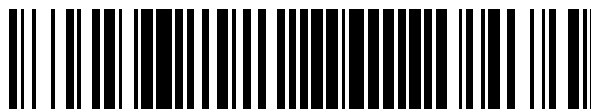


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 537**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00	(2006.01) C12N 15/09	(2006.01)
A61K 31/7105	(2006.01) C12Q 1/68	(2006.01)
A61K 31/711	(2006.01) G01N 33/48	(2006.01)
A61K 31/713	(2006.01) G01N 33/53	(2006.01)
A61K 38/43	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 48/00	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61P 35/02	(2006.01)	
A61P 43/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2009** **E 09809573 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013** **EP 2322224**

54 Título: **Pronóstico de cánceres de colon**

30 Prioridad:

01.09.2008 JP 2008223461

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.12.2013

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
NAGOYA UNIVERSITY (100.0%)
1 Furo-cho Chikusa-ku Nagoya-shi
Aichi 464-8601, JP**

72 Inventor/es:

**TAKAHASHI, MASAhide;
KATO, TAKUYA y
KIKKAWA, FUMITAKA**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 432 537 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Pronóstico de cánceres de colon.

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para estimar el pronóstico de pacientes con cáncer y el uso del mismo.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002] Las histona desacetilasas (HDAC) participan en la carcinogénesis regulando la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (bibliografía no patente 1 y 2). Los inhibidores de las HDAC (HDACi) han mostrado un profundo efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer cuando se combinan con otros fármacos antineoplásicos (bibliografía no patente 2 y 3). No obstante, los mecanismos moleculares por los que se induce este sinergismo tras la adición de un HDACi no se conocen por completo.

[0003] Estudios sistemáticos *in vitro* han revelado que los HDACi pueden inducir la parada del crecimiento celular, la diferenciación terminal y/o la inhibición de la angiogénesis en células transformadas sin que se vean afectadas las células normales (bibliografía no patente 2, 3 y 5). Atendiendo a estos resultados *in vitro*, actualmente se están probando varios HDACi en ensayos clínicos y uno de estos inhibidores, el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T (bibliografía no patente 4 y 5). Los HDACi también han mostrado efectos sinérgicos o aditivos con una amplia variedad de reactivos antineoplásicos (bibliografía no patente 2 y 4). Asimismo, se sabe que la citotoxicidad de los fármacos quimioterapéuticos, como cisplatino, etopósido, 5-FU y doxorubicina, se consigue en parte generando especies de oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) (bibliografía no patente 6 a 9). En consonancia con estos resultados, la alteración de antioxidantes y su expresión génica relacionada modulan la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos, probablemente a través de su capacidad de eliminación de ROS (bibliografía no patente 10 a 13). Este hecho respalda que la inducción de ROS por los fármacos quimioterapéuticos es importante para la citotoxicidad.

25 [Lista de citas]

[Bibliografía no patentes]

[0004]

[Bibliografía no patente 1] Yang, XJ. y Seto, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(3):206-18 (2008)

30 [Bibliografía no patente 2] Bolder, JE., Peart, MJ. y Johnstone, RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 5(9):769-84 (2006).

[Bibliografía no patente 3] Minucci, S. y Pelicci, PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer.* 6(1):38-51 (2006).

[Bibliografía no patente 4] Xu, WS., Parmigiani, RB. y Marks, PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 26(37):5541-52 (2007).

[Bibliografía no patente 5] Marks, PA. y Breslow, R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nature Biotechnology.* 25(1):84-90 (2007).

[Bibliografía no patente 6] Miyajima, A. y col. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br J Cancer.* 76(2):206-10 (1997).

40 [Bibliografía no patente 7] Kurosu, T., Fukuda, T., Miki, T. y Miura, O. BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene.* 22(29):4459-68 (2003).

[Bibliografía no patente 8] Hwang, IT. y col. Drug resistance to 5-FU linked to reactive oxygen species modulator 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 359(2):304-10 (2007).

45 [Bibliografía no de patentes 9] Ravid, A. y col. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Res.* 59(4):862-7 (1999).

[Bibliografía no patente 10] Godwin, AK. y col. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(7):3070-4 (1992).

[Bibliografía no patente 11] Yokomizo, A. y col. Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to

cisplatin, mitomycin C, doxorubicin and etoposide. *Cancer Res.* 55(19):4293-6 (1995).

[Bibliografía no patente 12] Sasada, T. y col. Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest.* 97(10):2268-76 (1996).

- 5 [Bibliografía no patente 13] Powis, G. y Kirkpatrick, DL. Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 7(4):392-7 (2007).

[Bibliografía no patente 14] Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 59: 177-189

[Bibliografía no patente 15] Glozak MA, Seto E. (2007). Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 26: 5420-5432

- 10 [Bibliografía no patente 16] Takahashi M, Inaguma Y, Hiai H, Hirose F. (1988). Developmentally regulated expression of a human "finger"-containing gene encoded by the 5' half of the ret transforming gene. *Mol Cell Biol.* 4:1853-6

[Bibliografía no patente 17] Tezel, G. y col. M. (1999). Different nuclear/cytoplasmic distributions of RET finger protein in different cell types. *Pathol. Int.* 49: 881-886

- [Bibliografía no patente 18] Takahashi, M. y Cooper, G. M.: ret transforming gene encodes a fusion protein
15 homologous to tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1378-1385 (1987)

[Bibliografía no patente 19] Shimono, Y, Murakami, H., Hasegawa, Y. y Takahashi, M.: RFP is a transcriptional repressor and interacts with enhancer of polycomb that has dual transcriptional functions. *J. Biol Chem.* 275: 39411-39419. (2000)

- [Bibliografía no patente 20] Shimono, Y., Murakami, H., Kawai, K., Wade, P.A., Shimokata, K. y Takahashi, M.: Mi-2
20 associates with BRG1 and RET finger protein at the distinct regions with transcriptional activating and repressing abilities. *J. Biol. Chem.* 278: 51638-51645 (2003)

[Bibliografía no patente 21] Shimono, K., Shimono, Y., Shimokata, K., Ishiguro, N., y Takahashi, M.: Microspherule protein 1, Mi-2 β , and RET finger protein associate in the nucleolus and up-regulate ribosomal gene transcription. *J. Biol. Chem.* 280: 39436-39447 (2005)

- 25 [Descripción de la invención]

[Problema técnico]

- [0005] A menudo se usan diversos fármacos antineoplásicos en combinación para el tratamiento del cáncer. Aunque el uso combinado de fármacos antineoplásicos se lleva a cabo con la intención de mejorar el efecto terapéutico, en ocasiones puede conllevar efectos adversos graves. Esto es debido a que muchos de los fármacos
30 antineoplásicos usados actualmente van dirigidos a células que proliferan rápidamente y, por tanto, ejercen su toxicidad sobre células normales distintas de las células cancerosas.

- [0006] Considerando los antecedentes mencionados más arriba, un objeto es proporcionar medios para potenciar la acción de un fármaco antineoplásico o proporcionar un biomarcador útil para conocer el pronóstico de
35 pacientes con cáncer y el uso de los mismos, así como contribuir a mejorar el resultado clínico del tratamiento del cáncer.

[Solución al problema]

- [0007] Hasta la fecha, se ha mostrado que los HDACi alteran la expresión de la tiorredoxina y de TBP-2 regulando el estado de oxidación de las células. Desde el punto de vista de este hecho, los presentes inventores han generado la hipótesis de que el HDACi regula el mecanismo antioxidante en las células, lo que hace a las células
40 cancerosas sensibles a un fármaco antineoplásico. Para verificar la hipótesis, los presentes inventores se han centrado y estudiado exhaustivamente HDAC1 y RFP (*RET finger protein*). Las características de HDAC1 son: 1) tiene una alta expresión en tumores humanos y 2) regula la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células (Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 59: 177-189 (documento no patente 14);
45 Glozak MA, Seto E. (2007). Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 26: 5420-5432 (documento no patente 15)). En la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/146921 A1 se describe RFP como uno de los genes encontrado en experimentos con micromatrices como posible biomarcador del cáncer de colon. Es concebible usar los ensayos de diagnóstico también como ensayos de pronóstico, aunque, en relación general con los datos completos generados en el ensayo de micromatrices, con los ejemplos dirigidos solo al aspecto diagnóstico y sin consideración
50 específica hacia RFP, no hay especificaciones en particular relativas a la regulación por incremento de RFP a este respecto. Las características de RFP son: 1) tiene una alta expresión en una línea de células cancerosas; 2) su expresión en organismos vivos es localizada (Takahashi M, Inaguma Y, Hiai H, Hirose F. (1988). Developmentally

regulated expression of a human "finger"-containing gene encoded by the 5' half of the ret transforming gene. Mol Cell Biol. 4:1853-6 (documento no patente 16); Tezel, G. y col. M. (1999). Different nuclear/cytoplasmic distributions of RET finger protein in different cell types. Pathol. Int. 49: 881-886 (documento no patente 17)) y 3) los ratones que no expresan este gen (ratones *knockout*) no presentan un fenotipo de afecciones graves (datos no publicados).

- 5 Como consecuencia, se ha descubierto que HDAC1 reduce la expresión de la proteína de unión a tiorredoxina-2 (TBP-2), acelerando así la resistencia de las células cancerosas al estrés oxidativo. Asimismo, se ha observado que HDAC1 es reclutado al promotor del gen TBP-2 por un complejo proteico compuesto por RFP y un factor de transcripción NF-Y. Además, la supresión de la expresión de RFP usando ARNi provoca la disgregación del complejo proteico, dando lugar a un aumento considerable de la sensibilidad de las células cancerosas al cisplatino
- 10 (que también es un fármaco antineoplásico inductor del estrés oxidativo). Estos hechos revelan que RFP es un importante factor de regulación que permite a las células cancerosas aumentar su resistencia a un fármaco antineoplásico y sugiere que la supresión de la expresión o la función de RFP potencia la acción de un fármaco antineoplásico, mejorando así el resultado clínico del tratamiento del cáncer.

- [0008]** Por otro lado, se ha observado que la alta expresión de RFP se correlaciona con la disminución de la expresión de TBP-2 en el carcinoma de colon humano o con el pronóstico desfavorable en pacientes con carcinoma de colon. Esto respalda la eficacia de la estrategia terapéutica de la supresión de la expresión o la función de RFP cuando se usan fármacos antineoplásicos y significa que se puede determinar la resistencia a los fármacos antineoplásicos examinando el nivel de expresión de RFP en las células cancerosas y la determinación de los resultados constituye una información útil que contribuye a determinar la política de tratamiento (selección del método terapéutico eficaz y similares), mejorando el pronóstico y la calidad de vida (CdV) de los pacientes. Como resultado de una investigación más profunda, se ha descubierto que la expresión de RFP se correlaciona con un pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer de endometrio. Curiosamente, se han obtenido los siguientes resultados: cuando se observa una elevada expresión de RFP, el empleo de operaciones quirúrgicas más agresivas conllevan la mejora del pronóstico. Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que RFP es útil como
- 20 biomarcador (indicador) para estimar el pronóstico de los pacientes con cáncer. En particular, en el caso de cáncer de endometrio, se sugiere que la expresión de RFP es un indicador útil en la determinación del procedimiento quirúrgico.

[0009] La presente invención se basa principalmente en los hallazgos y resultados mencionados anteriormente y que incluyen los siguientes:

- 30 [1] Un procedimiento para estimar el pronóstico en un paciente con carcinoma de colon, en el que se usa el nivel de expresión de RFP en una célula cancerosa aislada de un paciente con cáncer como indicador y en el que además, un nivel de expresión de RFP alto indica un pronóstico desfavorable.

[2] Uso de un anticuerpo anti-RFP en el procedimiento según [1].

La solicitud también describe:

- 35 [12] Un reactivo para estimar el pronóstico en un paciente con cáncer, que incluye un anticuerpo anti-RFP.

[13] El reactivo para estimar el pronóstico según [12], en el que el cáncer es carcinoma de colon o cáncer de endometrio.

[14] Un kit para estimar el pronóstico en un paciente con cáncer, que incluye un reactivo según [12] o [13].

[15] El kit para estimar el pronóstico según [14], en el que el cáncer es carcinoma de colon o cáncer de endometrio.

- 40 [Efectos ventajosos]

- [0010]** El uso combinado de un agente potenciador de la acción mejora la acción de fármacos antineoplásicos, como el cisplatino, que tienen capacidad para inducir el estrés oxidativo. Esto puede reducir la cantidad de fármaco antineoplásico que se tiene que usar o de los tipos de fármacos antineoplásicos (en los casos en los que se usan dos o más tipos de fármacos antineoplásicos en combinación). Además, los resultados clínicos del tratamiento
- 45 pueden mejorar.

[Breve descripción de los dibujos]

[0011]

- [Fig. 1] Asociación funcional entre HDAC1 y RFP. (a) Efecto del tratamiento con HDAC1 sobre la sensibilidad celular al estrés oxidativo. Se trataron células HeLa durante 10 h con las dosis indicadas de H₂O₂ con o sin pretratamiento con TSA (500 nM) durante 3 h. Se determinó la viabilidad de las células mediante un ensayo WST-1 y se definió el índice de supervivencia celular del grupo no tratado como 1. (b) Reducción de la expresión endógena de HDAC1 mediada por ARN interferente pequeño (ARNip) en células HeLa. Se analizó el lisado celular total de células HeLa transfectadas con ARNip de *HDCA1* o control mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-HDAC1. Se usó anti-β-actina como control de la carga. Se observó supresión de la expresión de HDAC1 en las células en la que se
- 50

había introducido HDAC1ip. (c), (d) Células HeLa transfectadas con ARNip de *HDAC1* o control y tratadas con las dosis indicadas de H_2O_2 (10 h) en c y cisplatino (24 h) en d. Se determinó la viabilidad celular y se calculó como se describe en a. En las células con expresión reducida de HDAC1, el grado de disminución del índice de supervivencia celular es mayor en las células tratadas que en las control. (e) Disminución de la expresión de RFP endógena mediada por ARNip en células HeLa. Se analizaron los lisados celulares totales de células HeLa transfectadas con ARNip de *RFP* o control mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-RFP y anti- β -actina. Se observó supresión de la expresión de RFP en las células en las que se había introducido RFPip. (f), (g) Células HeLa transfectadas con ARNip de *RFP* o control y tratadas con las dosis indicadas de H_2O_2 (10 h) en f y cisplatino (24 h) en g. Se determinó la viabilidad celular y se calculó como se describe en a. En las células con expresión reducida de RFP, el grado de disminución del índice de supervivencia celular es mayor en las células tratadas que en las control.

[Fig. 2] Identificación de los dominios de unión entre HDAC1 y RFP. (a) HDAC1 interacciona con RFP. Las células HEK293 se cotransfectaron de forma transitoria con HDAC1-V5 y Flag-RFP. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-V5 (panel superior) o anti-Flag (panel inferior) y los inmunoprecipitados se analizaron mediante inmunotransferencia con los anticuerpos indicados. Como control se usaron anticuerpos anti-HA. (b) Se inmunoprecipitaron HDAC1 y RFP endógenas con anticuerpos anti-HDAC1 (panel superior) y anti-RFP (panel inferior), respectivamente. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-HDAC1 y anti-RFP. (c) Dominio de RFP necesario para la asociación entre HDAC1 y RFP. Panel izquierdo: representación esquemática de las construcciones de RFP. Se indican el dominio dedo de cinc tipo anillo caja B, superhélice y Rfp. Los fragmentos de ADNc correspondientes a los dominios indicados de RFP están etiquetados con Flag. Panel derecho; las células HEK293 se cotransfectaron transitoriamente con las construcciones con delección HDAC1-V15 y RFP etiquetado con Flag y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-V5 seguido por inmunotransferencia con anticuerpos anti-Flag o anti-V5. El vector pFlag se usó como control. (d) Región de HDCA1 necesaria para la asociación entre HDAC1 y RFP. Panel izquierdo: representación esquemática de las construcciones de HDAC1. Los fragmentos de ADNc correspondientes a las regiones indicadas de HDAC1 se etiquetaron con V5. Las células HEK293 se cotransfectaron transitoriamente con las construcciones con delección de Flag-RFP y HDAC1 etiquetado con V15 y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Flag seguido por inmunotransferencia con anticuerpos anti-V5 o anti-Flag. Las puntas de flecha indican los fragmentos coimmunoprecipitados. El vector pcDNA se usó como control.

