vector, tal como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia.

## ES 2 347 619 B1

Tal como se utiliza en la presente invención el término “vector” se refiere a sistemas utilizados en el proceso de transferencia de un gen exógeno o de una construcción génica exógena al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculación de genes y construcciones génicas exógenas. Dichos vectores pueden ser vectores no virales o vectores virales (Pfeifer y Verma, 2001) y su administración puede ser preparada por un experto en la materia en función de las necesidades y especificidades de cada caso.

Por tanto, otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de HSP90 de la invención en el que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína HSP90, ya sea humana o animal, y que incluye al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína HSP90,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína HSP90,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína HSP90,
- d) un RNA de interferencia (siRNA o shRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90, y
- e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90.

Con anterioridad se han descrito siRNAs que inhiben la expresión de HSP90 (Chatterjee M, Jain S, Stühmer T, Andrulis M, Ungethüm U, Kuban RJ, Lorentz H, Bommert K, Topp M, Krämer D, Müller-Hermelink HK, Einsele H, Greiner A, Bargou RC. (2007) Heat shock protein 90 alpha und beta are overexpressed in multiple myeloma cells and critically contribute to survival” 1: Blood. 15; 109(2): 720-8; Håvik B, Bramham CR. (2007) Additive viability-loss following hsp70/hsc70 double interference and Hsp90 inhibition in two breast cancer cell lines. Oncol Rep. 17 (6): 1501-10; Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Bouchot A, Cartier J, Jacquelin A, Ducoroy P, Cathelin S, Decolonne N, Chiosis G, Dubrez-Daloz L, Solary E, Garrido C. (2008) Interaction of heat-shock protein 90beta isoform (HSP90beta) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. Cell Death Differ. 2008 15(5): 859-66; John H. Connor, Margie O. McKenzie, Griffith D. Parks, and Douglas S. Lyles. (2007) Published online 2007 January 26. doi: 10.1016/J. virol. Antiviral activity and RNA polymerase degradation following Hsp90 inhibition in a range of negative strand viruses. Virology. May 25; 362(1): 109-119; Fang He, Zhuan-Hong Qiao, Jian Cai, William Pierce, Da-Cheng He, and Zhao-Hui Song (2006) Involvement of the 90-kDa heat shock protein (Hsp-90) in CB2 cannabinoid receptor-mediated cell migration: a new role of Hsp-90 in migration signaling of a G protein-coupled receptor. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 26(8): 1118-20; Chen XM, Zou F. (2006) Stress response changes of NIH-3T3 cells with HSP90alpha expression inhibition by RNA interference. 1: Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 26(8): 1118-20; Zaarur N, Gabai VL, Porco JA Jr, Calderwood S, Sherman MY. (2006) Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. Cancer Res. 66(3): 1783-91). Cualquiera de estas secuencias de nucleótidos descritas en el estado del arte como inhibidoras de la expresión de HSP90 se incorporan como realizaciones de la presente invención como potenciales compuestos terapéuticos útiles para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de un proceso tumoral resistente a los inhibidores de IGF1/KIT. Por otro lado, estas técnicas de inhibición génica, y más concretamente la vehiculización de los compuestos -oligonucleótidos antisentido, iRNA, ribozimas o aptámeros- puede llevarse a cabo mediante el uso de liposomas, nanopartículas u otros vehiculizantes que incrementan el éxito de dicha transferencia al interior de la célula, preferentemente al núcleo celular (Lu y Woodle, 2005; Hawker y Wooley, 2005). En principio, pueden utilizarse inhibidores de la traducción del RNAm de HSP90 que se unen tanto a su región codificante como a la no codificante, por ejemplo frente a la zona 3' no codificante.

Así, otra realización particular de la invención lo constituye el uso de un RNAi tal como se menciona en el paso d) en el que el siRNA está constituido por la pareja de secuencias de nucleótidos específicos del siRNA de la forma beta siguiente: secuencia sentido: GGUGACAAUCUCCAAUAGAtt (SEQ ID NO1) y secuencia antisentido: UCUAUUGGAGAUUGUCACAttde (SEQ ID NO2) (secuencias 5' ->3, ver RefSeq: NM\_007355-siRNA ID: 119760; Ambion, Austin, TX), y que se ha utilizado en la presente invención, y dirigidos contra los exones diana del siRNA: NM\_007355: exón 10,11.

Corno se ha comentado anteriormente, en las células de mamíferos humanos, existen 2 genes el gen  $\alpha$ -HSP90 y el gen  $\beta$ -HSP90 con una alta de homología de secuencia. En este sentido, y con el objeto de aprovechar la estrategia de inhibir la expresión de ambos genes se puede, de una forma preferente, utilizar sistemas de silenciamiento génico que se unan específicamente a regiones del RNAm conservadas en ambas formas  $\alpha$ -HSP90 y  $\beta$ -HSP90, creando una mayor sinergia en la inhibición ambas proteínas HSP90, las cuales ya no podrán participar en la formación de dímeros (esta estrategia es la que ha dirigido la selección de los anteriores siRNA (SEQ ID NO1 y 2), que reconocen una región común a las formas  $\alpha$ - y  $\beta$ -).

Las secuencias de nucleótidos mencionadas previamente en los apartados a), b), c), d) y e), impiden la expresión del gen en mRNA o del mRNA en la proteína HSP90, y, por tanto, anulan su función biológica, y pueden ser desarrolladas por un experto en el sector de ingeniería genética en función del conocimiento existente en el estado del arte sobre transgénesis y anulación de la expresión génica. Por otro lado, los inhibidores de HSP90 pueden utilizarse de forma

## ES 2 347 619 B1

aislado en la elaboración del medicamento antitumoral descrito en la presente invención o en combinación con otros antitumorales para aprovechar las sinergias de distintos mecanismos de acción, y especialmente en combinación con inhibidores de las proteínas IGFR1/KIT, y más concretamente con los descritos en la presente invención.

5 Por tanto, otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inhibidor de HSP90 de la invención que comprende el uso en combinación de un inhibidor de las proteínas IGFR1/KIT, y más concretamente en combinación con, al menos, el compuesto ADW742 (ADW), AEW541 (AEW) y Imatinib (IMA).

10 Otro aspecto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento útil para el tratamiento de un proceso tumoral resistente a inhibidores de IGF1/KIT, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína HSP90, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 Otro aspecto más particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención que comprende un inhibidor de la proteína HSP90 perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: geldanamicina, 17-AAG, 17-DMAG, retaspimicina (IPI-504), ansamicina No-benzoquinona, compuestos diarilpirazoles (CCT018159 y CCT0129397/VER49009) y novobiocina.

20 Otro aspecto más particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención que comprende, además del inhibidor de la proteína HSP90, un inhibidor de las proteínas IGFR1/KIT, y más concretamente, al menos, un inhibidor perteneciente al siguiente grupo: ADW742 (ADW), AEW541 (AEW) y Imatinib (IMA).

25 Otro aspecto más particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína HSP90 humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína HSP90,
- 30 b) una ribozima específica del mRNA de la proteína HSP90,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína HSP90,
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90, y
- 35 e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90.

40 Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el inhibidor de HSP90 es un siRNA constituido por la pareja de secuencias de nucleótidos específicos del siRNA de la forma beta siguiente: secuencia sentido: GGUGACAAUCUCCAAUAGAtt (SEQ ID NO1) y secuencia antisentido: UCUAUUGGAGAUUGUCACctt de (SEQ ID NO2) (secuencias 5' ->3, ver RefSeq: NM\_007355-siRNA ID: 119760; Ambion, Austin, TX), y que se ha utilizado en la presente invención, y dirigidos contra los exones diana del siRNA: NM\_007355: exón 10,11.

45 Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

50 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto inhibidor de la actividad de la proteína HSP90, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

55 En una realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía 60 intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en Faulf i Trillo, 1993.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por un proceso o enfermedad tumoral resistente a los inhibidores de los receptores IGF1/KIT, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente 65 invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso de tumoral.

## Descripción de las figuras

Figura 1.- *Resultados de los geles 2D y validación de la expresión de HSP90*. Las líneas A673 y A4573 fueron tratadas con 0.1  $\mu\text{M}$  de ADW742 y/ó 10  $\mu\text{M}$  de Imatinib, durante 24 y 72 horas, y posteriormente la proteína fue extraída. A) Geles 2D de la línea A673. El panel de la izquierda presenta una situación control y el de la derecha una del tratamiento con ADW. Después de realizada la segunda dimensión se hizo un análisis manual de los puntos proteicos con cambios más relevantes y estos se analizaron por MALDI-ToF. Las proteínas resaltadas en la imagen son: 1 y 3- no determinadas por tener un score bajo; 2- PRDX1, 4- NASP, 5-HSP90. La imagen de close-up presenta los cambios de expresión de la proteína HSP90. B) Función de las proteínas que presentaron cambios de expresión tras el tratamiento con ADW y/ó IMA. El mayor grupo es el de las proteínas involucradas en la respuesta al stress (21%) y la apoptosis (17%). C) Análisis densitométrico del estudio por WB de los efectos del tratamiento con ADW y/ó IMA en los niveles de HSP90. La expresión de HSP90 se incrementó a las 24 horas en las líneas A673 y TTC466 y disminuyó en las demás líneas. A las 72 horas la expresión de HSP90 disminuyó en todas las líneas celulares, especialmente en A673. \*:  $p < 0,05$ , determinado con el análisis ANOVA *One-Way* de la Variancia para Muestras Independientes.

Figura 2.- *Efectos del tratamiento con 17-AAG en la proliferación y apoptosis de las líneas de SE*. Células sub-confluentes han sido tratadas con 17-AAG (0,01-25  $\mu\text{M}$ ) solo ó combinado con ADW742 (0,1-0,5  $\mu\text{M}$ ) ó Imatinib (5-15  $\mu\text{M}$ ), crecidas por 24 ó 72 horas, a diferentes combinaciones, y la proliferación medida por el ensayo del MTT y la apoptosis analizada por Citometría de flujo, con la detección con Annexin-V/PI. A)  $\text{IC}_{50}$  de proliferación ( $\mu\text{M}$ ) de las líneas de SE tratadas a las 24 y 72 horas con 17-AAG. Todas las líneas han tenido resultados similares, con una inhibición del crecimiento dosis-dependiente. El  $\text{IC}_{50}$  ha dependido de cada línea celular. B) Representación de los niveles de apoptosis obtenidos en distintos tratamientos de la línea A673 tratada con 17-AAG, ADW y/ó IMA por 72 horas. Mientras que con el monotratamiento no se indujo la apoptosis, con las combinaciones si se obtuvo inducción de apoptosis. Se obtuvo un mayor impacto en los niveles de apoptosis tardía/necrosis que en los de apoptosis temprana. C) Representación gráfica de todas las condiciones del tratamiento. Cuanto mas elevada fue la concentración de los fármacos usados, mayor el ratio entre células apoptóticas/necróticas y células vivas, indicando un incremento de la inducción de la muerte celular. El efecto del combinar 17AAG con ADW742 ó Imatinib resultó en un incremento adicional del 10-50% en la apoptosis, dependiendo de la línea celular estudiada. Se han observado principalmente efectos aditivos de las combinaciones pero en el caso de la línea A673 se han observado efectos sinérgicos. A/N: apoptosis/necrosis; A: ADW y I: IMA.

Figura 3.- *Efectos del tratamiento con 17-AAG en la expresión y fosforilación de algunas proteínas cliente de HSP90 en líneas celulares de SE*. A) Las líneas A673 y A4573 fueron tratadas con 0,25  $\mu\text{M}$  17-AAG por 24 y 72 horas, estimuladas con IGF1 por 10 minutos y la proteína extraída. El tratamiento con 17AAG resultó en una degradación de IGF1R, c-kit y AKT, con una disminución de la fosforilación de AKT, mTOR y MAPK42/44. Los niveles de degradación han dependido largamente de la línea celular usada, siendo la línea A673 más sensible a este tipo de tratamiento que A4573, en la cual casi no se verifica degradación de IGF1R ó KIT. B) Efectos del tratamiento con 17-AAG en la interacción física de HSP90 y algunas de sus proteínas cliente. La línea A673 fue tratada con 0,1  $\mu\text{M}$  17-AAG durante 72 horas, la inmunoprecipitación hecha contra HSP90, c-kit, AKT e IGF1R y las proteínas extraídas. Todas las proteínas estudiadas se encontraban en el extracto total (TE; primera banda de la izquierda) y c-KIT, AKT e IGF1R eran coimmunoprecipitadas con HSP90 (octava banda de la izquierda). El tratamiento con 17-AAG redujo la interacción de IGF1R, AKT y c-KIT con HSP90 (novena banda). Las proteínas cliente no inmunoprecipitaron entre sí (en cada blot no se observa señal para ninguna otra proteína cliente si no apenas la específicamente inmunoprecipitada, junto con la señal de HSP90), visto que HSP90 puede únicamente interactuar con una PC de cada vez, siendo observable apenas una señal de IP para la PC que está “chaperoning”.

