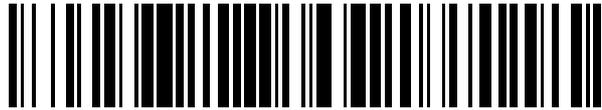


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 354 922**

21 Número de solicitud: 200901817

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **02.09.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2011**

Fecha de la concesión: **26.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **07.02.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**07.02.2012**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA DE  
L'HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON  
PASSEIG VALL D'HEBRON, 119 - 129  
08035 BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:

**ARANGO DEL CORRO, DIEGO;  
SCHWARTZ NAVARRO, SIMÓ y  
MARIADASON, JOHN MARTIN**

74 Agente: **González Díaz, Vicente**

54 Título: **MARCADORES PARA LA SELECCIÓN DE TERAPIAS PERSONALIZADAS PARA EL  
TRATAMIENTO DEL CÁNCER.**

57 Resumen:

La invención se relaciona con la identificación de los niveles de expresión de aprataxina (APTX) como marcador de respuesta a terapias basadas en inhibidores de topoisomerasa I en pacientes que sufren cáncer y, más en particular, cáncer de colon. Asimismo, la invención se relaciona con métodos de tratamiento de pacientes que sufren de cáncer y que presentan niveles bajos de expresión de APTX mediante la administración a dichos pacientes de un inhibidor de topoisomerasa I.

ES 2 354 922 B1

## DESCRIPCIÓN

Marcadores para la selección de terapias personalizadas para el tratamiento del cáncer.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se encuadra dentro del campo de los métodos de medicina personalizada y, en concreto, dentro del campo de los métodos para la selección de terapias adecuadas para el tratamiento del cáncer colorrectal basado en los niveles de expresión de marcadores en muestras aisladas del paciente.

10

**Antecedentes de la invención**

El cáncer colorrectal da cuenta de un millón de casos nuevos y más de 500.000 muertes en todo el mundo cada año y las opciones de tratamiento disponibles están lejos de ser óptimas (Parkin DM, *et al.*, CA Cancer J Clin 2005; 55: 74-108). El tratamiento curativo de estos pacientes implica cirugía y/o quimioterapia. Para pacientes con enfermedad avanzada, la quimioterapia paliativa se administra con frecuencia y puede mejorar significativamente la calidad de vida y la supervivencia total de los pacientes. Durante más de cuatro décadas el análogo de pirimidina 5-fluorouracilo (5-FU) ha sido el método de referencia para el tratamiento del cáncer colorrectal. Sin embargo, sólo alrededor del 20% de los pacientes de cáncer colorrectal se benefician del tratamiento con 5-FU, bien en el marco de adyuvante bien para el tratamiento de la enfermedad avanzada (Moertel CG, *et al.*, Ann Intern Med 1995; 122: 321-6; Petrelli N, *et al.*, J Clin Oncol 1989; 7: 1419-26). Más recientemente, se han aprobado agentes quimioterapéuticos adicionales para el tratamiento de estos pacientes y son ahora de uso común. Estos incluyen el inhibidor de la topoisomerasa I irinotecan, el compuesto de platino oxaliplatino y anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Estos nuevos agentes han aumentado el porcentaje de pacientes con enfermedad avanzada con una respuesta objetiva hasta aproximadamente el 50% y una mejora modesta pero significativa en su supervivencia total (Douillard JY, *et al.*, Lancet 2000; 355: 1041-7; Goldberg RM, *et al.*, J Clin Oncol 2004; 22: 23-30; Cunningham D, *et al.*, N Engl J Med 2004; 351: 337-45; Hurwitz H, *et al.*, N Engl J Med 2004; 350: 2335-42; Saltz LB, *et al.*, N Engl J Med 2000; 343: 905-14).

A partir de la falta de respuesta de la mitad de los pacientes tratados y la mejora modesta de la supervivencia de los que responden, es evidente que se necesitan urgentemente agentes quimioterapéuticos adicionales. Además, puesto que los diferentes agentes quimioterapéuticos actualmente disponibles son eficaces sólo en subseries solapantes de pacientes, sería muy ventajoso tener marcadores capaces de discriminar los pacientes que responderán más probablemente a cada uno de los diferentes agentes, en un intento de mejorar el tratamiento clínico de estos pacientes usando un planteamiento más personalizado al tratamiento quimioterapéutico. Se han descrito durante las últimas décadas un número de marcadores moleculares capaces de predecir la probabilidad de respuesta a estos agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, los niveles de expresión en el tumor de la diana del 5-FU, la timidilato sintasa (TS), el gen de reparación de escisión de nucleótidos ERCC1 (reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1) o el estado mutacional del oncogén KRAS, pueden predecir la respuesta de 5-FU, oxaliplatino y cetuximab, respectivamente (Allegra CJ, *et al.*, J Clin Oncol 2009; Aschele C, *et al.*, Cancer Treat Rev 2002; 28: 27-47; Shirota Y, *et al.*, J Clin Oncol 2001; 19: 4298-304).

Sin embargo, ha habido un progreso limitado en la identificación de marcadores capaces de predecir la respuesta al tratamiento basado en irinotecan.

45

**Compendio de la invención**

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar la respuesta de un paciente que sufre de un tumor a un inhibidor de la topoisomerasa I que comprende comparar los niveles de expresión de APTX determinados en una muestra aislada de dicho paciente con respecto a un valor de referencia, en donde niveles bajos de APTX son indicativos de una buena respuesta al inhibidor de la topoisomerasa I.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar una terapia para un paciente que sufre de cáncer colorrectal que comprende determinar en una muestra aislada de dicho paciente los niveles de expresión de APTX con respecto a un valor de referencia, en donde

- (i) si los niveles de expresión de APTX con respecto a dicho valor de referencia son bajos, el paciente es seleccionado para el tratamiento con un inhibidor de la topoisomerasa I y/o
- (ii) si los niveles de expresión de APTX con respecto a dicho valor de referencia son elevados, el paciente es seleccionado para el tratamiento con un agente seleccionado del grupo de un agente basado en platino, un inhibidor de EGFR, un inhibidor de VEGF o una combinación de uno o más de los anteriores.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con el uso de un inhibidor de la topoisomerasa I para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer colorrectal en un paciente en donde el paciente es seleccionado para dicho tratamiento si en una muestra aislada de dicho paciente se detectan niveles bajos de expresión de APTX con respecto a un valor de referencia.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso de un agente basado en platino, de un inhibidor de EGF, de un inhibidor de VEGF o de una combinación de uno o más de los anteriores o para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer colorrectal en donde el paciente es seleccionado para dicho tratamiento si en una muestra aislada de dicho paciente detectan niveles elevados de expresión de APTX con respecto un valor de referencia.

En un quinto aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende un inhibidor de topoisomerasa I y un inhibidor de APTX.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición que comprende un inhibidor de topoisomerasa I y un inhibidor de aprataxina para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: La delección de APTX produce sensibilización a CTP. La exposición de las células parentales DT40 a CPT 15 y 25 nM durante 72 horas produjo una inducción modesta de apoptosis. Sin embargo, la inactivación dirigida de APTX produjo una inducción significativamente aumentada de apoptosis en respuesta al tratamiento con CPT. La reintroducción de APTX en células DT40 nulas restableció completamente el fenotipo resistente de las células parentales DT40.

Figura 2: Niveles tumorales de aprataxina y supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal avanzado que recibían tratamiento basado en irinotecan. La tinción inmunohistoquímica de tumores colorrectales demostró un gradiente de expresión, con algunos tumores que no tenían aprataxina detectable (A), niveles altos (D) o niveles intermedios de expresión (B-C). Se muestran el tiempo de evolución (E) y la supervivencia total (F) según los niveles de proteína aprataxina (gráficos de Kaplan-Meier). Se muestran los valores de p del orden logarítmico.

### Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han observado que, de forma sorprendente, los niveles de expresión de aprataxina están asociados con la respuesta de un paciente que sufre de cáncer al tratamiento con irinotecan. En concreto, como se observa en el ejemplo 2 de la presente invención, los pacientes que mostraban bajos niveles de aprataxina o en los que esta molécula era indetectable mostraban un mayor tiempo de progresión y supervivencia en respuesta al tratamiento con irinotecan que los pacientes con niveles moderados o altos de aprataxina. Los pacientes con baja probabilidad de respuesta al tratamiento basado en irinotecan son candidatos ideales para recibir tratamiento con agentes alternativos disponibles tales como oxaliplatino, cetuximab y/o bevacizumab.

#### *Método de determinación de respuesta a terapia basada en inhibidores de topoisomerasa*

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método (en adelante primer método de la invención) para determinar la respuesta de un paciente que sufre de un tumor a un inhibidor de la topoisomerasa I que comprende comparar los niveles de expresión de APTX determinados en una muestra aislada de dicho paciente con respecto a un valor de referencia, en donde niveles bajos de APTX son indicativos de una buena respuesta al inhibidor de la topoisomerasa I.

La expresión “determinar la respuesta de un paciente” se refiere a la valoración de los resultados de una terapia en un paciente que padece cáncer en respuesta a una terapia basada en el uso de inhibidores de topoisomerasa I. La utilidad de los biomarcadores de la invención para seguir la eficacia de un tratamiento también se puede aplicar a métodos para seleccionar y cribar fármacos con potencial actividad anti-tumoral. Este proceso comprende a) administrar al sujeto (preferiblemente un animal) el fármaco a estudiar; b) a diferentes puntos del estudio (antes, durante y/o después de la administración) coger muestras biológicas del animal y determinar los niveles de marcador según la presente invención; y c) comparar las determinaciones realizadas en las muestras obtenidas en las diferentes fases del tratamiento y compararlas a animales control, por ejemplo sin tratar.