[Fig. 3] *TBP-2* es una diana común de HDAC1 y RFP y es responsable de la sensibilización de las células cancerosas al H_2O_2 y al cisplatino. (a), (b) La disminución de la expresión de HDCA1 o RFP causa el aumento de la expresión de *TBP-2*. Las células HeLa se transfectaron con ARNip de *HDAC1*, *RFP* o control. Los niveles de expresión de HDAC1, RFP o *TBP-2* en estas células se analizaron mediante RT-PCR en a y mediante inmunotransferencia en b. Tanto en la RT-PCR como en la inmunotransferencia se observó un aumento de la expresión de *TBP-2* mediante la reducción de la expresión de HDAC1 o RFP. (c) Sobreexpresión de *TBP-2* en células HeLa. Las células HeLa fueron transfectadas con *TBP-2-V5* y la expresión de *TBP-2-V5* se detectó mediante inmunotransferencia. (d), (e) Efecto de la sobreexpresión de *TBP-2* sobre la sensibilidad de las células a H_2O_2 y cisplatino. Las células HeLa transfectadas con *TBP-2-V5* y tratadas durante 10 h con H_2O_2 en d o durante 24 h con cisplatino en e. La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo WST-1 y el índice de supervivencia celular del grupo sin tratamiento se definió como 1. Se muestran los valores relativos con respecto a 1, el índice de supervivencia celular cuando no se llevó a cabo el tratamiento con H_2O_2 o cisplatino En células con sobreexpresión de *TBP-2*, el grado de disminución del índice de supervivencia celular es mayor en las células tratadas que en las células control. (f) Las células HeLa se transfectaron con ARNip de *HDAC1*, *RFP*, *TBP-2* o control. Los lisados celulares totales se analizaron mediante inmunotransferencia. Se muestra que la expresión de *TBP-2* que se ha aumentado mediante la disminución de la expresión de HDAC1 o RFP se suprime mediante *TBP-2ip*. (g), (h) Las células HeLa se transfectaron como se describe en f. Las células se trataron durante 10 h con H_2O_2 (g) o durante 24 h con cisplatino (h). La viabilidad celular se midió y calculó como se describe en d, e. El índice de supervivencia celular en el momento en que se administran los fármacos, el cual se ha reducido mediante la disminución de la expresión de HDAC1 o RFP, se disuelve parcialmente por la disminución de la expresión de *TBP-2*.

[Fig. 4] HDAC1 y RFP regulan la expresión de *TBP-2* y afectan a la sensibilidad celular al H_2O_2 y al cisplatino en líneas celulares de cáncer de colon y de mama. (a) Se transfectaron células de cáncer de colon (SW480, HT-29) y de mama (MDA-MB-231) con ARNip de *HDCA1*, *RFP* o control. Los lisados celulares totales se sometieron a inmunotransferencia. Se observó que cuando se reducía la expresión de HDAC1 y RFP en cada una de las líneas celulares, la expresión de *TBP-2* aumentaba. (b), (c) Las células se transfectaron con ARNip de *HDAC1*, *RFP* o control y se trataron durante 10 h con H_2O_2 en b o durante 24 h con cisplatino en c. La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo WST-1 y el índice de supervivencia celular del grupo sin tratamiento se definió como 1. En las células con expresión reducida de HDAC1 o RFP, el grado de disminución del índice de supervivencia celular es mayor en las células tratadas que en las células control.

[Fig. 5] RFP recluta HDAC1 al promotor de *TBP-2* a través de la interacción con NF- κ B. (a) El panel superior muestra una representación esquemática del promotor de *TBP-2*. Se indican dos regiones usadas para el análisis ChIP (proximal y distal). El panel inferior muestra que HDAC1 y RFP son reclutados al promotor de *TBP-2*. La cromatina entrecruzada se inmunoprecipitó usando los anticuerpos indicados. Se usó la PCR para detectar dos regiones del promotor de *TBP-2* con cebadores correspondientes a las secuencias proximal y distal. «Entrada»

representa la amplificación por PCR del ADN de entrada total. **(b)** RFP recluta HDAC1 al promotor de *TBP-2*, que desacetila las histonas H3 y H4. La cromatina entrecruzada de las células NC1hc y RFP30hc se inmunoprecipitó usando los anticuerpos indicados. La PCR se llevó a cabo como se describe en **a**. **(c)** RFP interacciona con NF-YC. Las células HEK293 se cotransfectaron de forma transitoria con Flag-RFP y NF-YC-V5. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-V5 (panel superior) o anti-Flag (panel inferior) y se analizaron mediante inmunotransferencia. Las flechas indican NF-YC-V5. Las puntas de flecha indican Flag-RFP. Como control se usaron anticuerpos anti-HA. **(d)** El RFP endógeno interacciona con NF-YC. Los inmunoprecipitados de las células con anti-RFP o IgG control se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-RFP y anti-NF-YC. **(e)** Coimmunoprecipitación de HDAC1 y RFP con NF-YC. Las células HEK293 se cotransfectaron con Flag-HDAC1, Flag-RFP y NF-YC-V5 y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-V5; los inmunoprecipitados se analizaron mediante inmunotransferencia. Como control se usaron anticuerpos anti-HA. **(f)** NF-Y se une a la región proximal del promotor de *TBP-2*. El análisis ChIP se realizó con anticuerpos anti-NF-YB. La PCR se llevó a cabo como se describe en **a**. **(g)** Disminución de la expresión de NF-YC endógeno mediada por ARNi en células HeLa. Los lisados celulares totales de células HeLa transfectadas con ARNi de *NF-YC* se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-NF-YC. **(h)** NF-YC recluta HDAC1 y RFP al promotor de *TBP-2*. La cromatina entrecruzada de las células transfectadas con ARNi de NF-YC y control se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-HDAC1 y anti-RFP. La PCR se realizó como se describe en **a**. **(i)** Representación esquemática del modelo de formación del complejo HDAC1/RFP/NF-YC sobre el promotor de *TBP-2*.

[Fig. 6] RFP media en la formación del complejo HDAC1/RFP/NF-YC. **(a)** HDAC1, RFP y NF-YC eluyen en la misma fracción en columnas de filtración en gel. Los extractos de células HeLa se separaron mediante cromatografía de filtración en gel Superose 6 y se aplicó un volumen idéntico de cada una de las fracciones a geles PAGE-SDS. Las fracciones se analizaron a continuación mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-HDAC1, anti-RFP y anti-NF-YC. El perfil de elución de los patrones de peso molecular se muestra en la parte superior (nulo, azul dextrano; 660 kDa, tiroglobulina; 440 kDa, ferritina; 230 kDa, catalasa). **(b)** La expresión de RFP potencia la formación del complejo. Las células HEK293 se cotransfectaron con NF-YC-V5, HDAC1-myc y Flag-RFP y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-V5. Las muestras inmunoprecipitadas se analizaron mediante inmunotransferencia con los anticuerpos indicados. **(c)** La eliminación de RFP mediante ARNi altera la formación del complejo. Se cotransfectó NF-YC-V5 con ARNi de *RFP* o control en células HeLa. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-V5, seguido de inmunotransferencia con los anticuerpos indicados. Como control se usaron anticuerpos anti-HA.

[Fig. 7] Oligomerización de RFP. **(a)** RFP forma un homooligómero. Las células HEK293 se cotransfectaron con GFP-RFP y Flag-RFP y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Flag seguido de inmunotransferencia con anticuerpos anti-Flag y anti-GFP. Como control se usaron anticuerpos anti-HA. LCT: lisados celulares totales. **(b)** Los dominios anillo-caja B y superhélice, pero no el dominio Rfp, de RFP eran necesarios para su oligomerización. Las células HEK293 se cotransfectaron con GFP-RFP y construcciones de delección de RFP etiquetadas con Flag y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Flag. El vector pFlag se usó como control. Las puntas de flecha indican las construcciones de RFP etiquetadas con Flag.

[Fig. 8] RFP es una nueva diana para el tratamiento del cáncer. **(a), (b), (c)** La disminución de la expresión de RFP potencia la sensibilidad de los tumores al cisplatino *in vivo*. Se inyectó a los ratones por vía subcutánea con las líneas celulares NC1hc, RFP23hc o RFP26hc. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó al menos 50 mm³, los animales fueron asignados aleatoriamente al grupo control y a los grupos de tratamiento antes del primer tratamiento con cisplatino. Se administró por vía intraperitoneal 1 mg/kg de cisplatino o vehículo (solución salina) cada 4 días. En **a** se muestran fotografías de tumores representativos. Se muestra por medio de la observación visual que el volumen tumoral en el grupo de tratamiento de la línea celular con expresión reducida de RFP es considerablemente más pequeño que el del grupo sin tratamiento. En **b** se muestra la curva de crecimiento tumoral. El crecimiento tumoral es considerablemente más lento en el grupo con tratamiento de la línea celular con expresión reducida de RFP en comparación con el grupo sin tratamiento. El volumen tumoral medio del grupo sin tratamiento (vehículo) se definió como el 100% y se comparó con el del grupo con tratamiento el día 1 y el día 21 en **c**. En NC1hc, el volumen tumoral era de aproximadamente el 92% con respecto al grupo sin tratamiento el día 1 y disminuyó al 77% el día 21. Mientras que en RFP23hc y RFP26hc los volúmenes disminuían del 95% al 38% y del 112% al 42%, respectivamente. El efecto terapéutico del cisplatino aumentaba significativamente en el grupo en el que se usó la línea celular con expresión reducida de RFP. **(d)** La expresión de RFP es representativa de los tejidos tumorales de pacientes con carcinoma de colon. El color marrón es indicativo de tinción con un anticuerpo policlonal anti-RFP. Cuando las células teñidas representan < 10%, se determina que son RFP-negativas y cuando las células teñidas representan ≥ 10% se determina que son RFP-positivas. **(e)** RFP reprime la expresión de *TBP-2* en pacientes con carcinoma de colon. Los tejidos tumorales se tiñeron con anticuerpo policlonal anti-RFP (rojo) y con anticuerpo monoclonal anti-*TBP-2* (verde). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). En las células que muestran expresión de RFP se observa que la expresión de *TBP-2* es baja. **(f)** La expresión de RFP se correlaciona con un pronóstico desfavorable en los pacientes con cáncer de colon. La supervivencia global de 115 pacientes con carcinoma de colon se estratificó según la expresión de RFP y se analizó mediante la representación de Kaplan-Meier. Un análisis de rango logarítmico mostró diferencias significativas entre los grupos RFP+ y RFP-.

[Fig. 9] Gráficas que muestran la correlación entre la expresión de RFP y el pronóstico desfavorable en el cáncer de

endometrio. Se compararon los grupos RFP-negativo y RFP-positivo entre sí en cuanto a la supervivencia global. (a) Comparación en todos los grupos de pacientes. (b) Comparación en el grupo de pacientes en estadio I. (c) Comparación en el grupo de pacientes en los estadios II a IV.

[Fig. 10] Las gráficas muestran la expresión de RFP y la diferencia de los pronósticos del cáncer de endometrio dependiendo de los métodos quirúrgicos. Se compararon entre sí un grupo de pacientes que se sometió a histerectomía radical y otro grupo que se sometió a linfadenectomía total en cuanto a la supervivencia global. (a) Comparación en todos los grupos de pacientes. (b) Comparación en el grupo RFP-negativo. (c) Comparación en el grupo RFP-positivo.

[Fig. 11] Las gráficas muestran la expresión de RFP y la diferencia de los pronósticos del cáncer de endometrio dependiendo de los métodos quirúrgicos. Se compararon entre sí un grupo de pacientes que se sometió a linfadenectomía y otro grupo que no se sometió a linfadenectomía en cuanto a la supervivencia global. (a) Comparación en todos los grupos de pacientes. (b) Comparación en el grupo RFP-negativo. (c) Comparación en el grupo RFP-positivo.

[Descripción de las realizaciones]

15 **[0012]** Como resultado de la investigación por los presentes inventores, se ha revelado que HDAC1 acelera la resistencia de las células cancerosas al estrés oxidativo reduciendo la expresión de la proteína de unión a tiorredoxina-2 (TBP-2).

[0013] RFP es una proteína nuclear que tiene una estructura de dedo de cinc tipo anillo que forma una proteína de fusión con RET y posteriormente es activada como proteína cancerosa (Takahashi, M y Cooper, GM: ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. Mol. Cell. Biol. 7, 1378-1385 (1987) (documento no patente 18; documento no patente 16). RFP tiene una potente actividad represora de la transcripción e interacciona con diversas proteínas nucleares (Shimono y, Murakami, H, Hasegawa Y y Takahashi M: RFP is a transcriptional repressor and interacts with enhancer of polycomb that has dual transcriptional functions. J. Biol. Chem. 275: 39411-39419. (200) (documento no patente 19); Shimono, Y, Murakami, H, Kawai, K, Wade, PA, Shimokata, K y Takahashi, M: Mi-2 associates with BRG1 and RET finger protein at the distinct regions with transcriptional activating and repressing abilities. J. Biol. Chem. 278: 51638-51645 (2003) (documento no patente 20); Shimono, K, Shimono, Y, Shimokata, K, Ishiguro, N, y Takahashi, M: Microspherule protein 1, Mi-2 β , and RET finger protein associate in the nucleolus and up-regulate ribosomal gene transcription. J. Biol. Chem. 280: 39436-39447 (2005) (documento no patente 21)). Se ha descrito que RFP se expresa a altos niveles en una línea celular de cáncer. Sin embargo, no se ha dilucidado el estado de expresión de RFP en tejido canceroso. La secuencia de un gen de RFP (SEC ID N.º: 1), la secuencia de ARNm de RFP (SEC ID N.º: 2) y la secuencia de aminoácidos de RFP (SEC ID N.º: 3) se muestran en el listado de secuencias. Como se mencionó anteriormente, puesto que los ratones *knockout* para RFP no muestran fenotipo de afecciones graves, es preferible RFP como diana desde el punto de vista de la seguridad. Además, ya que se observa una elevada expresión en diversos tipos de tumores humanos o líneas celulares en cultivo derivadas de la mayoría de los tumores examinados (datos no publicados y documento no patente 16), se espera que la acción se ejerza sobre una amplia variedad de tumores.

[0014] Como resultado de la investigación de los presentes inventores (véanse los ejemplos mencionados a continuación), se ha descubierto que RFP está implicado en la regulación de la sensibilidad al estrés oxidativo por HDAC1 a través de la interacción física y funcional entre RFP y HDAC1. Como resultado de la investigación de los presentes inventores, se ha revelado que el extremo N-terminal de HDAC1 se une a un dominio superhélice y a un dominio Rfp de RFP.

(Procedimiento para el análisis de la resistencia a fármacos antineoplásicos)

[0015] Como resultado de la investigación de los presentes inventores, se ha descubierto que la alta expresión de RFP está correlacionada con la reducción de la expresión de TBP-2 en un carcinoma de colon humano y con un pronóstico desfavorable en pacientes con carcinoma de colon (véanse los ejemplos mencionados a continuación). El método de análisis permite determinar la resistencia de las células cancerosas a un fármaco antineoplásico. La determinación de los resultados se pueden usar para determinar, por ejemplo, la política de tratamiento (selección del método de tratamiento y similares). El uso de la determinación conlleva mejoras en los resultados clínicos del tratamiento, mejora el pronóstico y la calidad de vida (CdV) de los pacientes, y similares. Por tanto, el procedimiento de análisis proporciona información extremadamente útil para el tratamiento del cáncer.

[0016] El procedimiento de análisis incluye las siguientes etapas: una etapa de examen del nivel de expresión de RFP en células cancerosas aisladas de un organismo vivo (etapa de detección) y una etapa de determinación de la resistencia de las células cancerosas a un fármaco antineoplásico que tiene capacidad para inducir el estrés oxidativo basado en los resultados de la etapa mencionada anteriormente (etapa de determinación).

55 **[0017]** En la etapa de detección, en primer lugar se preparan las células cancerosas aisladas de un organismo vivo. El término «aislado de un organismo vivo» se refiere a un estado en el que se extrae una parte del tejido vivo que incluye las células cancerosas que se desea analizar y, por tanto, las células cancerosas que se desea analizar

están completamente aisladas del organismo vivo origen de las células cancerosas. Tan pronto como se cumpla esta condición, las células cancerosas pueden estar en un estado en el que formen tejido junto con las células circundantes (esto es, en un estado de fragmento de tejido) o pueden estar en un estado en el que estén aisladas de las células circundantes. En el primer caso, las células se pueden preparar de modo que, por ejemplo, se realice el diagnóstico histológico mediante biopsia (biopsia) y en el segundo caso, las células se pueden preparar de modo que, por ejemplo, se realice el diagnóstico citológico.