Figura 4.- *Efectos de la inducción de expresión de HSP90 en las líneas de SE*. A) Efectos del HSP90-siRNA en la expresión de HSP90 de las líneas A673 y TTC466. Células sub-confluentes se han tratado con HSP90 -siRNA (75 nM), crecidas por 24 horas y la expresión de HSP90 analizada. El HSP90-siRNA redujo la expresión de HSP90 un 35-65% mientras que el neg.-siRNA no tuvo efecto alguno. B) Efectos antiproliferativos del bloqueo de la expresión de HSP90 con HSP90-siRNA combinado con ADW/IMA. Células subconfluentes se transfectaron con HSP90-siRNA (75 nM), crecidas por 24 horas y tratadas con ADW742 (0,1-0,5  $\mu\text{M}$ ) ó Imatinib (5-15  $\mu\text{M}$  Imatinib), durante 72 horas adicionales, y la proliferación fue analizada por el ensayo del MTT. Los resultados obtenidos con el HSP90-siRNA fueron muy similares a los del tratamiento con 17-AAG, con una disminución de la proliferación del orden del 20-30%. C) “Time-course” de los efectos de la transfección del clon de HSP90 en la expresión de HSP90. Células sub-confluentes se transfectaron con un clon de HSP90 (15  $\mu\text{g}$ ), crecidas por 96 horas y la expresión de HSP90 analizada. El clon de HSP90 indujo eficazmente una sobre-expresión de HSP90, especialmente en la línea A4573. D) Efectos de la combinación del clonHSP90 con ADW/IMA a nivel de la proliferación de las líneas de SE. Células A4573, SK-ES-1 y TC-71 subconfluentes fueron transfectadas con el clon de HSP90 (15  $\mu\text{g}$ ), crecidas por 24 horas y tratadas con ADW742 (0,1-0,5  $\mu\text{M}$ ) ó Imatinib (5-15  $\mu\text{M}$  Imatinib), durante 72 horas adicionales, y la proliferación fue analizada por el ensayo del MTT. La sobre-expresión de HSP90 indujo un incremento de la proliferación, obteniéndose valores por encima del 75%, incluso tras el tratamiento con ADW/IMA. \*:  $p < 0,05$ , determinado con el análisis ANOVA *One-Way* de la Variancia para Muestras Independientes.

Figura 5.- *Estudios *in vivo* del tratamiento con 17-AAG, solo ó en combinación con el AEW541 y su correlación con muestras clínicas*. Ratones NOD-Scid fueron inyectados s.c. con  $5 \times 10^6$  células A673. Se randomizaron en grupos tratados con vehículo (25 mM ácido tartárico ó PBSTween 80 0.05% DMSO 10%), 17-AAG solo (80 mg/kg/día), AEW solo (50 mg/kg/día) ó 17-AAG+AEW (mismas condiciones), durante 15 días. A) Inhibición del crecimiento tu-

moral de los ratones tratados con 17-AAG solo ó combinado con AEW541. Los tumores del grupo control presentaron un aumento del 340% y los del grupo tratado con AEW tuvieron un aumento del 270%. Los ratones del grupo tratado con 17AAG solamente tuvieron un aumento del 72% y los del grupo de la combinación 17-AAG+AEW -38%. Los animales tratados con 17-AAG presentaron un retraso del crecimiento tumoral mientras que los de la combinación tuvieron una reducción del tamaño tumoral., cerca del 40% \*:  $p < 0.05$ , determinado con el análisis *ANOVA One-Way* de la Variancia para Muestras Independientes. \*: 17-AAG solo ó 17-AAG+AEW vs control; \*: 17-AAG+AEW vs 17-AAG solo. B) Evaluación morfológica y visual de los tumores animales. Las secciones teñidas con H&E de los tumores de los animales tratados con 17AAG+AEW (panel inferior) señalaron un marcado aumento del área neurtizado y una drástica reducción del tamaño, con respecto a los tumores del grupo control (panel superior). Barra: 1cm. C) Evaluación ICQ de los niveles de la expresión de HSP90, IGF1R, AKT, m-TOR y c-kit de los tumores animales tras tratamiento con 17-AAG y/o AEW, durante dos semanas. La expresión de IGF1R, c-kit y AKT fue casi totalmente eliminada en los animales tratados con 17-AAG+AEW (derecha), con respecto al grupo control (izquierda). Sin embargo, la expresión de m-TOR no tuvo cambios significativos. (400x). D) Evaluación ICQ de la expresión de HSP90 en las muestras clínicas de SE. La expresión de HSP90 e IGF1R fue citoplasmática y uniforme en el tumor. La intensidad fue de floja a moderada para HSP90 y de moderada a intensa para IGF1R. La expresión de KIT se detectó en la membrana celular, con una señal heterogénea e intensidad de moderada a intensa. Se presenta una imagen de poca ampliación (4x), una vista intermedia (200x) y una vista de mayor ampliación (1000x) en los casos positivos y una intermedia para los casos negativos.

20

## Ejemplos de realización

### Ejemplo 1

25 *Los niveles de la proteína HSP90 son determinantes en la respuesta de líneas celulares de Sarcoma de Ewing al tratamiento con ADW y/o IMA y su inhibición sensibiliza a las líneas celulares resistentes a estos tratamientos*

1.1.- *El tratamiento con ADW742 (ADW) y/o Imatinib (IMA) induce cambios a nivel proteómico en líneas celulares de sarcoma de Ewing*

30

Ya que con estudios previos de inhibición de las rutas de IGF1R/KIT se verificó que la combinación de la inhibición de IGF1R con la de c-kit tenía efectos sinérgicos a nivel de la inhibición de proliferación, inducción de apoptosis y bloqueo de la ruta de señalización (14), se decidió hacer un estudio proteómico para poder caracterizar de un modo amplio los cambios de expresión proteica inducidos en las células de SE tras tratamiento con ADW y/o IMA. Con este estudio también se pretendió identificar proteínas relevantes que se pudieran utilizar como posibles dianas/marcadoras de la respuesta al tratamiento en el SE.

35

Inicialmente se trató la línea A673 y A4573 (las líneas más resistente y sensible al tratamiento, respectivamente) con 0,1  $\mu\text{M}$  de ADW y/o 10  $\mu\text{M}$  de IMA, durante 24 y 72 horas, haciendo a continuación los respectivos extractos proteicos y analizando el proteoma con una electroforesis bidimensional (Figura 1A). De cada uno de los geles obtenidos se ejecutó un análisis manual comparativo de los cambios de expresión de los puntos proteicos más relevantes y estos fueron analizados por espectroscopia de masas MALDI-TOF.

40

Así, se detectaron un gran número de proteínas cuya expresión se encontraba alterada bajo tratamiento (en estos análisis se eligió un nivel de “*minimal store*” de identidad de 65), que se han resumido en la Tabla 1. Las proteínas detectadas están involucradas en numerosos procesos celulares importantes, como es el caso de la regulación de la proliferación (EBP1, RhoA), la apoptosis (Set, 14-3-3) y la respuesta al stress (GRP75, HSP90, HSP70) (Figura 1B).

45

Con los datos obtenidos se hizo un análisis de interacción de rutas de señalización con el software *Ingenuity Pathway Analysis*, para poder detectar las rutas/redes de señalización más importantes alteradas con el tratamiento, seleccionando un panel más reducido de proteínas relevantes (marcadas con \* en la tabla), que se estudiaron posteriormente a nivel de mRNA y proteína.

50

55

60

65

ES 2 347 619 B1

TABLA 1

Proteínas identificadas con los estudios de electroforesis 2D/MALDI-ToF. Cada proteína fue identificada por "matching peptide-mass fingerprinting" contra una base de datos no-redundante humana de Swiss-Prot. Las proteínas marcadas con \* fueron caracterizadas a nivel de RNAm y proteína

Nº Acceso	Descripción	Score	Línea celular	Expresión
P27348*	1433T; 14-3-3 proteína Theta (Tau)	162	A4573	Sobre
Q25010+	ACT3A; Actina, citoplasmática A3a	171	A4573	Sub
P84184	ACT3B; Actina, citoplasmática A3b	138		sub
P23793	ARCA; arginina desaminasa	193	A4573	Sobre
Q92499	DDX1; Helicasa depend. ATP-DDX1	80	A4573	Sobre
Q92630	DYRK2; Reg. especif. pTyr-Ki2	67	A4573	Sobre
P26641	EF1G; Factor Elongación 1-gamma	143	A673	Sub
P38646*	GRP75; Prot. Choq. Term. 70, percu. mit.	368	A4573	Sub
P08238*+	HS90B y A; Proteína choque térmico 90 beta y alpha	176 +	A673	Over
P07900*		174		
		120 + 109		
P11142*	HSP7C; Proteína choque térmico 71kDaprot (HSP70)	99	A4573	Sub
P16144	ITB4; isoforma splice Beta-4B	70	A673	Sub
P05455	LA; proteína Lupus La	72	A4573	Sobre
P49321	NASP; isoforma splic. 2 y 1	120 + 90	A673	Sobre
Q9Y4L1	OXRP; Prot. Reg Oxi.- 150kDa	132	A673	Sub
Q9UQ80*	PA2G4; Prot. Ass. Prol. 2G4	206	A673	Sub

ES 2 347 619 B1

	(EBP1)				
5	Q06830	PRDX1; Peroxiredoxina 1	279 195	A4573 A673	Sub sobre
10	P28066	PSA5; Proteasa Subu. Alpha tipo 5.	106	A673	Sub
15	Q9NTK5	PTD4; Prot. Ligación GTP isoforma splice 1 y 2	145 112	A673	Sobre
	P61586*	RhoA; Transf. prot. RhoA	94	A673	Sub
20	P08865	RSSA; Prot. ribosomal 40S (p40)	147	A4573	Sobre
	Q01105*	SET; Prot. SET (I-2PP2A)	64	A4573	Sub
25	Q96FJ0	STALP; Proteasa AMSH –like	75	A4573	Sobre
	P13693*	TCTP; Prot. Transl. Cont. Tumoral (p23)	114	A4573	Sobre
30	P31930	UQCR1; Prot. I do complex. Ubiquinol-cytc Reductasa, Perc. mit.	333	A4573	Sobre
35	P18206	Vinculina; isoforma splice 1 y 2	208 + 205	A673	Sobre
40					

Con los estudios de qRT-PCR y WB se demostró que casi todas las proteínas elegidas estaban realmente alteradas, tanto a nivel de RNAm como de expresión proteica, y que los resultados no se debían prácticamente a la inespecificidad del *background* celular, propio de cada línea celular. Se han obtenidos diferencias significativas entre los estudios a las 24 y 72 horas de tratamiento, demostrando principalmente una activación inicial de la respuesta al stress a las 24 horas de tratamiento y obteniéndose efectos más consistentes y línea celular/fármaco-específicos a las 72 horas. Se han verificado diferencias significativas entre las dos líneas celulares estudiadas.

Globalmente se observó que el mono-tratamiento (ADW ó IMA) tenía efectos similares y que era menos efectivo que su combinación (ADW+IMA). Las proteínas sobre-expresadas estaban relacionadas con la apoptosis y las sub-expresadas estaban relacionadas con la proliferación y respuesta al stress.

1.2.- Los niveles de expresión de la proteína HSP90 se modifican drásticamente con el tratamiento ADW742/Imatinib

Visto que uno de los procesos celulares más cambiados con el tratamiento con ADW y/ó IMA era la respuesta al stress, y puesto que había disponibles inhibidores específicos de HSP90, estando ya caracterizada su función en el cáncer, se decidió estudiar el papel de HSP90 en la respuesta al stress de las líneas de SE.

Se empezó por comprobar los cambios de expresión de HSP90 en el panel de 5 líneas celulares de SE con diferentes tipos de fusión EWS-ETS (28-31), en condiciones control y tras tratamiento con ADW y/ó IMA, durante 24 ó 72 horas.

Como se puede verificar por la Figura 1C, la expresión de HSP90 cambiaba en todas las líneas celulares, dependiendo los efectos de la línea en cuestión. De un modo global, a las 24 horas de tratamiento, la expresión de HSP90 tuvo un incremento en las líneas A673 y TTC466 y una disminución en las demás líneas. A las 72 horas, la expresión de HSP90 se disminuyó en todas las líneas celulares, especialmente en al caso de A673.

## ES 2 347 619 B1

1.3.- *El bloqueo de HSP90 mediante 17-AAG inhibe la proliferación celular y la supervivencia reduciendo la activación de proteínas clientes clave de HSP90*

Después de confirmar los cambios de expresión de HSP90 en las líneas de SE, se procedió a estudiar su papel en la proliferación y apoptosis de las mismas líneas celulares, inhibiendo específicamente su función al tratar las líneas celulares con 17-AAG.

Todas las líneas celulares han tenido respuestas similares con la inhibición de HSP90, obteniéndose una inhibición de la proliferación de un modo dosis-dependiente, a las 24 y 72 horas de tratamiento, con un IC<sub>50</sub> a las 24 horas de 1.01-1.62  $\mu$ M y a las 72 horas de tratamiento de 0.42-0.72  $\mu$ M (Figura 2A).

Se verificó que los efectos del tratamiento con 17-AAG en la inducción de la apoptosis de las líneas de SE dependían específicamente de cada línea en cuestión. Como se verifica en la Figura 2B y C, la inducción de apoptosis varió entre el 20-30% en las líneas TTC466 y A673 y el 8-20% en las demás líneas celulares, con un impacto más acentuado en los niveles de apoptosis tardía/necrosis que en los de apoptosis temprana.

Los resultados obtenidos se han podido explicar, por lo menos parcialmente, cuando se analizaron los niveles de expresión de algunas proteínas cliente de HSP90 tras tratamiento con 17-AAG. Se observó que 17-AAG *per se* (Figura 3A) inhibía la expresión de IGF1R, c-kit y AKT y que, como consecuencia de esto, se obtenía también una disminución de los niveles de fosforilación de AKT, m-TOR y MAPK42/44. Estos resultados fueron más evidentes en la línea A673 que en la A4573, en la cual no se detectó una degradación significativa de IGF1R ó c-kit.

