

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 292**

21 Número de solicitud: 201031137

51 Int. Cl.:

G01N 33/573 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **22.07.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
02.02.2012

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es: **Carrera Ramírez, Ana Clara**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer.**

57 Resumen:

Biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer.

La presente invención proporciona un nuevo biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer, preferiblemente de mama y colon, el gen *PIK3R2* o cualquiera de sus productos de expresión; ya que niveles elevados de *PIK3R2* correlacionan con estadios tumorales avanzados, y en el caso de cáncer de mama, con capacidad invasiva o metastásica. Así, la invención también se refiere a un método de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer, preferiblemente de mama o de colon, en el que es necesaria la cuantificación de dicho biomarcador en una muestra biológica que comprende células tumorales.

DESCRIPCIÓN

Biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer.

5 La presente invención se encuadra en el campo de la oncología, específicamente, dentro de los biomarcadores útiles para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de tumores malignos, preferiblemente de mama y de colon, y de los métodos de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de dichos tumores en los que es necesaria la cuantificación de tales biomarcadores. La invención también se refiere al uso de compuestos inhibidores de estos biomarcadores para el tratamiento del cáncer, preferiblemente, de colon y mama.

10

Estado de la técnica anterior

15 En cáncer, los factores pronósticos y predictivos son de gran utilidad en la toma de decisiones médicas sobre el manejo y tratamiento de la enfermedad. Así, por ejemplo, en el caso de cáncer de mama, se consideran validados como factores pronósticos los siguientes: el estado de los ganglios axilares, el tamaño tumoral, el tipo y grado histológico, la edad del paciente, y otros factores como los biomarcadores, medibles en tejidos, células y fluidos, como el estado de los receptores esteroideos (RE-RP). En este último grupo, la sobreexpresión del c-erbB-2, el estado del p53, la evidencia histológica de invasión vascular y los parámetros cuantitativos de angiogénesis, han sido extensamente estudiados clínica y biológicamente, pero no tienen un papel establecido en el manejo de los pacientes, por lo que estos parámetros no son suficientes para predecir el curso de la enfermedad.

20 Las fosfoinosítido 3-quinasas (PI3K) son enzimas lipídicas que fosforilan la posición 3D del anillo de inositol de los fosfoinosítidos (PtdIns) de membrana para generar PtdIns(3,4)P₂ (PIP₂) y PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃), los cuales son capaces de activar rutas como la de la proteína quinasa B (PKB o Akt) que inducen división celular y supervivencia (Kok K., *et al.*, 2009, *Trends Biochem. Sci.* 34: 115-127).

25 Las PI3K son heterodímeros compuestos por una subunidad p85 reguladora y una subunidad p110 catalítica. Existen cuatro subunidades catalíticas codificadas por los genes *PIK3CA*, *CB*, *CD* y *CG*. De éstas p110 g (*PIK3CG*) se asocia a las subunidades reguladoras p87 o p101 y se activa por receptores asociados a proteínas G, mientras que las demás subunidades catalíticas se asocian a subunidades reguladoras tipo p85 y se activan principalmente por receptores con actividad tirosina quinasa. p85 regula la estabilidad de p110 y media su translocación a la membrana y su activación tras la estimulación de receptores de factores de crecimiento. Existen tres genes que codifican subunidades tipo p85, los ubicuos *PIK3R1* (p85 α) y *PIK3R2* (p85 β), y el específico de tejido *PIK3R3* (p85 γ) (Yuan T.L. y Cantley L.C., 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 9739-9744).

30 PI3K regula la división, migración y supervivencia celular y es conocido que mutaciones que inducen activación aberrante de esta ruta, incluyendo la delección del regulador negativo, la fosfatasa PTEN, mutaciones activadoras de *PIK3CA* y expresión aumentada de *PIK3CB* o *PIK3CD*, son frecuentes en cáncer. La sobreexpresión y mutación de genes que codifican para las subunidades p110 catalíticas en cáncer han sido estudiadas extensivamente (Cully M., *et al.*, 2006, *Nat Rev Cancer* 6: 184-192). El gen *PIK3R1* (p85 α) ha sido identificado como oncogén implicado en procesos tumorales en colon y ovario (Amanda J. Philp, *et al.*, 2001, *Cancer Research* 61: 7426-7429). Asimismo, un análisis del perfil de expresión de los ARNm de los genes PI3K en diferentes tipos de tumores (Lin Zhang, *et al.*, 2007, *Clinical Cancer Research* 13(18): 5314-5321) mostró que 6 de ellos presentan una ganancia en su número de copias en las células tumorales de ovario, así como en otros tipos de cáncer, como cáncer de colon o de mama, respecto a los tejidos normales correspondientes. En este sentido, se ha propuesto el gen *PIK3R3* como diana terapéutica, por ser el gen de sobreexpresión más significativa en los tumores analizados.

35 Ya que la actividad PI3K se encuentra incrementada en procesos hiperproliferativos, esta enzima se ha propuesto como diana terapéutica en cáncer. En este sentido, por ejemplo, la perifosina posee efectos inhibidores sobre las células tumorales en cáncer de mama, entre otros tipos de cáncer, a través de la inhibición de la vía de señalización PI3K (Bryan T. Hennessy, *et al.*, 2007, *Clinical Cancer Research* 13(24): 7421-7431).

40 No obstante, continúa existiendo la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores con los que poder diagnosticar, ya no la ausencia o presencia de tumores, sino estadios tumorales avanzados en pacientes de cáncer. De esta manera, se facilitaría el seguimiento de la enfermedad y se podrían establecer valoraciones predictivas sobre el curso de la misma, como por ejemplo, capacidad invasiva del tumor, y así, orientar la toma de decisiones médicas en cuanto al tratamiento más adecuado a administrar en cada caso clínico particular.

60

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un nuevo biomarcador de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer, el gen *PIK3R2* o cualquiera de sus productos de expresión, así como un método de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de esta enfermedad, preferiblemente de cáncer de mama o de colon, que comprende su cuantificación en una muestra biológica conteniendo células tumorales.

65

Como muestran los ejemplos de la presente invención, los tumores, preferiblemente de mama y colon, presentan un cambio en la subunidad reguladora de PI3K utilizada incrementando la expresión de p85 β (*PIK3R2*) y reduciendo la de p85 α (*PIK3R1*). Este cambio a p85 β correlaciona con progresión tumoral, es decir, fenotipos tumorales malignos presentan altos niveles de expresión de este gen en comparación con los tejidos no tumorales. En el caso de carcinomas de colon, la expresión de *PIK3R2* se encuentra relacionada con el grado tumoral y en el caso de cáncer de mama, los niveles de expresión de *PIK3R2* correlacionan con capacidad metastásica o invasiva. Así, la presente invención demuestra que el análisis de la expresión del biomarcador *PIK3R2* es un método útil para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la progresión tumoral.

Por ello, un aspecto de la invención se refiere al uso del gen *PIK3R2* o de sus productos de expresión para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer. En una realización preferida, el cáncer es cáncer de mama o de colon.

Se entiende por “diagnóstico” el procedimiento mediante el cual se identifica el grado o estadio de una enfermedad, preferiblemente, neoplásica. En el contexto de la presente invención, se refiere a la identificación de un estadio avanzado en un tumor de un individuo o a la identificación de un tumor invasivo o metastásico. El término “pronóstico” se refiere al procedimiento mediante el cual se establece una predicción de los sucesos que ocurrirán en el desarrollo o curso de una enfermedad, preferiblemente, neoplásica, incluyendo recaída, capacidad de diseminación metastásica o respuesta a un determinado tratamiento.

La secuencia nucleotídica codificante del gen *PIK3R2* es la de número de referencia en el GenBank NM_005027. El término “producto de la expresión”, tal y como se utiliza en esta descripción, hace referencia a cualquier producto de transcripción (ARN, incluyendo formas de reordenamiento alternativo) o expresión (proteína) de este gen, o a cualquier forma resultante del procesamiento de dichos productos de transcripción o expresión. Los productos de expresión de este gen son, preferiblemente, el ARNm codificante para la proteína p85 β o la proteína p85 β .