[0018] Posteriormente se examina el nivel de expresión de RFP en las células cancerosas preparadas. El nivel de expresión de RFP normalmente se calcula en función de la comparación con el control (comparación con control). Como control es posible usar diversas células cancerosas cuyo nivel de expresión de RFP se haya determinado previamente y células normales recogidas junto con las células cancerosas que se desea analizar cuando las células cancerosas que se desea analizar se obtienen de un organismo vivo. No es necesario cuantificar estrictamente el nivel de expresión de RFP, aunque se puede detectar el nivel de expresión de RFP en tal grado que la resistencia a un fármaco antineoplásico de las células cancerosas que se desea analizar se puede evaluar a través de la comparación con el control. Téngase en cuenta aquí que, como es habitual, el caso en el que se observa expresión de RFP en las células cancerosas que se desea analizar se define también como RFP-positivo (o positivo para RFP), y el caso en el que no se observa expresión de RFP en las células cancerosas que se desea analizar se define también como RFP-negativo (o negativo para RFP). Cuando el nivel de expresión de RFP de las células cancerosas que se desea analizar se detecta mediante inmunohistoquímica (descrito con detalle más adelante), por ejemplo, cuando se reconoce la tinción de no menos del 10% de las células cancerosas que se desea analizar (es decir, la tasa de células teñidas no es inferior al 10%), se determina que las células son RFP-positivas (o positivas para RFP). Se puede establecer adecuadamente un valor límite para distinguir positivo de negativo (lo que viene representado por la tasa de células teñidas) de acuerdo con el procedimiento de detección o las condiciones de detección. Por ejemplo, puede establecerse un valor límite del 5 al 30%.

[0019] El nivel de expresión de RFP se detecta mediante la concentración de proteína o de ARNm. Cuando se requiera una alta precisión, el nivel de proteína es mejor. Cuando el nivel de expresión de RFP se detecta mediante la concentración de proteína, es decir, cuando se examina la cantidad de proteína RFP como el nivel de expresión de RFP, se puede usar un procedimiento de inmunotransferencia o inmunohistoquímica (inmunotinción), aunque el procedimiento no se limita a estos. Mediante inmunohistoquímica se puede examinar al mismo tiempo la forma o estado de distribución de las células cancerosas que se desea analizar, se puede obtener información adicional al mismo tiempo.

En la inmunohistoquímica se usa un anticuerpo que reconoce específicamente RFP (anticuerpo anti-RFP) y se examina la cantidad de proteína RFP usando como indicador la propiedad de unión (cantidad de unión) del anticuerpo. Se puede realizar la inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-RFP por ejemplo mediante un método ABC (complejo avidina-biotina), un método PAP (complejo peroxidasa-antiperoxidasa), un método LAB (biotina ligada a avidina), un método LSAB (biotina ligada a estreptavidina) y similares. El protocolo convencional de cada uno de los procedimientos es bien conocido (véase por ejemplo, «Enzyme-labeled Antibody Method» 3ª edición revisada, K. Watanabe and K. Nakane (ed), Gakusai Kikaku).

[0020] El tipo y origen de los anticuerpos anti-RFP que se usen en la inmunohistoquímica no están especialmente limitados. Preferiblemente se usa un anticuerpo monoclonal, aunque se pueden usar anticuerpos oligoclonales (una mezcla de varios tipos de anticuerpos) o un anticuerpo policlinal, siempre que se pueda detectar RFP con suficiente especificidad. Se pueden usar fragmentos de anticuerpos como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv y dsFv. El anticuerpo anti-RFP se puede preparar mediante procedimientos inmunológicos, una técnica de despliegue de fagos, un procedimiento de despliegue de ribosomas y similares. Téngase en cuenta aquí que en el documento «Shimono, Y y col. RET finger protein is a transcriptional repressor and interacts with enhancer of polycomb that has dual transcriptional functions. J Biol Chem. 275(50): 39411-9 (2000)» se describe un procedimiento de preparación de un anticuerpo anti-RFP (anticuerpo policlinal de conejo) y el uso del mismo, que puede servir como referencia.

[0021] A continuación en este documento se muestra un ejemplo de los métodos y procedimientos de inmunohistoquímica.

(1) Inmovilización. Método de inclusión en parafina

[0022] El tejido extraído de un ser vivo (en necropsia, cadáver) se inmoviliza en formalina, paraformaldehído y similares y posteriormente se incluye en parafina. En general, se deshidrata con alcohol, se trata con xileno y finalmente se incluye en parafina. Las muestras incluidas en parafina se cortan con el grosor deseado (por ejemplo, 3 a 5 µm) y se extiende sobre un portaobjetos de vidrio. En lugar de la muestra incluida en parafina, se puede usar una muestra congelada.

(2) Desparafinación

[0023] En general, el tratamiento se realiza secuencialmente, por este orden, con xileno, alcohol y agua purificada.

(3) Pretratamiento (activación del antígeno)

[0024] Si es necesario, para la activación del antígeno se puede realizar, por ejemplo, un tratamiento enzimático, tratamiento térmico y/o tratamiento de presurización.

(4) Eliminación de la peroxidasa endógena.

[0025] Cuando se usa peroxidasa como material de marcaje para la tinción, se elimina la activación de la peroxidasa endógena realizando un tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno.

(5) Inhibición de la reacción inespecífica

[0026] La reacción inespecífica se inhibe tratando el corte de tejido con una solución de albúmina sérica bovina (por ejemplo, solución al 1%) de varios minutos a varias decenas de minutos. Téngase en cuenta aquí que este proceso se puede omitir cuando la reacción con el anticuerpo primario que sigue se realiza usando una solución de anticuerpo que contenga albúmina sérica bovina.

(6) Reacción con el anticuerpo primario

[0027] Se pone sobre el corte del portaobjetos de vidrio un anticuerpo diluido a la concentración apropiada y se deja reaccionar de diez minutos a varias horas. Tras la reacción, el producto reaccionado se lava con una solución de tampón apropiada, como tampón fosfato.

(7) Adición del reactivo de marcaje

[0028] Como material de marcaje se usa frecuentemente peroxidasa. Se pone sobre el corte del portaobjetos de vidrio un anticuerpo secundario al que se ha unido la peroxidasa y se deja reaccionar de diez minutos a varias horas. Tras la reacción, el producto formado se lava con una solución de tampón apropiada, como tampón fosfato.

(8) Reacción de color

[0029] Se disuelve DAB (3,3'-diaminobencidina) en solución de tampón Tris. A continuación se añade la solución de peróxido de hidrógeno. Se deja que la solución de color así preparada penetre en el corte de tejido durante varios minutos (por ejemplo, cinco minutos) de manera que se desarrolle color en el corte. Tras la reacción de color, el corte se lava lo suficiente con agua corriente para eliminar el DAB.

(9) Tinción nuclear

[0030] El corte se somete a una tinción nuclear haciéndolo reaccionar con hematoxilina de Mayer de varios segundos a varias decenas de segundos. Se lava con agua corriente para eliminar el exceso de colorante (en general durante varios minutos).

(10) Deshidratación, aclaramiento y encapsulación

[0031] El corte de tejido se deshidrata con alcohol, se somete a un tratamiento de aclaramiento con xileno y, finalmente, se encapsula con resina sintética, glicerina, jarabe de goma y similares.

[0032] Para la detección y determinación del ARNm cuando se examina el nivel de expresión de RFP en función de la concentración de ARNm se puede usar RT-PCR (Molecular Cloning, tercera edición, 8.46, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York), un procedimiento de transferencia de ARN (Molecular Cloning, tercera edición, 7.42, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York), un procedimiento de transferencia en puntos (Molecular Cloning, tercera edición, 7.46, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York), un procedimiento que use un chip de ADN (matriz de ADN) y similares.

Una persona experta en la materia puede diseñar un cebador de ácidos nucleicos o una sonda de ácidos nucleicos adecuados para cada uno de los procedimientos mediante un procedimiento convencional basado en la secuencia de RFP (base de datos del NCBI, acceso: RFPNM_006510, DEFINICIÓN: Homo sapiens tripartite motif-containing 27 (TRIM27), ARNm. (SEC ID N.º 2)).

[0033] En la etapa de determinación, la resistencia de las células cancerosas a un fármaco antineoplásico que tiene la capacidad de inducir el estrés oxidativo se determina en función del resultado de la etapa de detección, es decir, del nivel de expresión de RFP. A continuación en este documento se muestran ejemplos específicos de evaluación basados en el nivel de expresión de RFP.

[0034] Previamente se establecen diversas divisiones de evaluación para relacionar entre el nivel de expresión de RFP y la resistencia a fármacos antineoplásicos. A continuación, en la etapa de decisión se obtiene la división de evaluación que corresponde con las células cancerosas que se desea analizar en función del nivel de expresión de RFP. Como ejemplos específicos del establecimiento de divisiones de evaluación, se muestra a continuación un ejemplo centrado en la presencia o ausencia de expresión de RFP (ejemplo 1) y un ejemplo centrado en el grado de expresión de RFP (ejemplo 2). Téngase en cuenta aquí que se describe por este orden el nombre de división: nivel de expresión de RFP relacionado con la división: resultados de la evaluación relacionados con la división.

<ejemplo 1>

[0035]

División 1: RFP-positivo: resistencia a un fármaco antineoplásico

División 2: RFP-negativo: sensible a un fármaco antineoplásico

5 <ejemplo 2>

[0036]

División 1: no se observa expresión de RFP: sensible a un fármaco antineoplásico

División 2: se observa expresión débil de RFP: baja resistencia a un fármaco antineoplásico

División 3: se observa expresión moderada de RFP: resistencia moderada a un fármaco antineoplásico

10 División 4: se observa expresión fuerte de RFP: alta resistencia a un fármaco antineoplásico

[0037] El número de divisiones de evaluación, y el nivel de expresión de RFP y los resultados de la evaluación relacionados con cada división de evaluación no se limitan necesariamente a los ejemplos mencionados más arriba, pudiendo establecerse arbitrariamente por medio de un experimento preliminar y similares. Téngase en cuenta que la determinación y evaluación en la presente invención se puede realizar automática y mecánicamente sin depender de la determinación por expertos en la materia, por ejemplo, doctores y técnicos de laboratorio.

[0038] Como se mencionó anteriormente, la política de tratamiento se puede determinar usando los resultados de la determinación del procedimiento de análisis. Por ejemplo, cuando el resultado de la determinación es: «con resistencia a un fármaco antineoplásico» o «con alta resistencia a un fármaco antineoplásico», es posible predecir que el uso de un único fármaco antineoplásico puede no mostrar el efecto terapéutico deseado. En tal caso, una política de tratamiento eficaz es usar el agente de la presente invención en combinación con un fármaco antineoplásico, ya que potencia la acción del fármaco antineoplásico. Por otro lado, si el resultado de la determinación es: «sensibilidad a un fármaco antineoplásico» o «baja resistencia a un fármaco antineoplásico», es posible predecir que un único fármaco antineoplásico puede mostrar el efecto terapéutico esperado. En tal caso, una de las opciones de política de tratamiento eficaz es usar un fármaco antineoplásico en monoterapia. No obstante, también en tal caso, para mejorar el efecto terapéutico potenciando la acción del fármaco antineoplásico, se puede administrar en combinación el agente potenciador de la acción de la presente invención.

(Biomarcador para estimar el pronóstico y uso del mismo)

[0039] Como resultado de la investigación de los presentes inventores se ha revelado que la alta expresión de RFP se correlaciona con el pronóstico desfavorable en pacientes con carcinoma de colon o pacientes con cáncer de endometrio (véase el ejemplo mencionado a continuación). Según los resultados, un tercer aspecto de la presente invención es proporcionar un marcador compuesto de RFP para estimar el pronóstico en pacientes con cáncer. El biomarcador es útil para entender el pronóstico en pacientes con cáncer. Asimismo, puede servir de guía para determinar el procedimiento quirúrgico. Por ejemplo, cuando se observa la expresión de RFP en una muestra (células cancerosas) aislada de una paciente con cáncer de endometrio (por ejemplo, inmunotinción positiva), es posible determinar si es preferible emplear una intervención más agresiva. Una intervención más agresiva puede ser una histerectomía radical con linfadenectomía.

[0040] Este aspecto proporciona el procedimiento para estimar el pronóstico en pacientes con cáncer como uso del biomarcador mencionado anteriormente. De acuerdo con el procedimiento de estimación del pronóstico según la presente invención, se obtiene información sobre la estimación del pronóstico en pacientes con cáncer. Por ejemplo, la información se usa para determinar la política de tratamiento (selección del procedimiento eficaz de tratamiento y similares). El uso de la determinación conlleva mejoras en los resultados clínicos del tratamiento, mejora el pronóstico y la calidad de vida (CdV) de los pacientes, y similares.

[0041] A continuación se ofrece una descripción detallada de este aspecto de la presente invención. Los temas comunes en el primer o en el segundo aspecto emplean la descripción en el primer o segundo aspecto. En la memoria descriptiva, el «biomarcador para estimar el pronóstico en pacientes con cáncer» se refiere a una biomolécula que es un indicador para estimar el pronóstico en pacientes con cáncer. El biomarcador de la presente invención es particularmente útil en la estimación del pronóstico de pacientes con carcinoma de colon.

[0042] En el procedimiento de estimación del pronóstico en la presente invención, el biomarcador de la presente invención se usa como indicador para la determinación. Específicamente, el pronóstico en un paciente con cáncer se estima usando como indicador el nivel de expresión de RFP en células cancerosas aisladas del paciente con cáncer. Más específicamente, se lleva a cabo una etapa de detección del nivel de expresión de RFP en células cancerosas aisladas del paciente con cáncer (etapa de detección) y una etapa de estimación del pronóstico basada en el

resultado de la estimación (etapa de estimación del pronóstico). La etapa de detección aquí se puede realizar de forma similar a la etapa de detección del segundo aspecto mencionado anteriormente. Entre los ejemplos de pacientes con cáncer se incluyen pacientes con carcinoma de colon.

- 5 **[0043]** En la etapa de estimación del pronóstico, el pronóstico en un paciente con cáncer se estima usando el nivel de expresión de RFP en las células cancerosas como indicador. Básicamente, se emplea el criterio de determinación en el que se determina que el pronóstico es desfavorable si el nivel de expresión de RFP es grande. A continuación se describen ejemplos específicos de evaluación basados en el nivel de expresión de RFP.

- 10 **[0044]** Previamente se establecen diversas divisiones de evaluación para relacionar entre el nivel de expresión de RFP y el pronóstico. A continuación, se determina la división de evaluación correspondiente a las células cancerosas que se desea analizar en función del nivel de expresión de RFP obtenido en la etapa de decisión. Como ejemplos específicos del establecimiento de divisiones de evaluación, se muestra a continuación un ejemplo centrado en la presencia o ausencia de expresión de RFP (ejemplo 1) y un ejemplo centrado en el grado de expresión de RFP (ejemplo 2). Téngase en cuenta aquí que se describe por este orden el nombre de división: nivel de expresión de RFP relacionado con la división: resultados de la evaluación relacionados con la división.

15 **<ejemplo 1>**

[0045]

División 1: RFP-positivo: el pronóstico es desfavorable

División 2: RFP-negativo: el pronóstico es bueno

<ejemplo 2>

20 **[0046]**

División 1: no se observa expresión de RFP: el pronóstico es bueno

División 2: se observa expresión débil de RFP: el pronóstico es relativamente bueno

División 3: se observa expresión moderada de RFP: el pronóstico es relativamente desfavorable

División 4: se observa expresión fuerte de RFP: el pronóstico es desfavorable

- 25 **[0047]** El número de divisiones de evaluación, y el nivel de expresión de RFP y los resultados de la evaluación relacionados con cada división de evaluación no se limitan necesariamente a los ejemplos mencionados más arriba, pudiendo establecerse arbitrariamente mediante de un experimento preliminar y similares. Téngase en cuenta que la determinación y evaluación en la presente invención se puede realizar automática y mecánicamente sin depender de la determinación por expertos en la materia, por ejemplo, doctores y técnicos de laboratorio.