Los estudios de inmunoprecipitación han demostrado que IGF1R, KIT y AKT tenían su interacción física con HSP90 reducida tras tratamiento con 17-AAG. De nuevo, la interacción entre HSP90 y KIT ó IGF1R fue bastante más débil en las líneas sensibles a ADW/IMA (A4573, SK-ES-1 y TC-71) que en las J resistentes (A673 y TTC466) (Figura 3B).

1.4.- *El bloqueo de HSP90 mediante 17-AAG sensibiliza a las líneas celulares resistentes al tratamiento con ADW742 o Imatinib*

Como se verificó que el tratamiento con 17-AAG era eficaz en las líneas A673 y TTC466 (que habían resultado ser las más insensibles a ADW/IMA (14)) y que reducía p-AKT, p-m-TOR y p-MAPK, se decidió estudiar la combinación de este fármaco con ADW ó IMA, a nivel de la proliferación y apoptosis de las líneas de SE.

Se observó que la combinación de 17-AAG con ADW/IMA provocó un descenso adicional de la proliferación del orden del 15-50%, dependiendo de la sensibilidad de cada línea celular. La combinación de 17-AAG con ADW fue sinérgica en casi todas las líneas celulares (se obtuvo un rango de IC del 0.35-0,9). En el caso de la combinación con IMA, se observaron efectos sinérgicos en las líneas A673 y TTC466 (en la línea A673 el rango de IC fue de 0,53-0,8 y en el de la línea TTC466 fue de 0,44-0,796).

En los estudios de la apoptosis se detectó una inducción dosis-dependiente de la apoptosis tras tratamiento con ADW/IMA. El efecto de combinar 17-AAG con ADW ó IMA provocó un incremento adicional del 10-50% en la apoptosis, dependiendo de la línea celular (Figura 2B y C). Se observó principalmente efectos aditivos pero, de nuevo, se detectó sinergia (IC de 0,5-0,7) en el caso de las líneas A673 y TTC466, alcanzándose niveles de apenas un 25% de supervivencia.

1.5.- *Los niveles de la proteína HSP90 son determinantes de la respuesta de líneas celulares de sarcoma de Ewing al tratamiento con ADW/IMA*

Para comprobar que los resultados obtenidos con 17-AAG se debían al bloqueo específico de HSP90, se decidió hacer dos estudios adicionales. Uno de los estudios se basó en la técnica de la interferencia de RNA (en el cual se ha reducido la expresión de HSP90 en las líneas celulares resistentes a ADW/IMA) y el otro se basó en inducción de la sobre-expresión de HSP90 (en las líneas sensibles a ADW/IMA) para probar que la alta expresión de HSP90 confería resistencia a tratamiento con ADW ó IMA.

Tal y como se sospechaba, el HSP90-siRNA (que redujo la expresión de HSP90 en un 35-65%, como de muestra en la Figura 4A) mejoró los efectos del tratamiento con ADW ó IMA en la inhibición de proliferación e inducción de apoptosis, siendo los resultados muy similares a los obtenidos con 17-AAG (Figura 4B). Se observó un descenso del 20-30% en la proliferación y un 15-40% en la inducción de apoptosis de las células tratadas con el HSP90-siRNA (cuando comparadas con las situaciones control de no-tratamiento ó neg.-siRNA).

Estos resultados confirmaron que los resultados obtenidos con 17-AAG eran específicos de la inhibición de HSP90 y no debidos a efectos alternativos/inespecíficos de este fármaco. Con estos resultados también se confirmó la hipótesis de que los niveles de expresión de HSP90 son determinantes para la respuesta de las células de SE al tratamiento con ADW/IMA.

## ES 2 347 619 B1

La hipótesis propuesta fue igualmente comprobada en los estudios de sobre-expresión de HSP90, aunque por una aproximación opuesta. Se obtuvo una sobre-expresión de HSP90 del 30-73% en las líneas A4573, SK-ES-1 y TTC466, que se incrementó tras tratamiento con ADW/IMA (figura 4C).

5 Como se puede verificar en la Figura 4D, la sobre-expresión de HSP90 indujo un incremento en los niveles de proliferación de las líneas de SE, confiriéndoles resistencia a los efectos pro-apoptóticos de ADW/IMA. La inducción de apoptosis fue drásticamente bloqueada (no se obtuvo más del 20% de inducción de apoptosis en las condiciones bajo tratamiento, valores próximos a la situación control). Todas las condiciones tuvieron valores de más del 75%, más elevados que en las condiciones no-transfectadas. Estos resultados no se han debido, apenas, a efectos de la  
10 transfección ya que se verificó que el mock (vector vacío) no afectó ni la proliferación ni la apoptosis de las líneas estudiadas.

### Ejemplo 2

15

*La inhibición de la proteína HSP90, sola o en combinación con inhibidores de IGF1R, reduce el crecimiento tumoral in vivo*

Después de comprobar *in vitro* los efectos del tratamiento con 17-AAG, solo ó combinado con ADW/IMA, se decidió hacer un estudio *in vivo*, con un modelo xenógrafo usando la línea A673, resistente al tratamiento con ADW/IMA, valorando la eficacia antitumoral del tratamiento con 17-AAG, solo ó combinado con AEW541 (análogo del ADW, que tiene el mismo mecanismo de acción pero que es más específico para IGF1R y menos tóxico (32)).

Este estudio confirmó los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*. Mientras que en la parte final del estudio, en la situación control, se detectó un aumento del tamaño medio tumoral del 340% y en el grupo tratado con AEW de 270%, este aumento fue de apenas un 74% en el grupo tratado con 17AAG y de un -38% en el grupo de la combinación (figura 5A). Los animales tratados con el monotratamiento de AEW tuvieron un comportamiento similar a los del grupo control, mientras que los animales tratados con 17AAG tuvieron un retraso en el crecimiento tumoral durante las dos semanas de tratamiento. En el caso de los animales del grupo tratado con la combinación de 17-AAG+AEW, estos tuvieron no tan solo un retraso del crecimiento tumoral, sino también una marcada reducción del tamaño medio tumoral, aproximadamente del 40%. El efecto de la combinación fue incluso más marcado en aquellos animales que tenían inicialmente tumores más bajos del tamaño medio, en los cuales la reducción llegó a ser del 66%.

Los estudios histopatológicos hechos con las muestras tumorales demostraron que los tumores tratados con la combinación no eran apenas más pequeños, pero si tenían zonas más extensas de necrosis, como se puede ver en la 5B. Se verificó que la expresión de IGF1R, AKT y c-c-KIT estaba disminuida en los tumores tratados con 17-AAG, AEW y 17-AAG+AEW, respecto a las muestras del grupo control, lo que está de acuerdo con el hecho de que son proteínas cliente de HSP90. Por lo contrario, la expresión de m-TOR no cambió significativamente con el tratamiento (excepto en el caso del tratamiento con AEW).

40

### Ejemplo 3

45

*Un sub-grupo de muestras clínicas positivas para IGF1R tiene también expresión de HSP90*

Se analizó la expresión de las proteínas HSP90, IGF1R y KIT en dos grupos de muestras clínicas de pacientes con sarcoma de Ewing (análisis independiente). La prevalencia de la expresión de estas tres moléculas fue similar entre ambas series de muestras.

En lo que se refiere a la expresión de IGF1R, se detectó un mareaje citoplasmático y relativamente uniforme en los tumores, en ambos grupos de muestras clínicas de SE (5/10, 50% - en el caso del grupo de muestras del Dr. Enrique de Álava (EAC) y 33/44, 75% - en el caso del TMA). La intensidad de la señal fue de moderada a intensa. La expresión de HSP90 fue citoplasmática, en determinados casos con un mareaje punteado, y uniforme en los tumores (3/10, 30% - en las muestras de EAC y 19/44, 43% - en el caso del TMA). La intensidad fue de débil a moderada. La expresión de c-kit fue de membrana, teniéndose un mareaje heterogéneo en los tumores, con un 64% de positividad en los casos de EAC (7/11) y un 48% en el TMA (21/44). La intensidad de la señal fue de moderada a intensa.

Fue interesante verificar que, al comparar la expresión de IGF1R y HSP90, se haya que casi mitad de las muestras IGF1R+ también eran HSP90+. Sin embargo, casi un 80% de las muestras HSP90+ tenían también expresión de IGF1R. La expresión de KIT tuvo un comportamiento muy similar a IGF1R.

60

### *Materiales y Métodos*

65

#### *Líneas celulares*

La línea A673 se obtuvo de la ECACC (*European Collection of Animal Culture Cells*, #cat. 85111504) y la SK-ES-1 se obtuvo de la ATCC (*American Type Culture Collection*, #cat. HTB-86). La línea TC-71 fue un regalo de la

## ES 2 347 619 B1

Dra. Iranzu González, de la Universidad de Navarra y la línea A4573 del Dr. Samuel Navarro, de la Universidad de Valencia. La línea TTC466 fue un regalo del Dr. Jaume Mora, del Hospital Sant Joan de Déu, de Barcelona.

5 La línea A673 se ha cultivado en medio DMEM (Invitrogen/Life Technologies, #cat. 14167) suplementado con 10% de SBF. La línea SK-ES-1 se ha crecido en medio McCoy's (Invitrogen/Life Technologies, #cat. 26600-023) suplementado con 15% de SBF y la línea TC-71 en medio IMDM ; (Invitrogen/Life Technologies, #cat. 21980-032) suplementado con 20% de SBF. Las líneas A4573 y TTC466 se han crecido en medio RPMI (Invitrogen, Life Technologies, #cat. 21875-034) suplementadas con 15 y 10% de SBF, respectivamente.

10 Todas las líneas celulares fueron analizadas para descartar la presencia de Micoplasma, con el kit VenorGeM (Minerva Biolabs, #cat. 11-1050). Estas líneas tienen diferentes tipos de translocación EWS-ETS. Las líneas A673 y TC-71 tienen una translocación EWS-FLI1 de tipo1, la SK-ES-1 tiene una translocación EWS-FLI1 de tipo2, la A4573 tiene una EWS-FLI1 de tipo3 y la TTC466 tiene una translocación de tipo EWSESG, como descrito anteriormente (28-31).

15

### *Muestras clínicas*

20 Se estudiaron un total de 62 muestras de biopsias clínicas de Sarcoma de Ewing y 11 de otros tumores (utilizados como controles positivos de fosforilación o negativos de translocación), pertenecientes a 23 hombres y 18 mujeres (32 pacientes sin información), con una media de edades de 26 años en el momento de diagnóstico (18 en el caso de los pacientes de SE). 50% de los casos de SE se localizaban en los miembros inferiores (20.8% en la tibia, 16% en el fémur), 12.5% en los miembros superiores y 21% en la región pélvica, teniendo un 42% de ellos metástasis en los pulmones, hueso y médula en el momento del diagnóstico.

25

23 muestras se encontraban incluidas en bloques de parafina y las restantes 50 se obtuvieron mediante colaboración con el Dr. Christopher Poremba, Heinrich-Heine University, Dusseldorf, Alemania, y se encontraban en dos TMA (*Tissue Microarray*). El uso de este material fue aprobado por los comités éticos de ambas instituciones.

30

### *Compuestos farmacéuticos*

35 ADW742 (ADW), AEW541 (AEW) e Imatinib (IMA) han sido cedidos por Novartis Pharma AG, Basel, Suiza. El 17-AAG se obtuvo de Alexis Biochemicals, Suiza (#cat. 380-091-M001). Todos estos fármacos se han resuspendido en DMSO (10 mM) (a la excepción de VCR y DXR que se han resuspendido en agua MiliQ) y alicuotado en las concentraciones deseadas.

### *Electroforesis 2D*

40

Inicialmente las líneas celulares se trataron con 0.1  $\mu$ M de ADW742 y/ó 10  $\mu$ M de Imatinib, durante 24 y 72 horas. Se obtuvieron los respectivos extractos celulares por raspaje de las células con una asa "Scrapper", en hielo, con 500  $\mu$ l de tampón de lisis ((1% NP40, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10% glicerol, 20 mM Tris-HCl pH 7, protease inhibitor cocktail (Roche, Switzerland), 50 mM NaF and 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Las proteínas de precipitaron con ácido tricloroacético/acetona solubilizados en 7 M Urea, 2 M Thiourea, 2% CHAPS e inhibidores de proteasas.

45

A 100  $\mu$ g de proteína de partida (determinados usando el kit PlusOne Quant Kit (GE Healthcare, Sweden)) se han añadido 250  $\mu$ l de solución de rehidratación (8M urea, 0.5% CHAPS, 0.2% DTT, 0.5% tampón IPG y 0.002% azul de bromofenol), colocándoles en tiras de 13 cm (pH 3-11), dejando las muestras hidratando, por adsorción, por 12 horas.

50

El isoelectroenfoque se hizo en un aparato Ettan IPGphor (GE Healthcare, Sweden) a 30,000V.h a 20°C. La reducción y la alquilación de hicieron según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, USA). Los geles SDS-PAGE de la segunda dimensión (10 ó 12%) se han teñido con nitrato de plata.

55

Los puntos proteicos expresados diferencialmente se han tripsinizado y procesado para el análisis de espectrometría de masas MALDI-ToF. Las proteínas se identificaron por comparación de los datos obtenidos de la masa de los péptidos identificados con las bases de datos humanas de Swiss-Prot (score mínimo de 65). Se han realizado como mínimo 3 experimentos independientes. Se hizo un análisis de interacción de rutas de señalización con las proteínas identificadas, para resaltar las más relevantes que cambiaron con el tratamiento, usando el Software Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, Redwood City, CA).