El término “cáncer”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la enfermedad neoplásica en la cual las células, de morfología anormal, presentan un crecimiento descontrolado llegando a generar un tumor. Ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitarse, cáncer de hígado o hepatocarcinoma, de próstata, de pulmón, pancreático, de colon, de mama, cánceres ginecológicos, como el de ovario, útero, cérvix, vagina o vulva, cáncer de piel, como el melanoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer tiroideo, cáncer renal, cáncer de cerebro, sarcoma, linfoma o leucemia.

Se entiende por “cáncer de mama” el tipo de neoplasia maligna que tiene su origen en la proliferación acelerada y descontrolada de células que tapizan el interior de los conductos que durante la lactancia llevan la leche desde los acinos glandulares hasta los conductos galatóforos situados detrás de la areola y el pezón, o bien el tipo de neoplasia maligna que tiene su origen en los propios acinos glandulares. Dentro de este término se incluyen, aunque sin limitarnos, el adenocarcinoma, localizado en el tejido glandular; el cistosarcoma; el sarcoma; el carcinoma ductal, localizado en los conductos mamarios o galactóforos; el carcinoma lobulillar o lobular, dentro del cual se incluye la neoplasia lobular; el cáncer inflamatorio de mama, donde las células cancerosas bloquean los vasos linfáticos, lo cual se manifiesta en la piel que adquiere una apariencia gruesa y ahuecada; el cáncer de Paget, que se propaga por la piel del pezón y de la areola, las cuales aparecen escamosas y rojizas; el cáncer mucinoso o coloide, en el que las células cancerosas producen cierta mucosidad; o el cáncer medular, un tumor infiltrante. El cáncer de mama se puede detectar mediante técnicas conocidas en el ámbito biomédico como por ejemplo, aunque sin limitarnos, mamografía, resonancia magnética, ultrasonografía o biopsia.

El “cáncer colorrectal” o “cáncer de colon”, incluye cualquier tipo de neoplasia del colon, recto o apéndice. El cáncer de colon se puede detectar mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, tacto rectal, prueba de sangre oculta en heces (PSOH), sigmoidoscopia, colonoscopia, colonoscopia virtual, enema de bario con doble contraste, ecografía, biopsia o resonancia magnética nuclear (RMN).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer, de ahora en adelante “método de la invención”, que comprende:

- a. obtener una muestra biológica aislada que comprende células tumorales de un individuo,
- b. detectar la cantidad de producto de expresión del gen *PIK3R2* en la muestra biológica aislada de (a), y
- c. comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

El término “muestra biológica aislada que comprende células tumorales”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica puede ser un tejido, por ejemplo, pero sin limitarse, una biopsia tumoral o un aspirado por aguja fina, o puede ser un fluido biológico, por ejemplo, pero sin limitarse, una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, linfa, fluido ascítico, orina o exudado mamario. La muestra puede ser tomada de un humano, pero también de mamíferos no humanos, como por ejemplo, pero sin limitarse, roedores, rumiantes, felinos o caninos. Por ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención,

el individuo del cual procede la muestra biológica aislada del paso (a) del método de la invención es un mamífero. En una realización más preferida, el mamífero es un humano.

La detección de la cantidad de producto de la expresión del gen *PIK3R2* en la muestra obtenida, se refiere a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semicuantitativa o cuantitativa. Esta medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de la expresión del gen basada en una señal que se obtiene directamente del producto de la expresión del gen y que está correlacionada directamente con el número de moléculas del producto de la expresión del gen presente en la muestra. Dicha señal - a la que también podemos referirnos como señal de intensidad - puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física del producto de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del producto de la expresión génica) o un sistema de medida biológica (por ejemplo, la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiquetas" o productos de reacción enzimática).

De acuerdo con la presente invención, la detección de la cantidad de producto de la expresión del gen puede ser llevada a cabo por cualquier método de determinación de la cantidad del producto de la expresión de los genes conocido por el experto en la materia. En una realización preferida, la detección de la cantidad de producto de la expresión del gen se realiza determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total de la muestra biológica aislada lo cual puede llevarse a cabo por métodos conocidos por un experto en la materia. El análisis del nivel de ARNm se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RTLPCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; microarrays de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de mareaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. En otra realización preferida, la detección de la cantidad de producto de la expresión del gen se realiza determinando el nivel de proteína p85 β , mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, inmunohistoquímica o western blot. Finalmente, dado que la capacidad de traducción de *PIK3R2* a proteína p85 β se inhibe por el microARN-126, otra realización preferida incluye, como método indirecto de determinación de los niveles de p85 β , la medida de los niveles de expresión del microARN-126.

El término "cantidad de referencia", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier valor o rango de valores derivado de la cuantificación del producto de la expresión del gen *PIK3R2* en una muestra biológica control. En una realización preferida, la cantidad de referencia procede de una muestra biológica aislada que no comprende células tumorales (muestra biológica control), donde dicha muestra puede proceder del individuo del paso (a) o de otro individuo.

En otra realización preferida, el método de la invención además comprende:

d. asignar al individuo del paso (a) al grupo de pacientes con estadio tumoral avanzado cuando la cantidad detectada en el paso (b) es superior a la cantidad de referencia.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término "estadio tumoral avanzado" se refiere a la etapa o fase tumoral en la que las células neoplásicas o de crecimiento descontrolado han alcanzado capas profundas de tejido, y que puede cursar o no con metástasis.

En el caso de, por ejemplo, aunque sin limitarnos, cáncer de colon, las muestras con niveles de expresión de *PIK3R2* (o bien de p85 β) normales, es decir, no superiores a la cantidad de referencia, correlacionan con bajos grados de desarrollo tumoral, como por ejemplo, pero sin limitarnos, grados de 0 a A según la escala de estratificación de Dukes. Sin embargo, las muestras con un contenido elevado en producto de expresión del gen *PIK3R2*, es decir, con un nivel de expresión de este gen superior a la cantidad de referencia, presentan un mayor grado tumoral (grados a partir de A, es decir, B, C o D) que aquellas muestras con niveles de expresión de este gen normales. En este sentido, a mayor cantidad de producto de expresión del gen *PIK3R2* en la muestra biológica analizada, más avanzado es el estadio tumoral del individuo del cual procede la misma. Por ello, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es cáncer de colon.

En ocasiones puede ocurrir que las células comprendidas en un tumor de estadio avanzado presenten un fenotipo invasivo o metastásico. El término "cáncer invasivo", tal y como aparece en la presente invención, se refiere al tipo de cáncer en el cual las células comprendidas en el tumor poseen capacidad para metastatizar a otros tejidos.

En una realización más preferida, el cáncer es cáncer de mama. En el caso de este tipo de cáncer, las muestras que presentan elevados niveles de expresión del gen *PIK3R2* (o bien de p85 β), es decir, niveles de expresión de este gen/proteína superiores a la cantidad de referencia, proceden de regiones alrededor de las cuales hay un elevado

porcentaje de nódulos linfáticos que presentan células tumorales. Esto significa que las muestras con niveles de expresión de este gen superiores a la cantidad de referencia presentan células con mayor capacidad invasiva que las células comprendidas en las muestras con niveles normales de expresión de este gen. Por ello, en una realización aun más preferida, cuando el cáncer es cáncer de mama, el método de la invención que comprende los pasos (a) a (c) además comprende:

- d. asignar al individuo del paso (a) al grupo de pacientes con cáncer invasivo cuando la cantidad detectada en el paso (b) es superior a la cantidad de referencia.

Los pasos (b) y/o (c) del método de la invención pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante un equipo robótico para la detección, en el paso (b), de la cantidad del gen *PIK3R2* o del producto de expresión del gen *PIK3R2* en la muestra biológica aislada.

Además de los pasos especificados anteriormente, el método de la invención puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo, aunque sin limitarnos, relacionados con el pre-tratamiento de la muestra biológica aislada previamente a su análisis.

Por tanto, el método de la invención es útil para establecer el diagnóstico (estadio), pronóstico y seguimiento de cáncer, detectar la presencia de metástasis ocultas y recidivas, monitorear la respuesta a un tratamiento e incluso para realizar muestreos en la población.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer, de ahora en adelante “kit de la invención”, que comprende los cebadores, sondas o anticuerpos, o cualquiera de sus combinaciones, necesarios para detectar la cantidad de producto de expresión del gen *PIK3R2* en una muestra biológica aislada.