- 30 **[0048]** El reactivo está compuesto por un anticuerpo anti-RFP. Los tipos y origen de los anticuerpos anti-RFP emplean la correspondiente descripción en el segundo aspecto. Cuando se usa un anticuerpo marcado como anticuerpo anti-RFP, la cantidad de anticuerpo unido se puede detectar directamente usando una cantidad de marcaje como indicador. Por tanto, se puede construir un procedimiento de análisis más sencillo. Por el contrario, este procedimiento presenta los problemas de un anticuerpo anti-RFP al que se une un agente de marcaje y, además, la sensibilidad de detección es generalmente menor. Luego, es preferible usar procedimientos de detección indirectos como un procedimiento que use un anticuerpo secundario al cual se une un agente de marcaje, y un procedimiento que use un polímero al cual se une un anticuerpo secundario y un agente de marcaje. El anticuerpo secundario en el presente documento denota un anticuerpo con conectividad específica con respecto al anticuerpo anti-RFP. Por ejemplo, cuando se prepara un anticuerpo anti-RFP como un anticuerpo de conejo, se puede usar un anticuerpo anti-IgG de conejo. Hay disponibles en el mercado anticuerpos secundarios marcados que se pueden usar para diversos anticuerpos como conejo, cabra y ratón (por ejemplo, Funakoshi Co., Ltd., Cosmo Bio Co., Ltd. o similares) y los anticuerpos se pueden seleccionar adecuadamente según los reactivos de la presente invención.

- 45 **[0049]** Entre los ejemplos de agentes de marcaje se incluyen enzimas como peroxidasa, microperoxidasa, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa, glucosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; una sustancia fluorescente como isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) y euriopio; sustancias quimioluminiscentes como luminar, isoluminol y derivados de acridinio; coenzimas como NAD y biotina; así como sustancias radioactivas como ^{131}I y ^{125}I .

- 50 **[0050]** El reactivo se puede formar en una fase sólida de acuerdo con su uso. Los medios de soporte insoluble utilizado para hacer la fase sólida no están especialmente limitados. Por ejemplo, medios de soporte insoluble hechos de materiales insolubles en agua, por ejemplo, resina como una resina de poliestireno, una resina policarbonatada, una resina de silicona y una resina de nailon y vidrio. Los anticuerpos pueden fijarse en medios de soporte insolubles mediante adsorción física o química.

[EJEMPLOS]

[0051] Según la hipótesis de que el HDACi regula el mecanismo de antioxidación en las células haciendo que estas sean sensibles a un fármaco antineoplásico, se realizan los experimentos mencionados a continuación.

1. Materiales y procedimientos

5 (1) Plásmidos

[0052] El plásmido pcDNA3-HDAC1-Flag fue proporcionado generosamente por el Dr. Kawaguchi (Prefectura de Aichi, Japón). Los fragmentos de delección de *NF-YA*, *NF-YB*, *NF-YC*, *HDAC1* y *HDAC1* de longitud completa y el ADNc de *TBP-2* se clonaron en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO según las instrucciones del fabricante. El ADNc de *HDAC1* procedente de pcDNA3.1/V5-His-HDAC1 se insertó en el vector pcDNA3.1/myc-His. La construcción pFlag-RFP se ha descrito previamente (referencia 20). El ADNc de *RFP* se insertó en el vector pEGFP-C1.

(2) ARNi

[0053] El ARNip de *HDAC1* se adquirió en Dharmacon. Los ARNip de *RFP*, *TBP-2*, *NF-YC* y control se adquirieron en QIAGEN. Los ARNip se transfectaron usando Lipofectoamine 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Para la expresión reducida de *RFP* mediada por ARNhc se sintetizó como sigue un conjunto de oligonucleótidos de cadena sencilla que codificaban el ARNhc de la diana *NFP* o del control negativo y sus complementarios (solo se muestran las secuencias sentido) ARNi.

shRFP:

5'-GATCGAGTTACTCGGGAGGGAAATTCAAGAGATTTCCTCCCGAGTAACTCTT
TTTTGGAAA-3'(SEQ ID NO: 10)

El par de oligonucleótidos complementarios se insertó en un vector pSilencer3.1-H1 neo (Ambion) que se usó como vector de expresión de ARNhc.

20 (3) Generación de líneas celulares que expresan de forma estable ARNhc

[0054] Las células HeLa se transfectaron con el vector de expresión de ARNhc con Lipofectoamine 2000 y se seleccionaron con neomicina durante 2 semanas.

(4) Ensayo de viabilidad celular

[0055] Utilizando placas de 96 pocillos, se sembraron 8×10^3 células por pocillo y 24 horas después se trataron con H_2O_2 (10 h) o cisplatino (24 h) a la concentración descrita. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo WST-1 (Roche). En la gráfica, el índice del grupo sin tratamiento se define como 1.

(5) RT-PCR

[0056] El ARN total de las células HeLa transfectadas con ARNip se aisló usando el kit RNeasy Mini (Qiagen). A continuación, los transcritos del ADNc se generaron usando Superscript II (Invitrogen). Se realizó una RT-PCR con cebadores específicos de *HDAC1* (sentido, 5'-CTCCTGTTTTTTTCAGGCTCC-3' (SEC ID N.º: 11); complementario, 5'-ACGAGAAGACAGACAGAGGGC-3' (SEC ID N.º: 12)), *RFP* (sentido, 5'-TGCTCGACTGCGGCCATAAC-3' (SEC ID N.º: 13); complementario, 5'-TCGGTGCGCAGCTGCTTTAC-3' (SEC ID N.º: 14)), *TBP-2* (sentido, 5'-TGAGATGGTGATCATGAGACC-3' (SEC ID N.º: 15); complementario, 5'-GTATTGACATCCACCAGATCC-3' (SEC ID N.º: 16)), *GAPDH* (sentido, 5'-GAAGGTGAAGGTGCGAGTCAA-3' (SEC ID N.º: 17); complementario, 5'-GAGATGATGACCCTTTTGGCTC-3' (SEC ID N.º: 18)).

(6) Inmunoprecipitación e inmunotransferencia

[0057] Se lavaron las células dos veces con PBS enfriado en hielo y se lisaron con tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 120 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Nonidet P-40 al 0,8%, glicerol al 10%, DTT 1 mM y PMSF 1 mM) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas completa. Los lisados se sonicaron brevemente y se inmunoprecipitaron con los anticuerpos indicados. Como control se usó un anticuerpo normal de conejo purificado un anticuerpo anti-etiqueta HA. La separación electroforética y la inmunotransferencia se realizaron según lo descrito previamente (referencia 20). Para la inmunotransferencia con los inmunoprecipitados usando el anticuerpo policlonal de conejo se usó Relia Blot (Bethyl Laboratories) según las instrucciones del fabricante.

(7) Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

[0058] Los experimentos de ChIP se realizaron según lo descrito previamente (referencias 28). Brevemente, se sonicó la cromatina entrecruzada con formaldehído procedente de las células indicadas y los fragmentos de

cromatina resultantes se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HDAC1, anti-H3 acetilada, anti-H4 acetilada, anti-RFP o anti-NFYB. Como control se usó IgG normal de conejo o de ratón purificada. Los entrecruzados con formaldehído se invirtieron añadiendo NaCl 5 M a una concentración final de 0,2 M y se incubaron durante 8 h a 65°C. El ADN purificado y el ADN de entrada se amplificó mediante PCR en 32-37 ciclos.

5 (8) Modelo de tratamiento *in vivo*

[0059] Se inyectaron por vía subcutánea células control o HeLa que expresaban de forma estable ARNhc en el lomo de ratones hembra desnudos (7 semanas). Cuando el volumen tumoral medio alcanzó al menos 50 mm³, los animales fueron asignados aleatoriamente al grupo control y a los grupos de tratamiento antes del primer tratamiento con cisplatino. Se administró por vía intraperitoneal 1 mg/kg de cisplatino o vehículo (solución salina: control) cada 4 días. El volumen del tumor se calculó a partir de la siguiente ecuación después de medir el diámetro tumoral con un calibrador.

$$\text{Volumen} = (\text{Eje mayor} \times \text{Eje menor} \times \text{Eje menor}) / 2$$

(9) Inmunohistoquímica

[0060] Se desparafinaron y rehidrataron cortes de tejido fijados en formalina e incluidos en parafina procedentes de pacientes con carcinoma de colon. Las preparaciones se lavaron bien con agente bloqueante de proteínas (UltraTech HRP Streptavidin-Biotin Detection System, Beckman Coulter) y se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%. La recuperación del antígeno se realizó autoclavando a 121°C durante 10 min en tampón citrato (pH 7,0) 0,1 moles/l con NP-40 al 0,5% (Sigma-Aldrich). Los cortes se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-RFP y luego se aplicó un anticuerpo secundario polivalente biotinilado de cabra (Beckman Coulter). Las muestras se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa y los productos de la reacción se visualizaron con tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina (DAB). Cuando se teñían más del 10% de las células tumorales con el anticuerpo, se clasificaba como positivo para la expresión del antígeno.

Se usaron representaciones de Kaplan-Meier para estimar la importancia pronóstica de RFP en análisis univariable usando Stat view.

25 (10) Inmunofluorescencia

[0061] Se desparafinaron y rehidrataron cortes de tejido fijados en formalina e incluidos en parafina procedentes de pacientes con carcinoma de colon. La recuperación del antígeno se realizó calentando con microondas durante 10 min en tampón citrato (pH 6). Las muestras se bloquearon con BSA al 1% en PBS y se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-RFP y un anticuerpo monoclonal anti-TBP-2. A continuación, las muestras se tiñeron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594, un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 y con DAPI. Se montaron las preparaciones y se examinaron con un microscopio confocal.

(11) Pacientes con cáncer de endometrio

[0062] Se usaron para los experimentos, previo consentimiento informado, muestras problema (119 muestras) procedentes de pacientes con adenocarcinoma endometriode de endometrio que se habían sometido a tratamiento quirúrgico en el Hospital Universitario de Nagoya entre 1992 y 2007. Las edades de las pacientes oscilaban entre 28 a 86 años (mediana de edad: 57). Ninguna de las pacientes se había sometido a quimioterapia neoadyuvante. Todas las pacientes se sometieron a histerectomía radical o abdominal total más salpingo-ovariectomía bilateral. Además, 72 pacientes se sometieron a linfadenectomía. Todas las pacientes se estadiaron de acuerdo con los criterios FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) de 1998. Setenta y dos (72) pacientes tenían un estadio I, 16 pacientes estadio II, 24 pacientes estadio III y 7 pacientes estadio IV. El grado histológico se asignó según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud. Cincuenta (50) pacientes eran G1, 51 pacientes eran G2 y 18 pacientes eran G3.

2. Resultados y discusión

[0063] En primer lugar se analizó si los HDACi afectan a la sensibilidad celular al estrés oxidativo usando la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa. El tratamiento con tricostatina A (TSA), un HDACi convencional, sensibilizó a las células HeLa al H₂O₂, un potente inductor del estrés oxidativo (Fig. 1a). Para investigar el mecanismo molecular que subyace a esta sensibilización de las células cancerosas al estrés oxidativo, los presentes inventores se centraron en el papel de la HDAC1, que es un miembro bien estudiado de las HDAC. La reducción de la expresión de HDAC1 incrementaba considerablemente la citotoxicidad del H₂O₂ y del cisplatino en las células HeLa (Fig. 1b-d). Aunque se propuso que p53 se asocia con HDAC1 para regular la sensibilidad celular al estrés oxidativo (referencias 16-19), pueden existir otros mecanismos en las células HeLa en las que la proteína E6 del virus del papiloma ha inactivado p53.

[0064] Puesto que los presentes inventores previamente encontraron que RFP (*RET finger protein*), que tiene una elevada expresión en la mayoría de líneas celulares de cáncer, se asocia y colocaliza con HDAC1 (referencia 20), se intentó elucidar si RFP está implicada en la función biológica de HDAC1 en lo referente a la sensibilidad al estrés

oxidativo. Primero se determinó el dominio de unión de RFP y HDAC1. La región amino-terminal de HDAC1 se une tanto al dominio superhélice como al dominio Rfp de RFP (Fig. 2). Además, la reducción de la expresión de RFP o de HDAC1 potencia la sensibilidad de las células cancerosas al H₂O₂ y al cisplatino (Fig. 1b-g), sugiriendo la posibilidad de que HDAC1 esté funcionalmente asociado a RFP.

5 **[0065]** Puesto que tanto HDAC1 como RFP tienen actividad represora de la transcripción^{1,20,21}, se generó la hipótesis de que HDAC1 y RFP puede reprimir en cooperación los genes diana comunes que son responsables de la sensibilización de las células a fármacos citotóxicos. Para identificar dichos genes diana, se generaron células HeLa estables que expresaban ARN horquillado corto (ARNhc) control o de RFP y se compararon los perfiles de expresión génica mediante micromatrices de ADN. Entre los genes cuya expresión aumentaba en las células con
10 expresión reducida de RFP, los presentes inventores se centraron en el gen *TBP-2* porque se ha descrito que su expresión también es aumentada significativamente por un inhibidor de HDAC, SAHA (referencia 15). Es bien conocido que TBP-2 inhibe la tioredoxina (referencias 22 y 23), un eliminador de ROS, y sensibiliza a las células al estrés oxidativo y al cisplatino (referencias 4 y 24). A partir de los resultados obtenidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y el análisis mediante inmunotransferencia, los
15 presentes inventores confirmaron que la expresión de *TBP-2* está regulada a nivel transcripcional por HDAC1 y RFP (Fig. 3a y b). Para analizar si TBP-2 sensibiliza de hecho a las células al H₂O₂ y al cisplatino, se sobreexpresó TBP-2 en células HeLa. La sobreexpresión de TBP-2 aumentaba considerablemente la sensibilidad a estos agentes (Fig. 3d y e), sugiriendo que la expresión inducida de TBP-2 en células HeLa es responsable de la mayor sensibilidad al H₂O₂ y al cisplatino en células con expresión reducida de HDAC1 o RFP. Se examinó más en profundidad si la
20 expresión inducida de TBP-2 por HDAC1ip o RFPip era responsable del aumento de la sensibilidad. La reducción de la expresión de TBP-2 recuperaba significativamente la resistencia celular al H₂O₂ y al cisplatino, que disminuía por la reducción de la expresión de HDAC1 o RFP (Fig. 3f-h). Estos resultados demuestran que HDAC1 y RFP aumentan la resistencia celular a estos agentes en parte por la represión de la expresión de TBP-2.

Asimismo, se confirmó que se observaron los mismos resultados cuando se usaron líneas celulares de carcinoma de
25 colon y de cánceres de mama (Fig. 4).

[0066] Se realizó una inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para examinar si HDAC1 y RFP eran reclutados a la región del promotor del gen *TBP-2* y regulaban directamente su expresión. Tanto HDAC1 como RFP eran reclutados a la región proximal, pero no a la distal, del promotor de *TBP-2*. El ensayo con el indicador luciferasa mostró que HDAC1 y RFP pueden reprimir de forma coordinada la actividad del promotor de *TBP-2* y la actividad
30 represora de la transcripción de RFP era inhibida por HDAC1 (datos no mostrados). Puesto que la expresión de TBP-2 aumenta con la reducción de la expresión de RFP, se pensó que la acetilación de histonas en la región del promotor de TBP-2 está acelerada. La ChIP usando células con expresión reducida de RFP mostró un aumento de los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4 en el promotor (Fig. 5b). Además, puesto que el reclutamiento de HDAC1 en una región del promotor de *TBP-2* está debilitado por la supresión de la expresión de RFP, se pensó que
35 la acetilación de histonas por la reducción de la expresión de RFP es debida a que no se recluta HDAC1. Estos resultados sugieren en gran medida que RFP recluta HDAC1 a la región del promotor de *TBP-2* y reprime su transcripción a través de la actividad de HDAC1.

[0067] Puesto que no se ha descrito que HDAC1 o RFP se unan directamente al ADN, el complejo HDAC1-RFP debe ser reclutado al promotor a través de proteínas de unión a ADN. Estudios previos indicaron que la región
40 proximal del promotor de *TBP-2* incluye la secuencia de unión a NF-Y y que la inducción de la expresión de TBP-2 por HDACi estaba regulada por NF-Y (referencia 15). Por tanto, se especula que NF-Y puede ser un candidato que reclute el complejo HDAC1-RFP al promotor de *TBP-2*. NF-Y es un factor de transcripción trimérico que consta de NF-YA, B y C. Los estudios de coimmunoprecipitación revelaron que RFP puede interactuar específicamente con NF-YC (Fig. 5c y d). Esto sugiere que HDAC1, RFP y NF-Y pueden formar un complejo proteico. Para investigar este
45 complejo proteico se cotransfectaron transitoriamente las construcciones NF-YC-V5, Flag-HDAC1 y Flag-RFP en células HEK293 y se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-V5. HDAC1 y RFP coimmunoprecipitaban con NF-YC (fig. 5e).

