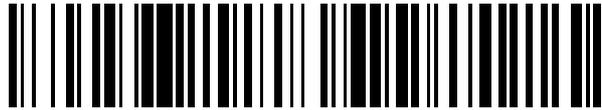


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 730**

21 Número de solicitud: 201131733

51 Int. Cl.:

**A61K 36/53** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**27.10.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.06.2013**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2012/070750**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)  
C/ EINSTEIN, 3  
28049 MADRID ES y  
FUNDACIÓN IMDEA ALIMENTACIÓN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RAMÍREZ DE MOLINA, Ana;  
MOLINA ARRANZ, Susana;  
GONZÁLEZ-VALLINAS GARRACHÓN, Margarita;  
FORNARI REALE, Tiziana;  
RODRÍGUEZ GARCÍA-RISCO, Mónica y  
REGLERO RADA, Guillermo**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **COMPOSICIONES DE EXTRACTO DE ROMERO PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER**

57 Resumen:

Composiciones de extracto de romero para el tratamiento de cáncer.

La presente invención se refiere al uso de un extracto de romero en la preparación de una composición para el tratamiento de un cáncer en el que existe una alteración en la señalización por estrógenos o en el metabolismo lipídico, a una composición que comprende extracto de romero y un agente quimioterapéutico, así como a un método in vitro para la predicción de la respuesta clínica a una terapia antitumoral mediante el empleo de dicha composición.

**ES 2 408 730 A1**

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de extracto de romero para el tratamiento de cáncer

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a nuevas composiciones de extracto de romero, a su uso en el tratamiento del cáncer, así como a un método *in vitro* para la predicción de la respuesta clínica a una terapia antitumoral mediante dichas composiciones.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El romero (*Rosmarinus officinalis L.*), utilizado desde hace décadas en la cocina o como infusión, es una planta que crece en muchas partes del mundo, a la que se han atribuido diversas funciones biológicas como antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas o antitumorales [Altinier et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 1718-1723; Aruoma et al., *Food Chem. Toxicol.*, 1996, 34, 449-456; Bastianetto et al. *Neurobiol. Aging*, 2002, 23, 891-897; Singletary et al., *Cancer Lett.*, 1996, 104, 43-48]. Entre los constituyentes responsables de estas actividades destacan diterpenos fenólicos como ácido carnósico, carnosol, rosmanol, epirosmanol y rosmadial y otros ácidos como el rosmarínico y el cafeico, y se ha propuesto que sus funciones biológicas están ligadas a la capacidad de reducir el daño oxidativo  
15 causado por radicales libres [Singletary et al., *Cancer Lett.*, 1996, 104, 43-48; Singletary et al., *Plant Foods Hum. Nutr.*, 1997, 50, 47-53; Dörrie et al., *Cancer Lett.*, 2001, 170, 33-39; Debersac et al., *Food Chem Toxicol* 2001, 39, 907-918, Offord et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 32, 1293-1303; Lo et al., *Carcinogenesis*, 2002, 23, 983-991].

20 Estas evidencias sugieren un posible efecto beneficioso de componentes del romero en cáncer. En este sentido, en los últimos años se ha demostrado un efecto preventivo del extracto de romero en la carcinogénesis inducida por carcinógenos químicos como DMBA o benzopireno [Singletary et al., *Cancer Lett.*, 1996, 104, 43-48; Slamenova et al., *Cancer Lett.*, 2002, 177, 145-153; Alexandrov et al., *Cancer Res.*, 2006, 66, 11938-11945]. Un número considerablemente menor de estudios se ha realizado sobre su efecto en la progresión tumoral, siendo la leucemia el sistema en el que se han centrado la mayor parte de estos estudios, en los que se ha observado de forma consistente un efecto antiproliferativo tanto del romero como de dos de sus componentes principales, ácido carnósico y carnosol [Steiner et al., *Nutr. Cancer*, 2001, 41, 135-144; Danilenko et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001, 93, 1224-1233]. Además, se ha demostrado en este sistema que el ácido carnósico extraído del romero potencia *in vitro* de forma significativa el efecto antiproliferativo de la vitamina D3 y sus derivados [Danilenko et al., *Cancer Res.*, 2003, 63, 1325-1332; Steiner et al., *Nutr. Cancer*, 2001, 41, 135-144]. También se ha demostrado que el tratamiento oral con ácido carnósico en combinación con una dosis intraperitoneal de un análogo de vitamina D3 resulta en una fuerte inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral de células murinas de leucemia WEHI-3B, sugiriendo que un aporte de ácido carnósico podría tener un efecto beneficioso en el tratamiento de leucemia mieloide aguda [Shabtay et al., *Oncology*, 2008, 75, 203-214]. Además de en leucemias, se han realizado estudios en hepatomas y melanomas. Su efecto antiproliferativo, sin profundizar en su efecto real como inhibidor de la carcinogénesis, se ha sugerido también en células derivadas de tumores de mama y de próstata [Yesil-Celiktas et al., *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2010, 65, 158-163]. En todos estos casos, se ha sugerido que su actividad antioxidante constituye la base de su efecto, sin realizar estudios que identifiquen realmente el mecanismo de acción del extracto de romero.

40 Por último, recientemente se ha descrito también que el extracto de romero tiene un efecto inhibitorio sobre la P-glicoproteína, implicada en la resistencia a fármacos [Nabekura et al., *Pharmacol. Res.*, 2010, 61, 259-263; Plouzek et al., *Eur. J. Cancer*, 1999, 35, 1541-1545;], y que ejerce un efecto modulador de los efectos de la radiación, sugiriéndose un papel beneficioso en el tratamiento con radioterapia [Sancheti et al., *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2006, 4, 165-172; Soyal et al., *Phytomedicine*, 2007, 14, 701-705]. Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio del extracto de romero como posible potenciador del efecto de agentes utilizados convencionalmente en quimioterapia.

45 Por otra parte, la causa fundamental de muerte por cáncer es el fallo en la respuesta a tratamiento que se produce en gran parte por el desarrollo de resistencia a quimioterapia. Por otro lado, los efectos secundarios derivados del tratamiento con agentes quimioterapéuticos ejercen un efecto negativo en la respuesta, por lo que aún es necesaria la identificación de agentes que puedan potenciar su efecto permitiendo, o bien disminuir el tiempo de tratamiento aumentando su eficacia, o bien disminuir la dosis utilizada del agente quimioterapéutico reduciendo así su toxicidad y, por tanto, sus efectos secundarios.

50 La tecnología de extracción con fluidos supercríticos (SFE) es una técnica de separación basada fundamentalmente en la capacidad que tienen determinados fluidos en estado supercrítico (es decir, en condiciones de temperatura y presión por encima de su punto crítico) de modificar su poder solvente. Este poder solvente depende, en gran parte, de su densidad, la que puede ser modificada en forma continua simplemente variando la presión y/o la temperatura. Por otro lado, la viscosidad y la difusividad de los fluidos supercríticos son similares a la de los gases, por lo que la transferencia de materia en estos procesos es elevada, lo cual permite una extracción rápida y eficaz del extracto de su matriz. Particularmente, es reconocido que la extracción de antioxidantes de matrices vegetales utilizando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) supercrítico produce extractos de mayor actividad comparados con los que se obtienen utilizando disolventes líquidos orgánicos (etanol, hexano) o hidrodestilación [Schwarz y Ternes, *Z Lebensm Unters Forsch*,

1992, 195, 99-103; Ibáñez et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 375-382]. Concretamente, la extracción de romero utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico puro o con modificadores ha sido ampliamente estudiada en la literatura [Ibáñez et al., *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 1400-1404; Cavero et al., *J. Food Prot.*, 2005, 68, 790-795; entre otros]. Por otro lado, la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) es una técnica de separación que combina las ventajas que ofrecen la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (HPLC), permitiendo la separación de mezclas en las que no es adecuada la aplicación de otras técnicas convencionales. El CO<sub>2</sub> es la fase móvil más utilizada en SFC debido a sus propiedades físicas y químicas, bajas temperaturas y presiones críticas (31 °C, 73,9 bar), inerte, no inflamable, no contaminante y relativamente económico, con la limitación de su apolaridad, que impide la separación de compuestos polares, pero que se suple fácilmente por la adición de pequeñas cantidades de sustancias polares (modificadores). En esta técnica, se pueden variar fácilmente parámetros cromatográficos como retención, selectividad y resolución optimizando así la separación. A nivel o escala preparativa (SFC-prep), ofrece numerosas ventajas como el menor consumo de disolventes, la rapidez de la separación o la facilidad de recuperar los compuestos aislados y sin disolventes con una simple descompresión, manteniendo así intactas sus propiedades originales [Yaku et al., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2000, 43, 59-76; Toribio et al., *J. Chromatogr. A*, 2003, 1011, 155-161]. Recientemente se ha descrito que ambas técnicas pueden ser aplicadas al fraccionamiento de extractos de matrices vegetales, y, concretamente a la extracción de compuestos antioxidantes del romero, como tecnologías innovadoras, más limpias, y con la ventaja de producir fracciones más bioactivas [Ramírez et al., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1057, 241-245; Ramírez et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, 41, 1606-1613; Soler-Rivas et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 1144-1152].

## 20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un nuevo uso de un extracto de romero en el tratamiento de determinados cánceres, concretamente en aquellos en los que existe una alteración del metabolismo lipídico o en la ruta de señalización por estrógenos. Además dicha composición se puede combinar con un agente antitumoral convencional obteniéndose un efecto sinérgico.

25 En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un extracto de romero en la preparación de una composición para el tratamiento de un cáncer en el que existe una alteración en la señalización por estrógenos o en el metabolismo lipídico.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende extracto de romero y un agente quimioterapéutico o antitumoral.

30 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición que comprende extracto de romero y un agente quimioterapéutico o antitumoral para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la predicción de la respuesta clínica a una terapia antitumoral con la composición según el segundo aspecto de la invención, definida anteriormente, en un paciente diagnosticado de cáncer que presenta alta probabilidad de responder a una terapia con dicha composición, que comprende:

- (i) determinar los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 en una muestra de dicho paciente antes de la administración de la terapia,
- (ii) comparar dichos niveles de expresión con un valor de referencia,

40 en donde una alteración de los niveles de expresión de dichos genes con respecto al valor de referencia es indicativa de una mejor respuesta clínica a la terapia con la composición definida anteriormente o de que el paciente tiene una alta probabilidad de responder a la terapia con dicha composición.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 Figura 1. Curvas dosis-respuesta en un experimento de viabilidad representativo de viabilidad celular después de 48 horas de tratamiento con extracto supercrítico de romero (SFRE) en dos líneas celulares humanas derivadas de cáncer de colon, SW620 (a) ó HT-29 (b). Los valores representan la media ± desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes cada uno realizado en triplicado. Los asteriscos muestran valores estadísticamente significativos respecto al control.

50 Figura 2. Formación de colonias en agar blando en células humanas tumorales de colon sin tratar y células tratadas con SFRE. En el experimento A, las células fueron sembradas en una base de DMEM-agar con 50 µg/mL de extracto (representativo de presencia de una alta concentración de SFRE), además de ser semanalmente irrigadas con extracto. En el experimento B, las células fueron sembradas en una base de DMEM-agar sin extracto, y fueron irrigadas una vez a la semana con DMEM con 100 µg/mL de extracto (representativo de una baja concentración de SFRE presente durante el curso del experimento).

Figura 3. Validación por PCR cuantitativa a tiempo real de la modificación de la expresión génica encontrada mediante microarrays de DNA en células tumorales de colon (SW620) tras el tratamiento con extracto de romero. Los resultados se presentan en relación con células no tratadas como referencia y normalizados frente al gen endógeno 18S. La gráfica muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes cada uno de ellos realizado en triplicado.