Los cebadores, sondas y/o anticuerpos comprendidos en el kit de la invención presentan complementariedad, y por tanto, capacidad de hibridación, con al menos un producto de la expresión del gen *PIK3R2*. Preferiblemente, el kit de la invención además comprende cebadores, sondas o anticuerpos, o cualquiera de sus combinaciones, complementarios al microARN-126. En general, el kit de la invención comprende todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención descrito anteriormente. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, enzimas, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit puede contener además otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer. En una realización preferida, el cáncer es cáncer de mama o de colon.

Por otro lado, cuando *p85 β* se asocia con la subunidad catalítica *p110 α* , el heterodímero formado tiene una mayor afinidad por el sustrato fisiológico presente en la membrana celular, lo que resulta en un aumento de la actividad PI3K y en progresión tumoral. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de al menos un inhibidor del gen *PIK3R2* o de sus productos de expresión para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer. En una realización preferida, el cáncer es cáncer de mama o de colon. En una realización más preferida, el cáncer es cáncer de mama.

En la presente invención se entiende por “inhibidor” todo compuesto que permite reducir, bloquear o eliminar la expresión del gen *PIK3R2* o el transporte o actividad de alguno de sus productos de expresión. Ejemplos de inhibidores de este tipo son, aunque sin limitarnos, siRNAs o microRNAs complementarios al ARNm producto de la transcripción de este gen; o inhibidores de la proteína *p85 β* como son, por ejemplo, aunque sin limitarnos: péptidos que deslocalicen *p85 β* o que desplacen su asociación con *p110*.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra el nivel de expresión, mediante Q-PCR, de *p85 β* (*PIK3R2*, R2) (eje x) y *p85 α* (*PIK3R1*, R1) (eje y) en carcinomas de mama (BC) y de colon (CC). n=número de muestras. Inactivo: muestras con actividad PIK3 inactiva. Activo: muestras con actividad PIK3. Los valores de R2 son iguales o mayores que en el tejido normal adyacente. Los valores de R1 en los CC son iguales (R1 normalizado = 0) o menores (R1 <0) que en el tejido normal; los valores de R1 en los BC son menores (R1 normalizado entre -2 y -3); o exhiben pequeños cambios (R1 entre -1 y +1) con respecto al tejido normal. (*) Chi-cuadrado, P=0,016 (BC) y 0,012 (CC).

ES 2 373 292 A1

Fig. 2. Muestra que el aumento en la expresión de p85 β correlaciona con progresión tumoral. (a) Los niveles de p85 α y p85 β se examinaron en Western Blot (WB) en diferentes muestras de BC y CC. Las gráficas muestran la intensidad de la señal de p85 α y p85 β (indicado R1 y R2) en unidades arbitrarias (A.U.) normalizadas frente a Actina. Las flechas indican los niveles normales de expresión de p85 α y p85 β . Los valores de mRNA (analizados por Q-PCR) de R2 y R1 normalizados se indican en la parte inferior, (b) Porcentaje de CC con niveles iguales (igual) o superiores (elevado) de PIK3R2 (R2) medido por Q-PCR en el tumor comparado con el tejido normal. Los tumores se agruparon según el grado de actividad de PI3K (activo/inactivo). (*) valor Chi-cuadrado para estos datos P=0,02. (c, d) Grado tumoral en muestras de carcinoma de colon (CC) con PI3K activa o inactiva (c), o en la colección completa de tumores (d) representado frente a los valores de expresión de R2 por Q-PCR. Los CC de grado entre 0-A se representan con los de grado 0. (**) Chi-cuadrado P=0,001 (c) y 0,002 (d). (e) Porcentaje de carcinomas de mama (BC) según los niveles de expresión de R2 medidos por Q-PCR. (*) Chi-cuadrado P=0,04. (f) Grado tumoral en BC con PI3K activa o inactiva en relación a los niveles de R2 por Q-PCR. *n.s.*; no significativo, (g) Invasión/metástasis de BC determinado como porcentaje de nodos linfáticos (LN) con células tumorales infiltradas con respecto a LN totales, representados frente a los niveles de R2. (**) test de Pearson P=0,002; se comparan muestras con R2 muy elevado (≥ 2), elevado (1) o igual al tejido adyacente normal (0). (***) Pearson P=0,0008.

Fig. 3. Muestra el aumento de la activación de la ruta de PI3K en células que expresan p85 β . (a) Células COS-7 se transfectaron con pSG5-p110 α combinado con pSG5-p85 α o -p85 β (24 h), a continuación se incubaron (1) en medio sin suero (48 h); (2) algunas muestras se activaron posteriormente con suero (10%) o (3) PDGF (50 ng/ml) 10 min. Exponencial: células COS-7 en crecimiento exponencial. Control: células COS-7 sin transfectar. Muestra los niveles de expresión de proteína y activación de los efectores de PI3K (geles inferiores) examinados por WB, usando Actina como control, (b) Muestra la cuantificación de la señal de los efectores de PI3K pPKB y pp70S6K de tres experimentos en células control y transfectadas (media \pm Desviación estándar, n=3; AU). (c) Las células HeLa se transfectaron con p85 β siRNA (100 nM, β 1 y 200 nM, β 2), (24 y 48 h); se prepararon extractos y se ensayaron por WB para estudiar la eficiencia de los siRNA en la reducción de los niveles de p85 β , así como la fosforilación de los efectores PKB y p70S6k, usando Actina como control. Ctr: extractos de células control, transfectadas con el siRNA control. Gráficas como en (b). (*) test *t* de Student P<0,01.

Fig. 4. Muestra que p85 β aumenta el contenido de PIP $_3$ en la membrana e induce transformación celular. (a) Células NIH3T3 se transfectaron con GFP-Btk-PH en combinación con p85 α /p110 α , o p85 β /p110 α (24 h), se incubaron (19 h) en medio sin suero (quiescencia) o se activaron con suero (15 min; derecha). Control: células no transfectadas. La localización de PIP $_3$ (GFP-Btk-PH) se examinó por microscopía de fluorescencia. Las flechas indican las secciones en las que se midió la señal de fluorescencia (AU). (b) Porcentaje de células con la señal de PIP $_3$ concentrada en la membrana, el citosol o ambas (intermedio), y de las células con morfología discoidal, mesenquimal, o intermedia, (c) Ensayos de formación de focos representativos en células NIH3T3 control y en células transfectadas con p85 α , p85 β o V12-Ras (media \pm Desviación estándar, n = 6). (**) test *t* de Student P<0,001. Barra = 15 μ m.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del método de la invención en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer, preferiblemente de mama y de colon. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Alteraciones en la ruta PI3K en tumores clínicos de colon y mama

Se examinó el estado de la ruta de PI3K en una colección de adenocarcinomas de colon (CC) y de carcinomas ductales de mama (BC) comparándolos con el tejido adyacente normal. Se diseñó un protocolo para analizar estas muestras que incluyó análisis por inmunohistoquímica (IH), PCR cuantitativa (Q-PCR) y análisis por Western blot (WB).

Tanto las muestras de carcinoma de mama (BC) como de colon (CC) y las muestras de tejidos normales adyacentes fueron obtenidas de la colección de tumores del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid, España).

En la inmunohistoquímica, las señales de intensidad estaban en un rango de 1 a 3 (1, bajo nivel de tinción; 2 era ≥ 3 veces superior al fondo; 3 era ≥ 6 veces superior al fondo). Para el análisis por WB se lisaron secciones congeladas de las muestras en buffer RIPA; la señal de WB fue cuantificada y normalizada cargando controles de actina. Dichas señales fueron medidas en un rango de -2 hasta +2 (0 indica sin cambios, ± 1 refleja un aumento o disminución de entre el 20% y el 50%; y ± 2 cambios superiores al 50%).