El cáncer que va a tratarse en el contexto de la presente invención puede ser cualquier tipo de cáncer o tumor. Estos tumores o cáncer incluyen, y no se limitan a, cánceres hematológicos (por ejemplo leucemias o linfomas), tumores neurológicos (por ejemplo astrocitomas o glioblastomas), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tumores gastrointestinales (por ejemplo cáncer de estómago, páncreas o colorrectal), cáncer de hígado (por ejemplo carcinoma hepatocelular), cáncer de células renales, tumores genitourinarios (por ejemplo cáncer de ovario, cáncer vaginal, cáncer de cuello de útero, cáncer de vejiga, cáncer de testículo, cáncer de próstata), tumores óseos y tumores vasculares. Por tanto, en una realización particular, la enfermedad del cáncer que va a tratarse o prevenirse es cáncer colorrectal.

El término “cáncer colorrectal” (CCR), tal como se usa aquí, incluye cualquier tipo de neoplasias del colon, recto y apéndice y hace referencia tanto a los adenomas tempranos y tardíos como a los carcinoma así como al cáncer hereditario, familiar o esporádico. Dentro del CCR hereditario se encuentran aquellos síndromes que incluyen la presencia de pólipos, tales como los síndromes de poliposis hamartomatosos y el más conocido, la poliposis adenomatosa familiar (PAF) así como los síndromes no poliposos tales como cáncer colorrectal hereditario no asociado a pólipos (CCHNP) o síndrome de Lynch 1. Asimismo, la invención contempla el tratamiento del cáncer colorrectal en sus distintos esta-

díos tales como los estadíos A, B, C1, C2 y D según la clasificación de Dukes, los estadíos A, B1, B2, B3, C1, C2, C3 y D según la clasificación de Astler-Coller, los estadíos TX, TO, Tis, T1, T2, T3, NX, NO, N1, N2, MX, MO y MI según el sistema TNM así como los estadíos 0, I, II, III y IV según la clasificación de la AJCC (American Joint Committee on Cancer).

El término “sujeto” o “paciente”, como se usa aquí, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

Los términos “aprataxina o APTX” se usan indistintamente en la presente invención y se refieren a una proteína perteneciente a una superfamilia denominada familia del dominio HIT formada por proteínas tales como la proteína de unión a nucleótidos (HINT), la triada de histidinas frágil (FHIT), la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT), IPR011151 y DcpS. El dominio HIT se caracteriza por presentar una secuencia consenso del tipo HXHXHXX en donde X es un aminoácido hidrofóbico. Apratxina contiene, adicionalmente, un dominio asociado a “Forkhead” (FHA) N-terminal que es capaz de unirse a fosfoproteínas y una región C-terminal que es un dominio putativo de unión a DNA del tipo *zinc finger*. La apratxina que puede ser determinada según la presente invención corresponde preferiblemente a la proteína de origen humano identificada en la base de datos NCBI con el número de acceso AAQ74130 (en la versión de 29 de septiembre de 2004), aunque también puede referirse a la proteína de rata (número de acceso NP\_683687 en la base datos NCBI en la versión de 11 de febrero de 2008), de ratón (número de acceso AAH21872 en la base datos NCBI en la versión de 30 de enero de 2008), de cerdo (número de acceso NP\_998899 en la base datos NCBI en la versión de 18 de noviembre de 2006), de perro (número de acceso NP001003355 en la base datos NCBI en la versión de 14 de junio de 2007), de vaca (número de acceso NP\_872595 en la base datos NCBI en la versión del de noviembre de 2008), caballo (número de acceso XP001917754 en la base datos NCBI en la versión de 11 de julio de 2008) y similares.

El término “apratxina”, según se usa en la presente invención, incluye no sólo las secuencias exactas definidas en anteriormente sino que también incluye variantes de apratxina en las que uno o más de los restos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o puede no ser uno codificado por el código genético, o (ii) variantes que comprende una inserción o una delección de uno o más aminoácidos. Las variantes según la invención tienen preferentemente una identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos del APTX de, al menos, el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad entre las variantes y las secuencias específicas de apratxina definidas anteriormente se determina usando algoritmos y procedimientos informáticos que son ampliamente conocidos para los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

Para llevar a cabo el primer método de la invención, es necesario disponer de una muestra del sujeto en estudio. El término “muestra” como se usa aquí, se refiere a cualquier muestra que se puede obtener del paciente, tal como una muestra de biopsia, tejido, célula o fluido (suero, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), lágrimas, moco, sudor, leche, extractos de cerebro y similares). En una forma de realización particular, dicha muestra es una muestra de tejido o una parte del mismo, preferiblemente una muestra de tejido tumoral o una parte del mismo. Dicha muestra se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, biopsia, utilizando métodos bien conocidos para los expertos en las técnicas médicas relacionadas. Los métodos para obtener una muestra de la biopsia incluyen partición en trozos grande de un tumor, o microdissección u otros métodos de separación de células conocidos en la técnica. Las células tumorales se pueden obtener de forma adicional mediante citología por aspiración con una aguja fina. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, estas se pueden fijar en formalina y embeber en parafina o congelar primero y después embeber en un medio criosolidificable, tal como compuesto OCT, mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permite la congelación rápida.

Como entiende el experto en la materia, los niveles de expresión de APTX se pueden determinar midiendo los niveles del ARNm que codifica APTX o midiendo los niveles de proteína APTX.

De esta manera, en una forma de realización particular de la invención, los niveles de expresión de APTX se determinan midiendo los niveles de expresión del ARNm codificados por el gen APTX. Para este fin, la muestra biológica se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o célula, para liberar los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos para análisis adicionales. Los ácidos nucleicos se extraen de la muestra mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente. El ARN se extrae después a partir de muestras congeladas o recientes mediante cualquiera de los métodos típicos en la técnica, por ejemplo Sambrook, J., *et al.*, 2001 Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3. Preferiblemente, se tiene cuidado para evitar la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

En una forma de realización particular, el nivel de expresión se puede determinar usando el ARNm obtenido de una muestra de tejido fijada en formalina, embebida en parafina. El ARNm se puede aislar de una muestra patológica

de archivo o una muestra de biopsia que primero se desparafiniza. Un método de desparafinización de ejemplo implica lavar la muestra en parafina con un solvente orgánico, tal como xileno. Las muestras desparafinizadas se pueden rehidratar con una solución acuosa de un alcohol inferior. Los alcoholes inferiores adecuados, incluyen por ejemplo, metanol, etanol, propanoles, y butanoles. Las muestras desparafinizadas se pueden rehidratar con lavados sucesivos con soluciones de alcoholes inferiores de concentración decreciente, por ejemplo. De forma alternativa, la muestra se desparafiniza y rehidrata simultáneamente. La muestra se lisa después y se extrae el ARN de la muestra.

Mientras que todas las técnicas de determinación del perfil de expresión génica (RT-PCR, SAGE, microarrays de expresión o TaqMan) son adecuadas para el uso al realizar los aspectos anteriores de la invención, los niveles de expresión de ARNm se determinan con frecuencia mediante transcripción inversa reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). En una forma de realización particular, los niveles de expresión del ARNm del APTX se determinan mediante PCR cuantitativa, preferiblemente PCR a tiempo real. La detección se puede llevar a cabo en muestras individuales o en micromatrices de tejidos.

Para normalizar los valores de expresión el ARNm entre las diferentes muestras, es posible comparar los niveles de expresión del ARNm de interés en las muestras a ensayar con la expresión de un ARN control. Un "ARN control" como se usa aquí, se refiere a un ARN cuyos niveles de expresión no cambian o solo cambian en cantidades limitadas en células tumorales con respecto a células no tumorigénicas. Preferiblemente, el ARN control es ARNm derivado de genes de mantenimiento y que codifica proteínas que se expresan de forma constitutiva y que llevan a cabo funciones celulares esenciales. Los ejemplos de genes de mantenimiento para su uso en la presente invención incluyen  $\beta$ -2-microglobulina, ubiquitina, proteína ribosómica de 18-S, ciclofilina, GAPDH y actina. En una forma de realización preferida, el ARN control es el ARNm de la  $\beta$ -actina. En una forma de realización la cuantificación de la expresión génica relativa se calcula según el método comparativo Ct usando  $\beta$ -actina como control endógeno y controles de ARN comerciales como calibradores. Los resultados finales, se determinan según la fórmula  $2^{(\Delta Ct \text{ de la muestra} - \Delta Ct \text{ del calibrador})}$ , donde los valores  $\Delta Ct$  del calibrador y la muestra se determinan sustrayendo el valor CT del gen diana del valor del gen de la  $\beta$ -actina.

De forma alternativa, en otra forma de realización particular, los niveles de expresión de APTX se pueden determinar midiendo tanto el nivel de dicha proteína o el nivel de variantes de la misma.

La determinación de los niveles de expresión de las proteínas se puede llevar a cabo mediante técnicas inmunológicas tales como por ejemplo, ELISA, inmunotransferencia, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. La inmunotransferencia se basa en la detección de proteínas previamente separadas mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes e inmovilizadas en una membrana, generalmente nitrocelulosa mediante incubación con un anticuerpo específico y un sistema de revelado (por ejemplo, quimioluminiscencia). El análisis mediante inmunofluorescencia requiere el uso de un anticuerpo específico para la proteína diana para el análisis de la expresión. El ELISA está basado en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con enzimas de modo que los conjugados formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado dan como resultado la formación de complejos enzimáticamente activos. Puesto que uno de los componentes (el antígeno o el anticuerpo marcado) están inmovilizados sobre un soporte, los complejos antígeno-anticuerpo están inmovilizados sobre el soporte y de esta manera, se pueden detectar mediante la adición de un sustrato que es convertido por la enzima en un producto que es detectable mediante, por ejemplo, espectrofotometría o fluorometría.

Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a las proteínas diana con alta afinidad para detectar la cantidad de proteínas diana. Sin embargo se prefiere el uso de un anticuerpo, por ejemplo sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, díacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados.

Por otra parte, la determinación de los niveles de expresión de proteínas se puede llevar a cabo mediante técnicas de inmunohistoquímica bien conocidas en el estado de la técnica. Para llevar a cabo la determinación mediante inmunohistoquímica, la muestra puede ser una muestra fresca, congelada o embebida en parafina y fijada usando un agente protector del tipo de la formalina. Para la determinación inmunohistoquímica, la muestra se tiñe con un anticuerpo específico para aprataxina y se determina la frecuencia de células que se han teñido y la intensidad de la tinción. Típicamente, se asigna a la muestra un valor indicativo de la expresión y total y que se calcula en función de la frecuencia de células teñidas (valor que varía entre 0 y 4) y de la intensidad en cada una de las células teñidas (valor variable entre 0 y 4). Criterios típicos para asignar valores de expresión a las muestras se han descrito en detalle, por ejemplo, en Handbook of Immunohistochemistry and *In Situ* Hybridization in Human Carcinomas, M. Hayat Ed., 2004, Academic Press. Adicionalmente, la inmunohistoquímica permite identificar que tipo de células de las presentes en el tejido canceroso son las que presentan niveles alterados de expresión del marcador. Preferiblemente, la detección inmunohistoquímica se lleva a cabo en paralelo con muestras de células que sirven como marcador positivo y como marcador negativo y, como referencia, se pueden usar tejidos sanos del mismo origen que el tumor que se está analizando. También es frecuente usar un control de fondo.

En aquellos casos en los que se desee analizar un elevado número de muestras (por ejemplo, cuando se desea analizar varias muestras de un mismo paciente o muestras de distintos pacientes), es posible la utilización de formatos matriciales y/o procedimientos automatizados. En una forma de realización, es posible el uso de micromatrices de tejidos (tissue microarrays or TMA) que pueden ser obtenidos usando distintas técnicas. Las muestras que forman parte de las micromatrices pueden ser analizadas de distinta manera incluyendo inmunohistoquímica, hibridación *in*

*situ*, PCR *in situ*, análisis de ARN o de ADN, inspección morfológica y combinaciones de cualquiera de las anteriores. Métodos para el procesamiento de micromatrices de tejido han sido descritos, por ejemplo, en Kononen, J. *et al.*, (Nat. Med. 1987, 4:844-7). Las micromatrices de tejido se preparan a partir de núcleos cilíndricos de 0,6 a 2 mm de diámetro a partir de muestras de tejido embebidas en parafina y vueltas a embeber en un único bloque receptor. De esta forma, el tejido procedente de múltiples muestras puede ser insertado en un único bloque de parafina.

La determinación de los niveles de expresión de APTX necesita ser correlacionada con los valores de referencia que corresponden al valor mediana de los niveles de expresión del APTX medidos en una colección de tejidos tumorales en muestras de biopsias de sujetos con cáncer. Dicha muestra de referencia se obtiene típicamente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la enfermedad se encuentra bien caracterizada por alguno de los métodos habituales (tacto rectal, prueba de sangre oculta en las heces, sigmoidoscopia, colonoscopia, biopsia, determinación de marcadores tumorales tales como el antígeno carcinoembrionario, ecografía, TAC, resonancia magnética nuclear, tomografía de emisión de positrones). En tales muestras, las concentraciones normales (de referencia) del biomarcador se pueden determinar, por ejemplo proporcionando la concentración media sobre la población de referencia. Al determinar la concentración de referencia del marcador se toman en cuenta varias consideraciones. Entre tales consideraciones están el tipo de muestra implicada (por ejemplo tejido o LCR), la edad, peso, sexo, estado físico general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo de varias categorías de edad. La colección de muestras de las que deriva el nivel de referencia estará preferiblemente constituida de sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto de estudio.

Una vez que se ha establecido este valor mediana, se puede comparar el nivel de este marcador expresado en tejidos tumorales de pacientes con este valor mediana, y de esta manera ser asignado al nivel de expresión "aumentada" o "disminuida". Debido a la variabilidad entre sujetos (por ejemplo, aspectos referidos a la edad, raza, etc.) es muy difícil (si no prácticamente imposible) establecer valores de referencia absolutos de expresión de APTX. De esta manera, en una forma de realización particular, los valores de referencia para expresión "aumentada" o "disminuida" de la expresión de APTX se determinan calculando los percentiles por medios convencionales que implica ensayar en una o varias muestras aisladas de sujetos en los que la enfermedad se encuentra bien documentada por alguno de los métodos mencionados anteriormente los niveles de expresión de APTX. Los niveles "reducidos" de APTX se pueden entonces asignar, preferiblemente, a muestras en donde los niveles de expresión de APTX son iguales a o inferiores a el percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o inferiores al percentil 60 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 70 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 80 en la población normal, iguales a o inferiores al percentil 90 en la población normal, e iguales a o inferiores al percentil 95 en la población normal. Los niveles "aumentados" de APTX se pueden entonces asignar, preferiblemente, a muestras en donde los niveles de expresión de APTX son iguales a o superan el percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o en exceso al percentil 60 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 70 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 80 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 90 en la población normal, e iguales a o en exceso al percentil 95 en la población normal.

La expresión "niveles bajos de expresión de APTX", según se usa aquí, se refiere a niveles de APTX inferiores a los que aparecen en una muestra de referencia. En particular, se puede considerar que una muestra presenta niveles bajos de expresión de APTX cuando los niveles de expresión son en la muestra de referencia son de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la muestra aisladas del paciente.

La expresión "Inhibidor de topoisomerasa I" según se usa aquí incluye cualquier compuesto capaz de inhibir la actividad de la topoisomerasa I determinado mediante cualquiera de los ensayos de relajación conocidos en la técnica tales como el descrito por Liu *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 76:3487-3491) así como cualquier compuesto capaz de inhibir la actividad nucleasa de la topoisomerasa I tales como el descrito por Hsiang *et al.* (J. Biol. Chem., 1985, 260:14873-14878).

Ejemplos de inhibidores de topoisomerasa I incluyen, sin limitación, topotecan, gimatecan, irinotecan, camptotecina, SN38 y sus análogos, 9-nitrocampotecina y el conjugado macromolecular de camptotecina PNU-166148 (compuesto A1 en WO 99/17804); sal acética de 10-hidroxycampotecina; hidrocloreto de idarubicina; hidrocloreto de irinotecan; teniposido; hidrocloreto de topotecan; doxorubicina; hidrocloreto de epirubicina; hidrocloreto de mitoxantrona y hidrocloreto de daunorubicina. Irinotecan puede ser administrado, por ejemplo, en la forma en la que se comercializa, es decir, bajo la marca CAMPTOSAR. Topotecan puede ser administrado, por ejemplo, en la forma en la que se comercializa, es decir, bajo la marca Hycamtin.

Los términos "buena" y "mala", según se usan en el contexto de una invención para referirse a la respuesta de un paciente al tratamiento con inhibidores de topoisomerasa I se refieren a que el paciente mostrará una respuesta favorable o desfavorable al tratamiento. El experto en la materia apreciará que la determinación de la respuesta al tratamiento no será correcta para el 100% de los pacientes analizados. No obstante, se pretende que la determinación de la respuesta sea correcta para una fracción estadísticamente significativa de los pacientes. La determinación de si una respuesta es estadísticamente significativa puede llevarse a cabo usando herramientas de evaluación estadística

tales como intervalos de confianza, determinación del valor p, el test de la t de Student, el test Mann-Whitney, etc. La forma de poner en práctica estas herramientas se describe en detalle, por ejemplo, en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983. Intervalos de confianza preferidos son de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0.2, 0.1, 0.05.

La determinación de la respuesta de un paciente a una determinada terapia se puede determinar usando cualquier criterio de valoración usado en oncología y conocido por el experto en la materia. Los parámetros de valoración útiles para describir la evolución de una enfermedad incluyen:

- evolución libre de enfermedad que, como se usa aquí, describe la proporción de sujetos en remisión completa que no han tenido recaída de la enfermedad durante el período de tiempo en estudio;
- respuesta objetiva, que, como se usa en la presente invención, describe la proporción de gente tratada en la que se observa una respuesta completa o parcial;
- control tumoral, que, como se usa en la presente invención, se refiere a la proporción de gente tratada en la que se observa una respuesta completa, respuesta parcial, respuesta menor o enfermedad estable  $\geq 6$  meses;
- supervivencia libre de evolución que, como se usa aquí, se define como el tiempo desde el principio del tratamiento hasta la primera medida de crecimiento del cáncer.
- supervivencia libre de evolución de seis meses o tasa “PFS6” que, como se usa aquí, se refiere al porcentaje de gente que están libres de evolución en los primeros seis meses después del inicio de la terapia
- supervivencia mediana que, como se usa aquí, se refiere al tiempo en el que la mitad de los pacientes inscritos en el estudio están todavía vivos y
- tiempo de evolución, como se usa aquí, se refiere al tiempo después de que la enfermedad se diagnostica (o trata) hasta que la enfermedad empeora.