60

### *Western Blotting (WB) e Inmunoprecipitación (IP)*

65

Se han realizado estudios de WB para estudiar la inhibición de la expresión de las PC de HSP90 tras tratamiento con 17-AAG.

## ES 2 347 619 B1

Inicialmente se obtuvieron los extractos celulares, por raspado de las células en hielo, con una asa Scrapper, con 500  $\mu$ l de tampón de lisis ([1% NP40, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA, 10% glicerol, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7), tabletas de cocktail de inhibidores de proteasas (Roche), 50 mmol/L NaF, y 2 mmol/L Na<sub>3</sub>V04], La concentración de proteína se determinó usando el kit de determinación de proteína denominado BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL)). Se han cargado 50  $\mu$ g de proteína por pocillo, se han corrido en geles del 10% y se han transferido para membranas de PVDF. Los blots se han bloqueado con una solución de TBS-T con 5% de BSA, incubados con los anticuerpos específicos y revelados con el kit ECL, de Amersham. Para analizar cuantitativamente los resultados obtenidos, se procedió a un análisis densitométrico, con el programa Quantity One 4.3.1 (Biorad), del aparato GELDoc 2000, en el cual se determinó la cantidad de píxeles que cada banda contenía, pudiendo comparar y normalizar cada banda con la situación control.

Los estudios de inmunoprecipitación se han realizado para detectar la interacción física de HSP90 con sus PC.

Se han inmunoprecipitado 1.5 mg de proteína total con anticuerpos anti-HSP90, anti-AKT, anti-c-kit y anti-IGF1R y proteína g-sefarosa, por 6 horas, a 4°C, lavándolas posteriormente 4x con tampón de lisis, y siguiendo, a partir de este punto, con el protocolo de WB. Se han realizado 2-3 experimentos independientes para cada caso.

Los anticuerpos usados han sido: anti-HSP90 (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland), anti-GAPDH (Abcam, Cambridge UK), anti-IGF1R (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-CD117 (Dako, Carpinteria, CA) y anti-AKT, anti-pAKT (Ser473), anti-mTOR, anti-p-mTOR (Ser2448), anti-MAPK42/44, anti-p-MAPK42/44 (Thr202/Tyr204) (todos de Cell Signalling, Danvers CA). Todos estos anticuerpos han sido optimizados de modo a no tener inespecificidad a la hora de la inmunodetección.

### Estudios de Proliferación

En primer lugar se ha estudiado la proliferación de las líneas celulares tras tratamiento con 17-AAG para determinar el IC50 de proliferación. En segundo lugar se ha estudiado el porcentaje de inhibición de la proliferación tras tratamiento con 17 AAG combinado con ADW/IMA.

Se han realizado 4-6 experimentos independientes.

Para determinar los niveles de proliferación, se ha realizado el ensayo del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

En resumen, se sembraron 200.000 células por pocillo, en placas de 24 pocillos y se trataron con 17-AAG, por 72 horas. Tras ese tiempo de tratamiento, se aspiró el medio de cultivo de las placas y se añadió a cada pocillo 300  $\mu$ l de una mezcla de 1:10 de MTT (disuelto en PBS1X, a una concentración final de 5  $\mu$ g/ $\mu$ l, protegido de la luz): medio celular. Se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C y transcurrido ese tiempo se aspiró la mezcla de los pocillos y se añadió DMSO (250-500  $\mu$ l). Se agitaron las placas durante 10-15 minutos a la temperatura ambiente (TA) y se leyó la absorbancia a 570 nm.

### Apoptosis

La apoptosis se ha medido tras tratamiento con 17-AAG solo ó combinado con ADW ó IMA, por 72 horas. Los índices de apoptosis y necrosis se han analizado por citometría de flujo, con el kit *AnnexinV-FITC Apoptosis Detection kit* (Immunostep, Spain), según las instrucciones del fabricante. La adquisición de los datos se hizo en un citómetro FACSsort (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) usando el software CellQuest y Paint-a-Gate. Por cada análisis se han adquirido 20,000 eventos.

### siRNA

Los HSP90 *validated siRNA* y *Silencer negative control siRNA* se han adquirido de Ambion (Austin, TX) (RefSeq: NM\_007355-siRNA ID: 119760 and Cat# AM4611, respectivamente). En resumen, las líneas A673 y TTC466 se han mantenido en cultivo como se ha descrito anteriormente, centrifugadas a 1500 g por 5 minutos y resuspendidas en 200  $\mu$ l de medio con 75 nM de HSP90siRNA, 5  $\mu$ l NaCl 1.5 M y 20  $\mu$ g de DNA carrier, y transferidas para cubetas de electroporación de Bio-Rad 0.4-cm. Se hizo la electroporación en un Gene Pulser II (Bio-Rad) a 126 V/800  $\mu$ F. Las células se transfirieron para 10 ml de medio de cultivo y crecidas por 24 horas antes del tratamiento. La proliferación y apoptosis se han analizado con los métodos descritos anteriormente.

### Transfección de HSP90

El clon de HSP90 clone se obtuvo de *Invitrogen Ultimate ORF clones resource* (Carlsbad, CA), cloneID: IOH61079, y eficientemente transferido para un *Gateway Destination Vector* (Invitrogen PCDNA3.1(+), catalogo n° V790-20), ligado previamente con un *RfcassetteA del Invitrogen Gateway Vector Conversión System* (catalogo n°

## ES 2 347 619 B1

11828-029), usando el *Gateway LR Clonase Enzyme mix* (catalog nº 11791-019), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El *Gateway Destination Vector* que contenía el clon de HSP90 ó el vector vacío (Mock) (15 µg) se han transfectedo en las líneas A4573, SK-ES-1 y TC71 por electroporación, como descrito anteriormente. La proliferación y apoptosis se han también analizado con los métodos descritos anteriormente.

5

### *Estudios in vivo*

Se usaron ratones jóvenes NOD/SCID de 4-5 semanas (NOD/CrCrI-Prkdc<sup>scid</sup>, fornecidos por los laboratorios Charles River), bajo las directrices españolas y de la Unión Europea ((RD 1201/05 y 86/609/CEE, respectivamente).

Se inyectaron subcutáneamente, en el flanco derecho de los ratones, 5x10<sup>6</sup> células A673 en fase de crecimiento exponencial, en una suspensión celular de Matrigel (0,2 ml de células resuspendidas en medio celular 1:1 Matrigel Matrix (BD Bioscience, #cat. 35624). Los ratones fueron randomizados en grupos control y tratamiento (2-3 semanas tras inyección, día cero de tratamiento) (los ratones sin tumor y aquellos cuyo volumen superó 1 cm<sup>3</sup> no fueron incluidos en el análisis). Los tratamientos fueron los siguientes: vehículo 1 (25 mM ácido tartárico, oralmente, 2 veces por día, 7 días/semana, por 2 semanas); vehículo 2 (PBSTween 80 0.05% DMSO 10%, i.p., dos veces por día, 5 días/semana, por 2 semanas), 17-AAG solo (i.p., dos veces por día, 80 mg/kg/día en los días 0 a 5 y 8 a 12); AEW solo (50 mg/kg/día, oralmente, dos veces por día, 7 días/semana, por 2 semanas) ó 17-AAG+AEW (mismas condiciones). Se hizo un seguimiento de la evolución de los tumores y el efecto de los tratamientos, valorando diariamente el estado de los animales. Los tumores fueron medidos cada dos-tres días con un calibre, y los diámetros anotados. Los volúmenes

tumorales fueron calculados según la siguiente fórmula:  $(a^2 b \pi / 6)$ , donde a es el diámetro mas pequeño y b el más grande.

Al final del estudio los ratones fueron sacrificados por sobreexposición a Isoflorano y los tumores extraídos para su posterior análisis histopatológico.

30

### *Análisis Histopatológico*

En el caso del modelo animal, en el momento del sacrificio de los animales, los tumores se colocaron directamente en formol y se procesaron lo más rápido posible (en menos de 15 minutos) y se incluyeron en parafina. En el caso de las muestras clínicas, se usaron preparaciones fijadas en formalina, incluidas en parafina. Todas las secciones se han teñido con hematoxilina-eosina, y preparadas para los estudios de ICQ.

Se han usado dos sets de muestras clínicas de SE, obtenidas antes del tratamiento para comprobar los resultados obtenidos *in vitro/in vivo*.

40

Para la ICQ, se han usado dos periodos de tratamiento por 8 minutos a 95°C y 4 minutos a 100°C, en una olla a presión, usando el tampón Tris-EDTA, pH8.0 (exceptuando para IGF1R, en el cual se usó el tampón citrato pH6.0) antes de desparafinar las secciones. Estas se incubaron a continuación a 37°C, durante 1 hora, con las anticuerpos deseados (anti-HSP90 (Alexis Biochemicals ALX 804, dilución 1/500), anti-IGF1R (Santa Cruz Biotechnologies, dilución 1/50), anti-anti AKT (Cell Signalling Technologies #9272, dilución 1/500), anti-m-TOR (Cell Signalling Technologies #2972, dilución 1/50) y anti-c-kit (Dako Cytomation A4502, dilución 1/200). El mareaje se hizo con el sistema IHC DAB MAP (Ventana Medical Systems, Tucson, AR). Los resultados se evaluaron a ciegas para los datos moleculares y clinicopatológicos. El número y la intensidad de las células inmunoreactivas fueron analizados en 3 campos elegidos al azar. La intensidad de la señal se clasifico de + a +++ (+: señal de intensidad floja, ++: señal de intensidad moderada y +++: señal de intensidad fuerte).

50

### *Análisis Estadístico*

Para estudiar la significación estadística de todos los resultados obtenidos, se hizo un análisis ANOVA One-Way de la Variancia para Muestras Independientes, usando el sitio web *VassarStats for Statistical Computation*.

55

## Referencias

60

1. **Bacci G, Ferrari S, Rosito P, et al.** [Ewing's sarcoma of the bone. Anatomoclinical study of 424 cases]. *Minerva Pediatric* 1992; 44: 345-59.

2. **Koscielniak E, Jurgens H, Winkler K, et al.** Treatment of soft tissue sarcoma in childhood and adolescence. A report of the Germán Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study. *Cancer* 1992; 70: 2557-67.

65

3. **Cooper R, Kaanders JH.** Biological surrogate end-points in cáncer triáis: potential uses, benefits and pitfalls. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1261-6.

## ES 2 347 619 B1

4. **Furukawa M, Raffeld M, Mateo C, et al.** Increased expression of insulin-like growth factor I and/or its receptor in gastrinomas is associated with low curability, increased growth, and development of metastases. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3233-42.
5. **González I, Andreu EJ, Panizo A, et al.** Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 751-61.
6. **Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL.** Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1692-703.
7. **Landuzzi L, De Giovanni C, Nicoletti G, et al.** The metastatic ability of Ewing's sarcoma cells is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *Am J Pathol* 2000; 157: 2123-31.
15. **Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V.** Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene* 2003; 22: 9282-7.
9. **Merchant MS, Woo CW, Mackall CL, Thiele CJ.** Potential use of imatinib in Ewing's Sarcoma: evidence for *in vitro* and *in vivo* activity. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1673-9.
20. **Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE.** Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 505-18.
11. **Samani AA, Chevet E, Fallavollita L, Galipeau J, Brodt P.** Loss of tumorigenicity and metastatic potential in carcinoma cells expressing the extracellular domain of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* 2004; 64: 3380-5.
12. **Scotlandi K, Benini S, Sarti M, et al.** Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer Res* 1996; 56: 4570-4.
30. **Strammiello R, Benini S, Manara MC, et al.** Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on the angiogenetic properties of Ewing's sarcoma cells. *Horm Metab Res* 2003; 35: 675-84.
14. **Martins AS, Mackintosh C, Martin DH, et al.** Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3532-40.
35. **Buchner J.** Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 136-41.
40. **Leppa S, Sistonen L.** Heat shock response-pathophysiological implications. *Ann Med* 1997; 29: 73-8.
17. **Smith DF, Whitesell L, Katsanis E.** Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 493-514.
45. **Thomas X, Campos L, Le QH, Guyotat D.** Heat shock proteins and acute leukemias. *Hematology* 2005; 10: 225-35.
19. **Zhang H, Burrows F.** Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J Mol Med* 2004; 82: 488-99.
50. **Jackson SE, Queitsch C, Toft D.** Hsp90: from structure to phenotype. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 1152-5.
21. **Solit DB, Rosen N.** Hsp90: a novel target for cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2006; 6: 1205-14.
55. **Whitesell L, Lindquist SL.** HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 761-72.
23. **Ge J, Normant E, Porter JR, et al.** Design, synthesis, and biological evaluation of hydroquinone derivatives of 17-amino-17-demethoxygeldanamycin as potent, water-soluble inhibitors of Hsp90. *J Med Chem* 2006; 49: 4606-15.
60. **Neckers L.** Using natural product inhibitors to validate Hsp90 as a molecular target in cancer. *Curr Top Med Chem* 2006; 6: 1163-71.
25. **Pacey S, Banerji U, Judson I, Workman P.** Hsp90 inhibitors in the clinic. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 331-58.
65. **Sharp S, Workman P.** Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Adv Cancer Res* 2006; 95: 323-48.