Figura 4. Respuesta sinérgica de células humanas de cáncer de colon (SW620) a 72 horas de tratamiento con 5-FU, solo o combinado con SFRE administrado 1 hora antes que el 5-FU. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes cada uno de ellos realizado en duplicado.

Figura 5. Efecto del extracto de romero sobre la capacidad tumorigénica de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 determinada *in vitro* mediante ensayo de crecimiento en medio libre de anclaje en ausencia de extracto supercrítico de romero (sin tratar) y en el que el extracto supercrítico de romero fue añadido en el medio de la siembra (tratadas). El panel superior muestra el número de colonias por placa encontradas en cada caso, especificando aquellas de gran tamaño. En el panel inferior se muestra una foto representativa de los datos obtenidos.

## 15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un extracto de romero en la preparación de una composición para el tratamiento de un cáncer en el que existe una alteración en la señalización por estrógenos o en el metabolismo lipídico.

En el contexto de la presente invención se entiende por “señalización por estrógenos” la ruta de transducción de señales regulada por la unión de un ligando a los receptores de estrógenos de las células.

El receptor de estrógeno hace referencia a un grupo de receptores celulares que son activados por la hormona denominada 17 $\beta$ -estradiol o estrógeno. Existen dos formas diferentes del receptor de estrógeno, normalmente referidas como las formas  $\alpha$  y  $\beta$ , ambas codificadas por genes diferentes e independientes (ESR1 y ESR2 respectivamente). El receptor ER $\alpha$  es expresado mayoritariamente en endometrio, células de cáncer de mama, células del estroma ovárico e hipotálamo. El receptor ER $\beta$  es expresado mayoritariamente en riñones, cerebro, hueso, corazón, pulmones, mucosa intestinal, próstata y células del endotelio. La conformación activada del receptor de estrógeno forma un dímero y, puesto que ambas variantes son coexpresadas en diversos tipos de células, los receptores pueden formar homodímeros del tipo ER $\alpha$  ( $\alpha\alpha$ ) o ER $\beta$  ( $\beta\beta$ ), o heterodímeros del tipo ER $\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ ).

En ausencia de hormona, los receptores de estrógeno se encuentran localizados principalmente en el citoplasma. La señalización por estrógenos se activa mediante la unión de la hormona al receptor y pone en funcionamiento un cierto número de eventos que comienzan con la migración del receptor desde el citoplasma al núcleo celular, la dimerización del receptor y la unión de este dímero a unas secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a hormonas. El complejo receptor/ADN recluta entonces otras proteínas implicadas en la transcripción de los genes diana y así expresa determinadas proteínas que darán lugar a variaciones en la función celular. Los receptores de estrógeno también tienen un dominio de unión a ADN y pueden actuar como factores de transcripción para regular la producción de proteínas. El receptor también interacciona con el factor de transcripción AP-1 y con Sp1 para promover la transcripción por medio de varios coactivadores tales como PELP-1. Algunos receptores de estrógeno se asocian con la superficie de la membrana celular y pueden ser rápidamente activados por exposición de las células al estrógeno. Además, algunos de estos receptores pueden asociarse con membranas celulares mediante anclaje a la caveolina-1 para formar complejos con proteínas G, estriatina, receptores tirosina quinasa (como por ejemplo EGFR e IGF-1) y receptores no-tirosina quinasa (como por ejemplo Src). A través de la estriatina, algunos de estos receptores de estrógeno unidos a membrana pueden dar lugar a un incremento de los niveles de Ca<sup>2+</sup> y óxido nítrico. A través de los receptores tirosina quinasa, las señales son enviadas al núcleo por medio de la vía de las MAPK y la vía PI3K/AKT. La glicógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3 $\beta$ ) inhibe la transcripción inducida por los receptores de estrógeno nucleares mediante la inhibición de la fosforilación del residuo de serina 118 de los receptores tipo  $\alpha$ . La fosforilación de GSK-3 $\beta$  impide este efecto inhibitorio, la cual puede ser llevada a cabo por la ruta PI3K/AKT y la ruta MAPK/ERK, vía quinasa s6 ribosomal.

En el contexto de la presente invención se entiende por “metabolismo lipídico” al conjunto de reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos que ocurren en las células relacionados con el catabolismo y anabolismo de lípidos. Los lípidos pueden ser sales biliares, colesterolos, eicosanoides, glicolípidos, cuerpos cetónicos, ácidos grasos, fofolípidos, esfingolípidos, esteroides y triacilglicerolos.

El término “tratamiento” se utiliza para designar la administración de una composición que comprende extracto de romero para controlar la progresión de la enfermedad antes o después de que los signos clínicos hayan aparecido. Por el control de la progresión de la enfermedad se entiende los resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen, pero no se limitan a, reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de estados patológicos (específicamente evitar un deterioro adicional), retrasar la progresión de la enfermedad, mejorar el estado patológico y remisión (tanto parcial como total). El control de la progresión de la enfermedad

también implica una prolongación de la supervivencia, comparado con la supervivencia esperada si el tratamiento no fuera aplicado.

Los términos "cáncer" y "tumor" se refieren a la condición fisiológica en mamíferos caracterizada por el crecimiento celular desregulado. Las composiciones de extracto de romero tiene utilidad para el tratamiento de cualquier cáncer o tumor en el que existe una alteración del metabolismo lipídico o la señalización por estrógenos, tales como, sin limitación, tumores de esófago, estómago, hígado, páncreas, vesícula biliar, intestino delgado, recto, colon, colorrectal, próstata, pulmón, ovario y mama. En una realización preferida de la invención el tumor/cáncer a ser tratado con dichas composiciones es cáncer de colon. En otra realización preferida de la invención el tumor/cáncer a ser tratado con dichas composiciones es cáncer de mama.

Tal como se usa en la presente invención, los términos "*Rosmarinus officinalis*" y "romero" son intercambiables. La composición de la invención comprende un extracto de romero obtenido a partir de las inflorescencias y partes superiores, tal como las hojas del arbusto. El extracto de romero se puede obtener por métodos clásicos convencionales conocidos por el experto en la materia. Entre los distintos métodos de extracción de romero, se utilizan extracción con solventes, extracción por prensado y extracción con fluidos supercríticos. En el caso de la extracción con solventes, el material previamente debe de ser molido, macerado o picado, para permitir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente. Para lograr mejor eficiencia en la operación, es conveniente realizar el proceso en movimiento continuo. Se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambientales. El proceso puede ejecutarse en batch (por lotes) o en forma continua (tal como la percolación, lixiviación y extracción tipo soxhlet). Los solventes más comúnmente empleados son etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo, etc. El siguiente paso es separar el solvente del extracto mediante evaporación, destilación bajo vacío, destilación molecular o mediante extracción por fluidos supercríticos. El extracto resultante, verde y altamente viscoso, se suele someter a concentración por destilación molecular. Un segundo método es la extracción por prensado, en donde el material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas tipo batch o en forma continua, dentro de éstos se pueden utilizar los siguientes equipos tornillo sin fin de alta o de baja presión, extractor expeller, extractor centrífugo, extractor decanter y rodillos de prensa. En cuanto a la extracción en condiciones supercríticas, el punto crítico corresponde a las condiciones de temperatura y presión, para un gas o un vapor, por encima de las cuales la sustancia ya no puede ser "licuada" por incremento de presión. Adicionalmente las propiedades de la fase líquida y/o vapor son las mismas, es decir no hay diferenciación visible ni medible entre gas y líquido. En una realización preferida de la invención, el extracto de romero de las composiciones de la invención se obtiene mediante extracción con fluidos supercríticos.

La sustancia mas empleada para la extracción en condiciones supercríticas es el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que en estas condiciones presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), que conlleva a un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar a pequeños poros y rendijas del mismo lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo. En la parte final del proceso hay una eliminación total del solvente y se realiza a una temperatura baja, se disminuye la pérdida de sustancias volátiles y se evita la formación de sabores y olores extraños. En una realización más preferida de la invención, la obtención del extracto de romero de dichas composiciones se realiza con dióxido de carbono supercrítico. En una realización aun más preferida, la extracción se realiza con dióxido de carbono a una temperatura del dióxido de carbono comprendida entre 30 °C y 70 °C y a una presión de dióxido de carbono comprendida entre 200 y 300 bar.

Los extractos vegetales obtenidos por fluidos supercríticos mantienen una composición más o menos constante. A pesar de ello, debido a la variabilidad vegetal, la composición química de los extractos puede presentar variaciones. Algunos de los compuestos mayoritarios y que se encuentran siempre presentes en los extractos obtenidos a partir de *Rosmarinus officinalis* son por ejemplo, aunque sin limitarse, rosmanol, carnosol, ácido carnósico, ácido rosmarínico, metil carnosato, flavonoides como genkwanina, escutellareina y otros compuestos como verbenona, alcanfor, borneol y 1,8-cineol. En una realización particular de la invención el extracto de romero posee un contenido en terpenos fenólicos entre el 15 y el 50%.

En una realización preferida de la invención, la composición que comprende el extracto de romero es una composición farmacéutica.

En el contexto de la presente invención, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del extracto de romero junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término "vehículo" se refiere a vehículo, adyuvante, diluyente y/o excipiente con el que se administra el principio activo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua o aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente agua o soluciones salinas de disolución acuosa y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos, particularmente para disoluciones inyectables. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

La composición farmacéutica de la invención, obtenida mezclando el (los) principio(s) activo(s) con el (los) vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s), puede administrarse en una pluralidad de formas farmacéuticas de administración, por ejemplo, sólidas, líquidas, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica de la invención incluyen gotas orales (disolución, suspensión, emulsión, etc.); formulaciones orales (líquidas, disolución, suspensión, emulsión, gel, pasta, polvo, etc.); liofilizado oral; goma oral; polvo para disolución o suspensión oral; gránulos; gránulos gastroresistentes; gránulos de liberación prolongadas; gránulos de liberación modificada; gránulos para suspensión oral; polvo y disolvente para disolución o suspensión oral; jarabe; polvo para jarabe; gránulos para jarabe; comprimidos (por ejemplo, comprimido soluble, comprimido dispersable, comprimido recubierto, comprimido recubierto de película, comprimido efervescente, comprimido bucodispersable, comprimido gastroresistente, comprimido de liberación prolongada, comprimido de liberación modificada, comprimido bucal, comprimido masticable, etc.); té herbal; té herbal instantáneo; polvo o gránulos efervescentes; sobre, cápsula (por ejemplo, dura, blanda, cápsula dura o blanda gastroresistente, cápsula dura o blanda de liberación prolongada, cápsula dura o blanda de liberación modificada, etc.); píldoras; dispositivo intrarruminal de liberación continua; dispositivo intrarruminal de liberación pulsátil; bloque para chupar; premezcla para personal de alimentación medicada; grageas, gárgaras; concentrado para gárgaras; gárgaras (polvo o comprimido para disolución); disolución, suspensión, gotas, aerosol, gel, pasta, cápsula bucomucosas etc.; aerosol, comprimido sublinguales, etc.; pastilla para chupar; pastilla para chupar comprimida; pastilla; parche transdérmico; cataplasma; suspensión nebulizadora; polvo para suspensión nebulizadora; polvo para disolución nebulizadora; emulsión nebulizadora; inhalación presurizada (disolución, suspensión, emulsión, etc.); polvo para inhalación; polvo para inhalación (cápsula dura); polvo para inhalación, predispensado; vapor para inhalación (polvo, cápsula, disolución, comprimido, pomada, líquido, etc.); formulaciones rectales; formulaciones vaginales; gas para inhalación; gel para inyección; disolución para inyección; suspensión para inyección; emulsión para inyección; polvo para disolución para inyección; polvo para suspensión para inyección; polvo y disolvente para disolución para inyección; polvo y disolvente para suspensión para inyección; concentrado para disolución para inyección; disolución para infusión; emulsión para infusión; polvo para disolución para infusión; concentrado para disolución para infusión; polvo y disolvente para disolución para infusión; comprimido de implantación; disolución para diálisis peritoneal; disolución para hemofiltración; disolución para hemodiafiltración; disolución para hemodiálisis; concentrado para disolución para hemodiálisis; disolución para uso intravesical; irrigación vesical; polvo para irrigación vesical; gel uretral; bastoncillo uretral; instilación endotraqueopulmonar (disolución); instilación endotraqueopulmonar (polvo para disolución); instilación endotraqueopulmonar (suspensión); instilación endotraqueopulmonar (polvo y disolvente para disolución); gel endocervical; polvo y disolvente para gel endocervical; sistema de administración intrauterina; etc.