En una forma preferida de realización, la respuesta de un paciente se determina mediante un parámetro seleccionado de tiempo para la progresión y supervivencia.

#### *Métodos de terapia personalizada y de diseño de terapia personalizada*

Los autores de la presente invención también han puesto de manifiesto que los niveles elevados de aprataxina permiten identificar pacientes con una baja probabilidad de respuesta a un tratamiento basado en un inhibidor de la topoisomerasa I (véase ejemplo 2 de la presente invención), por lo que estos pacientes serían candidatos ideales para recibir tratamiento con compuestos que son usados habitualmente en aquellos casos en los que el inhibidor de la topoisomerasa I no ha dado resultado tal y como se ha descrito por Cunningham *et al.* (N. Engl. J. Med. 2004, 351:337-45) y por Hurwitz *et al.* (N. Engl. J. Med., 2004, 3:2335-42). Este tipo de compuestos incluye, sin limitación, compuestos basados en platino, inhibidores de EGFR o inhibidores de VEGF.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método (en adelante segundo método de la invención) para seleccionar una terapia para un paciente que sufre de cáncer colorrectal que comprende determinar en una muestra aislada de dicho paciente los niveles de expresión de APTX con respecto a un valor de referencia, en donde

- (i) si los niveles de expresión de APTX con respecto a dicho valor de referencia son bajos, el paciente es seleccionado para el tratamiento con un inhibidor de la topoisomerasa I y/o
- (ii) si los niveles de expresión de APTX con respecto a dicho valor de referencia son elevados, el paciente es seleccionado para el tratamiento con un agente seleccionado del grupo de un agente basado en platino, un inhibidor de EGFR, un inhibidor de VEGF o una combinación de uno o más de los anteriores.

Los términos y expresiones “paciente”, “cáncer colorrectal”, “muestra”, “determinación de niveles”, “aprataxina”, “inhibidor de topoisomerasa I”, “niveles elevados” y “niveles bajos”, “valor de referencia” han sido descritos en detalle en relación con el primer método de la invención y son igualmente aplicables al segundo método de la invención.

El término “agente basado en platino”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier compuesto que comprende al menos un átomo de platino y que es capaz de unirse y de entrelazarse al ADN, provocando así la activación de las rutas de reparación del ADN y desencadenando la apoptosis. Compuestos basados en platino incluyen, sin limitación, carboplatino, cisplatino [cis-diamminedichloroplatinum, (CDDP)], oxaliplatino, iproplatino, nedaplatino, tetranitrato de triplatino, tetraplatino, satraplatino, y similares.

El término “inhibidor de EGFR”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir total o parcialmente la señalización mediada por EGFR bien mediante la inhibición de la unión de EGF a la región extracelular del receptor o bien mediante la inhibición de la actividad tirosina quinasa localizada en la

región intracelular de EGFR. Inhibidores de EGFR pueden identificarse usando métodos basados en la medida de la actividad tirosina quinasa en presencia del supuesto inhibidor tal y como el descrito en Hsu *et al.* (J. Biol. Chem., 1991, 261:21105-21112) o los métodos basados en ELISA tales como el descritos en Varkondi *et al.* (J. Recept. Signal. Transduct. Res. 2005;25:45-56). Alternativamente, es posible identificar inhibidores de EGFR usando los métodos basados en la capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales que sobre-expresan EGFR en agar blando tal y como ha sido descrito por Hudziak *et al.* (Mol. Cell. Biol., 1989, 9:1165-1172) y Lupu, R. *et al.* (Science, 1990, 249:1552-1555).

Ejemplos de agentes inhibidores de EGFR incluyen tanto anticuerpos como pequeñas moléculas con capacidad de unión a EGFR. Ejemplos de anticuerpos específicos frente al dominio extracelular de EGFR incluyen los anticuerpos monoclonales 579 (ATCC CRL HB 8506), 455 (ATCC CRL HB8507), 225 (ATCC CRL 8508), 528 (ATCC CRL 8509) (véase la patente en EEUU número 4943533 a nombre de Mendelsohn *et al.*) así como variantes de los mismos tales como 225 quimérico (C225) y 225 humanizado (H225) (véase WO 96/40210 a nombre de Imclone Systems Inc.), anticuerpos capaces de unirse al EGFR mutante de tipo II (véase la patente en EEUU 5212290); anticuerpos quiméricos y humanizados que unen EGFR tales como los descritos en la patentes US5891996; y anticuerpos humanos que unen EGFR (véase WO98/50433, Abgenix), (Avastin), 2C3, HuMV833, cetuximab (Erbix(R)), panitumumab (Vectibix(R)), nimotuzumab (TheraCim(R)), matuzumab, zalutuzumab, mAb 806 o IMC-1 1F8. Ejemplos de inhibidores de la actividad tirosín quinasa de EGFR incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA(TM); Astra Zeneca), CP-358774 (TARCEVA(TM); Genentech/OSI) y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), erlotinib (Tarceva), sunitinib (Sunitinib), lapatinib, sorafenib (Nexavar), vandetanib, axitinib, bosutinib, cediranib, dasatinib (Sprycel), lestaurtinib, y/o ARQ197. En una forma preferida de realización, el inhibidor de EGFR es Cetuximab.

El término "inhibidor de VEGF", según se usa en la presente invención, se refiere a un compuesto que inhibe la actividad o la producción de VEGF y que resulta en una disminución de la señalización vía la ruta VEGF-receptor VEGF. Inhibidores de VEGF pueden ser identificados usando métodos basados en la determinación de la capacidad proliferativa de células endoteliales vasculares humanas tal y como ha sido descrito por Kendall y Thomas (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:10705-10709) o basados en la determinación de la capacidad proliferativa de células endoteliales retinianas tal y como ha sido descrito por Aiello *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sic. USA, 1995, 92:10457-10461).

Compuestos inhibidores de VEGF incluyen, sin limitación, moléculas orgánicas de pequeño tamaño, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos frente a VEGF, péptidos, ácidos nucleicos antisentido, ARNi y ribozimas capaces de inhibir la expresión de VEGF. Ácidos nucleicos con capacidad de inhibir VEGF incluyen, sin limitación, los descritos en las patentes en EEUU US6168778 y US6147204, el compuesto EYE001 (conocido previamente como NX1838) que es un aptámero pegilado que se une con alta afinidad a la isoforma humana mayoritaria de VEGF, variantes de VEGF (patente en EEUU US6270933 y solicitud de patente internacional WO 99/47677), oligonucleótidos con capacidad de inhibir la expresión de VEGF bloqueando la expresión del mismo, tales como ARNs antisentido tales como los descritos en US5710136, US5661135, US5641756, US5639872 y US5639736. Otros compuestos capaces de inhibir la señalización mediada por VEGF incluyen ZD6474 (Tuccillo *et al.*, 2005, Clin Cancer Res., 11, 1268-76); COX-2, receptor Tie2, inhibidores de angiopoietin y de neuropilina; pigment epithelium-derived factor (PEDF), endostatina, angiostatina, tirosina quinasa de tipo fins soluble (sFlt1) (Harris *et al.*, 2001, Clin Cancer Res., 7, 1992-1997; US 5,861, 484); PTK787/ZK222 584; KR633 (Maier *et al.*, 2004, Mol Cancer Ther., 3, 1639-1649); VEGF-Trap(R) (Regeneron) y Alpha2-antiplasmin (Matsuno *et al.*, 2003, Blood, 120, 3621-3628). Otro grupo de agentes inhibidores de VEGF son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que mantienen la capacidad de unión al antígeno específicos frente a VEGF o frente a alguno de los miembros de la misma familia tales como VEGF B, I, C, D; PDGF). Ejemplos preferidos de anticuerpos anti-VEGF incluyen Avastin<sup>TM</sup> (conocida como bevacizumab, Genentech) o fragmentos del mismo y Lucentis<sup>TM</sup> (también conocidas como rhuFAb V2, AMD-Fab; ranibizumab, Genentech).

Adicionalmente, los resultados obtenidos por los investigadores con respecto a los métodos para la selección de una terapia personalizada permiten el tratamiento personalizado de un paciente que sufre de cáncer colorrectal en función de los niveles de expresión de aprataxina en una muestra aislada de dicho paciente. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un inhibidor de la topoisomerasa I para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer colorrectal en un paciente en donde el paciente es seleccionado para dicho tratamiento si en una muestra aislada de dicho paciente se detectan niveles bajos de expresión de APTX con respecto a un valor de referencia.

Alternativamente, la invención se relaciona con un inhibidor de la topoisomerasa I para su uso en el tratamiento de cáncer colorrectal en un paciente en donde el paciente es seleccionado para dicho tratamiento si en una muestra aislada de dicho paciente se detectan niveles bajos de expresión de APTX con respecto un valor de referencia.

Alternativamente, la invención se relaciona con un método de tratamiento de cáncer colorrectal en un paciente que comprende la administración a dicho paciente de un inhibidor de la topoisomerasa I en donde el paciente es seleccionado para dicho tratamiento si en una muestra aislada de dicho paciente se detectan niveles bajos de expresión de APTX con respecto un valor de referencia.

Por otro lado, pacientes en los que los niveles de expresión de aprataxina son elevados y, por tanto, no van a responder al tratamiento con inhibidores de topoisomerasa I, son candidatos a recibir terapias alternativas adecuadas para el cáncer colorrectal tales como un agente basado en platino, un inhibidor de EGF, un inhibidor de VEGF o una

combinación de uno o más de los anteriores. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un agente basado en platino, de un inhibidor de EGF, de un inhibidor de VEGF o de una combinación de uno o más de los anteriores o para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer colorrectal en donde el paciente es seleccionado para dicho tratamiento si en una muestra aislada de dicho paciente detectan niveles elevados de expresión de APTX con respecto un valor de referencia.