27. **Zhang H, Chung D, Yang YC, et al.** Identification of new biomarkers for clinical trials of Hsp90 inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1256-64.
28. **Martínez-Ramírez A, Rodríguez-Perales S, Melendez B, et al.** Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 141: 138-42.
29. **Pagani A, Fischer-Colbrie R, Eder U, Pellín A, Llombart-Bosch A, Bussolati G.** Neural and mesenchymal differentiations in Ewing's sarcoma cell lines. Morphological, immunophenotypic, molecular biological and cytogenetic evidence. *Int J Cancer* 1995; 63: 738-43.
30. **Selleri L, Hermanson GG, Eubanks JH, Lewis KA, Evans GA.** Molecular localization of the t(11;22) (q24;q12) translocation of Ewing sarcoma by chromosomal *in situ* suppression hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 887-91.
31. **Szuhai K, Ijszenga M, Tanke HJ, Rosenberg C, Hogendoorn PC.** Molecular cytogenetic characterization of four previously established and two newly established Ewing sarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 166: 173-9.
32. **Manara MC, Landuzzi L, Nanni P, et al.** Preclinical *in vivo* study of new insulin-like growth factor-I receptor-specific inhibitor in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1322-30.
33. **Benini S, Manara MC, Baldini N, et al.** Inhibition of insulin-like growth factor I receptor increases the antitumor activity of doxorubicin and vincristine against Ewing's sarcoma cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1790-7.
34. **García-Echeverría C, Pearson MA, Martí A, et al.** *In vivo* antitumor activity of NVP-AEW541 -A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer cell* 2004; 5: 231-9.
35. **Maloney EK, McLaughlin JL, Dagdigian NE, et al.** An anti-insulin-like growth factor I receptor antibody that is a potent inhibitor of cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2003; 63: 5073-83.
36. **Scotlandi K, Avnet S, Benini S, et al.** Expression of an IGF-I receptor dominant negative mutant induces apoptosis, inhibits tumorigenesis and enhances chemosensitivity in Ewing's sarcoma cells. *Int J Cancer* 2002; 101: 11-6.
37. **Warshamana-Greene GS, Litz J, Buchdunger E, García-Echeverría C, Hofmann F, Krystal GW.** The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1563-71.
38. **Warshamana-Greene GS, Litz J, Buchdunger E, Hofmann F, García-Echeverría C, Krystal GW.** The insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor kinase inhibitor NVP-ADW742, in combination with STI571, delineates a spectrum of dependence of small cell lung cancer on IGF-I and stem cell factor signaling. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 527-35.
39. **Davies H, Bignell GR, Cox C, et al.** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-54.
40. **de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, et al.** Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000; 89: 783-92.
41. **Wei G, Antonescu CR, de Alava E, et al.** Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000; 89: 793-9.
42. **Manara MC, Perdichizzi S, Serra M, et al.** The molecular mechanisms responsible for resistance to ET-743 (Trabectedin; Yondelis) in the Ewing's sarcoma cell line, TC-71. *Int J Oncol* 2005; 27: 1605-16.
43. **Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsihchlis P, Rosen N.** Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 2002; 277: 39858-66.
44. **Yu W, Rao Q, Wang M, et al.** The Hsp90 inhibitor 17-allylamide-17-demethoxygeldanamycin induces apoptosis and differentiation of Kasumi-1 harboring the Asn822Lys KIT mutation and down-regulates KIT protein level. *Leuk Res* 2006; 30: 575-82.
45. **Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Martínez-Valdez H, Medeiros LJ, Younes A.** Inhibition of heat shock protein 90 function by 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in Hodgkin's lymphoma cells down-regulates Akt kinase, dephosphorylates extracellular signal-regulated kinase, and induces cell cycle arrest and cell death. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 584-90.

## ES 2 347 619 B1

46. **Munster PN, Marchion DC, Basso AD, Rosen N.** Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway. *Cancer Res* 2002; 62: 3132-7.

5 47. **Bagatell R, Beliakoff J, David CL, Marron MT, Whitesell L.** Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate synergistic anticancer activity with cisplatin. *Int J Cancer* 2005; 113: 179-88.

10 48. **Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al.** Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood* 2006; 107: 1092-100.

49. **Zheng FF, Kuduk SD, Chiosis G, et al.** Identification of a geldanamycin dimer that induces the selective degradation of HER-family tyrosine kinases. *Cancer Res* 2000; 60: 2090-4.

15 50. **Banerji U, Walton M, Raynaud F, et al.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitor 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in human ovarian cancer xenograft models. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7023-32.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la selección de un inhibidor de la proteína HSP90 expresada en al menos un tumor resistente a antitumorales inhibidores de los receptores IGF1R/KIT, que comprende:
- a. determinación *ex vivo* de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 en una muestra biológica tumoral,
  - 10 b. comparación de los niveles de expresión del paso a) con respecto a una muestra biológica control,
  - c. determinación de resistencia a inhibidores de los receptores IGF1R/KIT cuando los niveles de expresión del paso a) son mayores que los obtenidos en el paso b), y
  - 15 d. selección de un inhibidor de la proteína HSP90 coadyuvante de un antitumoral inhibidor de los receptores IGF1R/KIT.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la muestra biológica tumoral del paso a) pertenece al siguiente grupo: sarcoma de Ewing, tumor del estroma gastrointestinal (GIST) y dermatofibrosarcoma protuberans.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 se llevan a cabo con o sin la inducción de un estrés de las células de la muestra biológica tumoral mediante un compuesto antitumoral inhibidor de los receptores IGF1R/KIT.
- 30 4. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el inhibidor de los receptores IGF1R/KIT se selecciona del siguiente grupo: ADW742, AEW541 e Imatinib.
- 35 5. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 del paso a) se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles del RNAm del gen Hsp90 y porque comprende:
- i) la extracción de RNAm de la muestra biológica tumoral,
  - ii) amplificación del RNAm del gen Hsp90, y
  - iii) determinación de los niveles de RNAm del gen Hsp90.
- 40 6. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque la amplificación del RNAm del gen Hsp90 consiste en la amplificación de la forma beta ( $\beta$ ) de dicho gen.
- 45 7. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque la amplificación del RNAm del gen Hsp90 consiste en la amplificación de la forma alfa ( $\alpha$ ) de dicho gen.
- 50 8. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 del paso a) se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles de la proteína HSP90 y que comprende:
- i) la extracción de las proteínas de la muestra biológica tumoral, y
  - ii) determinación de los niveles de la proteína HSP90, ya sea por un método inmunológico o no inmunológico.
- 55 9. Procedimiento según la reivindicación 8 **caracterizado** porque la determinación de los niveles de la proteína HSP90 consiste en la determinación de la forma beta ( $\beta$ ) de dicha proteína.
- 60 10. Procedimiento según la reivindicación 8 **caracterizado** porque la determinación de los niveles de la proteína HSP90 consiste en la determinación de la forma alfa ( $\alpha$ ) de dicha proteína.
- 65 11. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el inhibidor de la proteína HSP90 seleccionado en el paso d) pertenece al siguiente grupo: geldanamicina, ansamicina No-benzoquinona, compuestos diarilpirazoles y novobiocina.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, donde el compuesto geldanamicina pertenece al siguiente grupo: 17-AAG, 17-DMAG y retaspimicina, y los compuestos diarilpirazoles pertenecen al siguiente grupo: CCT018159 y CCT0129397/VER49009.

## ES 2 347 619 B1

13. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el inhibidor de la proteína HSP90 seleccionado es el compuesto 17-AAG coadyuvante de un compuesto inhibidor de los receptores IGF1R/KIT perteneciente al siguiente grupo: ADW742, AEW541 y Imatinib.

5 14. Uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína HSP90 expresada en al menos un tumor resistente a antitumorales inhibidores de los receptores IGF1R/KIT para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de dicho tumor.

10 15. Uso según la reivindicación 14 **caracterizado** porque el inhibidor de la proteína HSP90 pertenece al siguiente grupo: geldanamicina, ansamicina No-benzoquinona, compuestos diarilpirazoles y novobiocina.

15 16. Uso según la reivindicación 15, donde el compuesto geldanamicina pertenece al siguiente grupo: 17-AAG, 17-DMAG y retaspimicina, y los compuestos diarilpirazoles pertenecen al siguiente grupo: CCT018159 y CCT0129397/VER49009.

17. Uso según la reivindicación 14 **caracterizado** porque el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína HSP90 y porque incluye al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

20 a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína HSP90,

b) una ribozima específica del mRNA de la proteína HSP90,

25 c) un aptámero específico del mRNA de la proteína HSP90,

d) un RNA de interferencia (siRNA o shRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90, y

30 e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90.

35 18. Uso según la reivindicación 17 **caracterizado** porque el siRNA del paso d) está constituido por la pareja de secuencias de nucleótidos específicos de un siRNA de la forma beta de la proteína HSP90: secuencia sentido SEQ ID NO1 y secuencia antisentido SEQ ID NO2.

19. Uso según la reivindicación 14 **caracterizado** porque comprende el uso en combinación de un inhibidor de las proteínas IGF1R/KIT.

40 20. Uso según la reivindicación 19 **caracterizado** porque el inhibidor de las proteínas IGF1R/KIT pertenece al siguiente grupo: ADW742, AEW541 e Imatinib.

45 21. Composición farmacéutica o medicamento **caracterizada** porque comprende un compuesto o agente inhibidor de la proteína HSP90 expresada en al menos un tumor resistente a antitumorales inhibidores de los receptores IGF1R/KIT.

22. Composición farmacéutica o medicamento según la reivindicación 21, donde además comprende uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

50 23. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22 **caracterizada** porque comprende un inhibidor de la proteína HSP90 perteneciente al siguiente grupo: geldanamicina, ansamicina No-benzoquinona, compuestos diarilpirazoles y novobiocina.

55 24. Composición según la reivindicación 23, donde el compuesto geldanamicina pertenece al siguiente grupo: 17-AAG, 17-DMAG y retaspimicina, y los compuestos diarilpirazoles pertenecen al siguiente grupo: CCT018159 y CCT0129397/VER49009.

25. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22 **caracterizada** porque comprende, además del inhibidor de la proteína HSP90, un inhibidor de las proteínas IGF1R/KIT.

60 26. Composición farmacéutica según la reivindicación 25 **caracterizada** porque el inhibidor de las proteínas IGF1R/KIT pertenece al siguiente grupo: ADW742, AEW541 e Imatinib.

65 27. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22 **caracterizada** porque el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína HSP90 humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína HSP90,

## ES 2 347 619 B1

- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína HSP90,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína HSP90,
- 5 d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90, y
- e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína HSP90.

10 28. Composición farmacéutica según la reivindicación 27 **caracterizada** porque el inhibidor de HSP90 es un siRNA constituido está constituido por la pareja de secuencias de nucleótidos específicos de un siRNA de la forma beta de la proteína HSP90: secuencia sentido SEQ ID NO1 y secuencia antisentido SEQ ID2.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