ES 2 373 292 A1

Para el análisis por Q-PCR, se obtuvo el ARNm de las muestras congeladas y se analizó en custom-designed TaqMan Low Density Arrays (LDA, Applied Biosystems) que contenía los cebadores y las sondas de los genes de PI3K y de sus reguladores. Como ARN molde para la transcripción reversa, se utilizó 1 ng de ARN total por muestra (triplicado).

5

La Q-PCR se realizó en un ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems). Las sondas de LDA utilizadas fueron *GAPDH* (sonda Hs4342376), *ACTB* (Hs99999903), *AKT1* (Hs00178289), *AKT2* (Hs00609846), *AKT3* (Hs00178533), *IGF1* (Hs00153126), *IGF1R* (Hs00609566), *IGF2* (Hs00171254), *IGFBP3* (Hs00426287), *SHIP1* (Hs00183290), *PIK3CA* (Hs00180679), *PIK3CB* (Hs00178872), *PIK3CD* (Hs00192399), *PIK3CG* (Hs00176916), *PIK3R1* (Hs00236128), *PIK3R2* (Hs00178181), *PIK3R3* (Hs00177524) y *PTEN* (Hs00829813). Para *PIK3CG* y *PIK3R1*, también se utilizaron Hs00277090 y Hs00381459.

10

La cuantificación relativa de ARNm se determinó por el método $\Delta\Delta C_t$. Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (<1 representa disminución y >1 representa aumento). Para facilitar la comparación, los diferentes valores se normalizaron en un rango de -3 hasta +3 (donde 0 indica sin cambios o insignificantes ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ entre 0,6-1,2); 1-3 indica aumento, 1 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 1,2-3,0), 2 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 3,0-6,0), 3 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ >6); y los valores negativos indican un descenso -1 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 0,6-0,3), -2 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 0,3-0,1), -3 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ $<0,1$)).

15

Los anticuerpos primarios empleados para el WB fueron anti-fosfo-(p)-PKB (Ser473), -p-p70s6k (Thr389), -p-PKC (zeta-Thr410) de Cell Signaling; anti-pan-p85 PI3K, -humano p85 α y -PKB de Upstate Biotechnology; -p70S6K (C-18) y -PTEN (N-19) de Santa Cruz Biotechnology. Anti-HA (12CA5) era de Babeo y anti- β -actina de Sigma-Aldrich. El Anti-p110 α fue donado por A. Klippel. Los anticuerpos Anti-p85 β PI3K (rat Ab 1C8,) y anti-HA (12CA5) se utilizaron para la inmunoprecipitación (IP). Para los anticuerpos anti-p85 β , se inmunizaron ratones con el péptido KLH-conjugado C-terminal (residuos 711-722 de p85 β) o ratas con un fragmento GST-fusionado en N-terminal. El anticuerpo Anti-p85 β -específico fue testado en ELISA, WB e IP utilizando proteínas recombinantes de bacteria o células que expresaban los extractos r-p85 β o r-p85 α . El anticuerpo de conejo K1123 reconocía fuertemente p85 β en WB y p85 α ligeramente. El anticuerpo monoclonal (mAb) de rata 1C8 era eficiente en el reconocimiento de p85 β por WB e IP, pero no reconocía p85 α ; este mAb fue purificado por afinidad (kit GST; Pierce).

20

La inmunoprecipitación se realizó según lo descrito (Marqués M., *et al.*, 2008, *Mol Cell Biol.*, 28: 2803-2814). Para el WB, se lisaron las células en medio 1% Tritón X-100 (TX-100) que contenía inhibidores de la proteasa y de la fosfatasa. Las líneas de tumores humanas se lisaron en medio RIPA conteniendo inhibidores de la proteasa e inhibidores de fosfatasa.

30

Para la IH, las primeras 10 muestras se analizaron utilizando anticuerpos (Ab) anti-fosfo-PKB (P-PKB), sin embargo, los anticuerpos anti-fosfo-S6 (p-S6; Cell Signalling) dieron una señal mejor y más consistente y por ello fueron utilizados para el resto de las muestras. Para examinar los niveles de ARNm de los miembros de la ruta de PI3K, se utilizaron las tarjetas TaqMan mencionadas (que denominaremos PIP-chip); para WB se utilizaron los anticuerpos anteriormente descritos que reconocen las distintas subunidades catalíticas y reguladoras de PI3K y sus reguladores. El análisis completo se llevó a cabo en un 95% de los CC y en un 85% de los BC.

35

40

Para los análisis estadísticos, la relación entre las variables del tumor fue ensayada mediante el test de Pearson y la contingencia de los parámetros de los tumores por el test de Chi-cuadrado se calcularon utilizando Prism5V.5.0b software. Las bandas de gel y la intensidad de la fluorescencia se cuantificaron mediante ImageJ software. El test *t* de Student se realizó utilizando StatView 512+.

45

La IH mostró que la mayoría de las muestras eran heterogéneas, ya que solo una fracción de las células tumorales en un determinado tumor era positiva para p-S6. Se clasificaron como muestras activas aquellas en que la proporción de positividad para p-S6 o p-PKB era mayor del 50%, o bien cuando eran altamente positivas un 30 a 40% de las células (3 en una escala de 1 a 3). La actividad PI3K también se ensayó por WB utilizando Ab anti-pPKB y -pp70S6K; aproximadamente el 80% de las muestras de carcinoma que fueron positivas por IH también fueron positivas por WB. Solo cuando la proporción de células positivas en un tumor era muy baja, no se detectaba positividad por WB. El análisis por IH y WB mostró que un tercio de las muestras de BC y un 55% de las muestras de CC tenían activada la ruta de PI3K, resultados dentro del rango de estudios previos. En CC, la actividad de esta ruta correlacionó con el estadio tumoral (de acuerdo con el criterio de Dukes, estratificación A a D) (DeVita V.T., *et al.*, 2005, Philadelphia USA. P. 1239-1242). Para carcinoma de mama (BC, grados Bloom Richardson I a III) (Bloom M.J., *et al.*, 1962, *Br Med J.* 5299, 213), la correlación no fue estadísticamente significativa aunque los tumores avanzados (grado II/III o III) presentaban frecuentemente PI3K activa, sin embargo, en estos tumores sí hubo correlación de niveles de p85 β con invasividad como se muestra más adelante.

50

55

60

Se examinó si el estado de activación de la ruta de PI3K correlacionaba con cambios en los niveles de ARNm de los principales reguladores de la vía de PI3K. Usando PIP-chip, se midieron los niveles de las subunidades catalíticas p110, las subunidades reguladoras p85, SHIP1, PTEN y las isoformas de PKB, así como de los elementos de la vía de IGF. Este ensayo se complementó con la evaluación por WB de los niveles de proteína de la mayoría de estas moléculas en 10 muestras, aproximadamente. La alteración de los ARNm que codifican PTEN, p110 α , β , o δ , p85 α o β , PKB β (AKT2) y SHIP1 fue consistente con los cambios en la expresión de las proteínas correspondientes por WB (en el 75% o más de los casos examinados). La regulación postranscripcional o postraduccional podría explicar la falta de correlación en el 100% de los casos.

65

Los análisis PIP-chip y WB detectaron que, en una alta proporción de muestras de BC y CC con PI3K inactiva, la proteína PTEN tenía una elevada expresión; la diferencia en la expresión de PTEN entre las muestras con PI3K activa o inactiva fue significativa en el caso de BC (n=22).

Además de la mutación de *PIK3CA*, previamente observada en varios tipos de tumores, la expresión del ARNm de *PIK3CB* estaba incrementada en el 25% de los CC y en aproximadamente el 15% de los BC, mientras que la de *PIK3CD* estaba incrementada en el 20% de los BC y CC; se confirmaron estos cambios de expresión por WB en aproximadamente 10 muestras de tumores de cada tipo. *PIK3CG* también estaba incrementada en el 25% de los BC, pero ya que los WB mostraron muy bajos niveles de proteína, no está claro si este cambio contribuye al comportamiento del tumor. Aproximadamente el 30% de los CC y el 50% de los BC también mostraron aumento de los niveles de *AKT2*, aunque esto no correlacionó con la activación de la ruta, estadio tumoral o invasión de nodos linfáticos.