[0068] El ensayo ChIP reveló que NF-Y se asociaba con la región proximal del promotor de *TBP-2* (Fig. 5f) como se observaba para HDAC1 y RFP, y que la expresión reducida de NF-YC atenuaba considerablemente el
50 reclutamiento tanto de HDAC1 como de RFP al promotor de *TBP-2* (Fig. 5g y h). De estos resultados se deduce que HDAC1, RFP y NF-Y forman un complejo proteico sobre el promotor de *TBP-2*. Además, a partir de los resultados de cromatografía de filtración en gel, los presentes inventores encontraron que HDAC1, RFP y NF-YC se detectaban en las mismas fracciones (alrededor de las fracciones de 400 kDa). Esto respalda el hecho de que estas proteínas forman un complejo.

55 **[0069]** Los resultados que se muestran en la Fig. 5 sugieren que RFP media en la interacción entre HDAC1 y NF-YC. De acuerdo con esto, la asociación entre HDAC1 y NF-YC se potenciaba en las células que expresaban RFP de forma exógena, mientras que se atenuaba en consecuencia en las células con expresión reducida de RFP (Fig. 6b y c). Estos resultados indican que RFP media en la formación del complejo proteico. Puesto que se ha descrito que RFP forma un oligómero (referencias 25 y 26), se determinó el dominio necesario para su oligomerización. Como se
60 muestra en la Fig. 7b, para la oligomerización RFP-RFP son necesarios los dominios anillo-caja B (RB) y superhélice

(CC), pero no el dominio Rfp (RD).

Puesto que los experimentos hasta la fecha mostraban que era necesario un dominio Rfp para que RFP se uniera a HDAC1 y NF-YC, se pensó que RFP se polimerizaba en RB y CC en el extremo N-terminal y se unía a HDAC1 y NF-YC respectivamente en un dominio Rfp en el extremo C-terminal para formar un complejo proteico HDAC1-RFP-NF-Y (Fig. 5i).

[0070] Asimismo, se estudió el efecto de la expresión de RFP en modelos *in vivo* de tratamiento con fármacos antineoplásicos. Se trasplantó por vía subcutánea en un ratón desnudo una línea celular en la que se había expresado ARNhc de *RFP* (RFP23hc y RFP26hc) y control (NC1hc). Cuando los tumores crecieron por encima de un volumen de 50 mm³, se inyectó cisplatino por vía intraperitoneal cada cuatro días. El tratamiento con cisplatino suprimía más considerablemente el crecimiento tumoral de las células con expresión reducida de RFP que el de las células control (Fig. 8a-c).

[0071] Por último, se analizó el efecto de la expresión de RFP sobre el pronóstico de pacientes con cáncer. Se obtuvieron muestras de 115 pacientes con carcinoma de colon. El cáncer de colon RFP positivo se definió como más del 10% de células tumorales claramente teñidas con anticuerpo anti-RFP. Como resultado, 68 de las 115 muestras de carcinoma de colon eran RFP positivas (Fig. 8d). La expresión de RFP y TBP-2 era exclusiva y la expresión de TBP-2 estaba claramente reducida en las células que expresaban RFP en muestras de cáncer de colon (Fig. 8e). El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de estos casos reveló una correlación significativa entre la expresión de RFP y una supervivencia global más corta (Fig. 8f). Estos resultados sugieren que los niveles de expresión de RFP en el cáncer de colon afectan a la eficacia de los fármacos antineoplásicos, así como al desenlace clínico de los pacientes.

[0072] Los efectos antitumorales sinérgicos de HDACi y los fármacos quimioterapéuticos han recibido considerable atención en la investigación para el tratamiento del cáncer; sin embargo, no se ha esclarecido completamente la base mecanicista de dicha sinergia. Varios estudios han sugerido como posible mecanismo que HDAC1 regula la sensibilidad celular a la apoptosis inducida por diversos mecanismos de estrés a través de la asociación con p53 (referencias 16-19). En este documento se presenta evidencia directa de que HDAC1 forma un complejo con RFP y NF-YC y regula la sensibilidad de las células cancerosas al estrés oxidativo a través de la represión de la expresión de TBP-2. Según publicaciones previas, el aumento de la expresión de TBP-2 puede reducir la capacidad de eliminación de ROS de la tioredoxina y sensibilizar a las células cancerosas al estrés oxidativo inducido por fármacos antineoplásicos. A la vista de estos datos, HDAC1 confiere a las células cancerosas resistencia a los fármacos antineoplásicos mediante la regulación del estado del sistema antioxidante.

[0073] Además, los presentes inventores demostraron que la reducción de la expresión de RFP sensibiliza significativamente a las células cancerosas frente a los fármacos antineoplásicos. De este modo, RFP podría convertirse en una nueva diana del tratamiento antineoplásico en combinación con otros fármacos antineoplásicos. Aunque los HDACi tienen potentes actividades antineoplásicas a concentraciones que son mínimamente tóxicas para el huésped, también se observaron toxicidades limitantes de dosis (referencia 28). Considerando la expresión restringida a tejido de RFP en células normales (referencia 29) y la ausencia aparente de defectos fenotípicos en los ratones *knockout* para RFP, el desarrollo de un tratamiento para el cáncer dirigido a RFP podría ser beneficioso y tener menos toxicidad.

Los resultados de los presentes inventores podrían proporcionar nuevos conocimientos sobre el mecanismo molecular que subyace al sinergismo entre HDACi y los fármacos antineoplásicos.

[0074] Para profundizar más en la investigación, se examinó la relación entre la expresión de RFP en el cáncer de endometrio y el pronóstico. Como resultado, en la investigación de todos los grupos de pacientes (Fig. 9a), se demostró que el pronóstico era significativamente desfavorable en un grupo de pacientes en las que se observó la expresión de RFP. Además, cuando se realizó la misma investigación dividiendo los grupos de pacientes en estadio I y estadios II a IV, la expresión de RFP se correlaciona con un pronóstico desfavorable independientemente del estadio (Fig. 9b y c). Posteriormente, la relación entre la expresión de RFP y el pronóstico se comparó entre los grupos de pacientes en los que se emplearon diferentes intervenciones quirúrgicas respectivamente. En el presente documento se investigó la diferencia entre histerectomía radical e histerectomía total. Como resultado, en el grupo RFP-negativo no se observaron diferencias significativas en el pronóstico en función de la diferencia del procedimiento quirúrgico (Fig. 10b), aunque en el grupo RFP-positivo, el pronóstico mejoraba significativamente en el grupo de histerectomía radical en comparación con el grupo de histerectomía total (Fig. 10c). Por otro lado, se investigó la diferencia basada en la presencia o ausencia de linfadenectomía. En el grupo RFP-negativo no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (un grupo de pacientes (+) que se sometió a linfadenectomía y un grupo de pacientes (-) que no se sometió a linfadenectomía) (Fig. 11b). No obstante, en el grupo RFP-positivo, se demostró que el pronóstico mejoraba en un grupo que se sometió a linfadenectomía en comparación con un grupo de pacientes que no se sometió a linfadenectomía (Fig. 11c). Considerando en conjunto los resultados de ambas figuras (Figs. 10 y 11), se podría pensar que en el caso de las pacientes con expresión de RFP el empleo de procedimientos quirúrgicos más agresivos conduce a una mejora del pronóstico. Se puede decir que puede obtenerse información para seleccionar un procedimiento quirúrgico mediante la confirmación del estado de expresión de RFP (por ejemplo, realizando una inmunotinción) en la biopsia para el diagnóstico del cáncer de

endometrio.

[Aplicabilidad industrial]

<Bibliografía>

[0075]

- 5 1. Yang, XJ. y Seto, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(3):206-18 (2008)
2. Bolden, JE., Peart, MJ. y Johnstone, RW, Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 5(9):769-84 (2006).
3. Minucci, S. y Pelicci, PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer.* 6(1):38-51 (2006).
- 10 4. Junn, E. y col. Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol.* 164(12):6287-95 (2000).
5. Xu, WS., Parmigiani, RB. y Marks, PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 26(37):5541-52 (2007).
- 15 6. Marks, PA. y Breslow, R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nature Biotechnology.* 25(1):84-90 (2007).
7. Miyajima, A. y col. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br J Cancer.* 76(2):206-10(1997).
8. Kurosu, T., Fukuda, T., Miki, T. y Miura, O. BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene.* 22(29):4459-68 (2003).
- 20 9. Hwang, IT. y col. Drug resistance to 5-FU linked to reactive oxygen species modulator 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 359(2):304-10 (2007).
10. Ravid, A. y col. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Res.* 59(4):862-7 (1999).
- 25 11. Godwin, AK. y col. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(7):3070-4 (1992).
12. Yokomizo, A. y col. Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin and etoposide. *Cancer Res.* 55(19):4293-6 (1995).
- 30 13. Sasada, T. y col. Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest.* 97(10):2268-76 (1996).
14. Powis, G. y Kirkpatrick, DL. Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 7(4):392-7 (2007).
15. Butler, LM. y col. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(18):11700-5 (2002).
- 35 16. Luo, J. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature.* 408(6810):377-81 (2000).
17. Ito, A. y col. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J.* 21 (22):6236-45 (2002).
18. Insinga, A. y col. Impairment of p53 acetylation, stability and function by an oncogenic transcription factor. *EMBO J.* 23(5):1144-54 (2004).
- 40 19. Shimono, Y. y col. Mi-2 beta associates with BRG1 and RET finger protein at the distinct regions with transcriptional activating and repressing abilities. *J Biol Chem.* 278(51):51638-45 (2003).
20. Shimono, Y. y col. RET finger protein is a transcriptional repressor and interacts with enhancer of polycomb that has dual transcriptional functions. *J Biol Chem.* 275(50):39411-9 (2000).
- 45 21. Nishiyama, A. y col. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem.* 274(31):21645-50 (1999).

22. Wang, Y, De Keulenaer, GW. y Lee, RT. Vitamin D(3)-up-regulated protein-1 is a stress-responsive gene that regulates cardiomyocyte viability through interaction with thioredoxin. J Biol Chem. 277(29):26496-500 (2002).
23. Baker, AF. y col. Identification of thioredoxin-interacting protein I as a hypoxia-inducible factor 1 alpha-induced gene in pancreatic cancer. Pancreas. 36(2):178-86. (2008).
- 5 24. Cao, T., Borden, KL., Freemont, PS. y Etkin, LD. Involvement of the rfp tripartite motif in protein-protein interactions and subcellular distribution. J Cell Sci. 110 (Pt 14):1563-71 (1997).
25. Li, X. y col. Unique features of TRIM5alpha among closely related human TRIM family members. Virology. 360(2):419-33 (2007).
26. Kelly, WK., O'Connor, OA. y Marks, PA. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. Expert Opin
10 Investig Drugs. 11(12):1695-713 (2002).
27. Tezel, G. y col. M. Different nuclear/cytoplasmic distributions of RET finger protein in different cell types. Pathol Int. 49(10):881-6 (1999)
28. Shimono, K. y col. Microspherule protein 1, Mi-2beta, and RET finger protein associate in the nucleolus and up-regulate ribosomal gene transcription. J Biol Chem. 280(47):39436-47 (2005)

15 LISTADO DE SECUENCIAS

[0076]

<110> NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY TAKAHASHI, Masahide KATO, Takuya KIKKAWA, Fumitaka

<120> AGENTES PARA POTENCIAR EL FEECTO DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS Y USOS DE LOS MISMOS

20 <130> P08079P

<150> JP P2008-223461

<151> 01/09/2008

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1

<211> 2.969

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

gggttttaacgc tgcgcgcggc atccgcctcgg acgcggccac gttgtcttgc gcgctttgcc	60
cgcttgcccc tgggactctg accctcggtt accctttcct gccccactag cgtggccgcg	120
agcctcgggtg agccggccgt attcccctc tcgcttaggg ggcacaggcg caggcatcgg	180
cccggccact ccaagccttc ggtgcgcggg cgcgtctggg atacgggccc gggaggcgcc	240
gccctccgtc cgcgcggtgc ctctcaggaa cagcgaaccg gagagagcgc cggagagttg	300
ggctcagtgc agagctcggc gccggggccc atgcccgtc gccccgcag gccggcgcca	360
tggcctccgg gagtgtggcc gagtgcctgc agcaggagac cacctgcccc gtgtgcctgc	420
agtacttcgc agagcccatg atgctcgact gcggccataa catctgttgc gcgtgcctcg	480
ccgctgctg gggcacggca gagactaacg tgtcgtgccc gcagtgccgg gagaccttc	540
cgcagaggca catgcggccc aaccggcacc tggccaacgt gacccaactg gtaaagcagc	600
tgcgcaccga gcggccgtcg gggcccgcg gcgagatggg cgtgtgcgag aagcaccgcg	660
agccccgaa gctgtactgc gaggaggacc agatgcccac ctgcgtggtg tgcgaccgct	720
ccgcgagca ccgcggccac agcgtgctgc cgctcgagga ggcggtggag ggcttcaagg	780
agcaaatcca gaaccagctc gaccatttaa aaagagtga agatttaaag aagagacgct	840
gggcccaggg ggaacaggca cgagctgaac tcttgagcct aaccagatg gagagggaga	900
agattgtttg ggagtttgag cagctgtatc actccttaaa ggagcatgag tatcgccctc	960
tggcccgct tgaggagcta gacttgcca tctacaatag catcaatggt gccatcacc	1020
agttctcttg caacatctcc cacctcagca gctgategc tcagctagaa gagaagcagc	1080