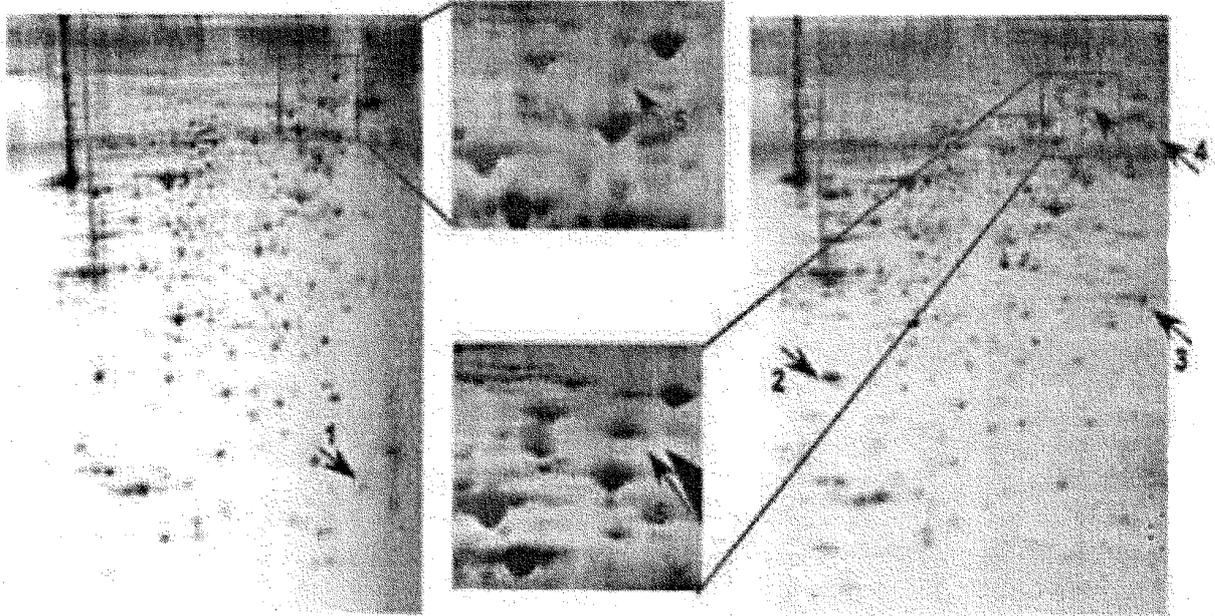


FIG. 1 A

**cellular functions changed**

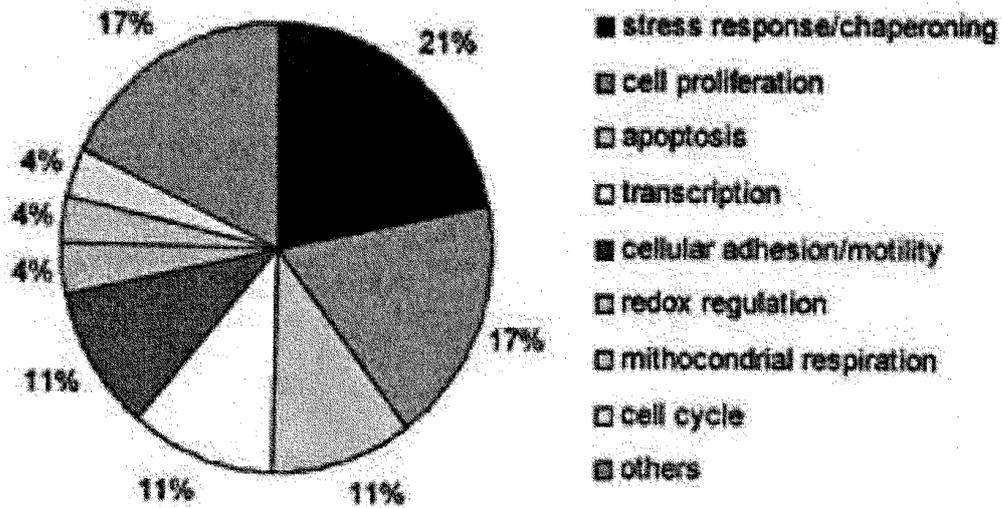


FIG. 1 B

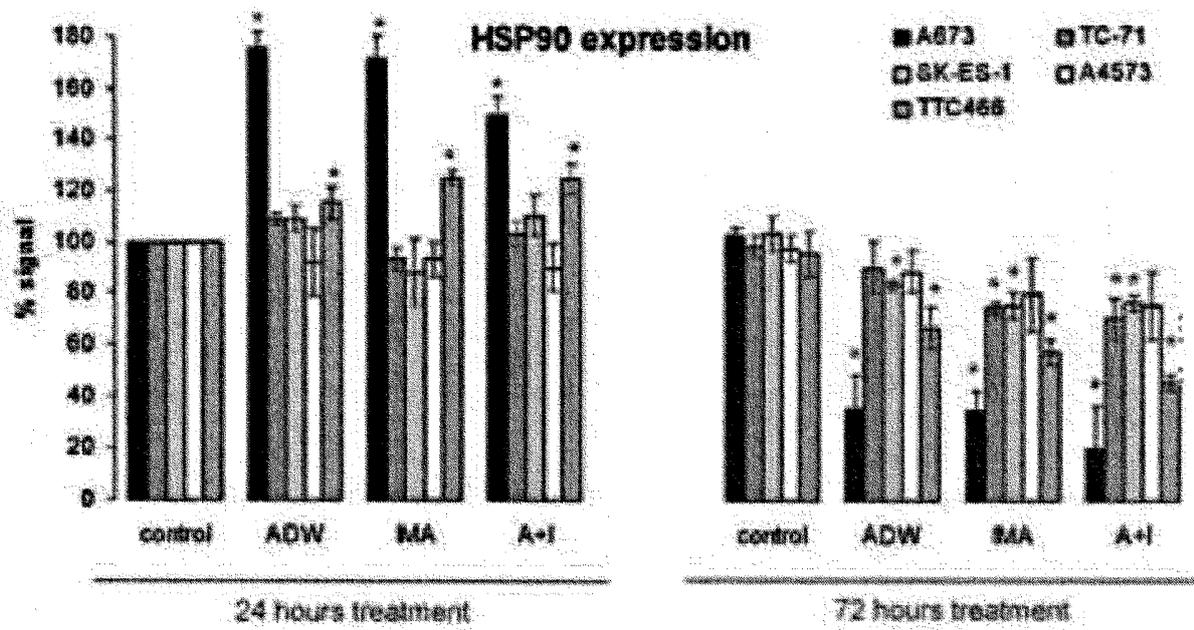


FIG. 1 C

Cell lines	17-AAG $\mu\text{M}$		ADW742* $\mu\text{M}$		Imatinib* $\mu\text{M}$	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
A673	1.33 +/- 0.17	0.57 +/- 0.06	5.2 +/- 0.67	1.41 +/- 0.28	18.36 +/- 0.80	18.77 +/- 4.02
TC-71	1.12 +/- 0.08	0.49 +/- 0.06	5.03 +/- 0.74	0.67 +/- 0.08	17.45 +/- 0.79	22.00 +/- 3.20
SK-ES-1	1.01 +/- 0.08	0.42 +/- 0.04	5.11 +/- 0.71	0.55 +/- 0.05	14.32 +/- 0.90	18.90 +/- 3.60
A4573	1.24 +/- 0.11	0.45 +/- 0.04	4.30 +/- 0.63	0.64 +/- 0.06	15.08 +/- 1.11	20.12 +/- 2.21
TTC466	1.62 +/- 0.1	0.72 +/- 0.06	5.1 +/- 0.43	1.20 +/- 0.30	17.8 +/- 1.2	19.20 +/- 2.10