Se observaron también patrones de expresión característicos de tipo tumoral. PIP-chip Q-PCR mostró que el 60% de los CC, y solo un 8% de los BC, exhibían aumento en la expresión de *SHIP1*, un fenotipo que se encontró principalmente en muestras activas en PI3K. La ruta de IGF estaba alterada en elevada frecuencia en BC (55%) y CC (85%), con aumentos en la expresión de *IGF1R*, más frecuentes en BC, y aumento de los niveles de *IGF2*, más frecuentemente en CC. Sin embargo, la observación más sorprendente fue el cambio en la expresión de las subunidades reguladoras ubicuas de PI3K de clase IA.

Ejemplo 2

Un aumento de los niveles de p85β en carcinoma de colon y mama correlaciona con progresión tumoral

En tejidos normales p85α (*PIK3R1*) se expresa habitualmente a niveles más altos que p85β (*PIK3R2*). Los análisis normalizados por Q-PCR en tarjetas PIP-chip mostraron que >50% de los carcinomas de colon y mama presentaban un aumento en la expresión de *PIK3R2* (p85β). Además el aumento de *PIK3R2* se encontraba en muestras con descenso de los niveles de *PIK3R1* (p85α) (Fig. 1). El aumento de *PIK3R2* por Q-PCR se confirmó en northern blot. Se prepararon anticuerpos específicos para p85 y se confirmaron los aumentos de expresión de p85β en CC y BC por WB (Fig. 2a).

A continuación, se evaluó si el aumento de expresión de p85β correlacionaba con la activación de la ruta de PI3K en CC. Se encontró que las muestras con niveles aumentados de ARNm de *PIK3R2* se encontraban con mayor frecuencia en muestras de CC con PI3K activa (Fig. 2b). Además, mientras que los tumores con niveles de *PIK3R2* normales tenían grados de 0 a 0-A, las muestras con elevado contenido en *PIK3R2* eran de mayor grado (Fig. 2c). De hecho, la expresión de *PIK3R2* correlacionaba con el grado tumoral (Fig. 2d). Así pues en CC el nivel de expresión de *PIK3R2* se puede considerar un biomarcador de progresión tumoral.

Mientras que en CC la estratificación de Dukes describe la penetración de las células tumorales en las capas del tejido, en BC el criterio de Bloom Richardson (BR) describe la diferenciación celular, y para evaluar la invasividad se informa de la proporción de nodos linfáticos (LN) en el entorno del tumor que presentan células tumorales. En BC, aunque los niveles elevados de *PIK3R2* se encontraban con mayor frecuencia en tumores con PI3K activa, los niveles de ARNm de *PIK3R2* también se encontraban aumentados en aproximadamente un 40% de muestras con PI3K inactiva (Fig. 2e). El aumento en los niveles de *PIK3R2* no correlacionó con el grado Bloom Richardson (Fig. 2f), aunque en muestras activas los fenotipos malignos tenían altos niveles de *PIK3R2* (Fig. 2f). Se examinó la posible correlación entre los niveles de ARNm de *PIK3R2* y el fenotipo invasivo/metastásico. El potencial invasivo se cuantificó como porcentaje de LN infiltrado por células tumorales; así, los niveles de *PIK3R2* correlacionaron con capacidad metastásica (Fig. 2g).

Así, la comparación de los niveles de expresión de las subunidades catalíticas y reguladoras de PI3K mostró que el ARNm y la proteína de p85β (*PIK3R2*) aumentan en estos tumores (>50%). El aumento de p85β en carcinomas de colon correlacionó con el grado tumoral. Así pues, en colon, la medida de los niveles de *PIK3R2* puede considerarse un biomarcador de progresión tumoral. En mama, mientras que los niveles de p85β aumentan en muestras con PI3K activo e inactivo, se encontraban más frecuentemente elevados en activos. En carcinoma de mama, el contenido de p85β correlacionó con invasión/metástasis. Por tanto, los niveles de *PIK3R2* en mama pueden indicar la potencial recidiva del tumor y apoyar la decisión de la necesidad de administrar terapia adyuvante.

Por lo tanto, estos estudios muestran que la expresión de *PIK3R2* es un biomarcador para progresión tumoral, ya que esta asociado al grado del tumor en CC y a invasividad en BC.

Ejemplo 3

La activación de la ruta PI3K esta aumentada en células que expresan p85β

Para comparar las actividades de p85α/p110α y p85β/p110α *in vivo*, se examinó el estado de activación de distintos efectores de la ruta de PI3K en células que expresaban p110α recombinante (r) y rp85α o rp85β.

Se cultivaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y células NIH3T3, COS-7 y U2OS como se ha descrito anteriormente (Marqués M., *et al.*, 2008, *Mol Cell Biol.*, 28: 2803-2814). Las células fueron transfectadas con Lipofectamina (Invitrogen). El vector vacío pSG5, pSG5-p85 α , -V12Ras y myc-p110 α ya han sido descritos con anterioridad. El plásmido pEGFP-PH-Btk que codifica el dominio PH de la Tirosina Kinasa de Bruton fue cedido por T. Baila (National Institutes of Health, Bethesda, MD). El vector pT7/T3-U19 que codifica para p85 β murino fue cedido por J.W.G. Janssen (Institute für Humangenetik, Heidelberg, Alemania). El p85 β se subclonó en pSG5, introduciéndose un epítipo de hemaglutinina (HA) en N-terminal. El codon p85 β ATG fue sustituido por una prolina y el codon HA-tag ATG se mantuvo (Quickchange mutagenesis kit; Stratagene). El siRNA control y para p85 β eran de Dharmacon.

Para los ensayos celulares de PI3K, las células permanecían inactivas entre 19 (NIH3T3) ó 48 h (COS7) sin suero; algunas fueron tratadas 10 min en medio que contenía 10% de suero o 50 ng/ml de PDGF (Calbiochem). Los extractos se prepararon en un medio de lisis TX-100; se hizo una IP con la PI3K con el anticuerpo apropiado. Para la inmunofluorescencia, se fijaron las células en paraformaldehído al 4% en PBS (15 min), y se permeabilizaron en PBS con BSA al 1% y 0,3% TX-100, posteriormente se bloquearon con un 1% de BSA, 10% de suero de cabra y 0,01% TX-100 en PBS (30 min). Las células se visualizaron utilizando un objetivo de 60 x 1,3NA PLOIL en un microscopio Olympus Fluoview 1000.

Tras transfectar células COS-7 con los ADNc adecuados se examinó la actividad de las dianas moleculares de PI3K en extractos de células quiescentes o activadas (10 min con medio conteniendo 10% de suero o 50 ng/ml de PDGF). p85 β aparecía asociada a razón 1:1 con p110 α , al igual que p85 α . Los niveles de expresión de p85 α y p85 β fueron comparables; y también lo fue la expresión de rp110 α (aproximadamente 10 veces mayor que los niveles endógenos) (Fig. 3a). El tratamiento con PDGF o con suero aumentó la cantidad de p-PKB, p-p70s6k y p-PKC ζ en las células control; la activación de estos efectores fue mayor en células que expresaban mayores niveles de p110 α (Fig. 3a). Además, a pesar de la similitud de expresión de p85 α /p110 α y p85 β /p110 α , las células p85 β /p110 α , mostraron una mayor activación de los efectores de PI3K incluso en ausencia de suero (Fig. 3a y 3b). Un análisis similar en células NIH3T3 mostró un resultado parecido, aunque la expresión de rp110 α fue solo aproximadamente 2 veces mayor al endógeno y la activación de la ruta en ausencia de suero fue menos prominente. Así pues, *in vivo*, p85 β /p110 α potenció la activación de la ruta de PI3K.

Para demostrar la contribución de p85 β en el control de la activación de la ruta de PI3K *in vivo*, se redujeron los niveles p85 β usando siRNA en células HeLa. El siRNA de p85 β , pero no el siRNA control, redujo los niveles de p85 β y de p-PKB y p-p70s6k en las células (Fig. 3c). Este resultado confirmó la contribución de p85 β en el control de la activación de la ruta de PI3K en células transformadas.