ES 2 432 537 T3

agcagcccac cagggagctc ctgcaggaca ttggggacac attgagcagg gctgaaagaa 1140
 tcaggattcc tgaaccttgg atcacacctc cagatttgca agagaaaatc cacatttttg 1200
 cccaaaaatg tctattcttg acggagagtc taaagcagtt cacagaaaaa atgcagtcag 1260
 atatggagaa aatccaagaa ttaagagagg ctgagttata ctgagtgga gtagctctgg 1320
 acccagacac ggccctaccc agcctgatcc tctctgataa tctgcggcaa gtgcggtaca 1380
 gttacctcca acaggacctg cctgacaacc ccgagagggt caatctgttt cctgtgtct 1440
 tgggctctcc atgcttcctc gccgggagac attattggga ggtagagggt ggagataaag 1500
 ccaagtggac cataggtgtc tgtgaagact cagtgtgcag aaaagggtga gtaacctcag 1560
 cccccagaa tggattcttg gcagtgtctt tgtggtatgg gaaagaatat tgggctctta 1620
 cctccccaat gactgcccta cccctgcgga ccccgctcca gcgggtgggg attttcttgg 1680
 actatgatgc tggtagagtc tctctctaca acgtgacaga gaggtgtcac accttcactt 1740
 tctctcatgc taccttttgt gggcctgtcc ggccctactt cagtctgagt tactcgggag 1800
 ggaaaagtgc agctcctctg atcatctgcc ccatgagtgg gatagatggg ttttctggcc 1860
 atgttgggaa tcatggtcat tccatggaga cctccctctg aggaggtgaa ttcaggccaa 1920
 aagggctgtt ggctgtaatc ctacgccagg cacaaggcat cttgttgctt tgccacgtcc 1980
 tgtcacagct gggatcctt accatgttcc acgcccttgc agtgggagac aggatgtcca 2040
 tgttctctac catccttttc cttcccatgc agatttgtaa atgtaatgag atgtatcaag 2100
 atatcctaga aataaaaacc agatgtccac ctccagtgtt tcatactttc tggttttaca 2160
 catcgctgga gggataaaga gtalggataa tctttggatt tggagagccg ttcaagatac 2220
 ttccagcttc ttggctcagc ctggcttctt ctgggttcagc cccacataat gattatggct 2280
 atttgctgtc atttctgggc tagggctcct ttctaacaac ctgactgga ataaggccct 2340
 gtcagcatgg ctccctttat ccagttttc cgtctgggaa cagtacctct gccctgatt 2400
 cccaatgtgc catagtttta ttaactccat taaagaagcc tgtatgtgtt ttggttagtt 2460
 acagttatct tacaataatg gtgggtaatg gcccacctc tgttatgaga taatgttcta 2520
 atcaatgtct ctgcctttgt atcttttctg agggctttgt ctgttctctt cattctaatg 2580
 aaagggtgat tctagtgtg ggtgcatatc atccaggata atattctgcc caactccatc 2640
 ctctgttact agatccctta ccagtcacat ttgtggactg gtggccagtc gtataccatc 2700
 cctggaagga ttctgggaca atattccagg gattcattga cttcttggct ccttttctcc 2760
 atttcttttg ggggaagggg gaattgacca tgcttaagtg catcctatca aggggcagct 2820
 ccgtcccat ggccattgga tcatgagaca ctctgaagtc egaaggctgg ggcagatcac 2880
 ttcaagcaag ccccatgat ggttctcagt cctgcttctc tgtgggtacg tgcccctctg 2940

tttaaaaata aactgaatat ggatgttta

2969

<210> 2

<211> 1.542

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 432 537 T3

atggcctccg ggagtgtggc cgagtgcctg cagcaggaga ccacctgccc cgtgtgcctg	60
cagtacttgc cagagcccat gatgctcgac tgcggccata acatctgttg cgcgtgcctc	120
gcccgtctgt ggggcacggc agagactaac gtgtcgtgcc cgcagtgcgc ggagaccttc	180
ccgcagaggc acatgcggcc caaccggcac ctggccaacg tgacccaact ggtaaagcag	240
ctgcgcacgc agcggccgtc ggggcccggc ggcgagatgg gcgtgtgcga gaagcacgc	300
gagcccctga agctgtactg cgaggaggac cagatgccc tctgcgtggt gtgcgaccgc	360
tcccgcgagc accgcggcca cagcgtgctg ccgctcgagg aggcggtgga gggcttcaag	420
gagcaaatcc agaaccagct cgaccattta aaaagagtga aagatttaaa gaagagacgt	480
cgggcccagg gggaacaggc acgagctgaa ctcttgagcc taaccagat ggagagggag	540
aagattgttt gggagtgtga gcagctgtat cactccttaa aggagcatga gtatgcctc	600
ctggcccggc ttgaggagct agacttgacc atctacaata gcatcaatgg tgccatcacc	660
cagttctctt gcaacatctc ccacctcagc agcctgatcg ctccagctaga agagaagcag	720
cagcagccca ccaggagct cctgcaggac attggggaca cattgagcag ggctgaaaga	780
atcaggattc ctgaaccttg gatcacacct ccagatttgc aagagaaaat ccacattttt	840
gccccaaaat gtctattctt gacggagagt ctaaagcagt tcacagaaaa aatgcagtca	900
gatattggaga aaatccaaga attaagagag gctcagttat actcagtgga cgtgactctg	960
gaccagaca cggcctaccc cagcctgacg ctctctgata atctgcggca agtgccgtac	1020
agttacctcc aacaggacct gcctgacaac ccgagagggt tcaatctgtt tccctgtgtc	1080
ttgggtcttc catgcttcat cgcggggaga cattattggg aggtagagggt gggagataaa	1140
gccaaagtga ccatagggtg ctgtgaagac tcagtgtgca gaaaagggtg agtaacctca	1200
gccccccaga atggattctg ggcagtgtct ttgtggtatg ggaaagaata ttgggtctct	1260
acctcccaa tgactgcctt acccctggcg acccgcctcc agcgggtggg gattttcttg	1320
gactatgatg ctggtgagggt ctctttctac aacgtgacag agagggtgtca caccttact	1380
ttctctcatg ctaccttttg tgggcctgtc cggcctact tcagtctgag ttactcgga	1440
gggaaaagtg cagctcctct gatcatctgc cccatgagtg ggatagatgg gttttctggc	1500
catgttggga atcatggtca ttocatggag acctcccctt ga	1542

<210> 3

<211> 513

<212> PROT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 432 537 T3

Met	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	Ala	Glu	Cys	Leu	Gln	Gln	Glu	Thr	Thr	Cys	
1				5					10					15		
Pro	Val	Cys	Leu	Gln	Tyr	Phe	Ala	Glu	Pro	Met	Met	Leu	Asp	Cys	Gly	
		20						25				30				
His	Asn	Ile	Cys	Cys	Ala	Cys	Leu	Ala	Arg	Cys	Trp	Gly	Thr	Ala	Glu	
		35					40					45				
Thr	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln	Cys	Arg	Glu	Thr	Phe	Pro	Gln	Arg	His	
	50					55					60					
Met	Arg	Pro	Asn	Arg	His	Leu	Ala	Asn	Val	Thr	Gln	Leu	Val	Lys	Gln	
65					70					75					80	
Leu	Arg	Thr	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Pro	Gly	Gly	Glu	Met	Gly	Val	Cys	
			85						90					95		
Glu	Lys	His	Arg	Glu	Pro	Leu	Lys	Leu	Tyr	Cys	Glu	Glu	Asp	Gln	Met	
			100					105					110			
Pro	Ile	Cys	Val	Val	Cys	Asp	Arg	Ser	Arg	Glu	His	Arg	Gly	His	Ser	
		115					120					125				
Val	Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Ala	Val	Glu	Gly	Phe	Lys	Glu	Gln	Ile	Gln	
	130					135					140					
Asn	Gln	Leu	Asp	His	Leu	Lys	Arg	Val	Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Arg	Arg	
145					150					155					160	
Arg	Ala	Gln	Gly	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Gln	
			165						170					175		
Met	Glu	Arg	Glu	Lys	Ile	Val	Trp	Glu	Phe	Glu	Gln	Leu	Tyr	His	Ser	
			180					185					190			
Leu	Lys	Glu	His	Glu	Tyr	Arg	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Glu	Glu	Leu	Asp	
	195						200					205				

ES 2 432 537 T3

Leu Ala Ile Tyr Asn Ser Ile Asn Gly Ala Ile Thr Gln Phe Ser Cys
 210 215 220
 Asn Ile Ser His Leu Ser Ser Leu Ile Ala Gln Leu Glu Glu Lys Gln
 225 230 235 240
 Gln Gln Pro Thr Arg Glu Leu Leu Gln Asp Ile Gly Asp Thr Leu Ser
 245 250 255
 Arg Ala Glu Arg Ile Arg Ile Pro Glu Pro Trp Ile Thr Pro Pro Asp
 260 265 270
 Leu Gln Glu Lys Ile His Ile Phe Ala Gln Lys Cys Leu Phe Leu Thr
 275 280 285
 Glu Ser Leu Lys Gln Phe Thr Glu Lys Met Gln Ser Asp Met Glu Lys
 290 295 300
 Ile Gln Glu Leu Arg Glu Ala Gln Leu Tyr Ser Val Asp Val Thr Leu
 305 310 315 320
 Asp Pro Asp Thr Ala Tyr Pro Ser Leu Ile Leu Ser Asp Asn Leu Arg
 325 330 335
 Gln Val Arg Tyr Ser Tyr Leu Gln Gln Asp Leu Pro Asp Asn Pro Glu
 340 345 350
 Arg Phe Asn Leu Phe Pro Cys Val Leu Gly Ser Pro Cys Phe Ile Ala
 355 360 365
 Gly Arg His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly Asp Lys Ala Lys Trp Thr
 370 375 380
 Ile Gly Val Cys Glu Asp Ser Val Cys Arg Lys Gly Gly Val Thr Ser
 385 390 395 400
 Ala Pro Gln Asn Gly Phe Trp Ala Val Ser Leu Trp Tyr Gly Lys Glu
 405 410 415
 Tyr Trp Ala Leu Thr Ser Pro Met Thr Ala Leu Pro Leu Arg Thr Pro
 420 425 430
 Leu Gln Arg Val Gly Ile Phe Leu Asp Tyr Asp Ala Gly Glu Val Ser
 435 440 445
 Phe Tyr Asn Val Thr Glu Arg Cys His Thr Phe Thr Phe Ser His Ala

450

455

460

Thr Phe Cys Gly Pro Val Arg Pro Tyr Phe Ser Leu Ser Tyr Ser Gly
465 470 475 480

Gly Lys Ser Ala Ala Pro Leu Ile Ile Cys Pro Met Ser Gly Ile Asp
485 490 495

Gly Phe Ser Gly His Val Gly Asn His Gly His Ser Met Glu Thr Ser
500 505 510

Pro

<210> 4

<211> 19

<212> ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNip diseñado para inhibir la expresión del gen de RFP

<400> 4

gaguuaucug ggagggaaa 19

10 <210> 5

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> ARNip diseñado para inhibir la expresión del gen de RFP

<400> 5

aacucuuagg ccuaaccag a 21

<210> 6

<211> 21

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNip diseñado para inhibir la expresión del gen de RFP

<400> 6

25 aagagaggcu caguuaucuc 21

<210> 7

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> ARNip diseñado para inhibir la expresión del gen de RFP

<400> 7

ccuauagagu gggauugau 19

<210> 8

<211> 19

10 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNip diseñado para inhibir la expresión del gen de RFP

<400> 8

15 gacucagugu gcagaaaag 19

<210> 9

<211> 18

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> ARNip diseñado para inhibir la expresión del gen de RFP

<400> 9

agaaccagcu cgaccuu 18

<210> 10

25 <211> 62

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica RFP_{hc} diseñado para inhibir la expresión del gen de RFP

30 <400> 10

gatcgagtta ctcgggaggg aaattcaaga gatttccctc ccgagtaact cttttttgga 60

aa 62

<210> 11

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador específico para HDAC1

<400> 11

5 ctctgttt ttcaggctc c 21

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> cebador específico para HDAC1

<400> 12

aggagaagac agacagagg c 21

<210> 13

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador específico para RFP

20 <400> 13

tgctgacg oggcataac 20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador específico para RFP

<400> 14

tcggtgcga gctgcttac 20

30 <210> 15

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> cebador específico para TBP-2

<400> 15

tgagatggg atcatgagac c 21

<210> 16

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador específico para TBP-2

<400> 16

10 gtattgacat ccaccagatc c 21

<210> 17

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> cebador específico para GAPDH

<400> 17

gaagggaag gtcggagtca a 21

<210> 18

20 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

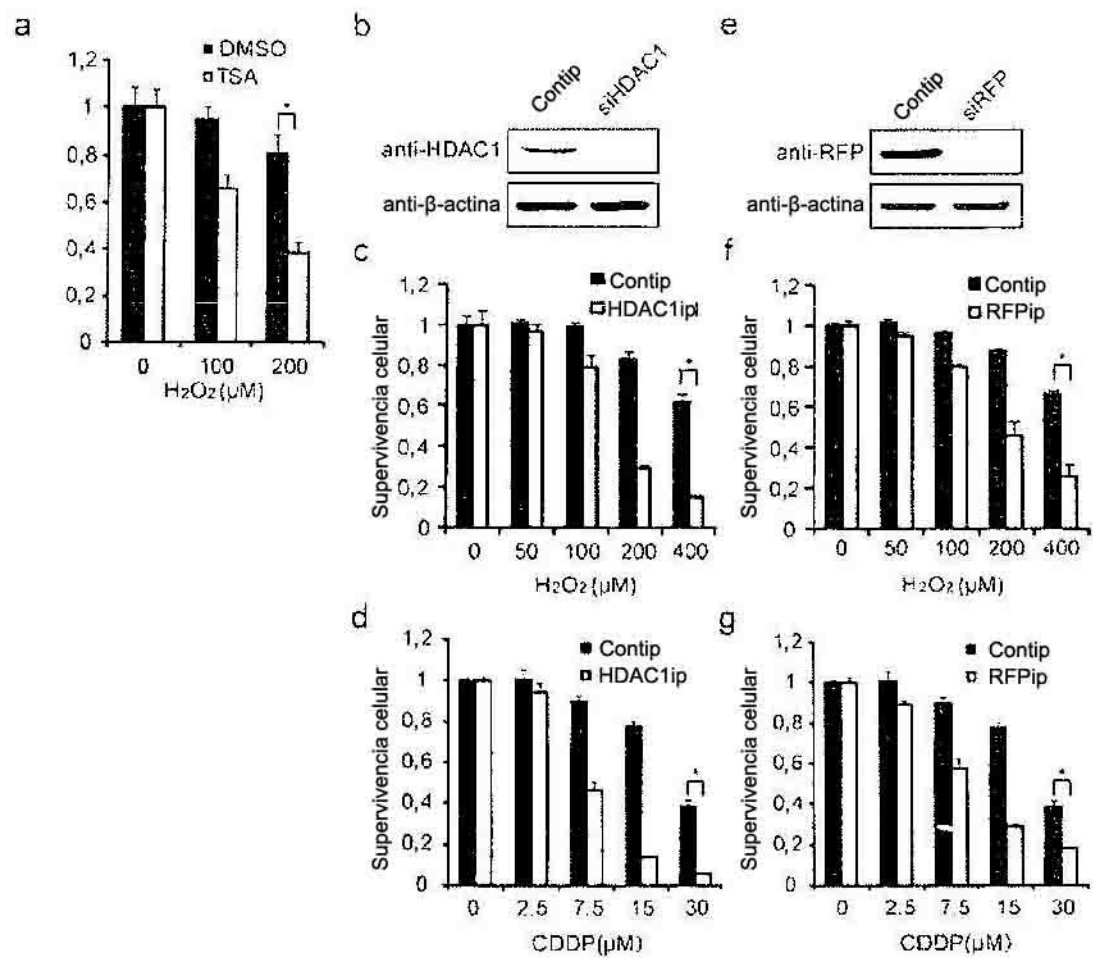
<223> cebador específico para GAPDH

25 <400> 18

gagatgatga ccdtttggc tc 22

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para estimar el pronóstico en un paciente con carcinoma de colon, en el que se usa el nivel de expresión de RFP (*RET finger protein*) en una célula cancerosa aislada de un paciente con cáncer como indicador y en el que además, un nivel de expresión de RFP alto indica un pronóstico desfavorable.
- 5 2. Uso de un anticuerpo anti-RFP en el procedimiento de la reivindicación 1.