Los vehículos y sustancias auxiliares necesarias para fabricar la forma farmacéutica deseada de administración de la composición farmacéutica de la invención dependerán, entre otros factores, de la forma farmacéutica de administración elegida. Dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica se fabricarán según métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Puede encontrarse una revisión de diferentes métodos de administración de principios activos, excipientes a utilizar y procedimientos para producirlos en "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

En el sentido utilizado en esta descripción "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de principio activo calculada para producir el efecto deseado y estará determinada generalmente, entre otros motivos, por las propias características del principio activo utilizado y el efecto terapéutico que va a obtenerse.

En otra realización preferida de la invención, la composición que comprende el extracto de romero es una composición alimentaria o suplemento nutricional.

En el contexto de la presente invención, la expresión "composición alimentaria" se refiere a una composición que comprende el extracto de romero junto con un vehículo alimentario. A los efectos de la presente invención, se entiende por vehículo alimentario cualquier producto susceptible de ser usado en alimentación humana o animal o que encaje en la definición de alimento según la legislación europea vigente. La elección del vehículo alimentario adecuado para cada caso podrá realizarse por un experto en la materia a partir de los vehículos alimentarios convencionales existentes en el estado de la técnica. Dicha composición alimentaria puede estar en forma de polvo soluble, ser un concentrado líquido, un snack o ser una formulación lista para usar adecuada para el consumo oral o la administración enteral. Ejemplos de estas composiciones pueden ser, entre otras, un producto lácteo o derivado del mismo tal como una leche materna, una leche de fórmula infantil para lactantes o una fórmula de continuación, un batido, leche en general (incluyendo leche entera, semidesnatada, desnatada, concentrada, pasteurizada, aromatizada, fermentada, leche de soja, opcionalmente suplementada con azúcares, otros carbohidratos, grasas y otros aditivos nutricionales), un yogurt, etc.; un zumo; un producto harinoso o derivado del mismo tal como una tarta, un pan, una galleta; un aceite, una golosina, tal como un chicle, un caramelo, etc., productos basados en cereales fermentados, suspensiones líquidas, productos orales secos, productos orales no secos, etc.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "suplemento nutricional" todo aquel aporte dietético que se consume por vía oral y que contiene uno o más nutrientes destinados a complementar la alimentación o a remediar una deficiencia. Dichos nutrientes están a menudo ausentes de la dieta o bien están presentes a bajas concentraciones. Generalmente los suplementos nutricionales se distribuyen en forma de diferentes presentaciones,

como comprimidos, cápsulas, cápsulas blandas, líquidos (jarabes o bebidas) y polvos. Dicho suplemento nutricional puede contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y puede ser preparado por métodos convencionales. Ejemplos de suplementos nutricionales pueden ser, entre otros, suspensiones líquidas, suplementos orales secos, suplementos orales no secos, etc. Dicho suplemento nutricional puede ser una composición ingerible líquida, como un jarabe o una bebida, o una composición ingerible sólida, como una tableta, cápsula o polvo reconstituible.

Para el tratamiento del cáncer la composición con extracto de romero según la invención puede usarse en combinación con un agente antitumoral o quimioterapéutico.

Ejemplos ilustrativos de agentes antitumorales o quimioterapéuticos, no limitantes incluyen, sin limitación, agentes alquilantes como por ejemplo cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mercloretamina, ciclofosfamida, clorambucil e ifosfamida; antimetabolitos análogos del ácido fólico, como por ejemplo metotrexato, análogos de la purina, como por ejemplo 6-mercaptopurina, y análogos de la pirimidina, como por ejemplo 5-fluorouracilo (5-FU), ara-c y capecitabina; alcaloides de la vinca, como por ejemplo vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina; taxanos como por ejemplo paclitaxel y docetaxel; inhibidores de la topoisomerasa como irinotecan, topotecan, amsacrina, etopósido, etopósido fosfato y tenipósido; antibióticos citotóxicos como por ejemplo actinomicina, antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina y epirubicina), bleomicina, plicamicina y mitimicina; tratamiento hormonal del cáncer como por ejemplo moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (tamoxifeno); etc. En una realización preferida de la invención, el agente antitumoral o quimioterapéutico se selecciona de 5-FU y tamoxifeno.

La composición de extracto de romero según la invención puede administrarse conjuntamente o separadamente, simultáneamente, al mismo tiempo o secuencialmente con un agente antitumoral o quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer en cualquier orden. Por ejemplo, la administración de la composición de extracto de romero de la invención puede hacerse primero, seguida por la administración de uno o más agentes antitumorales o quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer; o la administración de la composición de extracto de romero de la invención puede hacerse al final, precedida por la administración de uno o más agentes antitumorales o quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer; o la administración de la composición de extracto de romero de la invención puede hacerse al mismo tiempo que la administración de uno o más agentes antitumorales o quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer.

El experto en la técnica entenderá, en el contexto de la presente invención, que el medicamento para la administración combinada de una composición de extracto de romero según la invención y un agente antitumoral o quimioterapéutico adicional en el tratamiento del cáncer puede prepararse como una única forma de dosificación o en formas de dosificación separadas.

En un segundo aspecto, la presente invención está dirigida a una composición que comprende extracto de romero y un agente quimioterapéutico. Los ejemplos aportados demuestran que el tratamiento simultáneo de un agente quimioterapéutico, tal como 5-fluorouracilo, y extracto de romero permite potenciar el efecto de dicho agente en células tumorales en más de un 50%.

En una realización preferida de la invención el agente quimioterapéutico se selecciona de agentes alquilantes como por ejemplo cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mercloretamina, ciclofosfamida, clorambucil e ifosfamida; antimetabolitos análogos del ácido fólico, como por ejemplo metotrexato, análogos de la purina, como por ejemplo 6-mercaptopurina, y análogos de la pirimidina, como por ejemplo 5-fluorouracilo (5-FU), ara-c y capecitabina; alcaloides de la vinca, como por ejemplo vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina; taxanos como por ejemplo paclitaxel y docetaxel; inhibidores de la topoisomerasa como irinotecan, topotecan, amsacrina, etopósido, etopósido fosfato y tenipósido; antibióticos citotóxicos como por ejemplo actinomicina, antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina y epirubicina), bleomicina, plicamicina y mitimicina; tratamiento hormonal del cáncer como por ejemplo moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (tamoxifeno); etc. En una realización más preferida de la invención, el agente antitumoral o quimioterapéutico se selecciona de 5-FU y tamoxifeno.

En otra realización preferida, el extracto de romero de dicha composición se obtiene mediante la extracción con fluidos supercríticos, según se ha definido anteriormente. Preferiblemente, el fluido supercrítico es dióxido de carbono. En una realización aun más preferida, la extracción se realiza con dióxido de carbono a una temperatura del dióxido de carbono comprendida entre 30 °C y 70 °C y a una presión de dióxido de carbono comprendida entre 200 y 300 bar.

En un tercer aspecto, la invención está dirigida al uso de la composición definida en el segundo aspecto de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer. En una realización preferida, el cáncer se selecciona de cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer de recto, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, pulmón, cáncer ovárico y cáncer de mama. En una realización más preferida de la invención el cáncer es cáncer de colon. En otra realización más preferida de la invención el cáncer es cáncer de mama.

En otro aspecto, la invención está dirigida a un método *in vitro* para la predicción de la respuesta clínica a una terapia antitumoral con la composición según el segundo aspecto de la invención, definida anteriormente, en un paciente diagnosticado de cáncer que presenta alta probabilidad de responder a una terapia con dicha composición, que comprende:

- 5 (i) determinar los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 en una muestra de dicho paciente antes de la administración de la terapia,
- (ii) comparar dichos niveles de expresión con un valor de referencia,

10 en donde una alteración de los niveles de expresión de dichos genes con respecto al valor de referencia es indicativa de una mejor respuesta clínica a la terapia con la composición definida anteriormente o de que el paciente tiene una alta probabilidad de responder a la terapia con dicha composición.

15 El término “predicción”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la determinación de la probabilidad de que el paciente que sufre de cáncer responda favorable o desfavorablemente a una terapia antitumoral con la composición según el segundo aspecto de la invención. Especialmente, el término “predicción”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la valoración individual de la supervivencia global esperada de un paciente que sufre de cáncer si se trata con la composición según el segundo aspecto de la invención.

20 En la presente invención se entiende por “respuesta clínica” la respuesta de un paciente que sufre de cáncer a una terapia antitumoral. Para evaluar la respuesta a la terapia antitumoral puede utilizarse el sistema propuesto por Dworak [Dworak et al., *Int. J. Colorectal Dis.*, 1997, 12, 19-23] que clasifica la respuesta basándose en el grado de respuesta tumoral (GRT) en tres grupos: no respuesta tumoral (GRT 0 y 1), buena respuesta tumoral (GRT 2 y 3) y respuesta tumoral completa (GRT 4). El término “respuesta”, tal como se usa en el presente documento, puede ser una respuesta tumoral completa, en la que no hay células tumorales viables; o bien una buena respuesta tumoral, en la que se produce una regresión mayor del 25% de la masa tumoral con al menos algunas células tumorales viables. La “no respuesta” se define como la no-regresión o la regresión de menos del 25% de la masa tumoral. Los 25 pacientes que consiguen una buena respuesta o una respuesta completa se consideran como respondedores, y el resto de pacientes como no respondedores.

Para determinar la respuesta al tratamiento antes de la administración de la terapia puede utilizarse cualquier otro parámetro ampliamente aceptado para comparar la eficacia de tratamientos alternativos. Dichos parámetros incluyen, sin limitación:

- 30 - riesgo de recaída que, tal como se usa en el presente documento, se entiende como la probabilidad de un paciente de volver a desarrollar cáncer tras un período libre de enfermedad;
- progresión libre de enfermedad que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la proporción de pacientes en remisión completa que no han recaído de la enfermedad en el primer periodo de tiempo en el estudio;
- 35 - supervivencia libre de enfermedad que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la longitud del tiempo después del tratamiento en el que el individuo vive sin signos de enfermedad;
- respuesta objetiva que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la proporción de personas tratadas en las que se observa respuesta clínica;
- 40 - control tumoral que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la proporción de personas tratadas cuya respuesta (completa o parcial) se observa por un periodo de tiempo igual o superior a 6 meses;
- tiempo hasta la progresión que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la longitud del tiempo desde que se inicia el tratamiento hasta que la enfermedad empieza a progresar;
- supervivencia global que, tal como se usa en el presente documento, se refiere al porcentaje de pacientes que sobreviven, desde el momento del diagnóstico o tratamiento, al cabo de un período de tiempo definido;
- 45 - muerte por enfermedad que, tal como se usa en el presente documento, se refiere al porcentaje de pacientes que fallecen como consecuencia de la enfermedad, desde el momento del diagnóstico o tratamiento, al cabo de un período de tiempo definido.