\* previously published <sup>14</sup>

FIG. 2 A

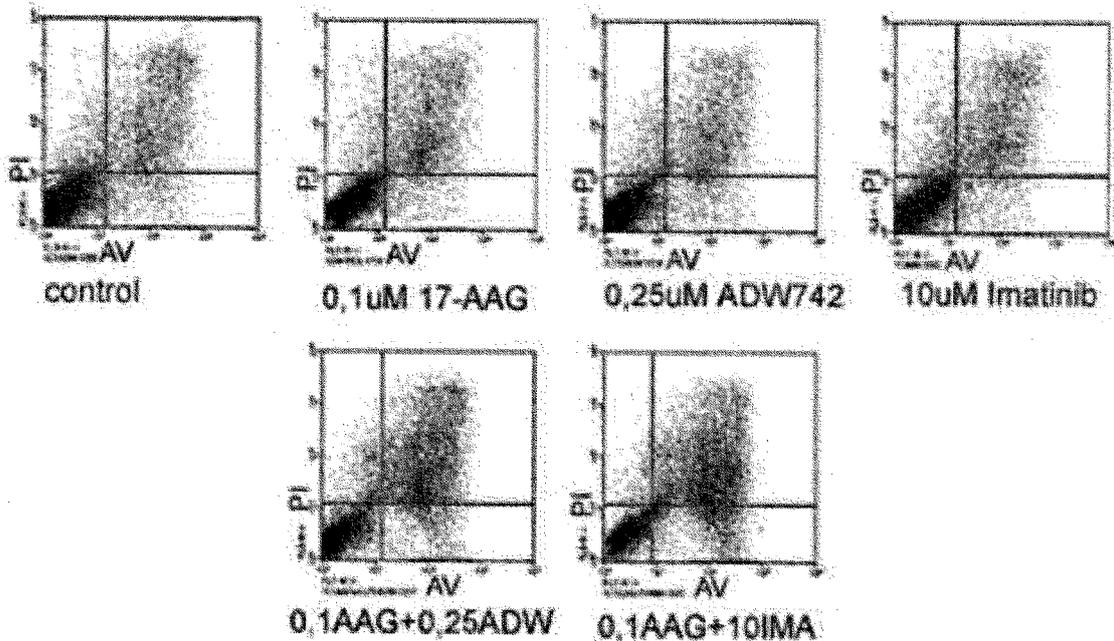


FIG. 2 B

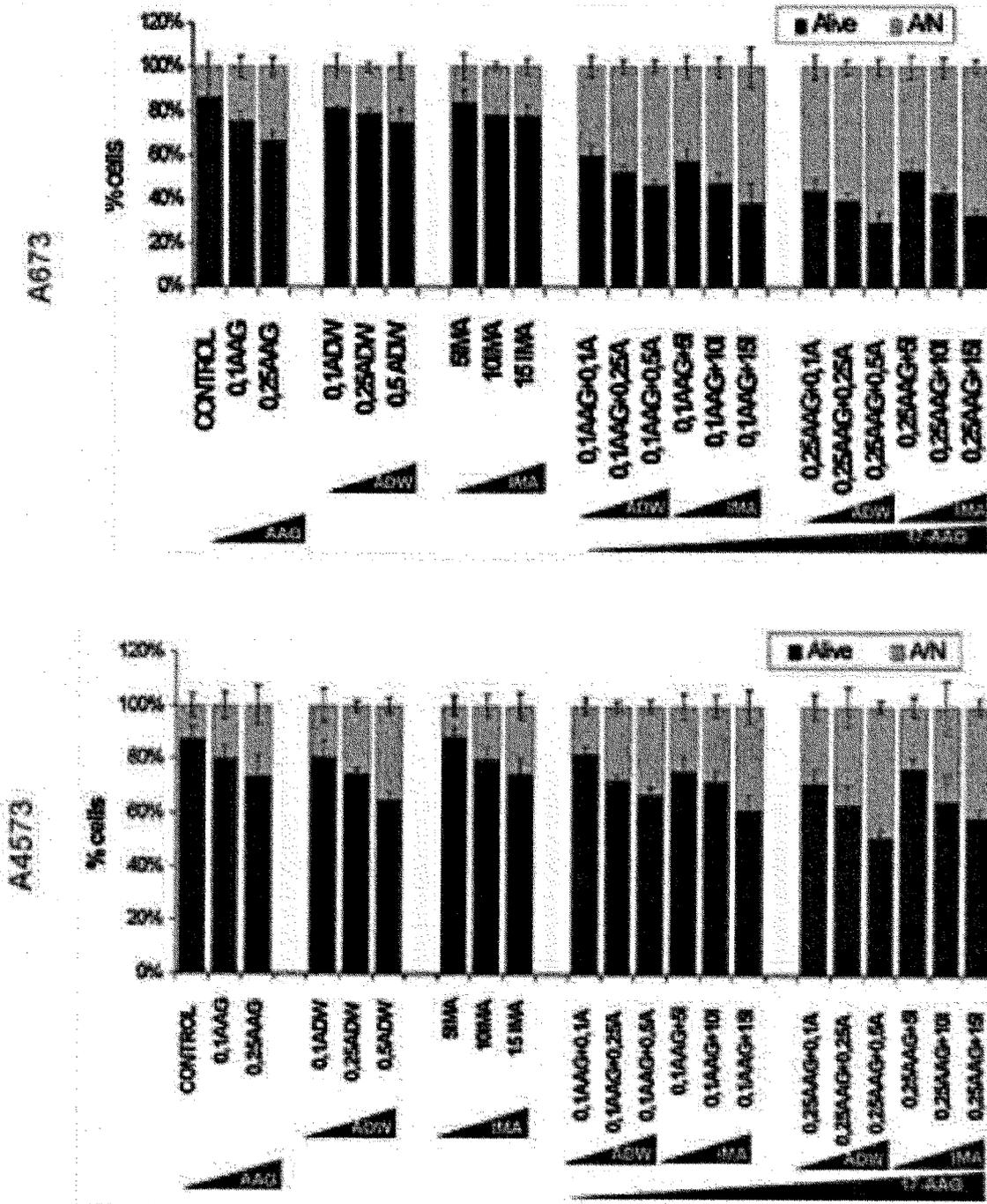


FIG. 2 C

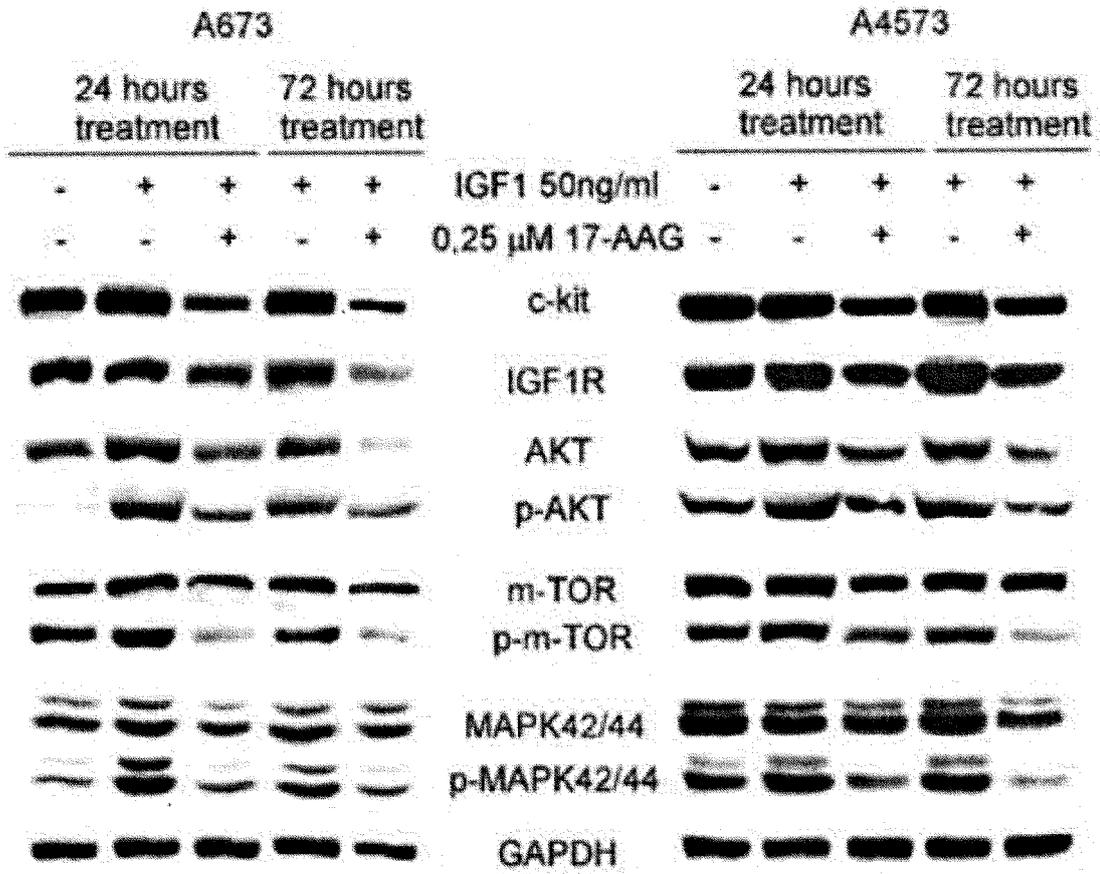


FIG. 3 A

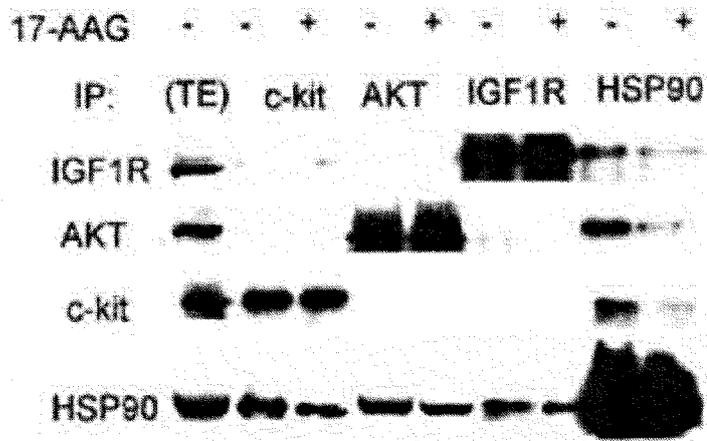


FIG. 3 B

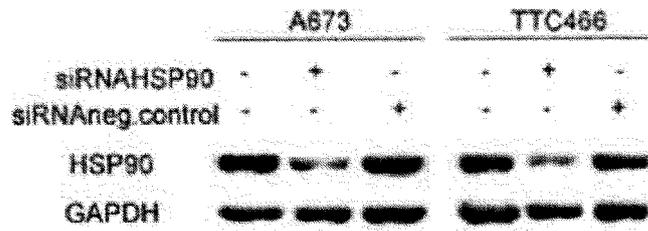


FIG. 4 A

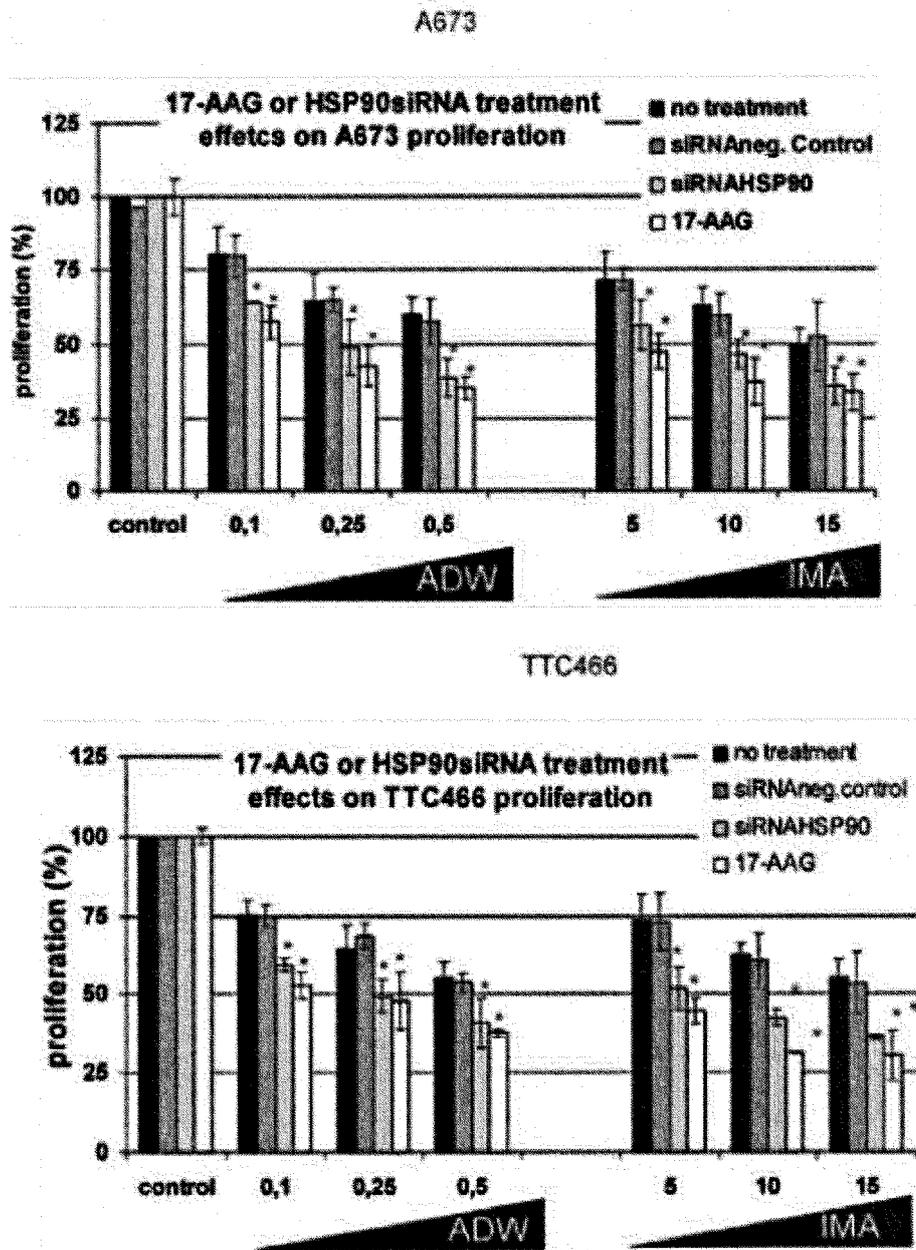


FIG. 4 B

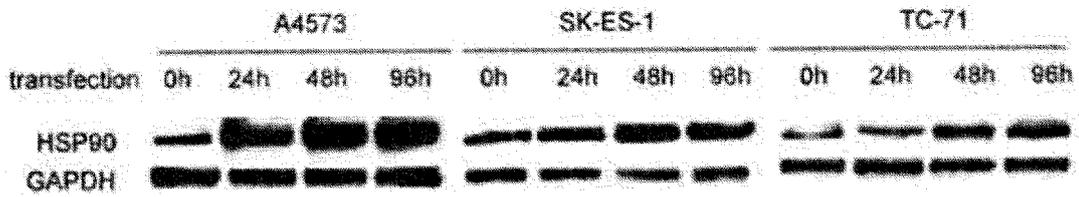


FIG. 4 C

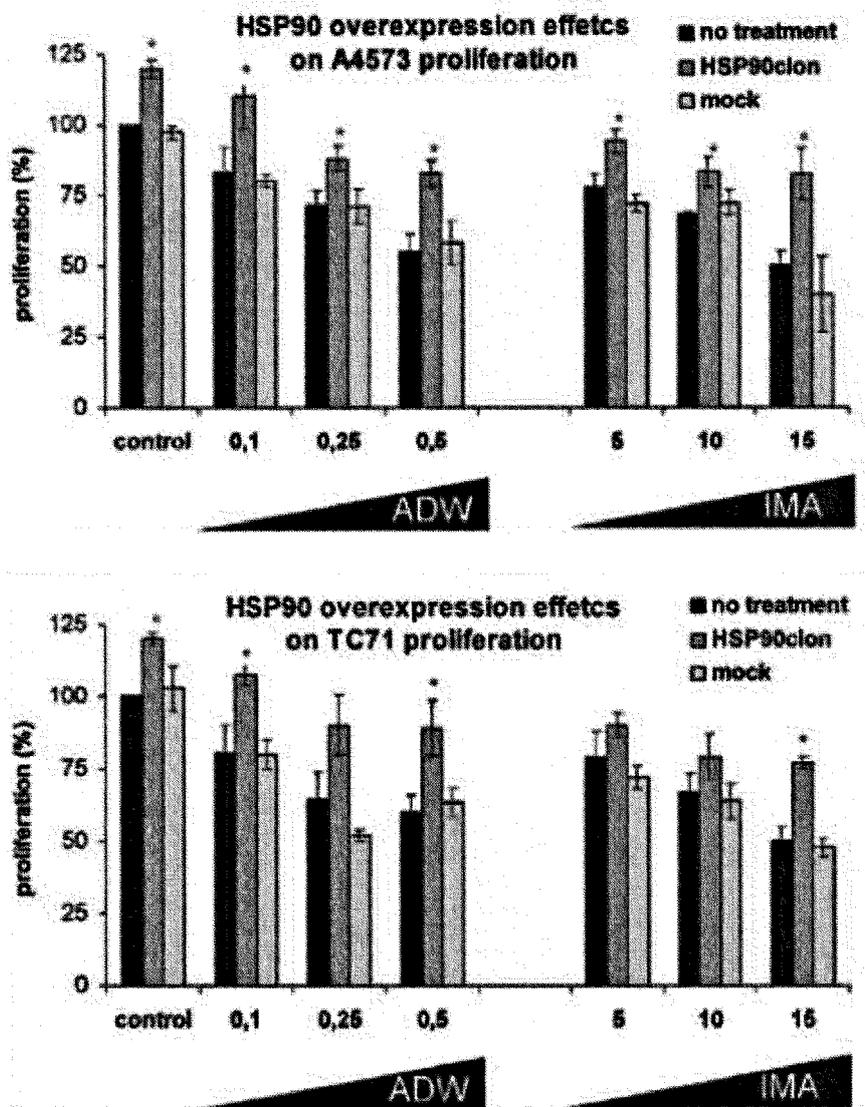


FIG. 4 D

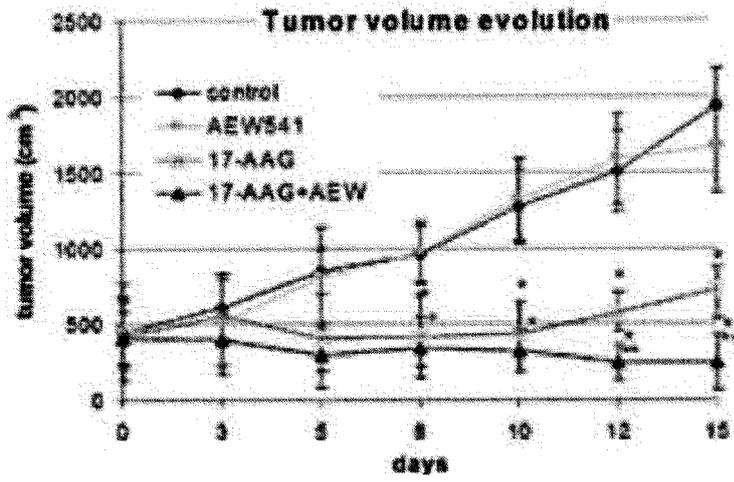


FIG. 5 A

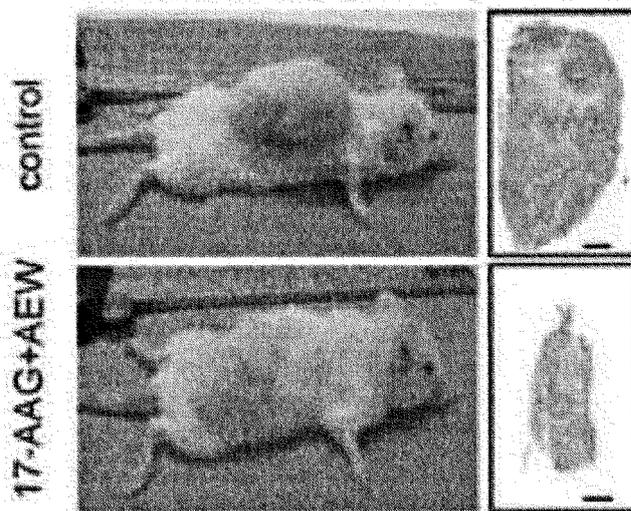


FIG. 5 B

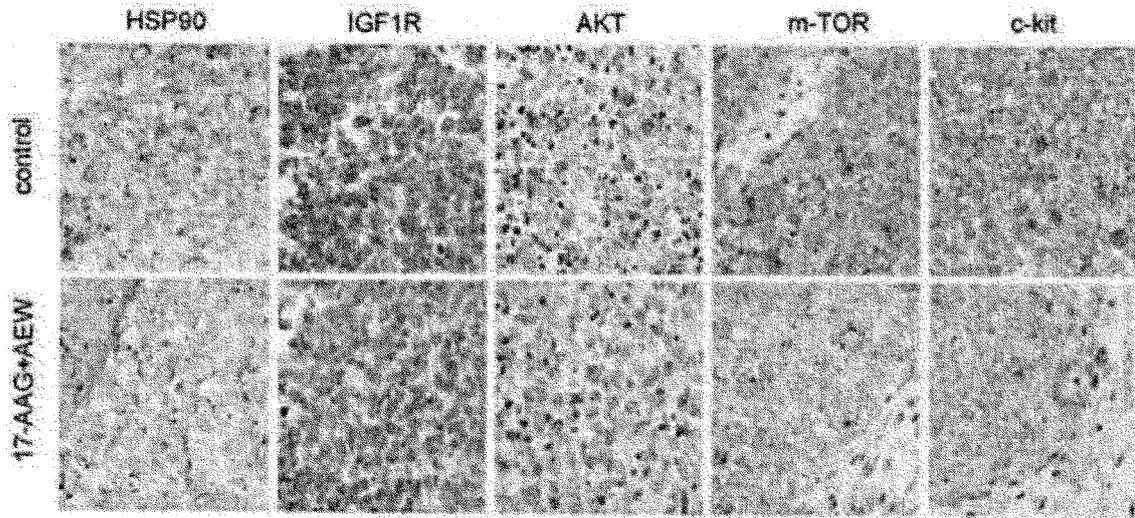


FIG. 5 C

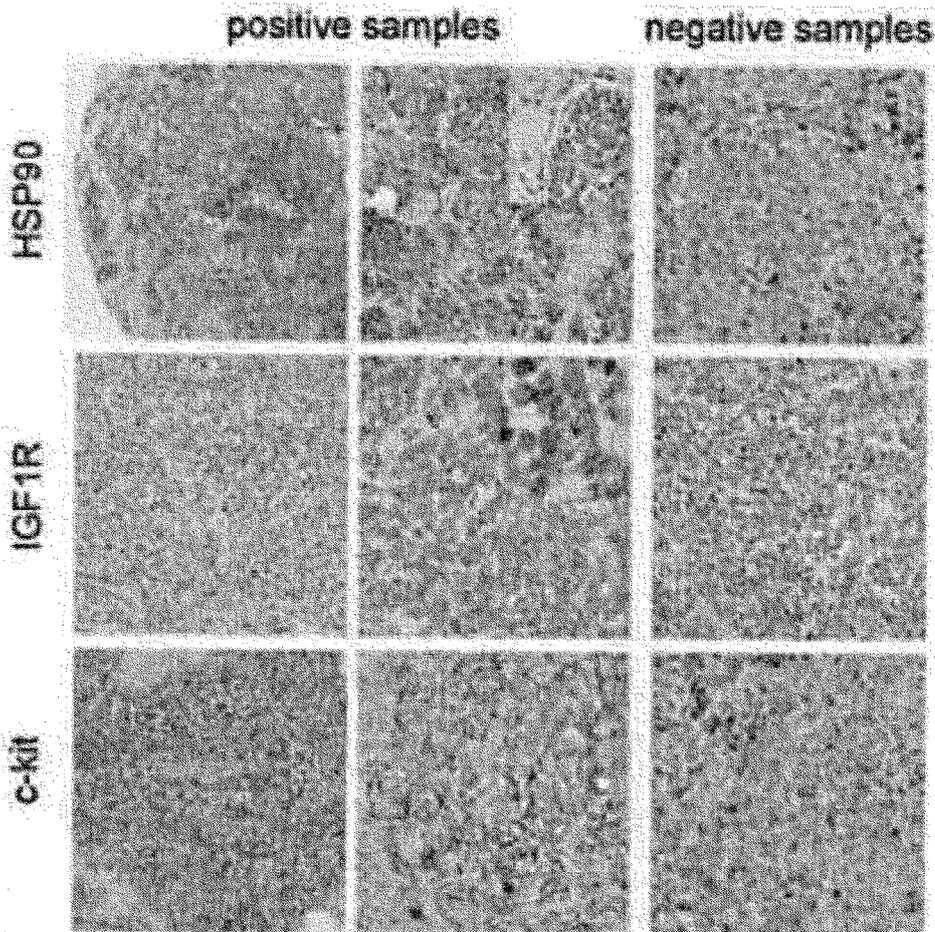


FIG. 5 D

# ES 2 347 619 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

5 <120> PROCEDIMIENTO PARA DISEÑAR UNA TERAPIA INDIVIDUAL ANTITUMORAL BASADO EN LA  
DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA HSP90, EL USO DE INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA  
HSP90 PARA LA ELABORACIÓN DE COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS, LAS COMPOSICIONES  
ASÍ OBTENIDAS Y SUS APLICACIONES

10 <130> Inh\_HSP90

<160> 2

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

20 <211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

25 <220>

<223> Secuencia sentido de siRNA específico de beta HSP90

<400> 1

30 ggugacaauc uccaauaga 19

<210> 2

35 <211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

40 <220>

<223> secuencia antisentido de siRNA específico de beta HSP90

<400> 2

45 ucuauuggag auugucacc 19

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 347 619

② Nº de solicitud: 200801371

③ Fecha de presentación de la solicitud: 13.05.2008

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	RADUJKOVIC A., SCHAD M., TOPALY J., VELDWIJK M., LAUFS S., SCHULTHEIS BS., JAUCH A., MELO J.V., FRUEHAUF S. y SELLER W. J. "Synergistic activity of imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL - Inhibition of P-glycoprotein function by 17-AAG." Leukemia (2005) 19, 1198-1206. Resumen y páginas 1198-1200.	1-4,11-16, 21-26
X	SEBASTIAN BAUER, LYNN K. YU, GEORGE D. DEMETRI y JONATHAN A. FLETCHER. "Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant." Gastrointestinal Stromal Tumor. Cancer Research, 2006; 66:9153-9161. Resumen y páginas 9153,9155,9157,9160-9161.	1-4,11-16, 21-26
X	WO 2003013430 A2 (KOSAN BIOSCIENCES, INC.) 20.02.2003, párrafos 96,100.	1-4,11-16, 21-26
A	ROCHELLE BAGATELL, JASON BELIAKOFF, CYNTHIA L. DAVID, MARILYN T. MARRON y LUKE WHITESELL. "Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate anticancer activity with cisplatin." Int. J. Cancer (2005) 113, 179-188. Páginas 193-187.	1-28

#### 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

18.10.2010

Examinador

M. Jesús García Bueno

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 31/395** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**C07D 225/06** (2006.01)

**C07D 401/04** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

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

A61K, C07D, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE, EMBL ALL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.10.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	1-13, 17-20 Y 27-28	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	14-16, 21-26	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	5-10, 17-20 Y 27-28	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-4, 11-16, 21-26	<b>NO</b>

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	RADUJKOVIC A., SCHAD M., TOPALY J., VELDWIJK M., LAUFS S., SCHULTHEIS BS., JAUCH A., MELO J.V., FRUEHAUF S. AND SELLER W. J. "Synergistic activity of imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL - Inhibition of P-glycoprotein function by 17-AAG." <i>Leukemia</i> (2005) 19, 1198-1206.	2005
D02	SEBASTIAN BAUER, LYNN K. YU, GEORGE D. DEMETRI AND JONATHAN A. FLETCHER. "Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant." <i>Gastrointestinal Stromal Tumor. Cancer Research</i> , 2006; 66:9153-9161.	2006
D03	WO 2003013430 A2	20-02-2003
D04	ROCHELLE BAGATELL, JASON BELIAKOFF, CYNTHIA L. DAVID, MARILYN T. MARRON AND LUKE WHITESELL. "Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate anticancer activity with cisplatin." <i>Int. J. Cancer</i> (2005) 113, 179-188.	2005

**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**

El objeto de la presente solicitud consiste en un procedimiento de selección de un inhibidor de la proteína HSP90 expresada en al menos un tumor resistente a antitumorales inhibidores de los receptores IGF1R/KIT que comprende la determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 en una muestra biológica tumoral (sarcoma de Ewing, GIST o dermatofibrosarcoma protuberans), compararla con una muestra biológica control, determinar la resistencia a inhibidores de los receptores IGF1R/KIT cuando los niveles de la muestra tumoral son mayores que los de la muestra control, y seleccionar un inhibidor de la proteína HSP90 coadyuvante de un antitumoral inhibidor del receptor IGF1R/KIT (reivindicación 1-3).

Los compuestos inhibidores de los receptores IGF1R/KIT se seleccionan entre ADW742, AEW541 o imatinib, y los compuestos inhibidores de la actividad de la proteína HSP90 pertenecen al grupo de la geldanamicina y sus derivados (17-AAG y 17-DMAG), ansamincina no benzoquinona, compuestos diarilpirazoles (CCT018159 o CCT0129397/VER49009) o novobiocina (reivindicaciones 4, 11-13).