**Fig. 1**

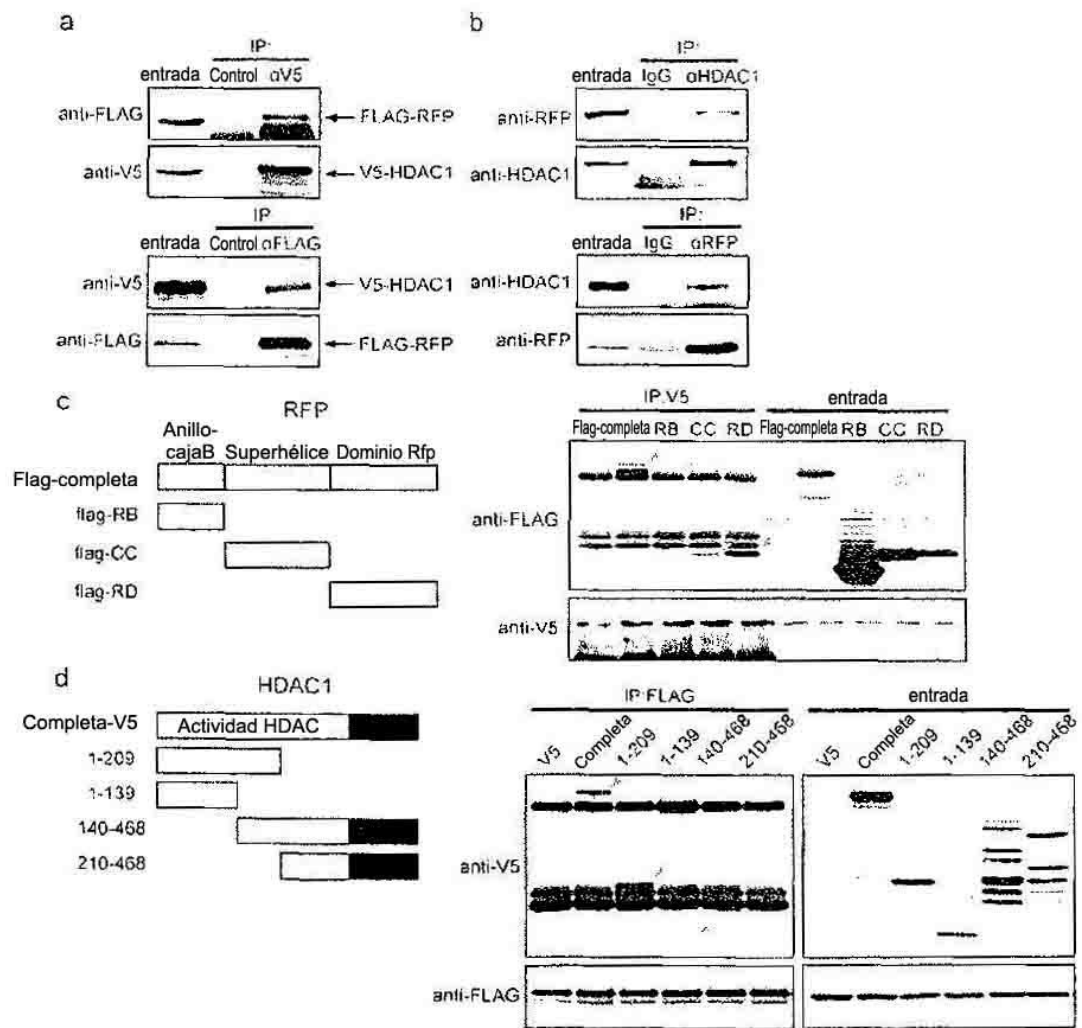


Fig. 2

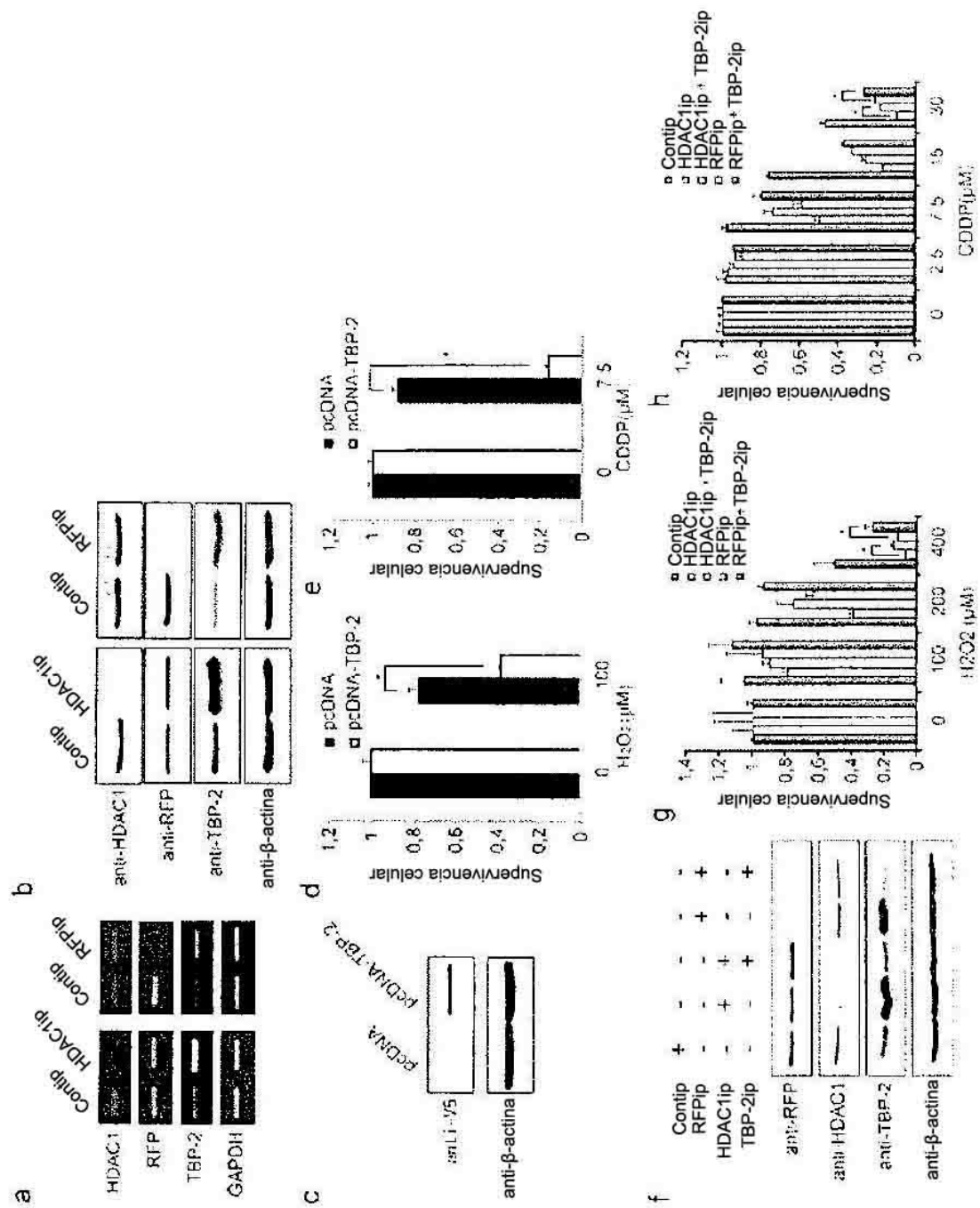
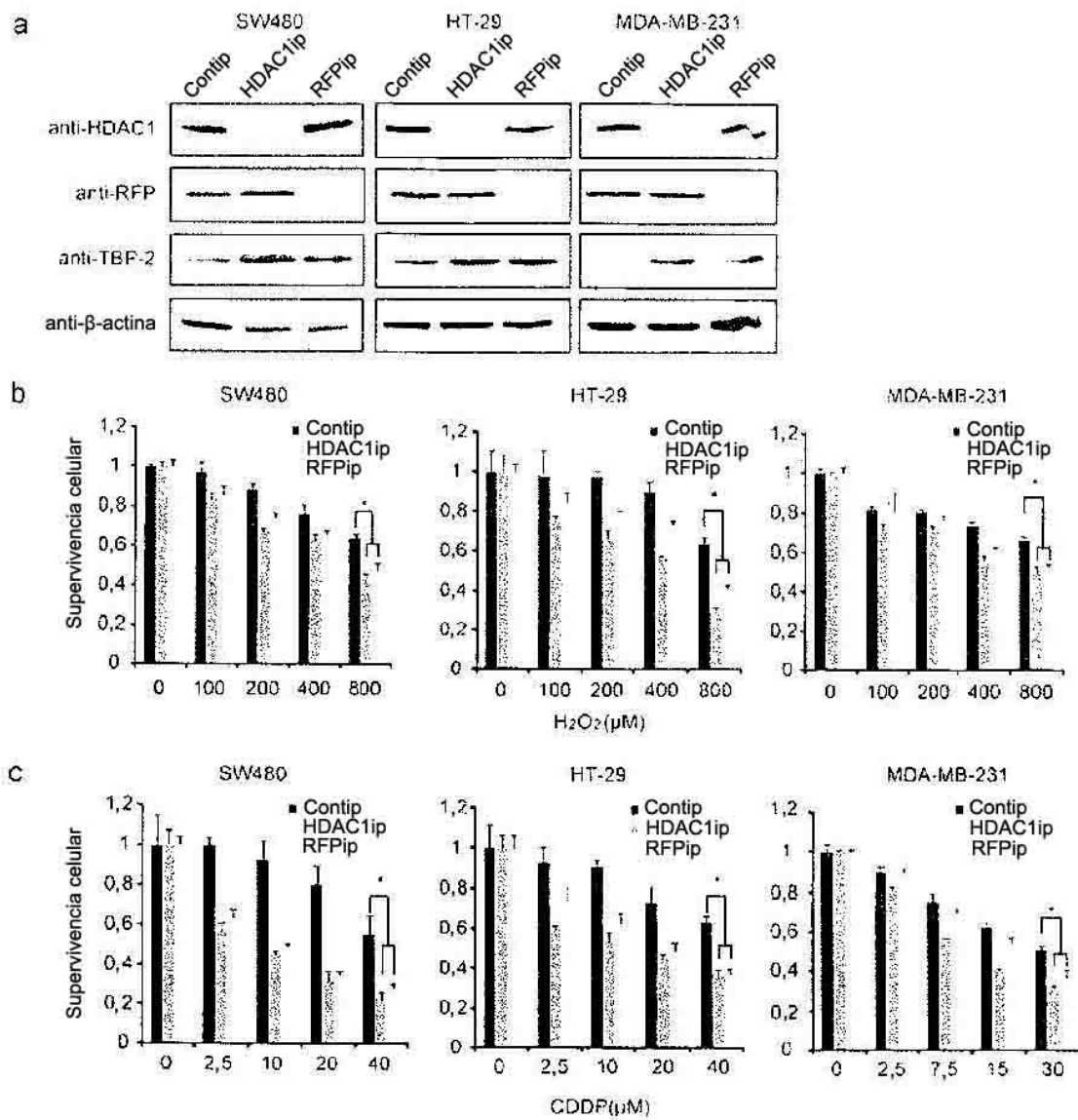