En una realización de la invención el parámetro que se utiliza para determinar la respuesta clínica se selecciona de supervivencia libre de enfermedad, progresión libre de enfermedad y muerte por enfermedad.

50 En la presente invención se entiende por “paciente” cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, pero no se limita 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 paciente es un ser

humano de sexo femenino o masculino y de cualquier raza o edad. En el contexto de la presente invención, el paciente es un paciente que sufre de cáncer o que ha sido previamente diagnosticado de cáncer. En una realización preferida, el paciente es un paciente que sufre de cáncer de colon o de mama, o que ha sido previamente diagnosticado de cáncer de colon o de mama.

5 En este contexto se entiende como “terapia” la administración de una composición de extracto de romero según la invención.

En la presente invención se entiende por “alta probabilidad de responder a un tratamiento” como la probabilidad de que el paciente muestre una respuesta favorable a la terapia antitumoral. Esta respuesta favorable puede incluir, pero no se limita a, disminución de los síntomas, disminución de la duración de la enfermedad, estado patológico estabilizado, mejora del estado patológico. También puede incluir el aumento de la supervivencia, comparado con la supervivencia esperada si no se aplica el tratamiento.

La primera etapa del método de la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 en una muestra del paciente en estudio antes (como marcadores de pronóstico y factores predictivos de respuesta) o durante (como biomarcadores de respuesta) la administración de la terapia.

El término “muestra”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra biológica que puede obtenerse de un paciente. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas muestras incluyen muestras de biopsia, tejido, célula o fluido (sangre, suero, plasma, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, heces, orina, lágrimas, moco, sudor, leche, extractos cerebrales y similares). En una realización particular, dicha muestra es una muestra de tejido, preferiblemente una muestra de tejido tumoral. Dicha muestra puede obtenerse por métodos convencionales, tales como biopsia, usando procedimientos conocidos en el estado de la técnica por el experto en la ciencia médica. Métodos para obtener la muestra de la biopsia incluyen la resección quirúrgica de una masa de tejido o la microdissección u otros métodos de separación celular conocidos. Las células tumorales pueden obtenerse adicionalmente por citología de aspiración mediante la punción con una aguja fina conectada a una jeringa. Para simplificar la conservación y la manipulación de las muestras, éstas pueden fijarse en formalina y embeberse en parafina, o congelarse primero y después embeberse en un medio criosolidificable, tal como OCT-Compound, a través de la inmersión en un medio altamente criogénico que permita la congelación rápida.

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 puede realizarse a partir del ARN mensajero resultante de la transcripción de dichos genes (ARNm) o de un fragmento de dicho ARNm. Alternativamente, la cuantificación del nivel de expresión de dichos genes también puede realizarse a partir de su ADN complementario (ADNc) o de un fragmento de dichos ADNc. En una realización particular de la presente invención, la determinación de los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 se lleva a cabo mediante la medida de los niveles del ARN mensajero (ARNm) de dichos genes.

Para medir los niveles de ARNm de los genes de la invención, la muestra biológica puede tratarse físicamente o mecánicamente para disrupcionar el tejido o las estructuras celulares y liberar los componentes intracelulares a una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos para un posterior análisis. Los ácidos nucleicos se extraen de la muestra por procedimientos conocidos por el experto en la materia y comercialmente disponibles. El ARN se extrae posteriormente de las muestras congeladas o frescas por cualquiera de los métodos habituales, por ejemplo, los descritos en Sambrook, J., *et al.*, 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3. Preferiblemente, debe evitarse la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

El nivel de expresión puede determinarse usando ARNm obtenido de una muestra de tejido fijada en formalina y embebida en parafina. El ARNm puede aislarse de una muestra patológica almacenada o de una muestra de biopsia que primero se desparafina. Un método para desparafinar la muestra es lavar la muestra parafinada con un disolvente orgánico, tal como xileno. Las muestras desparafinadas pueden rehidratarse con una solución acuosa de un alcohol inferior. Alcoholes inferiores adecuados incluyen, por ejemplo, metanol, etanol, propanoles y butanoles. Las muestras desparafinadas pueden rehidratarse, por ejemplo, mediante sucesivos lavados con soluciones alcohólicas de alcoholes inferiores de concentración decreciente. Alternativamente, la muestra puede desparafinarse y rehidratarse simultáneamente. Después la muestra se lisa y se extrae el ARN. También puede obtenerse ARN de muestras de tejido tumoral fresco.

Técnicas adecuadas que pueden utilizarse en la presente invención para estudiar el perfil de expresión génica son, por ejemplo, RT-PCR, SAGE, Taqman o microarrays. Los niveles de expresión del ARNm pueden determinarse mediante transcripción inversa (RT) del ARNm seguida de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cuantificación del producto de la amplificación del ADNc. En una realización particular de la invención, la cuantificación de los niveles del ARNm de los genes de interés se realiza mediante una PCR cuantitativa múltiple. La detección puede realizarse en muestras individuales o en microarrays de tejidos.

El experto en la materia apreciará que el método de la invención puede ponerse en práctica usando tanto niveles absolutos de expresión de los genes como niveles relativos. Así, en la presente invención, la expresión “niveles de expresión” se usa para referirse tanto a niveles absolutos como a niveles relativos de expresión de un ARNm.

5 La expresión “niveles absolutos de expresión” se refiere a la cantidad de ARNm de interés total que aparece en una muestra. Dicho valor puede venir dado por la concentración de ARNm, expresada en unidades de masa de ARNm por unidad de volumen (por ejemplo, en ng/ml de muestra), en número de moléculas de ARN por unidad de volumen (por ejemplo, en pmol ARN /ml de muestra), en unidades de masa de ARNm por unidad de masa de ARN total (por ejemplo, pg ARNm específico / mg de ARN total) o en número de moléculas de ARN por unidad de masa de ARNm total (por ejemplo, en pmol ARN / mg de ARN total).

10 La expresión “niveles relativos de expresión” se refiere a la relación entre los niveles de expresión del ARNm objeto de estudio y de un ARNm de referencia, es decir, se define la concentración de ARNm de forma normalizada con respecto a dicho ARNm de referencia.

15 Para normalizar los valores de expresión de ARNm entre las diferentes muestras es posible comparar los niveles de expresión del ARNm de interés en las muestras a analizar con la expresión de un ARN control. Como “ARN control” en la presente invención se entiende ARN cuyos niveles de expresión no cambian o cambian sólo en cantidades limitadas en las células tumorales con respecto a células no-tumorales. Preferiblemente, el ARN control es ARNm derivado de genes que se expresan de manera constitutiva, que son aquellos que siempre están activos o que se transcriben de manera constante, y que codifican para proteínas que están constitutivamente expresadas y que llevan a cabo funciones celulares esenciales. Genes constitutivos preferidos que pueden utilizarse en la presente  
20 invención incluyen GAPDH, 18S y B2M y PSMB4.

En una realización de la invención, la cuantificación de la expresión génica relativa se calcula según el método Ct comparativo usando GAPDH, B2M, 18S y PSMB4 como control endógeno y controles de ARN comercial 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 de la muestra se calculan restando el valor CT del gen en estudio del valor del gen control [Ramírez de Molina et al., *Lancet Oncol.*, 2007, 8, 889-897; Ramírez de Molina et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008, 40, 1753-1763]. El resultado final obtenido para cada gen en esta etapa es un valor absoluto de expresión.

25 El perfil génico cuya expresión se analiza en el método de la presente invención está formado por 9 genes: GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2.

30 El gen GCNT3 codifica para la enzima glucosaminil (N-acetil) transferasa 3 (tipo mucina) (UniGene Hs. 194710); el gen AKR1B10 codifica para el miembro B10 de la familia 1 de enzimas de aldosa reductasa (UniGene Hs. 116724); el pseudogen LOC344887 que contiene un dominio semejante al de la familia NmrA (Gene ID 344887); el gen ABCC6 codifica para el miembro 6 de la subfamilia C (CFTR/MRP) de proteínas ATPasa del tipo ABC (cassette de unión a ATP) (UniGene Hs.442182); el gen SLFN5 codifica para el miembro 5 de la familia de proteínas schlafen  
35 (UniGene Hs. 709347); el gen ENTPD8 codifica para la enzima ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 8 (UniGene Hs. 512562); el gen GRB10 codifica para la proteína 10 unida al receptor del factor de crecimiento (UniGene Hs. 164060); el gen STC2 codifica para la proteína stanniocalcina 2 (UniGene Hs. 233160); y el gen ESR2 codifica para el receptor de estrógeno 2 (ER $\beta$ ) (UniGene Hs. 660607).

40 El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de dichos genes no afectan a la detección de la expresión de los mismos y, por lo tanto, las variantes de estos genes generadas por mutaciones de su secuencia de nucleótidos caen dentro del ámbito de la presente invención.

Una vez que se ha determinado un valor de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 en una muestra, la etapa (ii) de la invención consiste en calcular un factor predictivo en base a los niveles de expresión de dichos genes.

45 En una realización preferida de la invención el factor predictivo o pronóstico se calcula mediante la suma de los niveles de expresión de los genes, opcionalmente corregidos usando un coeficiente para cada gen.

Finalmente, la etapa (ii) de la invención consiste en comparar los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 obtenidos en la etapa (i) con un valor de referencia. La colección de muestras de las que deriva el valor de referencia está constituida preferiblemente por  
50 pacientes que sufren el mismo tipo de cáncer, o una mezcla de tejidos de individuos normales no afectados de cáncer.

El valor de referencia puede determinarse mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, determinando la media de los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 medidos en tejido tumoral procedente de muestras de biopsias de pacientes que sufren de cáncer que responden o no a la terapia antitumoral, o en tejido normal. Alternativamente, el valor de referencia podría corresponder al valor de la media de los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10,  
55

LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 medidos en una muestra de ARN obtenida mezclando cantidades iguales de ARN de cada una de las muestras tumorales obtenidas de biopsias de los pacientes que sufren cáncer y que responden o no a una terapia antitumoral. El valor de referencia también puede obtenerse de genes que se expresan de forma constitutiva procedentes del mismo paciente.

- 5 En una realización preferida de la invención, el valor de referencia se calcula a partir de los valores de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 en una población de pacientes que no responden a la terapia con la composición según la invención que comprende extracto de romero y un agente quimioterapéutico. Preferentemente, dicho valor de referencia es la mediana de los valores obtenidos a partir de la población de muestras de pacientes que no responden a la terapia con la composición según la invención que comprende extracto de romero y un agente quimioterapéutico

Una vez establecido el valor de referencia, los valores de expresión de los genes obtenidos en la etapa (i) pueden compararse con este valor de referencia y, por lo tanto, permite detectar alteraciones en los valores de expresión de los genes con respecto al valor de referencia.

- 15 En el contexto de la presente invención, se entiende por "alteración de los valores de expresión de los genes con respecto al valor de referencia" cualquier variación de los valores de expresión de los genes por encima o por debajo del valor de referencia. Una variación de los valores de expresión de los genes por encima o por debajo del valor de referencia puede ser 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 o menos, respectivamente, comparado con el valor de referencia.

- 20 Una vez que se ha realizado dicha comparación, el método de la invención permite hacer una predicción de si el paciente mostrará una mejor o peor respuesta a la terapia antitumoral con una composición de extracto de romero según la invención.

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no se deben considerar como limitativos de la invención.