Por tanto, la contribución de *PIK3R2* en progresión tumoral sugiere que terapias dirigidas a reducir la expresión o la acción de p85 β (como siRNAs) son de utilidad para el tratamiento del cáncer.

Ejemplo 4

p85 β aumenta los niveles de PIP₃ de membrana e induce transformación celular

Para confirmar la mayor actividad de p85 β /p110 α por su sustrato fisiológico PtdIns(4,5)P₂, se examinó la formación de PIP₃ *in vivo* co-transfectando p85 β /p110 α o p85 α /p110 α con la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada al dominio PH de Btk, que une selectivamente PIP₃. Se analizaron los niveles de Btk-PH en la membrana celular en células NIH3T3 quiescentes y tratadas con suero (10 min) que expresaban p85 β /p110 α o p85 α /p110 α .

Los niveles de expresión de Btk-PH fueron similares en células control y en las células transfectadas con p85 β /p110 α y p85 α /p110 α . En células control, Btk-PH se localizaba en el citoplasma y en el núcleo (Fig. 4a). La adición de suero produjo una relocalización de parte del Btk-PH a la membrana celular tanto en células control como en células p85 α /p110 α . Sin embargo, en células quiescentes p85 β /p110 α la mayoría de Btk-PH estaba en la membrana, y esta fracción aumentó al añadir suero (Fig. 4a). La cuantificación de la señal de fluorescencia en un número de muestras elevado (n=50) confirmó que este fenotipo era general (Fig. 4b). Además, la incubación con suero indujo un cambio de morfología discoidal/epitelial a mesenquimal (Fig. 4a). Comparado con células control, el porcentaje de células con morfología mesenquimal estaba levemente aumentado en células p85 α /p110 α ya que estas expresan niveles más altos de p110 α (Fig. 4b). Además, una gran proporción de las células p85 β /p110 α mostraron esta morfología migratoria previamente a la adición de suero (Fig. 4b). Estos resultados indican que la expresión de p85 β aumenta los niveles de PIP₃ en la membrana y causa un fenotipo migratorio.

Dado el efecto de p85 β en la actividad de PI3K, y la función de PI3K en la transformación celular, se utilizó un ensayo de formación de focos para ensayar la capacidad de p85 β de inducir transformación. Mientras que la expresión de p85 α no transforma células NIH3T3, p85 β era capaz de inducir formación de focos aunque en menor grado que V12-Ras (Fig. 4c).

Estos resultados muestran que la progresión tumoral correlaciona con alteraciones en los niveles de las subunidades reguladoras de PI3K. El aumento de p85 β y el descenso de p85 α causa un enriquecimiento en complejos p85 β /p110 α que tiene mayor afinidad por el sustrato fisiológico PtdIns(4,5)P₂. Esto aumenta la producción de PIP₃ incluso en ausencia de factores de crecimiento explicando la capacidad transformante de p85 β y su papel en progresión tumoral.

ES 2 373 292 A1

Estos ensayos muestran el distinto efecto de $p85\alpha$ y $p85\beta$ en la actividad de $p110\alpha$, ya que asociada a $p85\beta$, $p110\alpha$ presenta una unión mayor a su sustrato fisiológico $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. El aumento en los complejos $p85\beta/p110\alpha$ resulta en una mayor producción de PIP_3 y, en consecuencia, en una mayor activación de los efectores de PI3K: PKB y p70s6k, incluso en ausencia de estímulo, proporcionado al tumor independencia de factor para su crecimiento. Finalmente, el aumento de expresión de la subunidad reguladora $p85\beta$ es un evento frecuente en carcinomas de colon y mama que aumenta la actividad PI3K en ausencia de estímulo. La elevación de $p85\beta$ es, por tanto, un factor pronóstico de progresión tumoral.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 373 292 A1

REIVINDICACIONES

1. Uso del gen *PIK3R2* o de sus productos de expresión para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer.
- 5 2. Uso del gen *PIK3R2* o de sus productos de expresión según la reivindicación 1 donde el cáncer es cáncer de mama o de colon.
3. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer que comprende:
 - 10 a. obtener una muestra biológica aislada que comprende células tumorales de un individuo,
 - b. detectar la cantidad de producto de expresión del gen *PIK3R2* en la muestra biológica aislada de (a), y
 - 15 c. comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.
4. Método según la reivindicación 3 que además comprende:
 - 20 d. asignar al individuo del paso (a) al grupo de pacientes con estadio tumoral avanzado cuando la cantidad detectada en el paso (b) es superior a la cantidad de referencia.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 donde el cáncer es cáncer de colon.
- 25 6. Método según la reivindicación 3 donde el cáncer es cáncer de mama.
7. Método según la reivindicación 6 que además comprende:
 - 30 d. asignar al individuo del paso (a) al grupo de pacientes con cáncer invasivo cuando la cantidad detectada en el paso (b) es superior a la cantidad de referencia.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 donde la cantidad de referencia procede de una muestra biológica aislada que no comprende células tumorales.
- 35 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 donde el individuo es un mamífero.
10. Método según la reivindicación 9 donde el mamífero es un humano.
- 40 11. Kit para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer que comprende los cebadores, sondas o anticuerpos, o cualquiera de sus combinaciones, necesarios para detectar la cantidad de producto de expresión del gen *PIK3R2*.
12. Uso del kit según la reivindicación 11 para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer.
- 45 13. Uso del kit según la reivindicación 12 donde el cáncer es cáncer de mama o de colon.

50

55

60

65

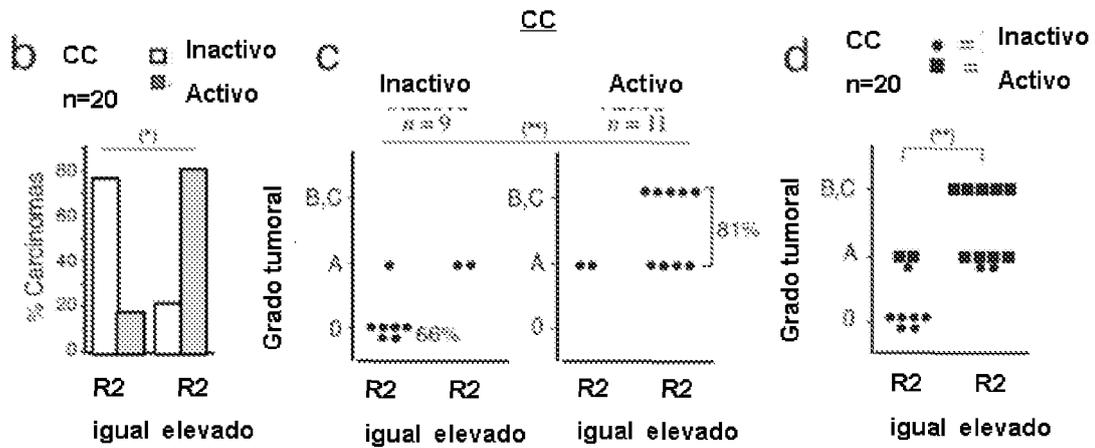


FIG. 2 (B, C, D)

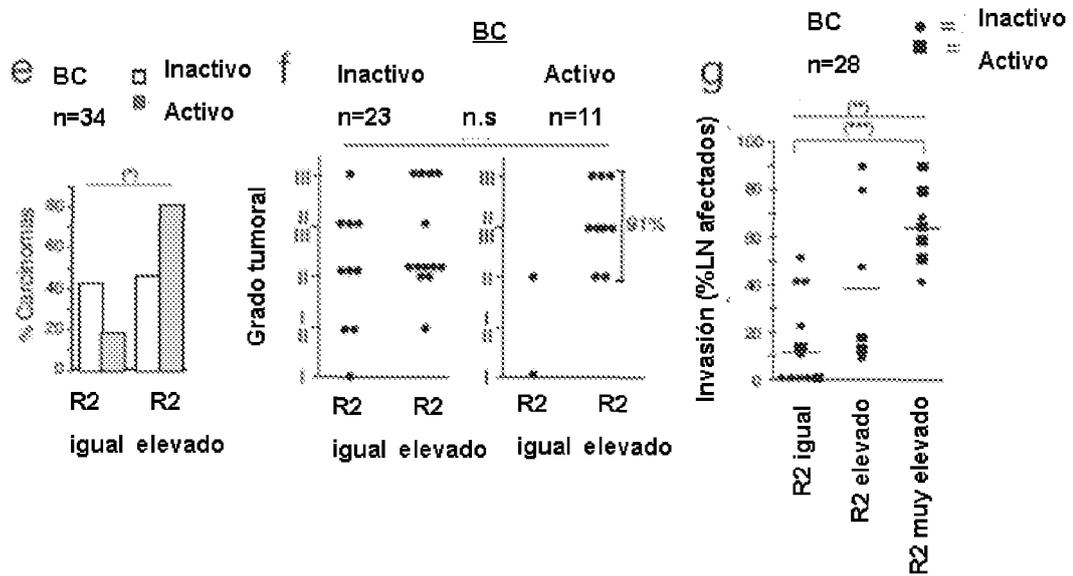


FIG. 2 (E, F, G)