Alternativamente, la invención se relaciona con un agente basado en platino, un inhibidor de EGF, un inhibidor de VEGF o una combinación de uno o más de los anteriores para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal en donde el paciente es seleccionado para dicho tratamiento si en una muestra aislada de dicho paciente detectan niveles elevados de expresión de APTX con respecto un valor de referencia.

Alternativamente, la invención se relaciona con un método de tratamiento del cáncer colorrectal en un paciente que comprende la administración a dicho paciente de un agente basado en platino, un inhibidor de EGF, un inhibidor de VEGF o una combinación de uno o más de los anteriores en donde el paciente es seleccionado para dicho tratamiento si en una muestra aislada de dicho paciente detectan niveles elevados de expresión de APTX con respecto un valor de referencia.

Compuestos inhibidores de topoisomerasa I, agente basado en platino, inhibidores de EGFR e inhibidores de VEGF se han descrito en detalle anteriormente en relación con el método de diseño de terapia personalizada. En una forma preferida de realización, el inhibidor de la topoisomerasa I es irinotecan. En otra forma preferida de realización, el agente basado en platino es oxalipatino, el inhibidor de EGFR es un anticuerpo específico contra EGFR y el inhibidor de VEGF es un anticuerpo específico frente a EGFR.

El inhibidor de topoisomerasa I, el agente basado en platino, el inhibidor de EGFR, el inhibidor de VEGF o la combinación de uno o más de los anteriores puede administrarse mediante diferentes procedimientos, por ejemplo intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intramuscularmente, tópicamente, intradérmicamente, oralmente, intranasalmente o intrabronquialmente, y pueden administrarse localmente o sistémicamente o directamente al sitio diana. Una revisión de los diferentes procedimientos de administración de principios activos, de los excipientes que van a usarse y de los procedimientos para prepararlos puede encontrarse en Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20a edición, Williams & Wilkins PA, EE.UU. (2000).

Los agentes terapéuticos de acuerdo a la presente invención pueden ser formulados conjuntamente con un excipiente que sea aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

#### **Composiciones farmacéuticas de la invención**

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que células deficientes en aprataxina son más sensibles a la inhibición mediada por un inhibidor de la topoisomerasa I (véase ejemplo 1 de la presente invención). De esta forma, es posible aumentar la eficacia de los tratamientos basados en la inhibición de la topoisomerasa I mediante la administración simultánea de agentes inhibidores de aprataxina. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende un inhibidor de topoisomerasa I y un inhibidor de APTX.

El término "composición", según se usa aquí, se refiere a una mezcla de dos o más agentes bio-activos y define, en particular, un kit-de-partes en el sentido que los distintos componentes se pueden dosificar de forma independiente, es decir, simultáneamente o a distintos tiempos. Adicionalmente, la expresión también se refiere a un empaquetamiento comercial que comprende los componentes de la composición y, opcionalmente, instrucciones para el uso simultáneo, secuencial (desplazado en el tiempo) o separado. Así, los distintos componentes de la composición pueden ser administrado simultáneamente o secuencialmente, esto es, a tiempos distintos con intervalos constantes o variables y en la misma región o en regiones distintas del cuerpo. Preferiblemente, los intervalos de administración en el caso de administración secuencial o las vías de administración en el caso de la administración separada se eligen de tal forma que el efecto de la composición sea superior al de cada uno de los componentes administrado de forma separada. El cociente entre las dosis del primer y segundo componente puede variar de acuerdo con factores tales como la enfermedad particular, la edad, el sexo, el peso, etc. del paciente. Preferiblemente, la administración de la composición resulta en un efecto ventajoso, en concreto, en un aumento del efecto terapéutico de la composición con respecto a cada uno de los componentes de forma que sea posible llegar al mismo resultado con dosis menores de cada uno de los componentes, reduciendo así los efectos secundarios. Preferiblemente, el uso de la composición consigue un efecto sinérgico entre ambos componentes.

Posibles inhibidores de topoisomerasa I útiles para las composiciones de la presente invención son los descritos anteriormente en el contexto del primer método de la invención. En una forma preferida de realización, el inhibidor de topoisomerasa I es irinotecan.

5 En el contexto de la presente invención se entiende por “inhibidores de aprataxina” los compuestos que disminuyen la actividad de aprataxina, así como cualquier sustancia o compuesto que sea capaz de impedir o bloquear la transcripción y la traducción del gen que codifica aprataxina (es decir, impedir o bloquear la expresión de dicho gen), o que sea capaz de impedir que la proteína codificada por dicho gen realice su función (actividad).

10 A modo ilustrativo, agentes inhibidores de la expresión de aprataxina adecuados para su uso en la presente invención son, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARNs de interferencia (ARNiPs), ARNs catalíticos o ribozimas específicos, ARN con actividad “decoy”, es decir, con capacidad para unirse específicamente a un factor (proteico generalmente) importante para la expresión del gen, de manera que la expresión del gen de interés, en este caso aprataxina sea inhibida, etc. Asimismo, agentes inhibidores capaces de impedir que la proteína codificada por dicho gen que codifica aprataxina realice su función son, por ejemplo, péptidos inhibidores de la proteína, anticuerpos dirigidos específicamente contra epítopos de la proteína esenciales para desempeñar su función, o contra aprataxina, etc.

20 Por tanto, en una realización particular de la invención, el agente inhibidor se selecciona del grupo formado por ARNiPs, oligonucleótidos antisentido, ribozimas específicos, anticuerpos y polipéptidos. En una realización preferida de la invención, el inhibidor de aprataxina es un ARNiP específico para aprataxina.

#### ARNiP

25 Los ARN de interferencia pequeños o ARNiP (siRNA en su denominación en inglés) son agentes que son capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia de ARN. Un ARNiP se puede sintetizar químicamente, se puede obtener mediante transcripción *in vitro* o se puede sintetizar *in vivo* en la célula diana. Típicamente, los ARNiP consisten en una cadena doble de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNiP. Los ARNiP actúan mediante la degradación o el silenciamiento post-transcripcional del mensajero diana.

35 Los ARNiP pueden ser los llamados shRNA (short hairpin RNA), caracterizados por que las cadenas antiparalelas que forman el ARNiP están conectadas por una región bucle u horquilla. Los shRNAs pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus y estar bajo el control de promotores tales como el promotor U6 de la ARN polimerasa III.

40 Los ARNiP de la invención son sustancialmente homólogos al ARNm del gen que codifica aprataxina o a la secuencia genómica que codifica dicha proteína. Por “sustancialmente homólogos” se entiende que tienen una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de forma que el ARNiP sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. Los ARNiP adecuados para provocar dicha interferencia incluyen ARNiP formados por ARN, así como ARNiP que contienen distintas modificaciones químicas tales como:

- 45 - ARNiP en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotioato.
- conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo.
- 50 - Modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular el extremo 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales del hidroxilo en posición 2'.
- Nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alquilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribosap 2'-O-fluorosibosa.
- 55 - Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanósina).

60 Los ARNiP y ARNsh de la invención se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas para el experto en la materia. La región de la secuencia de nucleótidos que se toma como base para diseñar los ARNiP no es limitante y puede contener una región de la secuencia codificante (entre el codón de iniciación y el codón de terminación) o, alternativamente, puede contener secuencias de la región no traducida 5' o 3', preferentemente de entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en posición sentido 3' con respecto al codón de iniciación. Una forma de diseñar un ARNiP implica la identificación de los motivos AA(N19)TT, en donde N puede ser cualquier nucleótido en la secuencia que codifica aprataxina, y la selección de aquellos que presenten un alto contenido en G/C. Si no se encuentra dicho motivo, es posible identificar el motivo NA(N21), en donde N puede ser cualquier nucleótido.

*Oligonucleótidos antisentido*

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de ácidos nucleicos “antisentido” aislados para inhibir la expresión, por ejemplo inhibiendo la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico que codifica aprataxina cuya actividad se desea inhibir. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir a la diana potencial de la droga mediante complementariedad de bases convencional, o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren al rango de técnicas generalmente empleadas en la técnica e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

Una construcción antisentido de la presente invención se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica aprataxina. De forma alternativa, la construcción antisentido es una sonda de oligonucleótidos que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la expresión génica hibridando con el ARNm y/o secuencias genómicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables *in vivo*. Moléculas de ácidos nucleicos ejemplares para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y metilfosfonato (ver también las patentes de EE.UU. Nos. 5176996; 5264564; y 5256775). Adicionalmente, se han revisado las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, en Van der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6: 958-976, 1988; y Stein *et al.*, *Cancer Res* 48: 2659-2668, 1988.

Respecto al oligonucleótido antisentido, son preferidas las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivadas del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (bien ADN bien ARN) que son complementarios al ARNm que codifica el polipéptido diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm y prevendrán la traducción.

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deberían funcionar de la forma más eficaz para inhibir la traducción. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de los ARNm también son eficaces para inhibir la traducción de los ARNMs (Wagner, *Nature* 372: 333, 1994). Por lo tanto, se podrían usar oligonucleótidos complementarios bien a las regiones 5' ó 3' no traducidas, no codificantes de un gen en una aproximación antisentido para inhibir la traducción de ese ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deberían incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces pero también se podrían usar según la invención. Si están diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud y tener preferiblemente menos de alrededor de 100 y más preferiblemente menos de alrededor de 50, 25, 17 ó 10 nucleótidos de longitud.