## **EJEMPLOS**

### **Materiales y métodos**

#### *Extracto de romero*

La extracción de romero (*Rosmarinus officinalis*) mediante fluidos supercríticos se realizó de acuerdo con Ibáñez et al. [Ibáñez et al., *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 1400-1404]. El extracto de romero (SFRE) se disolvió posteriormente en etanol absoluto a 50 mg/mL y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

#### 30 *Cultivo celular*

Las células SW620 and HT-29 de cáncer de colon humano, y MDA-MB-231 Y MCF-7 derivadas de carcinomas humanos de mama fueron suministradas por ATCC, y se incubaron en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 2 mM de glutamina (Gibco) y 1% de solución de antibiótica-antimicótica (que contenía 10000 unidades/mL de penicilina, 10000 µg/mL de estreptomina y 25000 ng/mL de anfotericina B; Gibco). Las células primarias de colon Ccd841 y C18Co, también suministradas por ATCC, se crecieron en medio EMEM (LGCStandards) suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (GIBCO) y una mezcla de penicilina, estreptomina y anfotericina B (GIBCO). El medio de las placas de cultivo, así como de los pocillos de los experimentos, se reemplazó por medio fresco cada 2-3 días. Las células se mantuvieron bajo condiciones estándar de temperatura (37°C), humedad (95%) y dióxido de carbono (5%).

#### 40 *Ensayo de viabilidad celular*

La actividad antiproliferativa del extracto de romero se calculó mediante el ensayo del MTT (metil-tiazolil-tetrazolio). Las células en fase de crecimiento exponencial se sembraron en placas de 24 pocillos, añadiendo 500 µL por pocillo a una densidad de entre  $25 \times 10^3$  y  $60 \times 10^3$  células, y se incubaron durante 24 horas. Después, se midió el número de células viables de los pocillos control (tiempo 0 horas) como se describe a continuación, e inmediatamente después el medio de los pocillos a ensayar se reemplazó con medio de cultivo solo (pocillos blanco) o suplementado con diferentes concentraciones de 5-fluorouracilo (5-FU) (Sigma), extracto supercrítico de romero (SFRE), o la combinación de ambos, según el experimento, y las placas se incubaron durante 48 horas. Para determinar el número de células viables, se añadieron 50 µL de solución de MTT (5 mg/ml en PBS) a cada pocillo y se incubaron durante 3 horas. Pasado ese tiempo, el medio se retiró y se añadieron 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) con el fin de lisar las células y resuspender el formazán (producto metabólico del MTT). Las cantidades de formazán, que son directamente proporcionales al número de células viables, se midieron a 560 nm en el espectrofotómetro (UVM 340 Biochrom, Cambridge). Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces, cada uno de ellos con tres réplicas de cada concentración a ensayar. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  s.e.m. y en su análisis se empleó la técnica del Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido de las pruebas post hoc de Bonferroni y Tukey. Valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. El posible sinergismo entre el 5-FU y el SFRE se analizó

mediante el programa informático Calculusyn (Biosoft, UK), que se basa en el método de Chou-Talalay [Chou et al., *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 6438-6442].

#### *Crecimiento en medio libre de anclaje*

5 El crecimiento independiente de anclaje se comprobó por la habilidad de las células de formar colonias en agar blando. Las bases de las placas de cultivo se cubrieron con una capa de medio de cultivo con agar al 0,5%. Una vez solidificado, se añadió encima la capa superior, que contenía medio de cultivo con 0,4% de agar y  $5 \times 10^4$  células. A esta capa superior se le añadió extracto de romero en un experimento alternativo. Estas placas de cultivo se incubaron durante 4 semanas bajo condiciones estándar para el crecimiento de las colonias. El experimento se realizó por triplicado. Durante el tiempo de incubación, las placas fueron irrigadas dos veces por semana con medio de cultivo solo (placas control) o suplementado con extracto supercrítico de romero. Para visualizar las colonias formadas, se añadió cristal violeta al 0,005% en PBS y se incubó durante una hora a 37 °C, según Ramírez de Molina et al. [Ramírez de Molina et al., *Cancer Res.*, 2005, 65, 5647-5653]. Después de retirar la solución de cristal violeta, las colonias se contaron bajo el microscopio.

#### *Actividad antitumoral in vivo*

15 Ensayos de xenografías de células humanas derivadas de carcinoma colorectal (HT-29) fueron realizados en ratones inmunodeprimidos obtenidos de Harlan (Barcelona, España), mediante la inyección subcutánea de 106 cells/0,1 mL tal y como se describe en Hernando et al. [Henando E et al., *Oncogene.*, 2009, 28, 2425-2435]. Los ratones fueron divididos al azar en dos grupos (n=18). Al grupo experimental se le administró oralmente SFRE (120 mg/kg) durante 5 días consecutivos a la semana mientras que al grupo control se le administró el vehículo siguiendo la misma pauta. El crecimiento tumoral se evaluó cada 4-6 días, y el volumen tumoral se determinó midiendo el diámetro mayor (D) y menor (d), calculándose según la fórmula  $V=(D*d^2)/2$ . Los ratones se mantuvieron en un área libre de patógenos según la guía española de cuidado animal.

#### *Aislamiento de ARN*

25 Las células de cáncer de colon ( $3,2 \times 10^5$  por placa) se sembraron en placas p60 y se mantuvieron bajo condiciones estándar. Pasadas 24 horas de incubación, diferentes concentraciones de extracto supercrítico de romero se añadieron a las placas correspondientes. Después de 48 horas, se retiró el medio y se extrajo el ARN total de cada placa utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen) según el protocolo del fabricante. La cantidad y pureza del ARN total obtenido se determinó por espectroscopía ultravioleta (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA).

#### *Ensayos de expresión génica*

30 El análisis de expresión génica por microarrays fue realizado por Nimgenetics S.L. (Madrid, Spain). El control de calidad del ARN se realizó en el Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies). En todos los casos, el número de integridad del ARN fue superior a 8. Los ARNs complementarios fueron preparados para la hibridación en una plataforma Agilent G4112F (Microarray del Genoma Humano Completo 44k) utilizando el sistema de expresión génica de un solo color (Agilent Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos microarrays contienen alrededor de 41,000 genes humanos y transcritos con una sonda 60 nucleótidos representando cada secuencia. Los datos de los análisis por microarrays fueron extraídos con el programa Feature Extraction Software versión 10.7 (Agilent Technologies), y el análisis de estos datos se llevó a cabo utilizando el programa GeneSpring GX version 10.0 (Agilent Technologies). Para determinar las diferencias de expresión génica entre grupos, se utilizó la prueba t de Student pareada junto con la corrección de pruebas múltiples de Benjamini y Hochberg. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Adicionalmente, se fijó un cambio mínimo de expresión génica (ya sea de sobreexpresión o de represión) de 2 veces el control para definir que un gen está diferencialmente regulado. Los resultados del análisis de microarrays se analizaron más ampliamente mediante el programa informático Ingenuity System Pathway Analysis (Ingenuity Systems, USA).

#### *Reacción en cadena de la polimerasa PCR a tiempo real (qPCR)*

45 El ARN fue extraído de células control y tratadas con extracto de romero (ver Aislamiento de ARN) y una cantidad de ARN de 400 ng se transcribió de manera reversa a ADN complementario utilizando el sistema High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems) según instrucciones el fabricante. Para la qPCR, se utilizó para cada gen el ensayo Taqman de expresión génica correspondiente, que contiene el cebador específico y la sonda Taqman. La PCR se realizó en tiempo real en el equipo 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems), en duplicado, de acuerdo con el protocolo del fabricante. La expresión del gen 18S se utilizó en cada muestra como control endógeno. El programa informático RQ Manager (Applied Biosystems) se utilizó para el análisis de los datos. Para calcular la expresión relativa de cada gen, se aplicó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  según descrito previamente [Ramírez de Molina et al., *Lancet Oncol.*, 2007, 8, 889-897; Ramírez de Molina et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008, 40, 1753-1763].

55

**Ejemplo 1. El extracto de romero obtenido mediante tecnología de fluidos supercríticos induce una alteración metabólica que resulta en una inhibición de la proliferación, transformación y tumorigénesis de células tumorales de colon.**

5 Para desarrollar este estudio se han utilizado dos líneas celulares derivadas de adenocarcinomas de colon humanos, SW620 y HT-29, que han sido tratadas con un extracto de romero obtenido por tecnología de fluidos supercríticos con CO<sub>2</sub> a presiones comprendidas entre 200 y 300 bar, y temperaturas entre 30 y 70 °C. El extracto posee un contenido en diterpenos fenólicos entre el 15 y el 50%.

10 Se ha determinado la sensibilidad al extracto de romero de ambas líneas celulares de cáncer de colon determinando la IC<sub>50</sub> (concentración a la que se produce el 50% de la inhibición de la proliferación celular), observándose una sensibilidad acusada y similar en ambas líneas (36,46 µg/mL para SW620 y 35,17 µg/mL para HT-29 a 48 h de tratamiento). Resultados similares se han obtenido utilizando dos preparaciones distintas de extracto supercrítico de romero siguiendo la misma metodología y mismo protocolo de extracción. Fibroblastos humanos de colon primarios (Ccd841 y C18Co) han sido también tratados con SFRE, encontrándose muy poco afectadas en estas condiciones. Para llegar a alcanzar una afectación en células primarias en el mismo rango de magnitud que el referido en las células tumorales se necesita un tiempo de tratamiento 3 veces superior, encontrando por tanto una buena ventana terapéutica (por su escaso crecimiento y afectación por el SFRE no es posible dar un valor de sensibilidad en estas células a 48h de tratamiento, IC<sub>50</sub> a 144 h 55,19 µg/mL para Ccd841 y 46,52 µg/mL para C18Co).

20 Estudios de actividad antiproliferativa se han realizado en otros sistemas celulares por otros autores, pero no en cáncer de colon, y no se ha descrito si esta inhibición de la proliferación se debe a un efecto citoestático o citotóxico. Con el fin de profundizar en el efecto del extracto de romero en células de cáncer de colon, hemos determinado la concentración a la que se produce inhibición de la proliferación celular (inhibitory concentration o IC<sub>50</sub>, que refleja la concentración del agente a la que se produce el 50% de la inhibición de la viabilidad celular dando idea de la sensibilidad al compuesto, y growth inhibitory 50 o GI<sub>50</sub>, teniendo en cuenta el número de células iniciales, dando idea del poder inhibitorio de la proliferación celular del agente), parada del crecimiento celular (*tumor growth inhibitory concentration* o TGI, reflejo de su efecto citoestático), así como la concentración a la que se produce un 25 50% de muerte celular (*lethal concentration* 50 o LC<sub>50</sub>, reflejo de su efecto citotóxico) en ambas líneas. Como se puede observar en la Tabla 1, el extracto de romero es capaz de inducir inhibición de la proliferación y la muerte de las células tumorales de forma dosis dependiente, sugiriendo un efecto específico del extracto de romero sobre el mecanismo de proliferación y muerte en estas células.

30 **Tabla 1.** Respuesta *in vitro* de dos líneas humanas derivadas de cáncer de colon (SW620 and HT-29) a extracto de romero supercrítico (SFRE) a 48 h de tratamiento. Los resultados representan la media ± s.e.m., en µg/mL, de al menos tres experimentos independientes realizados en triplicado (véase la Figura 1).