La determinación de los niveles de expresión del gen de la proteína HSP90 se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles del RNAm del gen HSP90, y comprende la extracción de RNAm de la muestra biológica tumoral, la amplificación del RNAm del gen HSP90 (su forma alfa o su forma beta), y la determinación de los niveles de RNAm del gen HSP90, o mediante la extracción de las proteínas de la muestra biológica tumoral y la determinación de los niveles de proteína (su forma alfa o su forma beta), ya sea por un método inmunológico o no inmunológico (reivindicaciones 5-10).

También se reivindica el uso de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína HSP90 perteneciente al grupo de la geldanamicina y sus derivados (17-AAG y 17-DMAG), ansamincina no benzoquinona, compuestos diarilpirazoles (CCT018159 o CCT0129397/VER49009) o novobiocina, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor resistente al tratamiento con inhibidores de los receptores IGF1/KIT, o el uso de un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína HSP90 (reivindicaciones 14-20) y la composición farmacéutica o medicamento útil para el tratamiento de un proceso tumoral resistente a inhibidores de IGF1/KIT que comprende los inhibidores de la actividad de la proteína HSP90 mencionados anteriormente, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Además de este inhibidor de la proteína HSP90, comprende también un inhibidor de las proteínas IGF1/KIT, en concreto, ADW742, AEW541 o imatinib (reivindicaciones 21-28).

El documento D01 divulga una investigación sobre el efecto de la combinación del tratamiento con imatinib y 17-AAG, inhibidor de la proteína HSP90, en diferentes líneas celulares sensibles a imatinib y otras líneas celulares resistentes a imatinib, mostrándose un efecto sinérgico en estas últimas líneas celulares mencionadas.

Hoja adicional

El documento D02 divulga que la inhibición de oncoproteínas KIT por imatinib induce una respuesta clínica en pacientes con tumor estromal gastrointestinal (GIST), pero muchos de estos pacientes desarrollan resistencia a imatinib debido a mutaciones secundarias de KIT. La proteína HSP90 protege estas oncoproteínas KIT de la degradación mediada por proteosoma. El inhibidor de la proteína HSP90, 17-AAG es estudiado en dos tipos de líneas celulares de GIST, sensibles a imatinib y resistentes a imatinib, mostrando que la inhibición de HSP90 es una prometedora estrategia para superar la resistencia de GIST hacia imatinib.

El documento D03 divulga el uso de ansamicinas benzoquinonas (geldanamicina y sus derivados) en una terapia combinada con un inhibidor de proteína quinasa, entre las que se encuentra el compuesto Gleevec (imatinib).

El documento D04 divulga inhibidores de la proteína HSP90 que tienen interés en el tratamiento de cánceres pediátricos que disminuyen o eliminan los niveles celulares de señalización de moléculas importantes en el crecimiento y supervivencia de este tipo de tumores.

1.- NOVEDAD (Art. 6 Ley 11/1986).

1.1.- REIVINDICACIONES 14-16 Y 21-26.

El documento D01 se considera el más próximo al estado de la técnica al objeto de las reivindicaciones 1-28 y divulga el uso del compuesto inhibidor de la actividad de la proteína HSP90 perteneciente al grupo de la geldanamicina, 17-AAG, para el tratamiento de un tumor resistente al tratamiento con inhibidores de los receptores IGF1/KIT, junto con el inhibidor de las proteínas IGF1/KIT, imatinib, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor resistente al tratamiento de inhibidores de los receptores IGF1/KIT (ver resumen y páginas 1198-1200).

El documento D02 divulga el uso del compuesto inhibidor de la actividad de la proteína HSP90 perteneciente al grupo de la geldanamicina, 17-AAG, para el tratamiento de un tumor resistente al tratamiento con inhibidores de los receptores IGF1/KIT, junto con el inhibidor de las proteínas IGF1/KIT, imatinib, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor estromal gastrointestinal (GIST) resistente al tratamiento de inhibidores de los receptores IGF1/KIT (ver resumen y páginas 9153, 9155, 9157 y 9160-9161).

El documento D03 divulga uso del compuesto inhibidor de la actividad de la proteína HSP90 perteneciente al grupo de la geldanamicina, 17-AAG, para el tratamiento de un tumor resistente al tratamiento con inhibidores de los receptores IGF1/KIT, junto con el inhibidor de las proteínas IGF1/KIT, imatinib, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor estromal gastrointestinal (GIST) resistente al tratamiento de inhibidores de los receptores IGF1/KIT (ver párrafo 96 y 100).

Las características de las reivindicaciones 14-16 y 21-26 ya son conocidas en los documentos D01, D02 y D03. Por lo tanto, estas reivindicaciones no son nuevas a la vista del estado de la técnica, según el artículo 6 de la Ley 11/1986.

1.2.- REIVINDICACIONES 1-13, 17-20 Y 27-28.

Las reivindicaciones 1-13, 17-20 Y 27-28 se consideran nuevas según el artículo 6 de la Ley 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/1986).

2.1.- REIVINDICACIONES 14-16 Y 21-26.

Las reivindicaciones 14-16 y 21-26 al no ser nuevas no implican actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley 11/1986.

2.2.- REIVINDICACIONES 1-4 Y 11-13.

A la vista de lo que se conoce de los documentos D01, D02 y D03 no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia desarrollar un procedimiento como el descrito en las reivindicaciones 1-4 y 11-13. Por consiguiente, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-4 y 11-13 no implica actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley 11/1986.

2.3.- REIVINDICACIONES 5-10, 17-20 Y 27-28.

Las reivindicaciones 5-10, 17-20 Y 27-28 implican actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley 11/1986.