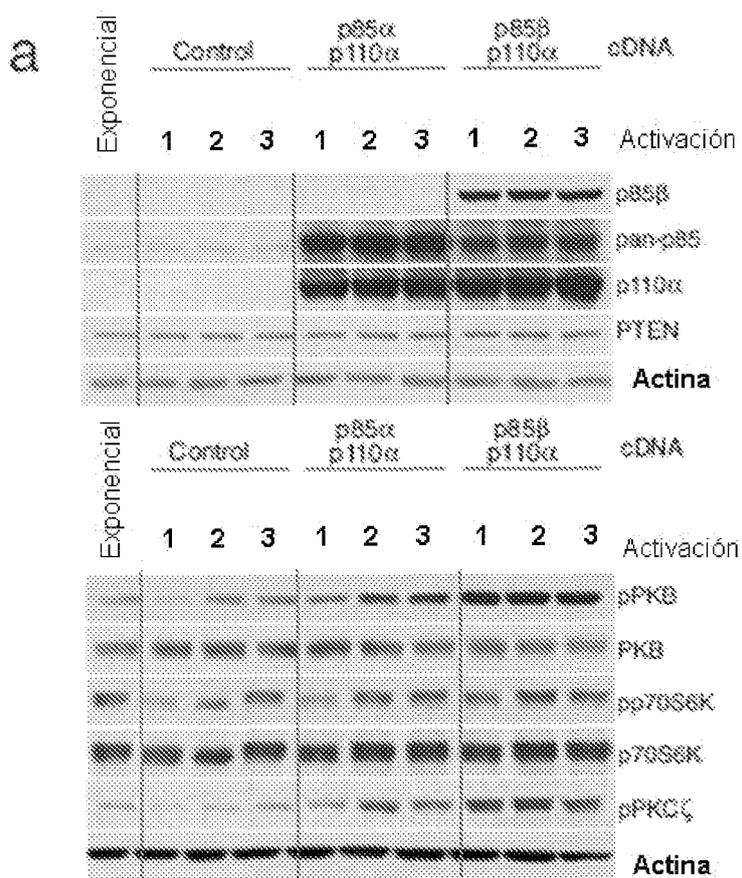


FIG. 3 (A)

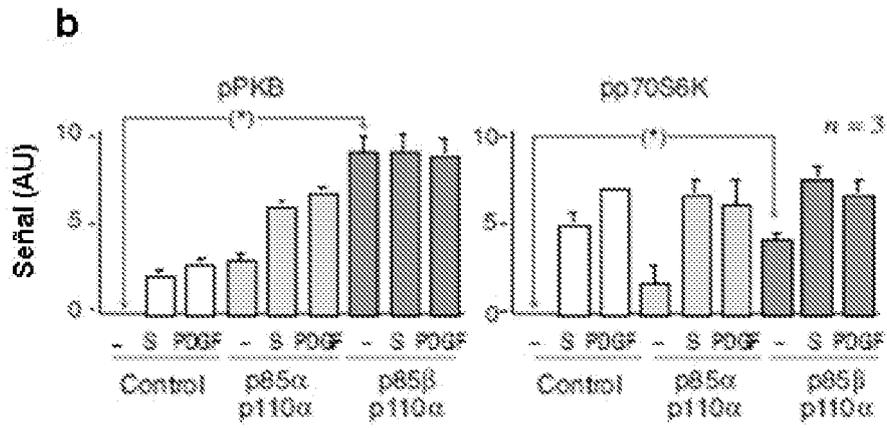


FIG. 3 (B)

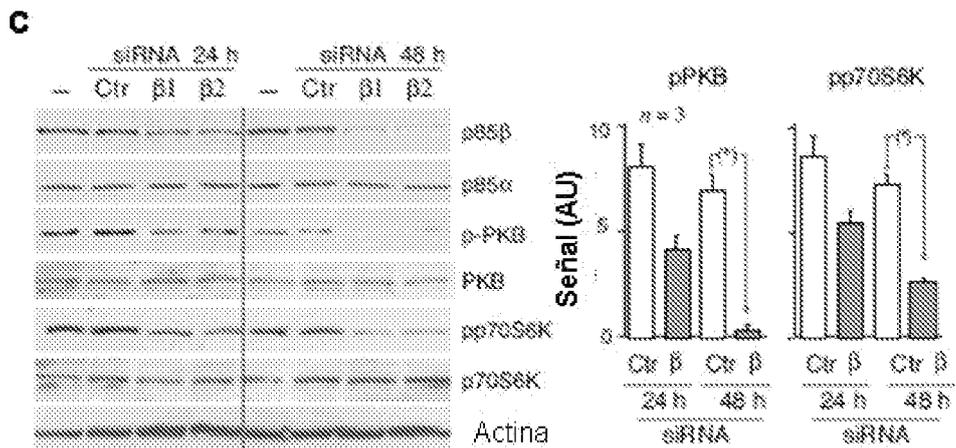


FIG. 3 (C)

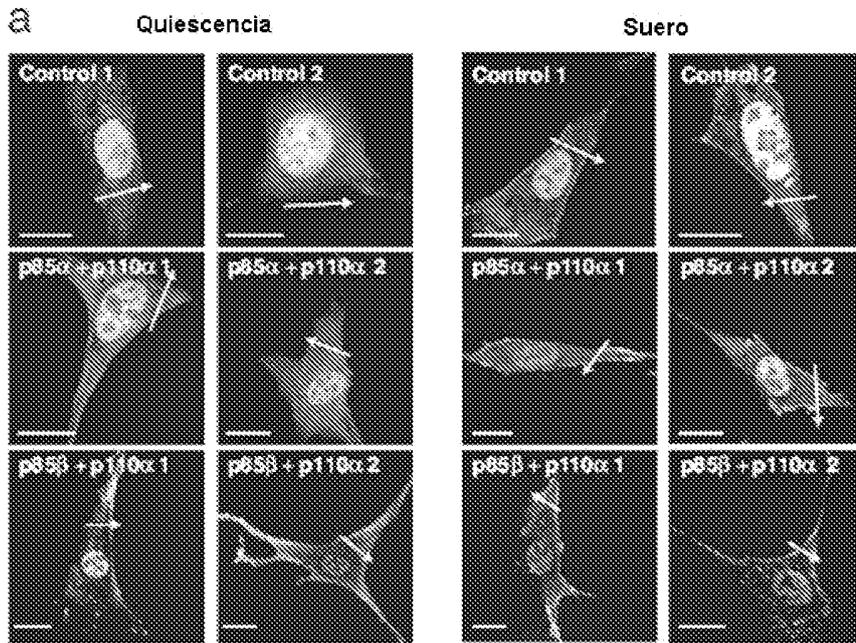


FIG. 4 (A)