	SW620	HT-29
IC <sub>50</sub>	36,46 ± 7,23	35,17 ± 6,54
GI <sub>50</sub>	26,58 ± 5,58	16,92 ± 3,92
TGI	53,51 ± 4,87	67,89 ± 19,59
LC <sub>50</sub>	91,93 ± 13,82	141,84 ± 50,19

35 Sin embargo, un efecto sobre la proliferación de células tumorales no es un reflejo de su actividad antitumoral. Para tener una medida de su actividad antitumoral *in vitro* hemos analizado el efecto del extracto de romero en la capacidad transformante de células derivadas de tumores de colon humanos determinando su capacidad de inhibición del crecimiento en un medio libre de anclaje o agar blando. Como se puede observar en la Figura 2, un contacto suave simplemente en las gotas de medio de riego de estas células es suficiente para inhibir 3,5 veces su capacidad transformante, que es bloqueada hasta 900 veces al tener un contacto continuo con el extracto de romero al estar éste presente en el agar. Se observa que la capacidad de crecimiento en medio libre de anclaje de células humanas de cáncer de colon es inhibida por el tratamiento con SFRE.

40 Finalmente, hemos analizado el efecto antitumoral de SFRE *in vivo* en ratones inmunodeprimidos mediante ensayo de xenografía con células tumorales humanas de colon HT-29. Como se puede observar en la Tabla 2, el número de tumores desarrollados en los ratones control fue significativamente superior que en el grupo de ratones tratados con SFRE, indicando que el extracto de romero reduce significativamente la formación y progresión del tumor. Dado que en este caso, al contrario de lo que ocurre en ensayos de promoción de tumores por carcinógenos químicos, las células tumorales ya se encuentran en el organismo al iniciar el tratamiento con SFRE, estos resultados sugieren que el extracto de romero no sólo actúa como agente quimiopreventivo, sino también como un agente bloqueante del desarrollo y progresión tumoral.

**Tabla 2.** Respuesta *in vivo* de xenografías de cáncer de colon a extracto de romero. Células HT-29 han sido inyectadas s.c. en ratones inmunodeprimidos, y posteriormente los ratones han sido oralmente tratados, bien con el vehículo como control, o bien con SFRE (150 mg/Kg) durante 5 días consecutivos seguidos de dos días de descanso durante dos semanas. En la tabla se muestra el desarrollo tumoral a día 9 del experimento.

5

Grupos	n	Tumores desarrollados (n)	P
Control	34	25 (74%)	0,043
SFRE	36	18 (50%)	

10

Con el fin de identificar el mecanismo por el que se produce este efecto y verificar si se trata de un mecanismo específico y no una consecuencia de la conocida actividad antioxidante de los componentes del extracto de romero, hemos realizado un estudio de análisis de expresión génica en células humanas de cáncer de colon SW620 tratadas con extracto de romero utilizando la plataforma de Agilent G4112F (*whole human genome microarray*) en las condiciones en las que hemos observado los efectos biológicos de efecto antiproliferativo, citoestaticidad y citotoxicidad. Las condiciones en las que se produce un efecto citoestático son las más restrictivas ya que son suficientes para inducir un bloqueo total de la proliferación pero sin que se hayan disparado todos los mecanismos inductores de muerte celular. En estas condiciones, y teniendo en cuenta un filtro de dos veces de expresión diferencial y una  $p \leq 0,05$  corregida para el experimento o FDR, encontramos 50 genes que se encuentran diferencialmente expresados tras el tratamiento con el extracto supercrítico de romero de forma significativa. De estos 50 genes, 19 son comunes a las tres condiciones en las que se produce un efecto biológico, indicando que estos 19 genes son los candidatos a ser fundamentales efectores del mecanismo de acción de este compuesto (Tabla 3).

15

20

25

**Tabla 3.** El experimento se repitió dos veces, cada una de ellas realizadas en triplicado. Los genes se seleccionaron al tener una diferencia de expresión absoluta mayor que dos de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), excepto para la concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , donde el leve efecto biológico encontrado resultó en una modulación no significativa de la expresión génica.

Genes disminuidos en células SW620 después del tratamiento con SFRE								
		30 $\mu\text{g}/\text{mL}$		60 $\mu\text{g}/\text{mL}$		100 $\mu\text{g}/\text{mL}$		
Nombre de la sonda	Símbolo del gen	Cambio en expresión	Valor p	Cambio en expresión	Valor p	Cambio en expresión	Valor p	
A_23_P166269	FAM3B	-2,70	0,16468	-35,57	0,04919	-17,17	0,03635	
A_23_P52668	NAALADL1	-4,03	0,12993	-18,16	0,04919	-12,34	0,02916	
A_23_P137173	TMSB15A	-2,65	0,14795	-10,90	0,03101	-8,78	0,03630	
A_23_P89649	KRTAP3-3	-2,47	0,16945	-10,55	0,04919	-7,66	0,03472	
A_23_P44335	ENTPD8	-3,44	0,12993	-9,60	0,04919	-10,52	0,03894	
A_23_P11629	TMEM61	-7,72	0,13193	-8,96	0,03101	-3,91	0,02765	
A_23_P122976	GNAI1	-2,88	0,12993	-4,33	0,04919	-5,14	0,02750	
A_23_P205959	ALDH1A3	-3,52	0,13649	-3,37	0,04736	-4,67	0,03131	
A_23_P100539	ABCC6	-2,39	0,22378	-3,10	0,04919	-5,51	0,04288	

Genes aumentados en células SW620 después del tratamiento con SFRE								
		30 $\mu\text{g}/\text{mL}$		60 $\mu\text{g}/\text{mL}$		100 $\mu\text{g}/\text{mL}$		
Nombre de la sonda	Símbolo del gen	Cambio en expresión	Valor p	Cambio en expresión	Valor p	Cambio en expresión	Valor p	

A_23_P110686	STC2	2,60	0,14795	6,29	0,04919	14,54	0,02825
A_23_P312358	BEND7	2,50	0,12993	6,49	0,04919	10,76	0,02703
A_23_P414343	MT1H	3,98	0,25471	6,53	0,04919	17,88	0,04361
A_23_P69810	AGPAT9	5,63	0,12976	10,40	0,04919	32,73	0,02675
A_23_P37685	TMEM204	6,14	0,17828	13,33	0,04919	46,07	0,03438
A_23_P402899	SLFN5	-3,76	0,13253	14,03	0,04919	10,91	0,03102
A_23_P122863	GRB10	11,13	0,12976	70,35	0,04919	130,15	0,02519
A_23_P151915	GCNT3	7,52	0,12976	157,48	0,03101	209,74	0,02519
A_24_P68908	LOC344887	46,47	0,12993	664,81	0,04919	1321,64	0,02519
A_23_P93641	AKR1B10	217,18	0,12976	1011,78	0,04919	411,01	0,03032

5 Estos genes han sido analizados en ontología genética utilizando el software Ingenuity con el fin de definir los procesos y funciones que se ven mayoritariamente alteradas de forma significativa. Con este estudio hemos identificado que un alto número de genes dentro de estos 19 se encuentran en una ruta de síntesis y degradación de proteínas, teniendo una gran relevancia la alteración del metabolismo lipídico (Tablas 4 y 5).

10 **Tabla 4.** Principales rutas reguladas por el extracto de romero implicadas en su efecto biológico en la inhibición de la progresión tumoral. La mayor puntuación (Score) representa la ruta más alterada de forma significativa con el mayor número de genes alterados dentro de la misma ruta. El score se expresa como el logaritmo negativo del valor de p. Valores de score mayor o iguales a 2 tienen el 99% de seguridad de no haber sido generados únicamente de manera aleatoria.

<b>Funciones de las rutas asociadas</b>	<b>Score*</b>
Muerte celular, degradación de proteínas, síntesis de proteínas	25
Respuesta inflamatoria, enfermedad infecciosa, mecanismo de infección	3
Metabolismo de ácidos nucleicos, bioquímica de moléculas pequeñas	3
Desarrollo y función de tejido conectivo, morfología tisular, crecimiento y proliferación celular	2
Desarrollo celular, desarrollo y función de sistema muscular y esquelético, desarrollo tisular	2

**Tabla 5.** Funciones celulares alteradas de forma significativa en células humanas de cáncer de colon tratadas con SFRE según análisis por ontología genética.

Funciones molecular y celular	Valor p	# Moléculas
Metabolismo lipídico	1,14E-03 - 2,76E-02	5
Metabolismo de ácidos nucleicos	1,14E-03 - 2,03E-02	3
Ciclo celular	1,14E-03 - 2,37E-02	2
Metabolismo de fármacos	1,14E-03 - 1,81E-02	1
Expresión génica	1,14E-03 - 3,14E-02	1

Como se puede observar en la Figura 3, estos resultados han sido validados por PCR cuantitativa a tiempo real. Estos resultados indican que la alteración metabólica que se produce por el extracto de romero es la causa fundamental de su efecto antiproliferativo y antitumoral en células de colon humanas, y que no se trata de un efecto indirecto debido a su actividad antioxidante. Dada la importancia de la absorción y metabolización de nutrientes en tumores gástricos, estos resultados sugieren que esta alteración metabólica puede suponer la base fundamental de la acción del extracto de romero al menos en este tipo de tumores.

#### 10 **Ejemplo 2. Estudio del efecto del extracto de romero como agente potenciador del tratamiento con quimioterapia.**

Con el fin de estudiar la posible utilización del extracto como agente coadyuvante a la quimioterapia convencional en cáncer de colon, se realiza un estudio de la actividad de este compuesto asociado al 5-FU, antimetabolito inhibidor de la timidilato sintasa que constituye la base del tratamiento con quimioterapia en pacientes con carcinomas colorrectales, también indicado en otros tumores como mama, cabeza y cuello, esófago, cérvix o renal. Como se puede observar en la Figura 4, el tratamiento simultáneo de células tumorales de cáncer de colon humanas con extracto de romero y 5-FU potencia su actividad en un 50%, de manera que obtenemos el mismo efecto con ambos agentes combinados que con el doble de dosis del 5-FU en solitario. Se observa que el tratamiento simultáneo de 5-FU con una pequeña cantidad de extracto supercrítico de romero (15 µg/mL, correspondiente a la mitad de su IC50) es suficiente para potenciar su efecto en células tumorales de colon en más de un 50%. El índice de combinación (CI=0,516) se determina por el método de Chou-Talalay

Además, por los datos obtenidos de los microarrays realizados en estas células tras el tratamiento con extracto de romero hemos identificado la inhibición del gen ABCC6 (MDR6) asociado con resistencia a fármacos (Tabla 3), así como la modulación específica de genes implicados en el metabolismo lipídico, la metabolización del 5-FU y en el metabolismo del folato (íntimamente relacionado con la actividad de este fármaco). La alteración en estos genes supone una validación del efecto biológico observado, y sugiere que este efecto de potenciación de un agente quimioterapéutico podría no sólo producirse con 5-FU sino también con otros fármacos relacionados o cuyo efecto se vea alterado por la expresión de MDR6.

#### 30 **Ejemplo 3. Efecto beneficioso del extracto de romero en tumores relacionados con la señalización de estrógenos como es el caso del cáncer de mama.**

Se determina la sensibilidad al extracto de romero de dos líneas humanas derivadas de adenocarcinomas de mama, por un lado la línea dependiente de estrógenos MCF-7 (clasificada como ER+), y por otro lado de la línea MDA-MB-231, clasificada como ER-. Sorprendentemente hemos encontrado una notable y significativa diferencia de sensibilidad entre ambas, siendo la IC50 de MDA-MB-231 de 21,11 µg/mL, mientras que la de MCF-7 es de 81,21 µg/mL, lo que supone que las células ER- son prácticamente 4 veces más sensibles que las células ER+.

La inhibición de la proliferación celular por extracto de romero en estas células se ha comentado recientemente en un trabajo previo en el que analizar estas células como parte de un panel de varios sistemas [Yesil-Celiktas et al., *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2010, 65, 158-163; Cheung y Tai, *Oncol. Rep.*, 2007, 17, 1525-1531]. En este estudio los autores reportan una gran sensibilidad de las células derivadas de leucemia, que contrastan con la línea MCF-7, siendo éstas las células menos sensibles. Sin embargo, los autores no hacen ninguna referencia a la diferencia existente entre dos líneas celulares del mismo sistema (cáncer de mama) con características tan específicas como es una diferencial capacidad de respuestas a estrógenos.