Se prefiere que se realicen primero estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distinguen entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que esos estudios comparen los niveles del ARN o proteína diana con el de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere que el oligonucleótido control sea aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido a ensayar y que la secuencia del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación específica al secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de cadena doble. El oligonucleótido se puede modificar en el grupo de la base, el grupo del azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 648-652, 1987; Publicación de PCT No. WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (ver, por ejemplo, publicación de PCT No. WO89/10134), agentes intercalantes (ver, por ejemplo, Zon, *Pharm. Res.* 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada. El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un grupo azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no está limitado a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto semejante a péptido neutro. Tales moléculas se denominan oligómeros ácido nucleico peptídico (ANP) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14670, 1996, y en Eglom *et al.*, *Nature* 365: 566, 1993.

En aún otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un esqueleto de fosfato modificado.

En todavía una forma de realización más, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido alfa-anomérico.

Mientras que se pueden usar oligonucleótidos antisentido complementarios a la región codificante de la secuencia diana de ARNm, también se pueden usar aquellos complementarios a la región transcrita no traducida.

En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNms endógenos. Por lo tanto, una aproximación preferida usa una construcción de ADN recombinante en la que se coloca el oligonucleótido antisentido bajo el control de un promotor fuerte de pol III o pol II.

De forma alternativa, se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en las células diana en el cuerpo (ver en general, Helene, *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84, 1991).

En ciertas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido son morfolinos antisentido.

#### *Enzimas de ADN*

Un aspecto más de la invención se refiere a uso de enzimas de ADN para inhibir la expresión del gen que codifica la aprataxina de la invención. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánicas tanto de las tecnologías de antisentido como de las de ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana de ácido nucleico particular, parecido al oligonucleótido antisentido, sin embargo parecido a la ribozima son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

#### *Ribozimas*

También se pueden usar moléculas de ribozimas diseñadas para cortar de forma catalítica transcritos de un ARNm diana para prevenir la traducción de los ARNms que codifican aprataxina cuya actividad se desea inhibir. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN. (Para una revisión, ver, Rossi, *Current Biology* 4: 469-471, 1994). El mecanismo de acción de la ribozima implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a un ARN diana complementario, seguido por un suceso de corte endonucleolítico. La composición de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5093246).

Las ribozimas usadas en las composiciones de la presente invención incluyen las ribozimas de cabeza de martillo, las ARN endorribonucleasa (de aquí en adelante "ribozimas de tipo Cech") (Zaug *et al.*, *Science* 224:574-578, 1984).

Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo para mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y se deberían distribuir a células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método preferido de distribución implicar usar una construcción de ADN que "codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte de pol III ó pol II, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, contrariamente a otras moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular menor para su eficacia.

#### *Péptidos inhibidores*

El término "péptido inhibidor", tal como aquí se utiliza, hace referencia a aquellos péptidos capaces de unirse a aprataxina e inhibir su actividad según se ha explicado anteriormente, es decir, impedir que aprataxina pueda activar la transcripción génica.

#### *Anticuerpos inhibidores*

Por "anticuerpo inhibidor" se entiende en el contexto de la presente invención todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a aprataxina de manera específica e inhibir una o más de las funciones de aprataxina, preferiblemente las relacionadas con la transcripción. "Anticuerpo inhibidor" es también todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a aprataxina de manera específica y bloquear la oligomerización de aprataxina o los sitios de unión de aprataxina con otras proteínas. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia, algunos de los cuales ha sido citados anteriormente. Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a aprataxina, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de ésta proteína usando un ensayo de identificación de agentes inhibidores, (véase por ejemplo Metz; S. *et al.* *J. Biol. Chem.*, 2008, 283:5985-5995).

*Otros compuestos inhibidores de la actividad de aprataxina*

Otros compuestos con capacidad de inhibición de la expresión de una aprataxina incluyen aptámeros y espiegelmeros, que son ácidos nucleicos D o L de cadena sencilla o doble que se unen específicamente a la proteína, lo que resulta en una modificación de la actividad biológica de ésta. Los aptámeros y espiegelmeros tienen una longitud de entre 15 y 80 nucleótidos y, preferiblemente, de entre 20 y 50 nucleótidos.

Las composiciones de la invención se pueden usar en medicina para el tratamiento del cáncer y, en particular, del cáncer colorrectal. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición que comprende un inhibidor de topoisomerasa I y un inhibidor de aprataxina para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Alternativamente, la invención se relaciona con una composición que comprende un inhibidor de topoisomerasa I y un inhibidor de aprataxina para su uso en el tratamiento del cáncer. Alternativamente, la invención se relaciona con un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de una composición que comprende un inhibidor de topoisomerasa I y un inhibidor de aprataxina.

Los tipos de formulación y las vías de administración de las composiciones de la invención han sido descritas en detalle anteriormente y son esencialmente las mismas que las empleadas para cada uno de los componentes usado separadamente.

Las composiciones de la invención son adecuadas para el tratamiento de distintos tipos de cáncer incluyendo, sin limitación, los descritos anteriormente en el contexto del primer método de la invención. En una forma preferida de realización, el cáncer es cáncer colorrectal.

La invención se ilustra a continuación en base a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

**Ejemplos***Materiales y métodos**Caracterización de la sensibilidad a camptotecina*

Se usaron la línea de células B parental de pollo DT40, una sublínea donde ATPX se interrumpió mediante recombinación homóloga y una línea derivada donde se reintrodujo APTX en las células nulas (Ahel I, *et al.*, Nature 2006; 443: 713-6). Se evaluó la inducción de apoptosis por camptotecina como se ha descrito previamente (Arango D, *et al.*, Cancer Res 2001; 61: 4910-5; Arango D, *et al.*, Br J Cancer 2003; 89: 1757-65). Brevemente, se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células por triplicado en placas Falcon de 6 pocillos (Becton Dickinson) y se dejaron adherir durante 24 horas antes de aspirar el medio y cambiarlo por medio fresco que contenía camptotecina 0, 15 ó 25 nM (Calbiochem, San Diego, CA). Después de 72 horas de tratamiento, se recogieron tanto las células adheridas como las que flotaban, se lavaron dos veces con 2 ml de PBS, y se resuspendieron en PBS que contenía yoduro de propidio 50  $\mu\text{g/ml}$ , citrato de sodio al 0,1%, y Tritón X-100 al 0,1%. Las células se tiñeron durante la noche a 4°C y se analizó el contenido de ADN usando un separador de células (FACSCalibur; Becton Dickinson). Se descartaron los restos celulares, y se cuantificó la proporción de células con un contenido subdiploide de ADN, característico de células apoptóticas, usando WinList 2.0 (Verity Software House, Inc.). Todos los experimentos se llevaron a cabo en triplicado, y se muestra la media de tres experimentos independientes.

*Pacientes*

Se incluyeron en el estudio un total de 135 pacientes con cáncer colorrectal con enfermedad metastásica que recibieron quimioterapia basada en irinotecan en el Hospital Universitario Valí d'Hebron. La tabla 1 resume la información clinicopatológica de los pacientes. Se evaluó la respuesta al tratamiento quimioterapéutico mediante tomografía axial computarizada (TAC) y se consideró una respuesta completa cuando se observó la desaparición total de las lesiones metastásicas.

Los pacientes con enfermedad estable mostraron entre el 30% de descenso y el 20% de aumento en la suma del diámetro de las lesiones. Una reducción en el tamaño de las lesiones observadas por TAC mayor del 30% o un aumento por encima del 20% se consideraron como respuesta parcial o enfermedad progresiva, respectivamente. El estudio se llevó a cabo según los protocolos de investigación aprobados por el Comité Ético de Investigaciones Clínicas.

TABLA 1

*Características clínicas de los 135 pacientes en la serie usada en este estudio*

	<b>Total</b>	<b>Aprataxina baja</b>	<b>Aprataxina alta</b>	<b>valor de p*</b>
<b>Sexo - no. (%)</b>				
<b>Hombre</b>	50 (37,0)	20 (30,3)	30 (43,5)	0,15 <sup>1</sup>
<b>Mujer</b>	85 (63,0)	46 (69,7)	39 (56,5)	
<b>Edad (años)</b>	64,2	63,0	61,9	0,78 <sup>2</sup>
<b>Protocolo de irinotecán - no. (%)</b>				
<b>Monoterapia de CPT11</b>	60 (46,9)	23 (37,1)	37 (56,1)	0,1 <sup>3</sup>
<b>FOLFIRI</b>	41 (32,0)	26 (41,9)	15 (22,7)	
<b>FOLFIRI + Bevacizumab</b>	8 (6,3)	4 (6,5)	4 (6,2)	
<b>FOLFIRI + Cetuximab</b>	19 (14,8)	9 (14,5)	10 (15,2)	
<b>Grado de diferenciación del tumor - no. (%)</b>				
<b>Bueno</b>	13 (10,4)	7 (11,7)	6 (9,2)	0,44 <sup>3</sup>
<b>Moderado</b>	74 (59,2)	38 (63,3)	36 (55,4)	
<b>Poco</b>	38 (30,4)	15 (25)	23 (35,4)	
<b>Respuesta Objetiva</b>				
<b>Respuesta completa</b>	9 (7,7)	7 (11,9)	2 (3,5)	0,13 <sup>3</sup>
<b>Respuesta parcial</b>	30 (25,9)	17 (28,8)	13 (22,8)	
<b>Enfermedad estable</b>	29 (25)	16 (27,1)	13 (22,8)	
<b>Enfermedad progresiva</b>	48 (41,4)	19 (32,2)	29 (50,9)	
<b>Supervivencia total mediana – (meses)</b>	26,3	36,7	19	0,008 <sup>4</sup>

\* Valores de p calculados usando la prueba exacta de Fisher (1), la prueba de Mann-Whitney (2), la prueba de Ji cuadrado (3) o la prueba del orden logarítmico (4) para la comparación de aprataxina alta y baja. FOLFIRI: Irinotecán con fluorouracilo (5FU) y ácido folínico.