Fig. 3

**Fig. 4**

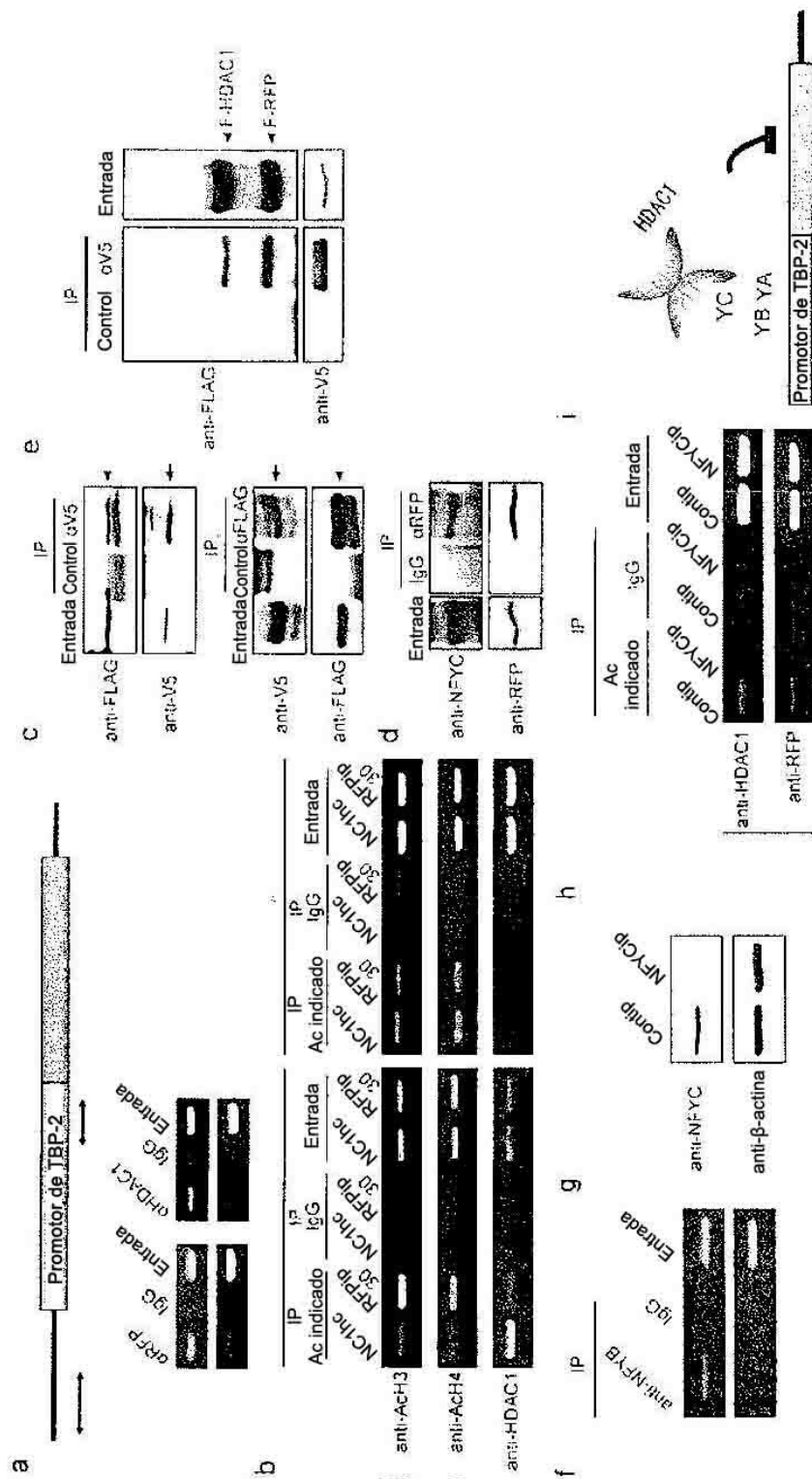


Fig. 5

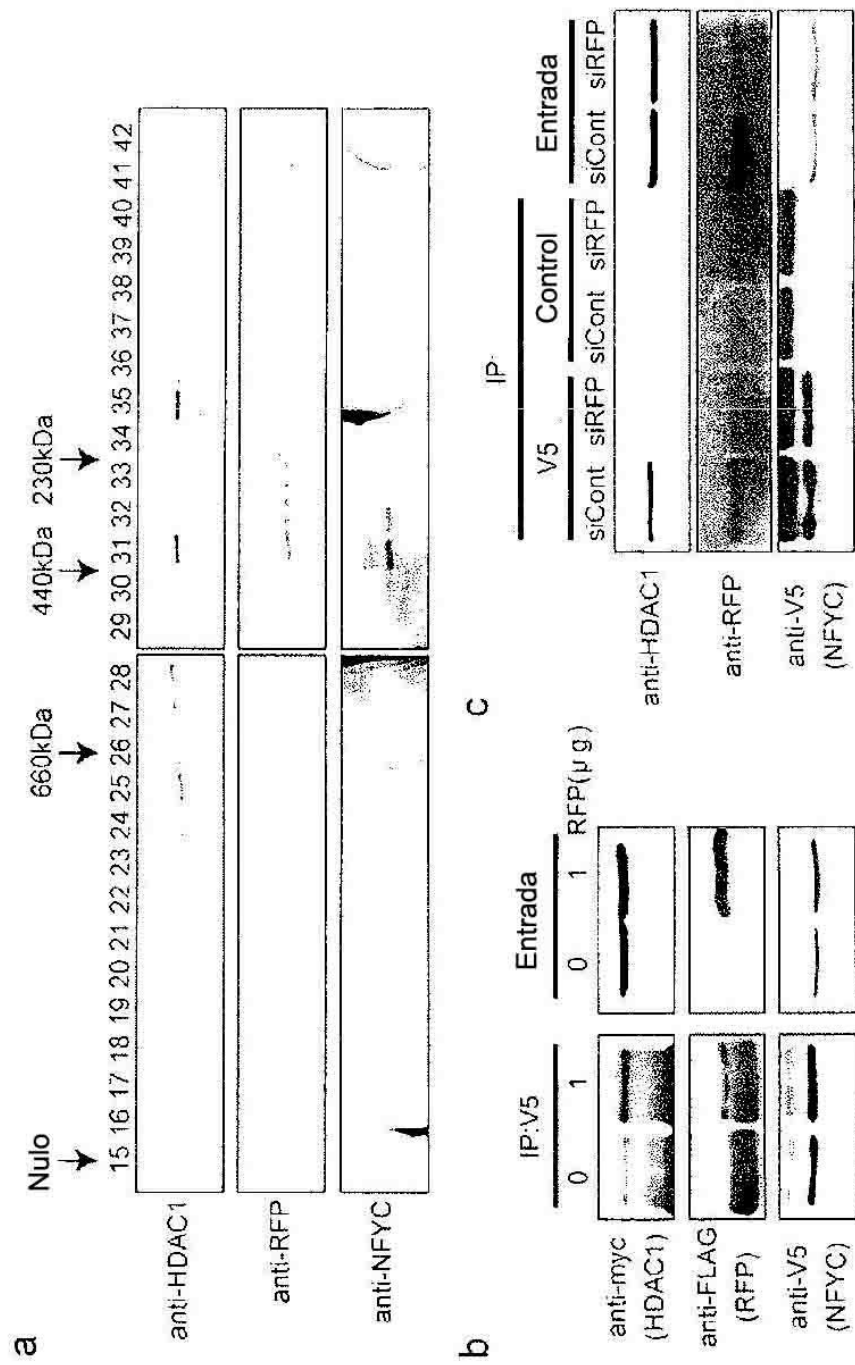


Fig. 6

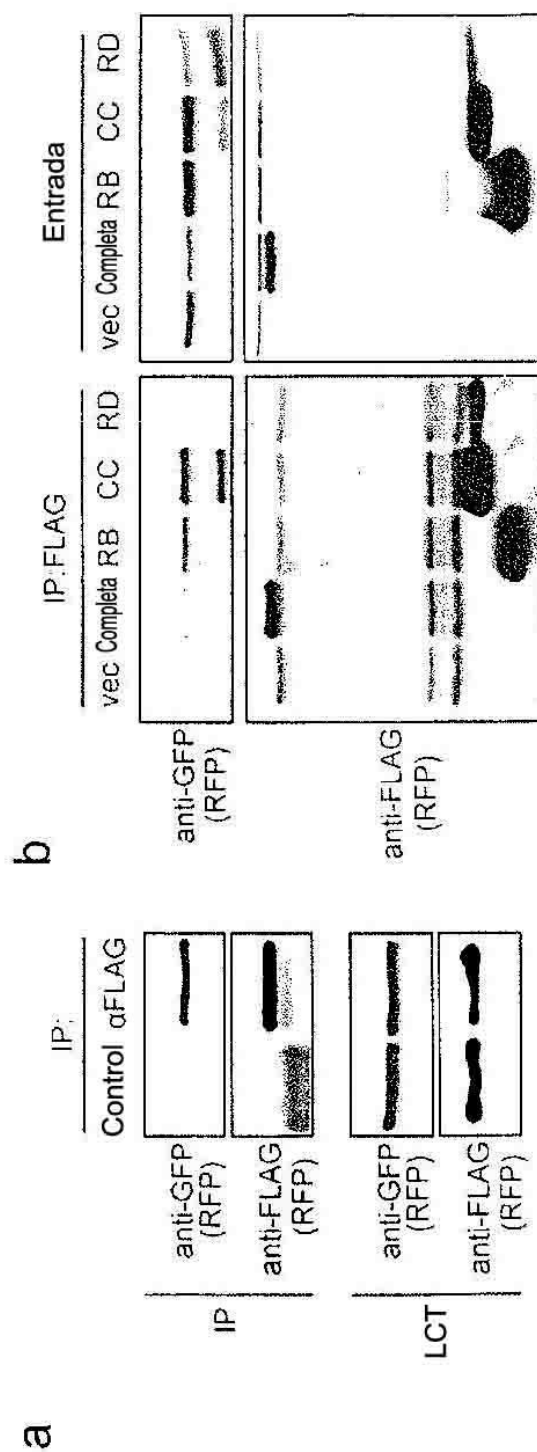


Fig. 7

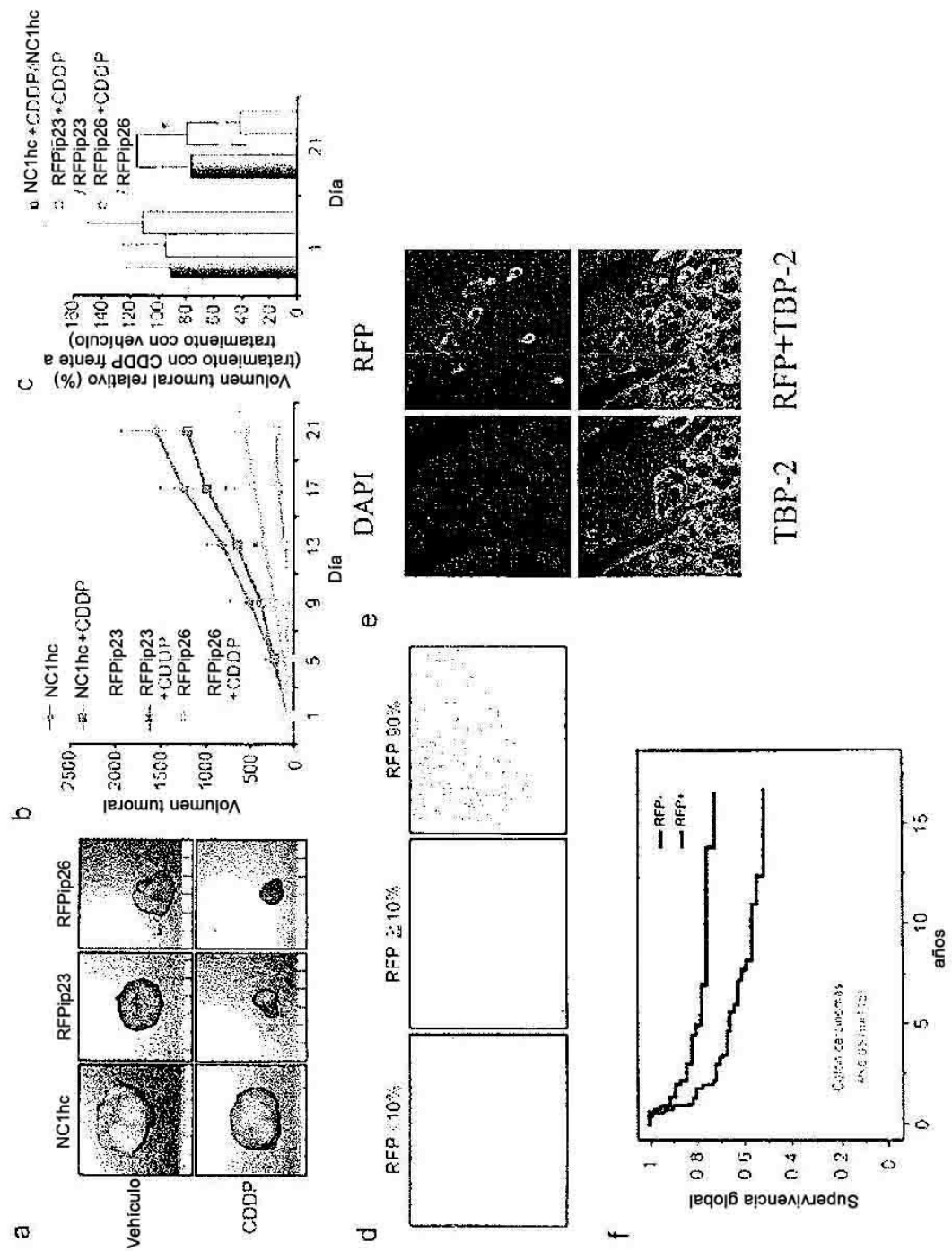


Fig. 8

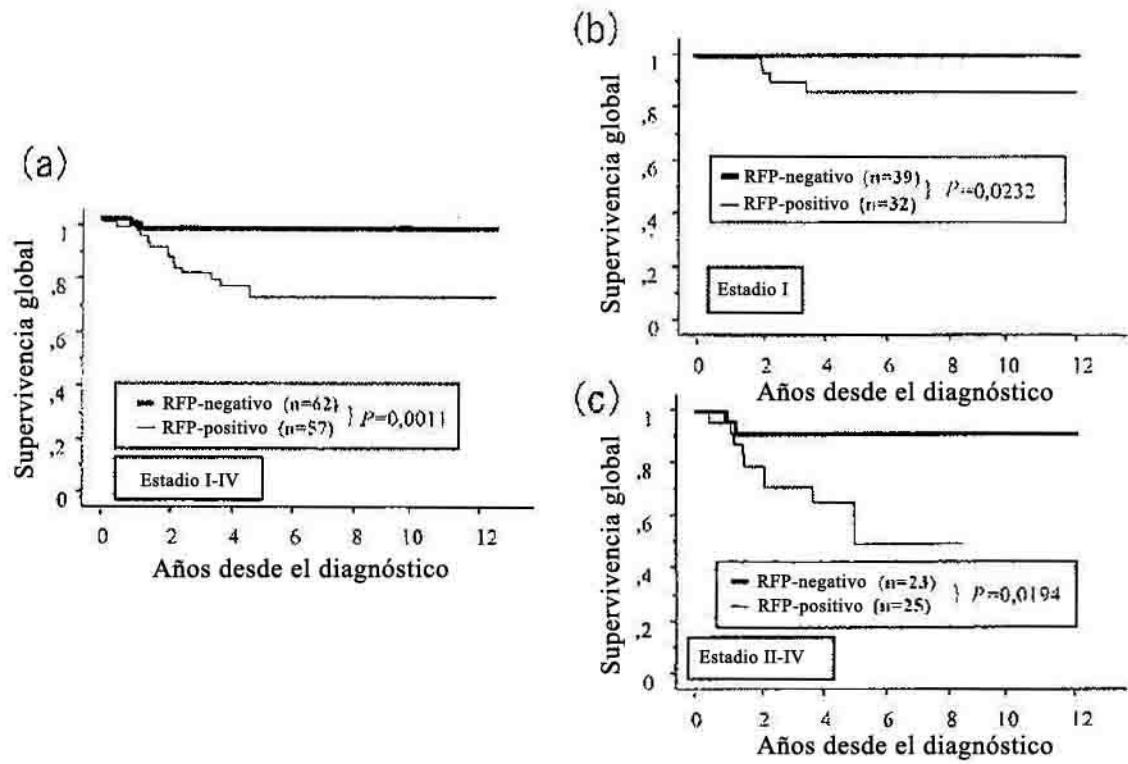


Fig. 9

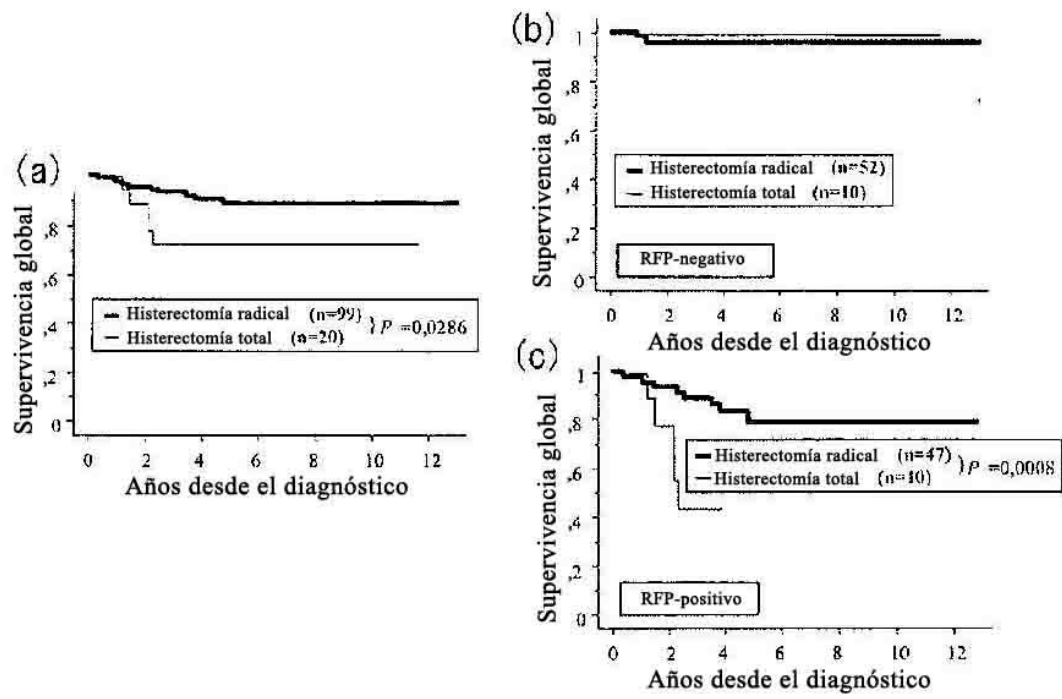


Fig. 10

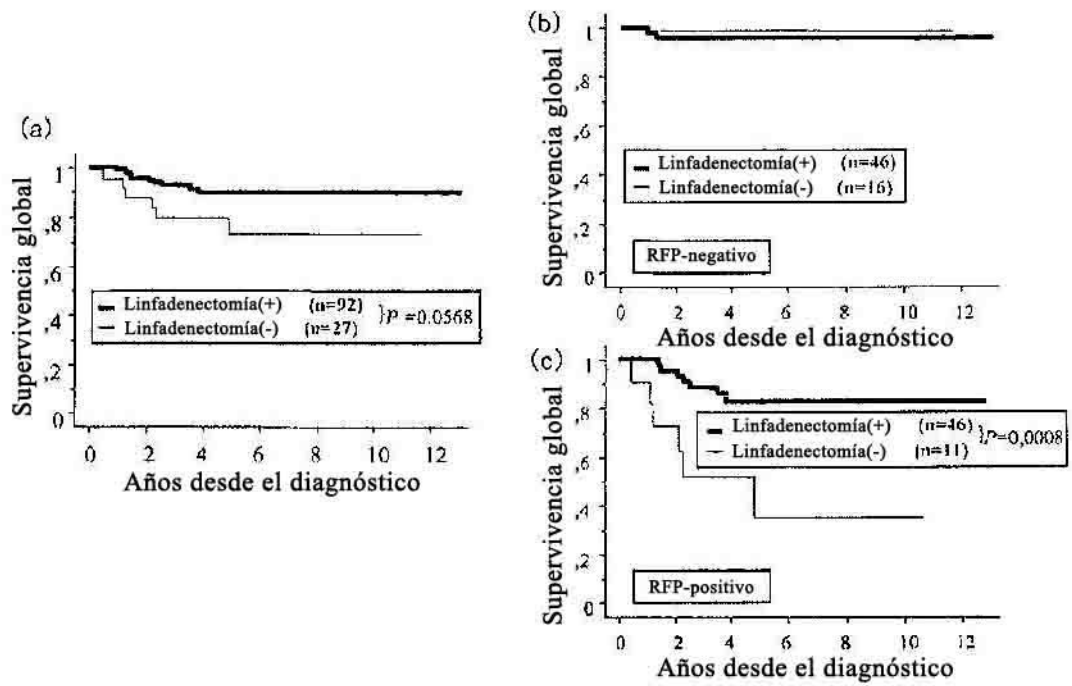


Fig. 11 (corregida)

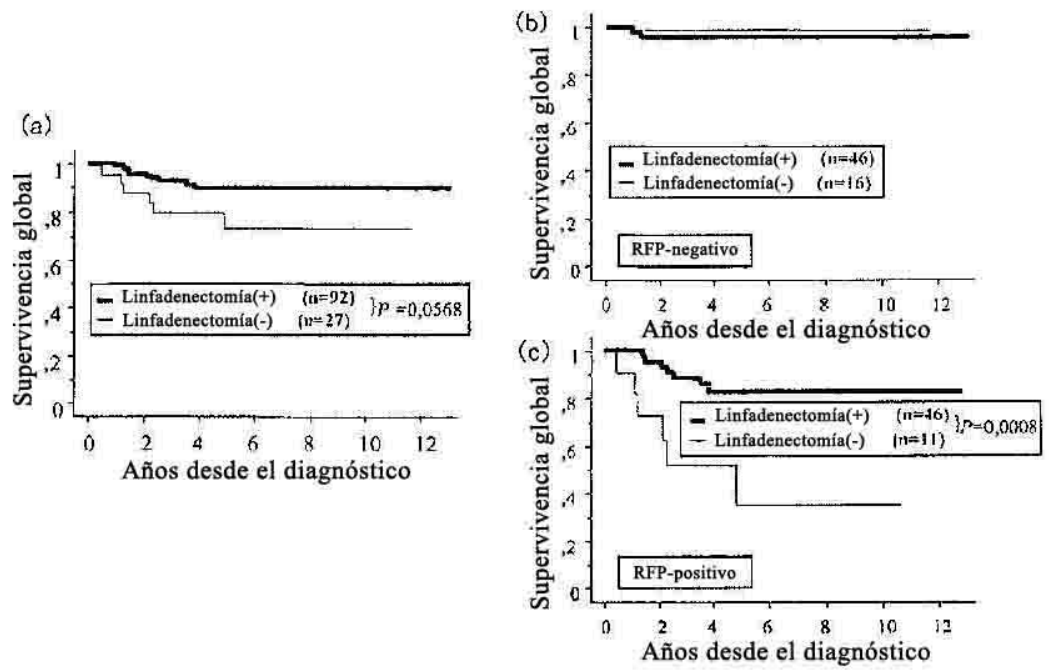


Fig. 11 (corregida)