Dado que la terapia hormonal es una de las principales aproximaciones terapéuticas en los casos de cáncer de mama en los que es factible aplicarla, y, por tanto, la determinación de la respuesta hormonal es fundamental en este tipo de tumores, los inventores han profundizado en el estudio de la implicación de la ruta de estrógenos en la respuesta a extracto de romero de células tumorales de mama.

5 En primer lugar, para determinar que la alta sensibilidad encontrada en estas células se traduce en una fuerte inhibición de su capacidad tumorigénica, se realiza un ensayo *in vitro* de crecimiento en soft agar tal y como se ha descrito anteriormente. Como se puede observar en la Figura 5 la agresividad de las células ER- MDA-MB-231 se refleja en la generación de un alto número de colonias (tanto normales como de gran tamaño) en agar blando, que es absolutamente bloqueada por el tratamiento con extracto supercrítico de romero.

10 Finalmente, con el fin de estudiar la posible implicación de la modulación de la ruta de estrógenos mediada por extracto de romero en este efecto, se realiza un estudio de análisis de expresión génica en estas células tratadas con extracto supercrítico de romero utilizando la plataforma de Agilent G4112F (*whole human genome microarray*) en las condiciones en las que los inventores han observado sensibilidad (20 µg/mL), citoestaticidad (40 µg/mL) y citotoxicidad (90 µg/mL).

En estas condiciones, y teniendo en cuenta un filtro de dos veces de expresión diferencial y una  $p \leq 0,05$  corregida para el experimento o FDR, encontramos 7500 genes que se encuentran alterados en todas las condiciones, probablemente reflejo de la mayor sensibilidad encontrada en estas células.

15 Es importante destacar que de los 19 genes que se encuentran específicamente alterado en cáncer de colon, 8 de ellos (GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2) están también significativamente alterados en cáncer de mama, corroborando la especificidad y relevancia de estas rutas metabólicas en el mecanismo de acción del extracto supercrítico de romero.

20 Por otro lado, dada la importancia de la señalización por estrógenos en cáncer de mama, y que los resultados de los experimentos realizados *in vitro* sugieren una dependencia de esta ruta en su efecto en células de mama, se analiza la expresión de los genes implicados en respuesta al tratamiento de células tumorales de mama con extracto de romero.

25 Como se puede observar en la Tabla 6, de los 346 genes que codifican a proteínas para la ruta de señalización de estrógenos, 271 (78%) se encuentran alterados tras el tratamiento con el extracto de romero en alguna de las concentraciones. En total, de los 346 genes de la ruta, 96 (28%) están significativamente alterados de forma consistente en todas las concentraciones. Teniendo en cuenta sólo estos genes alterados de forma común a todas las condiciones, de las 47 proteínas implicadas en la señalización por estrógenos 16 (34%) se encuentran significativamente alteradas por el extracto de romero, indicando la fuerte modulación de la ruta que se produce por este componente.

**Tabla 6.** Modulación de genes de la ruta de señalización por estrógenos por extracto de romero en células tumorales de cáncer de mama. Fondo blanco: genes que no se encuentran alterados por el tratamiento con extracto de romero, fondo azul: genes significativamente regulados en alguna concentración, fondo amarillo: genes significativamente regulados en todas las condiciones de tratamiento.

GNA11	PRKAR1A	SHC3	RAF1	POLR2A	TBP	AATK	LMTK2	ANGPTL6	FGF4	LTBP1	TIMP3
GNA12	PRKAR1B	SHC1	ARAF	POLR2B		ALK	LMTK3	AREG	FGF5	LTBP2	TIMP4
GNA13	PRKAR2A	SHC2	BRAF	POLR2C	EP300	AXL	MERTK	BCGF1	FGF6	LTBP3	THPO
GNA14	PRKAR2B	PIK3R1				CSF1R	MET	BDNF	FGF7	LTBP4	UTS2
GNA15	PRKACA	PIK3R2	MAP3K1	TAF1	CREBBP	DDR1	MUSK	BMP15	FGF8	MDK	PPAP2B
GNA1	PRKACB	PIK3R3	MAP3K2	TAF1L		DDR2	NTRK1	BMP10	GAS1	KITLG	VEGFA
GNAI2	PRKACG	PIK3R4	MAP3K3	TAF2	SIN3A	EPHA1	NTRK2	BMP2	GAS2	NGF	VEGFB
GNAI3		PIK3R5	MAP3K4	TAF3	SIN3B	EPHA2	NTRK3	BMP3	GAS6	NRG1	VEGFC
GNAL	CREB1	PIK3C2G	MAP3K5	TAF4		EPHA3	PDGFRA	BMP4	GAS8	NRG2	FIGF
GNAO1	ATF4	PIK3C3		TAF4B	NCOR1	EPHA4	PDGFRB	BMP5	GDF10	NRG3	
GNAQ	CREB3	PIK3C2A	MAPK8	TAF5	NCOR2	EPHA5	PTK7	BMP6	GDF15	NRG4	
GNAS	CREB3L4	PIK3C2B	MAPK9	TAF5L		EPHA7	RET	BMP7	GDF5	NTF3	
GNAT1		PIK3CA	MAPK10	TAF6	HDAC1	EPHA8	MST1R	BMP8A	GDF6	NTF4	
GNAT2	BCL2	PIK3CD		TAF6L	HDAC2	EPHB1	ROR1	GDF2	GDF9	OGN	
GNAZ		PIK3CB	MAPK14	TAF7	HDAC3	EPHB2	ROR2	BTC	GFER	PDGFA	
GNAT3	AKT1		MAPK11	TAF7L	HDAC4	EPHB3	ROS1	CLEC11A	GH1	PDGFB	
	AKT2	CHUK	MAPK12	TAF9	HDAC5	EPHB4	RYK	CTGF	GH2	PDGFC	
GNB1	AKT3	IKBKB	MAPK13	TAF9B	HDAC6	EPHB6	TEK	TYMP	GHRH	PDGFD	
GNB2		IKBKE		TAF10	HDAC7	EPOR	TYRO3	EGF	GMFG	PGF	
GNB3	NOS3	IKBKG	MAPK3	TAF11	HDAC8	EGFR		PROK1	GNRH1	PTN	
GNB4			MAPK1	TAF12	HDAC9	ERBB2		FGF1	GNRH2	CXCL12	
GNB5	ESR1	NFKB1		TAF13	HDAC10	ERBB3	SRA1	FGF10	GPC6	SEMA3A	
	ESR2	REL	SP1	TAF15	HDAC11	ERBB4		FGF11	HDGF	SEMA4B	
GNG2		RELB				FGFR1	NCOA3	FGF12	HGF	SEMA4G	
GNG3	SRC	RELA	JUN	GTF2A1	BRCA1	FGFR2		FGF13	IGF1	SEMA5A	
GNG4		NFKB2		GTF2A2		FGFR3	NCOA1	FGF14	IGF2	SPON1	
GNG5	SHC3		FOS	GTF2B	MIRGPRF	FGFR4		FGF16	IGF2AS	TBRG1	
GNG7	SHC1	HRAS		GTF2H1		FLT1	NCOA2	FGF17	IL2	TDGF1	
GNG8	SHC2	KRAS	ELK1	GTF2H2	PHB2	FLT3		FGF18	IL3	TGFA	
GNG10		NRAS		GTF2H3		FLT4	CCND1	FGF19	IL6	TGFB1	
GNG11	GRB2	RRAS	SMARCA4	GTF2H4	NROB1	IGF1R		FGF2	IL9	TGFB2	
GNG12		MRAS		GTF2H5		INSR	DDX17	FGF20	PPBP	TGFB3	
GNG13		RRAS2	PELP1	GTF2E1	NRIP1	INSRR		FGF21	PSIP1	LEFTY2	
GNGT1				GTF2E2		KDR	MED1	FGF22	LEFTY1	KLF10	
GNGT2		SOS1	UBE3A	GTF2F1	PPARGC1A	KIT		FGF23	LHB	TIMP1	
		SOS2		GTF2F2		LIFR		NUDT6		TIMP2	

5

Es importante destacar que el receptor de estrógenos beta (ESR2), que se ha descrito recientemente que está disminuido en cáncer de mama asociado a peor pronóstico y que es fundamental en la respuesta a tamoxifeno (terapia hormonal ampliamente utilizada en este tipo de tumor), se encuentra significativamente aumentado en todas las condiciones de tratamiento por extracto de romero. Estos resultados sugieren, no sólo un papel relevante de este receptor nuclear en la respuesta a extracto de romero en este sistema, sino también una posible potenciación del efecto de tamoxifeno mediada por romero al estar uno de sus principales mediadores aumentado de forma específica.

10

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un extracto de romero en la preparación de una composición para el tratamiento de un cáncer en el que existe una alteración en la señalización por estrógenos o en el metabolismo lipídico.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en que el cáncer se selecciona de cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer de recto, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, pulmón, cáncer ovárico y cáncer de mama.
3. Uso según la reivindicación 2, en que el cáncer es cáncer de colon.
4. Uso según la reivindicación 2, en que el cáncer es cáncer de mama.
- 10 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el extracto de romero se obtiene mediante extracción con fluidos supercríticos.
6. Uso según la reivindicación 5, en que el fluido supercrítico es dióxido de carbono.
7. Uso según la reivindicación 6, en que el dióxido de carbono está a una temperatura comprendida entre 30 °C y 70 °C y a una presión comprendida entre 200 y 300 bar.
- 15 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la composición es una composición farmacéutica.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que la composición es una composición alimentaria o suplemento nutricional.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el extracto de romero se administra en combinación con un agente quimioterapéutico.
- 20 11. Uso según la reivindicación 10, en que el agente quimioterapéutico se selecciona de cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mercloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, ifosfamida, metotrexato, 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo (5-FU), ara-c, capecitabina, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, irinotecan, topotecan, amsacrina, etopósido, etopósido fosfato, tenipósido, actinomicina, doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina, epirubicina, bleomicina, plicamicina, mitimicina y tamoxifeno.
- 25 12. Uso según la reivindicación 11, en que el agente quimioterapéutico se selecciona de 5-fluorouracilo, tamoxifeno.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en que el agente quimioterapéutico se administra en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica, composición alimentaria o suplemento nutricional que comprende el extracto de romero.
- 30 14. Una composición que comprende extracto de romero y un agente quimioterapéutico.
15. La composición según la reivindicación 14, en que el agente quimioterapéutico se selecciona de cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mercloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, ifosfamida, metotrexato, 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo (5-FU), ara-c, capecitabina, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, irinotecan, topotecan, amsacrina, etopósido, etopósido fosfato, tenipósido, actinomicina, doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina, epirubicina, bleomicina, plicamicina, mitimicina y tamoxifeno.
- 35 16. La composición según la reivindicación 15, en que el agente quimioterapéutico se selecciona de 5-fluorouracilo y tamoxifeno.
17. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en que el extracto de romero se obtiene mediante extracción con fluidos supercríticos.
- 40 18. La composición según la reivindicación 17, en que el fluido supercrítico es dióxido de carbono.
19. La composición según la reivindicación 18, en que el dióxido de carbono está a una temperatura comprendida entre 30 °C y 70 °C y a una presión comprendida entre 200 y 300 bar.
- 45 20. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer.
21. Uso según la reivindicación 20, en que el cáncer se selecciona de cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer de recto, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, pulmón, cáncer ovárico y cáncer de mama.