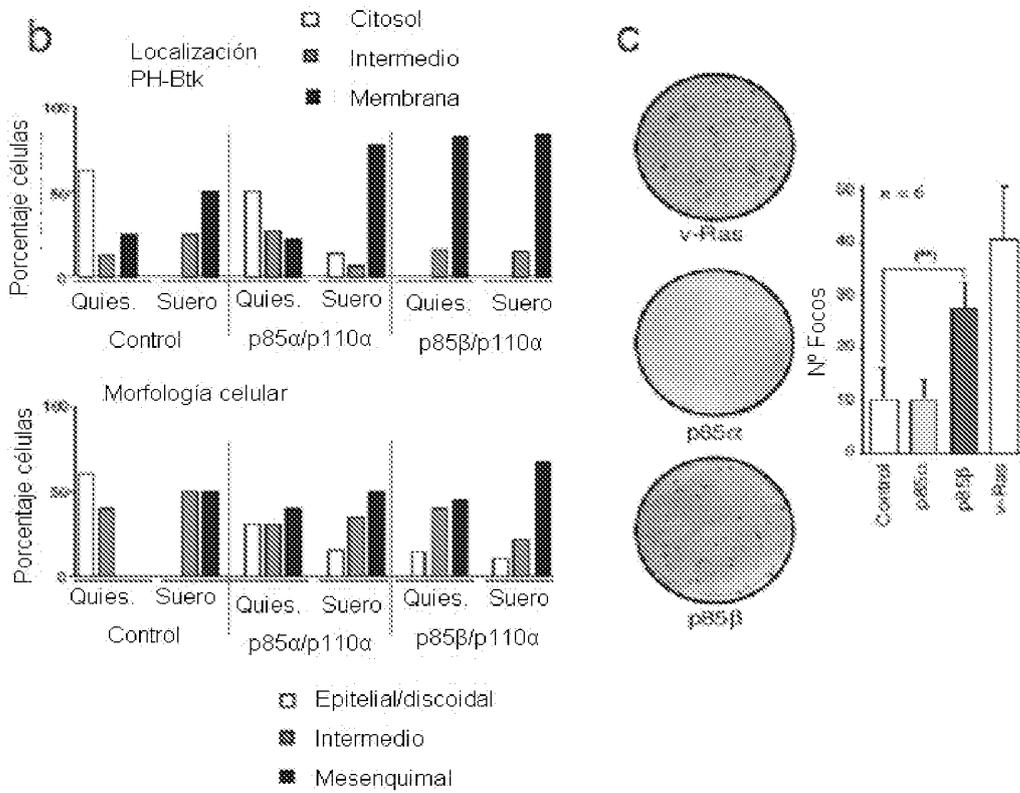


FIG. 4 (B, C)



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031137

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GRANE A. et al. "A novel mitogenic signaling pathway of Bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a Gq/11 Protein, Phosphatidylinositol 3-Kinase β , and Protein Kinase C ϵ " The Journal of Biological Chemistry (27 noviembre 1998) Vol. 273, N.º. 48, páginas 32016-32022; DOI 10.1074/jbc.273.48.32016; todo el documento.	1-13
A	US 20080014598 A1 (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC.) 17.01.2008, todo el documento.	1-13
A	BÉNISTANT C. et al. "A specific function for phosphatidylinositol 3-Kinase α (p85 α -p110 α) in cell survival and for phosphatidylinositol 3-kinase β (p85 α -p110 β) in de novo DNA synthesis of human colon carcinoma cells" ONCOGENE (19 octubre 2000) Vol. 19, N.º. 44, páginas 5083-5090; todo el documento.	1-13
A	ENGELMAN J.A. et al. "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism" Nature Reviews Genetics (agosto 2007) Vol. 7, páginas 606-619; DOI 10.1038/nrg1879; todo el documento.	1-13
A	YUAN T.L. et al. "PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme" ONCOGENE (2008) Vol. 27, páginas 5497-5510; DOI 10.1038/onc.2008.245; todo el documento.	1-13

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
12.01.2012

Examinador
M. M. García Coca

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/573 (2006.01)

C12N9/12 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

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

G01N, C12N

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.01.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-13	NO

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

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como 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	GRANE A. et al. "A novel mitogenic signaling pathway of Bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a Gq/11 Protein, Phosphatidylinositol 3-Kinase β , and Protein Kinase C ϵ " The Journal of Biological Chemistry (27 noviembre 1998) Vol. 273, N°. 48, páginas 32016-32022; DOI 10.1074/jbc.273.48.32016	27.11.1998
D02	US 20080014598 A1 (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC.)	17.01.2008
D03	BÉNISTANT C. et al. "A specific function for phosphatidylinositol 3-Kinase α (p85 α -p110 α) in cell survival and for phosphatidylinositol 3-kinase β (p85 α -p110 β) in de novo DNA synthesis of human colon carcinoma cells" ONCOGENE (19 octubre 2000) Vol. 19, N°. 44, páginas 5083-5090	19.10.2000
D04	ENGELMAN J.A. et al. "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism" Nature Reviews Genetics (agosto 2007) Vol. 7, páginas 606-619; DOI 10.1038/nrg1879	Agosto 2007
D05	YUAN T.L. et al. "PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme" ONCOGENE (2008) Vol. 27, páginas 5497-5510; DOI 10.1038/onc.2008.245	2008

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-13, se refiere al uso del gen PIK3R2 o de sus productos de expresión para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer, concretamente del cáncer de mama o de colon (reiv. 1 y 2). Es también objeto de la invención un método de obtención de datos para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer (reiv. 3-10), un kit y su uso para llevar a cabo el método (reiv. 11-13).

Novedad y Actividad Inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga la relación entre la sobreexpresión del gen $p85\beta$ y el cáncer de colon. En este documento se analiza, en células de cáncer de colon, la ruta de activación de la bradikina que va a dar lugar a la activación de la MAPK. La cascada de activaciones implica la activación secuencial de la proteína G $_{q/11}$, la fosfoinosítido 3 kinasas, y la proteína kinasa C ϵ . Los autores analizan la expresión de distintos genes en la línea celular SW-480 y la comparan con células no tumorales (células control) y observan que, como resultado de la activación de la bradikina, se observa el aumento de expresión de la subunidad reguladora $p85\beta$ de la PI3K en células cancerígenas, respecto a células no transformadas.

El documento D02 divulga la relación entre la modificación de las subunidades reguladoras de la proteína PI3K y el desarrollo de distintos tipos de cáncer, en concreto, divulga nuevos sitios de fosforilación en las subunidades PI3Kp85 α , PI3Kp85 β y PI3Kp85 γ de la proteína PIK3, relacionados con el cáncer. Este documento también divulga anticuerpos y métodos de detección de la proteína PI3K fosforilada para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer en muestras biológicas. Este documento también divulga kits para llevar a cabo los métodos de la invención.

El documento D03 divulga la relación entre la PI3K α (p85 α -p110 α) en la supervivencia celular y la PI3K β (p85 β -p110 β) en la síntesis *de novo* de DNA en células de cáncer de colon. En este documento también se divulga la relación del incremento de la actividad y aumento de expresión en PI3K tipo I y la progresión del tumor tanto en cáncer de colon como en cáncer de mama.

El documento D04 divulga las rutas en las que está implicada la proteína PI3K y su relación con el metabolismo celular, el ciclo celular, síntesis de proteínas, entre otros, y la implicación de dicha proteína con el desarrollo del cáncer, debido a su asociación con oncoproteínas.

El documento D05 divulga la relación de la proteína PI3K con el cáncer y analiza las alteraciones en la ruta de señalización que dan lugar al desarrollo de la enfermedad.

El documento D01 es el más cercano del estado de la técnica. En este documento se divulga la relación entre la sobreexpresión de p85 β con el cáncer de colon, en concreto se divulga una ruta de señalización celular que lleva al aumento de expresión de p85 β en líneas celulares de cáncer de colon. A la vista de lo divulgado en el documento D01 y teniendo en cuenta que en el estado de la técnica ya es conocida la relación de esta subunidad reguladora p85 con distintos tipos de cáncer, como el cáncer de colon, de ovario, y de mama entre otros (ver por ejemplo, el documento D02), sería obvio para un experto en la materia, utilizar el gen PIK3R2 o sus productos de expresión para diagnosticar, pronosticar o realizar un seguimiento del cáncer, basándose en los niveles de expresión de dicho gen y tener una expectativa razonable de éxito.

Por lo tanto, la invención según se recoge en las reivindicaciones 1-13, aunque se considera nueva en el sentido del artículo 6.1 Ley 11/1986 de Patentes, no implica actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986 de Patentes.