#### *Micromatrices de tejido e inmunohistoquímica*

Después del examen histológico de secciones teñidas con hematoxilina y eosina de muestras de tumor fijadas con formalina embebidas en parafina, se seleccionaron áreas que contenían una gran proporción de células tumorales de los 135 pacientes. Se ordenaron núcleos de 1,2 mm en duplicado de muestras de tumores de cada paciente en un nuevo bloque de parafina usando un aparato para la preparación de matrices de tejidos de Beecher Instruments (Beecher Instruments, Silver Spring, MD).

Se montaron secciones no teñidas de 4  $\mu\text{m}$  de las micromatrices de tejidos sobre portaobjetos recubiertos con 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.). Las secciones se desparafinaron en xileno, y se rehidrataron mediante una serie gradual de alcohol y agua destilada. La recuperación del antígeno se hizo con tampón citrato 10 mM pH = 6 precalentado, durante 20 minutos a 95°C. Para el análisis inmunohistoquímico, se usó el sistema comercial de detección de polímeros Novolink según las instrucciones del fabricante (Novocastra Laboratories; Newcastle, RU). Se usó un anticuerpo policlonal de conejo contra aprataxina hecho contra el extremo C-terminal de aprataxina humana a una dilución 1:100 (4°C durante la noche; Aviva Systems Biology Corp.; San Diego, CA). La tinción se visualizó usando una solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB) y las secciones se contratiñeron en hematoxilina de Mayer, se lavaron en agua, se deshidrataron a través de una serie de soluciones de etanol, se clarificaron en xileno y se montaron. Se evaluaron los niveles de aprataxina sin conocer los datos clínicos. Se usó una escala semicuantitativa desde 0 hasta 3 para medir la intensidad de la tinción. La ausencia de tinción de aprataxina se puntuó como 0 y los niveles de aprataxina bajos, moderados y altos se puntuaron como 1, 2, y 3, respectivamente (ver la figura 2A-D). Se usó la puntuación media de muestras por duplicado en análisis posteriores.

#### 15 *Análisis estadístico*

Se construyeron curvas de supervivencia usando el método de Kaplan y Meier y se evaluaron las diferencias de supervivencia usando la prueba del orden logarítmico. Se usó el modelo de riesgos proporcionales de Cox para evaluar la contribución simultánea en la supervivencia total de las siguientes covariables: sexo, edad, grado histológico, y niveles tumorales de aprataxina. Se usaron la prueba exacta de Fisher, la prueba Ji cuadrado y la prueba de Mann-Whitney para evaluar diferencias entre parámetros clinicopatológicos en pacientes con niveles altos y bajos de aprataxina (ver la tabla 1). Se consideró que los valores de p menores de 0,05 indicaban significación estadística.

#### 25 *Ejemplo 1*

##### *Aprataxina regula la sensibilidad a CPT*

Se determinó previamente que la expresión de aprataxina a nivel del ARNm está asociada significativamente (respuesta apoptótica a la exposición de 72 horas a CTP 100 nM; Spearman  $R=0,54$   $p=0,0022$ ) con la sensibilidad de un panel de líneas celulares de cáncer colorrectal a camptotecina (CPT), un análogo de irinotecan que se metaboliza al mismo componente activo, SN38 (Mariadason JM, *et al.*, Cancer Res 2003; 63: 8791-812). Aquí se usó un sistema manipulado *in vitro* donde ambos alelos de APTX se inactivaron mediante recombinación homóloga, para evaluar directamente el papel de aprataxina en la sensibilidad a CPT (Ahel I, *et al.*, Nature 2006; 443: 713-6). La figura 1 muestra que el tratamiento de las células parentales DT40 con CTP 15-25 nM durante 72 horas produjo una inducción modesta de apoptosis. Sin embargo, la inactivación dirigida de APTX sensibilizó significativamente ( $p<0,004$ ) las células al tratamiento con CPT. Además, la reintroducción de APTX en células nulas para APTX restableció completamente el fenotipo resistente a CPT de las células parentales DT40, demostrando que aprataxina regula directamente la sensibilidad a CPT (Figura 1).

#### *Ejemplo 2*

##### *Los niveles tumorales bajos de aprataxina predicen una buena respuesta a irinotecan*

A continuación se quiso investigar el valor de los niveles tumorales de aprataxina como un marcador de respuesta a CPT11 (irinotecan). Para este fin, se usaron una serie de pacientes con cáncer colorrectal con enfermedad metastásica que recibieron tratamiento basado en irinotecan (ver la tabla I). Se construyó una micromatriz de tejidos (TMA) que contenía muestras por duplicado de 135 de estos pacientes. Se evaluaron los niveles de expresión de aprataxina en estos tumores mediante inmunohistoquímica y se observó un gradiente de expresión, que variaba desde la ausencia completa (Figura 2A) a altos niveles tumorales de aprataxina (Figura 2D). El tiempo de evolución (TTP) para pacientes con niveles moderados o altos de aprataxina en el tumor era significativamente más corto (prueba del orden logarítmico,  $p=0,03$ ) que en pacientes con niveles de aprataxina ausentes o bajos (mediana de TTP de 5,5 y 9,2 meses, respectivamente; cociente de riesgos instantáneos de 1,5; IC del 95%, 1,04-2,29; Figura 2E). Además, la aprataxina ausente/baja estaba asociada con supervivencia total significativamente más larga (prueba del orden logarítmico,  $p=0,008$ ) en pacientes con cáncer colorrectal que recibían quimioterapia basada en irinotecan (mediana de TTP de 19 y 36,7 meses, respectivamente; cociente de riesgos instantáneos de 2,1; IC del 95%, 1,21-3,63) indicando una mejor respuesta al tratamiento con irinotecan (Figura 2F).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para determinar la respuesta de un paciente que sufre de un tumor a un inhibidor de la topoisomerasa I que comprende comparar los niveles de expresión de APTX determinados en una muestra aislada de dicho paciente con respecto a un valor de referencia, en donde niveles bajos de APTX son indicativos de una buena respuesta al inhibidor de la topoisomerasa I.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 en donde el inhibidor de la topoisomerasa I es irinotecan.
3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2 en donde el tumor es un cáncer colorrectal.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la respuesta de un paciente se determina mediante un parámetro seleccionado de tiempo para la progresión y supervivencia.
- 20 5. Método para seleccionar una terapia para un paciente que sufre de cáncer colorrectal que comprende determinar en una muestra aislada de dicho paciente los niveles de expresión de APTX con respecto a un valor de referencia, en donde
- 25 (i) si los niveles de expresión de APTX con respecto a dicho valor de referencia son bajos, el paciente es seleccionado para el tratamiento con un inhibidor de la topoisomerasa I y/o
- (ii) si los niveles de expresión de APTX con respecto a dicho valor de referencia son elevados, el paciente es seleccionado para el tratamiento con un agente seleccionado del grupo de un agente basado en platino, un inhibidor de EGFR, un inhibidor de VEGF o una combinación de uno o más de los anteriores.
- 30 6. Uso de un inhibidor de la topoisomerasa I para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer colorrectal en un paciente en donde el paciente es seleccionado para dicho tratamiento si en una muestra aislada de dicho paciente se detectan niveles bajos de expresión de APTX con respecto un valor de referencia.
- 35 7. Uso según la reivindicación 6 en donde el inhibidor de la topoisomerasa I es irinotecan.
8. Uso de un agente basado en platino, de un inhibidor de EGF, de un inhibidor de VEGF o de una combinación de uno o más de los anteriores o para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer colorrectal en donde el paciente es seleccionado para dicho tratamiento si en una muestra aislada de dicho paciente detectan niveles elevados de expresión de APTX con respecto un valor de referencia.
- 40 9. Uso según la reivindicación 8 en donde el agente basado en platino es oxalipatino, el inhibidor de EGFR es un anticuerpo específico contra EGFR y/o el inhibidor de VEGF es un anticuerpo específico frente a EGFR.
- 45 10. Una composición que comprende un inhibidor de topoisomerasa I y un inhibidor de APTX.
11. Una composición según la reivindicación 10 en donde el inhibidor de la topoisomerasa I es el irinotecan.
- 50 12. Una composición según las reivindicaciones 10 u 11 en donde el inhibidor de aprataxina se selecciona del grupo de un oligonucleótidos antisentido, una ribozimas, un siRNA, un shRNA y un anticuerpos inhibidores de la actividad aprataxina.
13. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para su uso en medicina.
- 55 14. Uso de una composición que comprende un inhibidor de topoisomerasa I y un inhibidor de aprataxina para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 60 15. Uso según la reivindicación 14 en donde el cáncer es cáncer colorrectal.
- 65