22. Uso según la reivindicación 21, en que el cáncer es cáncer de colon.
23. Uso según la reivindicación 21, en que el cáncer es cáncer de mama.
- 5 24. Un método *in vitro* para la predicción de la respuesta clínica a una terapia antitumoral con la composición según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19 en un paciente diagnosticado de cáncer que presenta alta probabilidad de responder a una terapia con la composición según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, que comprende:
- (i) determinar los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 en una muestra de dicho paciente antes de la administración de la terapia,
- 10 (ii) comparar los niveles de expresión obtenidos en la etapa (i) con un valor de referencia,
- en donde una alteración de los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 con respecto al valor de referencia es indicativa de una mejor respuesta clínica a la terapia con la composición según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19 o de que el paciente tiene una alta probabilidad de responder a la terapia con dicha composición.
- 15 25. El método según la reivindicación 24, en que el valor de referencia se calcula a partir de los valores de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 en una población de pacientes que no responden a la terapia con la composición según las reivindicaciones 14 a 19.
- 20 26. El método según la reivindicación 25, en que el valor de referencia es la mediana de los valores obtenidos a partir de la población de muestras de pacientes que no responden a la terapia con la composición según las reivindicaciones 14 a 19.
27. El método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en que la respuesta clínica se selecciona de supervivencia libre de enfermedad, respuesta objetiva y supervivencia global por enfermedad.
- 25 28. El método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en que la determinación de los niveles de expresión de los genes GCNT3, AKR1B10, LOC344887, ABCC6, SLFN5, ENTPD8, GRB10, STC2 y ESR2 se lleva a cabo mediante la medida de los niveles de ARN mensajero de dichos genes.
29. El método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en que el cáncer se selecciona del cáncer de colon y cáncer de mama.

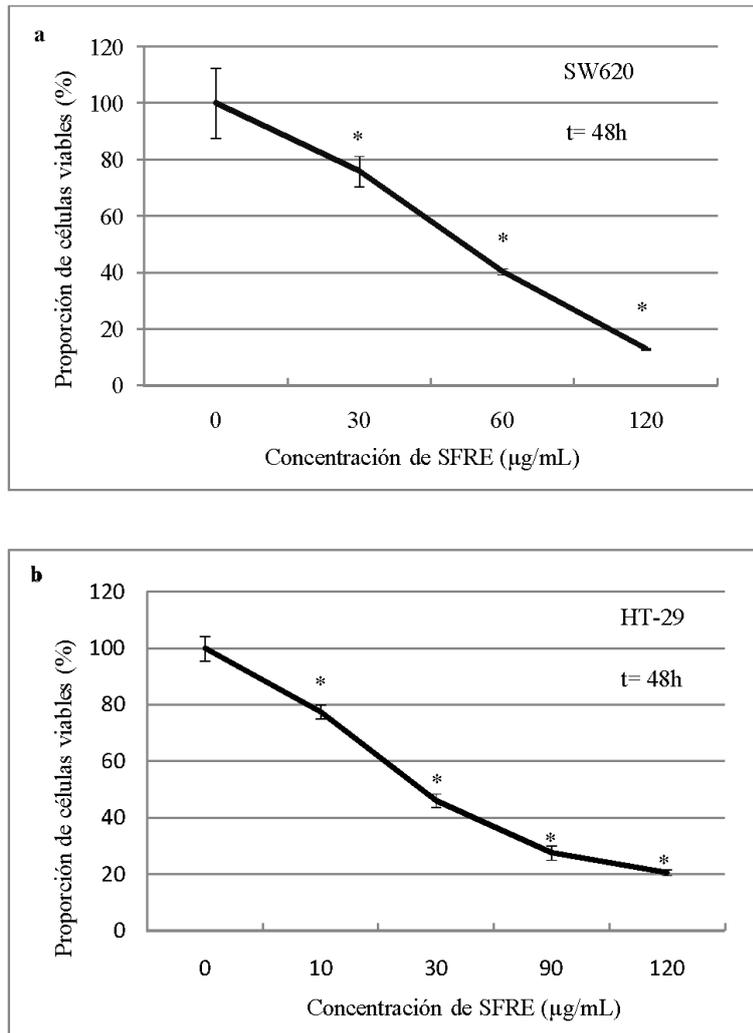


FIG. 1

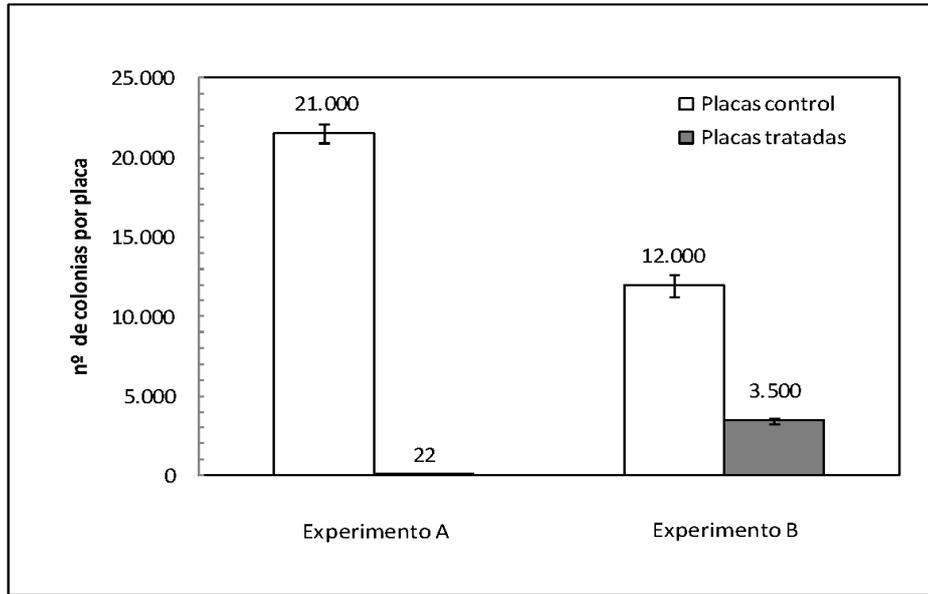


FIG. 2

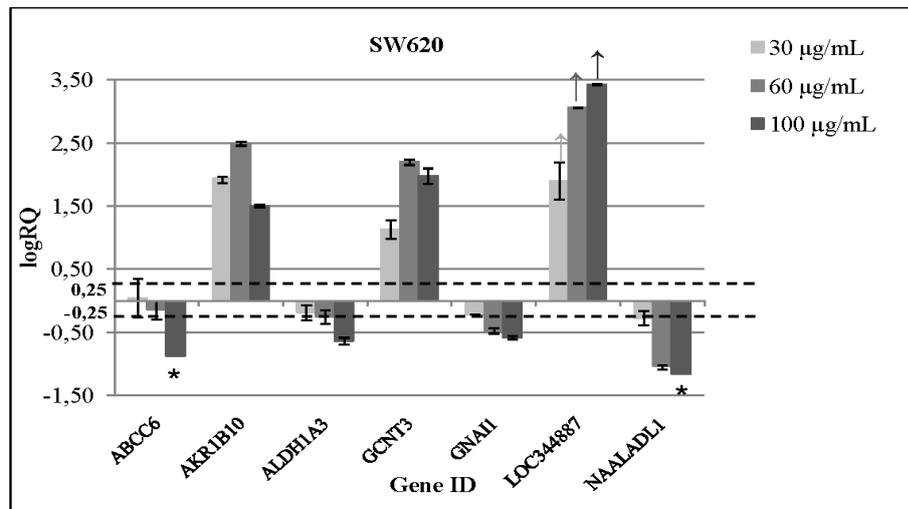


FIG. 3

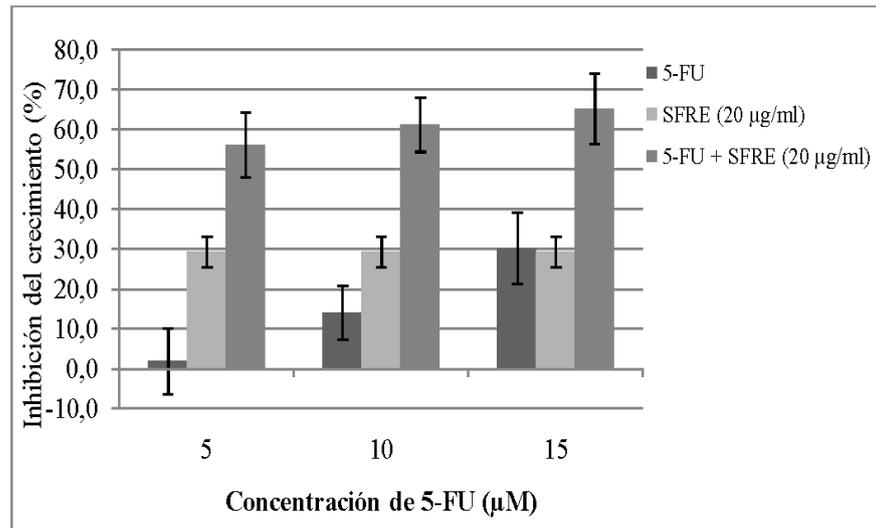


FIG. 4

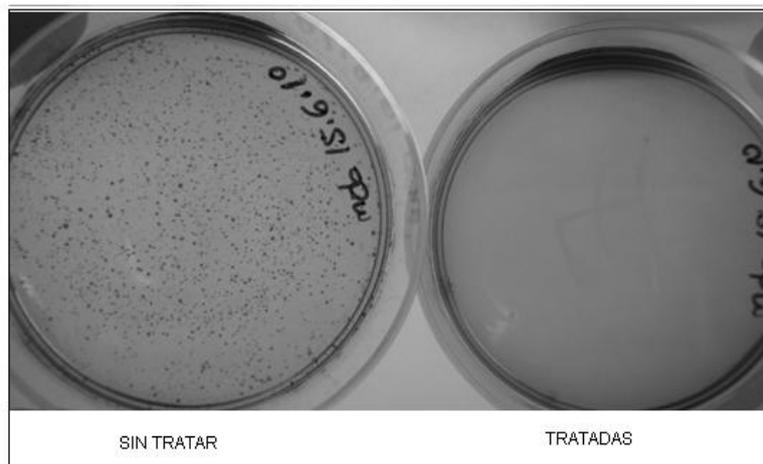
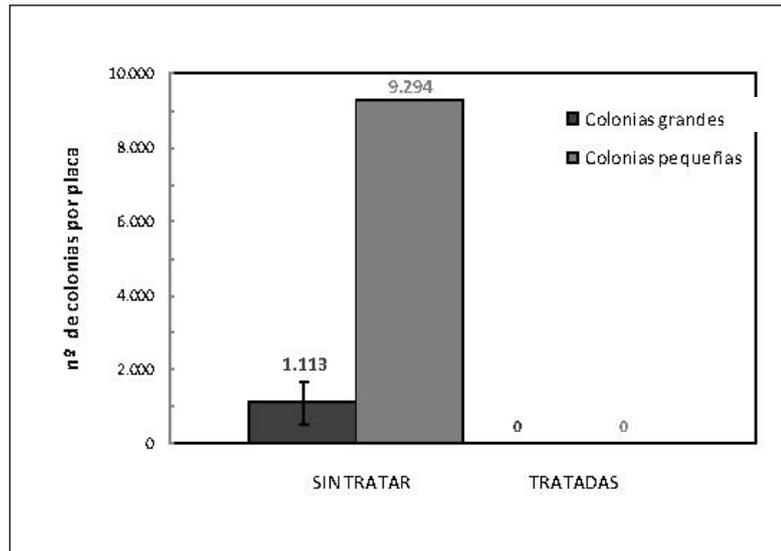


FIG. 5