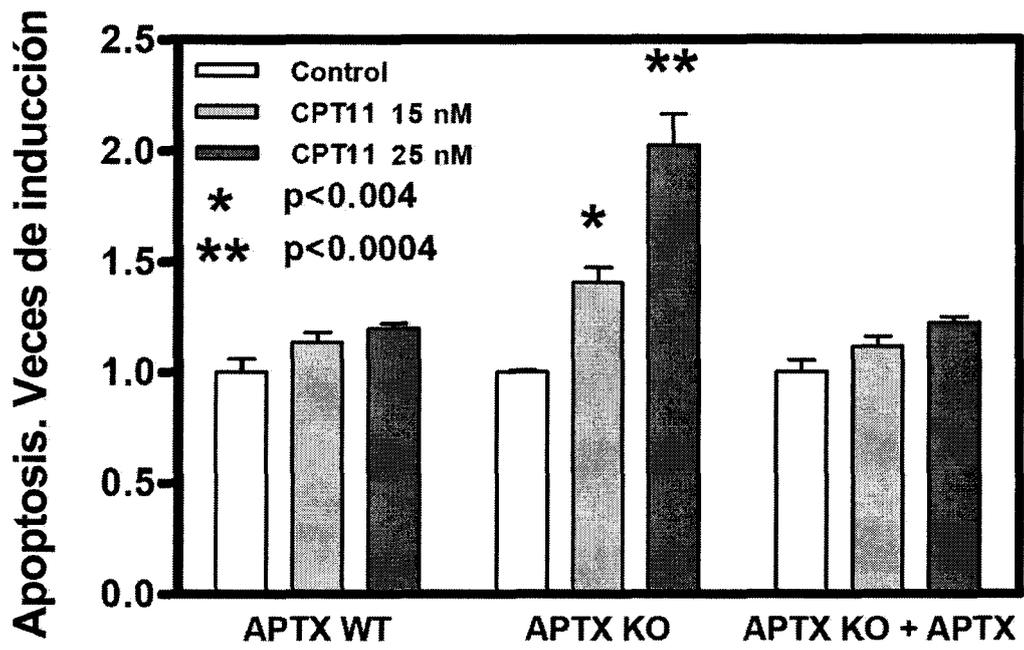
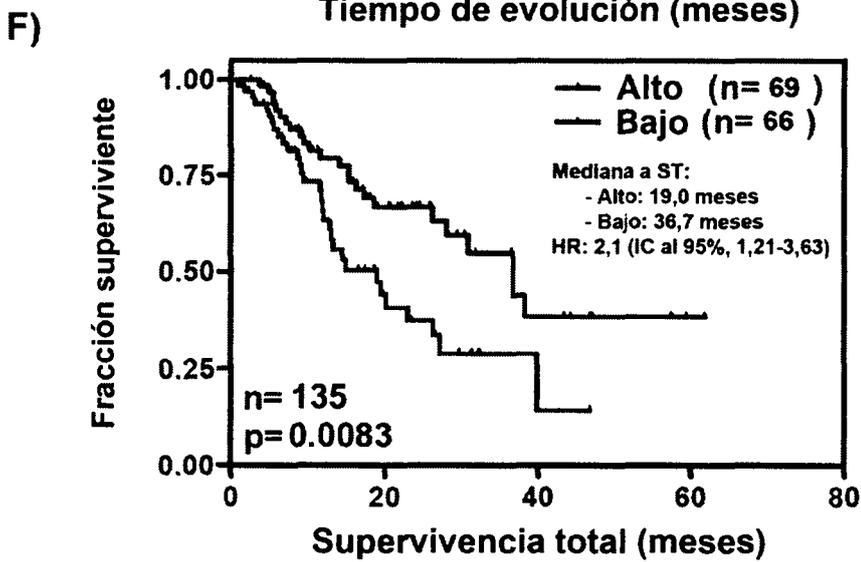
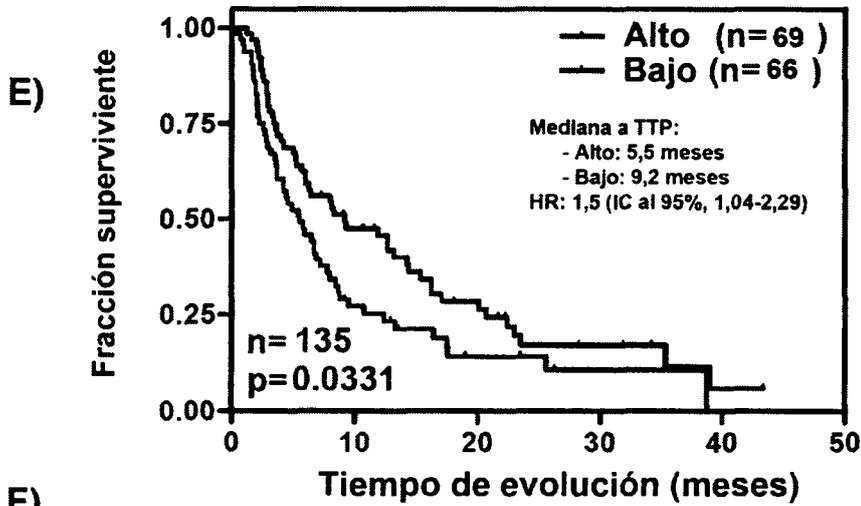
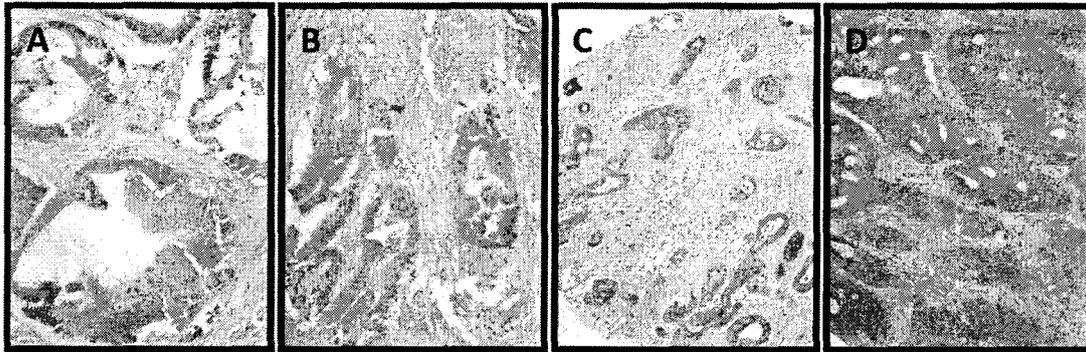


FIGURA 1



**FIGURA 2**



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901817

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.09.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2009099649 A1 (PONIARD PHARMACEUTICALS INC.) 13.08.2009, reivindicaciones.	8,9
X	EMMANOUILIDES, C. et al., 'Front-line bevacizumab in combination with oxaliplatin, leucovorin and 5-fluorouracil (FOLFOX) in patients with metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II study.', BMC CANCER, 2007, Vol. 7, página 91, ISSN: 1471-2407, Métodos; Resultados.	8,9
X	CHUA, Y.J. et al., 'Recent data with anti-epidermal growth factor receptor antibodies and irinotecan in colon cancer.', CLINICAL COLORECTAL CANCER, 2005, Vol. 5, Suppl. 2, páginas S81-S88, ISSN: 1533-0028, Métodos; Resultados.	8,9
A	MARIADASON, J.M. et al., 'Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin.', CANCER RESEARCH, 2003, Vol. 63, No. 24, páginas 8791-8812, ISSN: 0008-5472, Resultados, Tablas 2 y 4.	1-15
A	ALLEN, W.L. et al., 'Clinical determinants of response to irinotecan-based therapy derived from cell line models.', CLINICAL CANCER RESEARCH, 2008 Oct, Vol.14, No. 20, páginas 6647-6655, ISSN 1078-0432, todo el documento.	1-15
A	WO 2008112749 A1 (VERIDEX LLC) 18.09.2008, todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
01.03.2011

Examinador  
J. Vizán Arroyo

Página  
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.03.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7, 10-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 8, 9	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7, 10-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<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 se publica.

**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	WO 2009099649 A1	13.08.2009
D02	EMMANOUILIDES, C. et al., <i>BMC Cancer</i> , (2007), 7: 91.	2007
D03	CHUA, Y.J. et al., <i>Clin. Colorectal Cancer</i> , (2005), 5(Suppl 2): S81-8.	2005
D04	MARIADASON, J.M. et al., <i>Cancer Res.</i> , (2003), 63(24): 8791-812.	2003
D05	ALLEN, W.L. et al., <i>Clin. Cancer Res.</i> , (2008 Oct), 14(20): 6647-55.	2008
D06	WO 2008112749 A1	18.09.2008

En D1-D3 se divulga la utilización de un agente basado en platino, de un inhibidor de VEGF y de un inhibidor de EGF y de algunas de sus combinaciones posibles en el tratamiento del cáncer colorrectal.

En D4 se analiza la predicción de la respuesta al tratamiento del cáncer colorrectal con 5-Fluorouracilo y Camptotecina basada en el análisis de la expresión génica.

En D5 se analizan los determinantes clínicos asociados a la respuesta al Irinotecano en el tratamiento terapéutico del cáncer colorrectal.

En D6 se describen métodos para determinar la respuesta al tratamiento terapéutico de la leucemia mieloide aguda.

**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**

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicación independiente 8.

En los documentos D1-D3 se divulga el uso de un agente basado en platino (cf. D1-D2), de un inhibidor de VEGF (cf. D1-D2), de un inhibidor de EGF (cf. D3) y de alguna de sus combinaciones (cf. D1) en el tratamiento del cáncer colorrectal.

Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 8 y el de la dependiente 9 se considera que no es nuevo ni tiene actividad inventiva sobre la base de los documentos D1-D3.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 8 y 9 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.