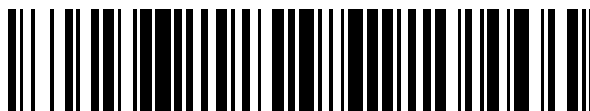


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 868**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08717840 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2134374**

54 Título: **Inhibidores de la BTK para uso en el tratamiento de tumores epiteliales resistentes a fármacos quimioterapéuticos**

30 Prioridad:

14.03.2007 IT PD20070088

13.04.2007 EP 07106119

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

13.03.2014

73 Titular/es:

BIONSIL S.R.L. IN LIQUIDAZIONE (100.0%)

Via Giuseppe Mazzini 2

20123 Milano , IT

72 Inventor/es:

LAVITRANO, MARIALUISA;

GRASSILLI, EMANUELA y

HELIN, KRISTIAN

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 447 868 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

Inhibidores de la BTK para uso en el tratamiento de tumores epiteliales resistentes a fármacos quimioterapéuticos

5 **Campo de la técnica**

[0001] La presente invención se refiere a una proteína aislada de acuerdo con las características indicadas en el preámbulo de la reivindicación principal. También está destinada a un procedimiento *in vitro* para reducir la resistencia a los fármacos en las células tumorales epiteliales así como en las células madre tumorales.

10

Antecedentes de la tecnología

[0002] Una de las estrategias más seguidas en la terapia de las enfermedades neoplásicas prevé el uso de fármacos (quimioterapia) capaces de dañar el ADN de las células tumorales con el fin de inducir el proceso natural de la apoptosis en las mismas.

15

[0003] No obstante, se sabe que las células tumorales pueden responder de un modo inesperado a la terapia farmacológica, lo que muestra, por el contrario, una fuerte resistencia a la misma. También se sabe que una de las razones principales de la resistencia farmacológica mostrada por las células tumorales es la incapacidad de las células para comenzar el proceso de la apoptosis, incluso en presencia de daños considerables en el ADN.

20

[0004] Este fenómeno se ha rastreado hasta una alteración funcional (mutación o delección) del gen p53, que ya no puede iniciar el proceso de apoptosis celular, de modo que hace que las células resistan la acción del fármaco. Los niveles de resistencia a los fármacos de las células tumorales pueden ser muy altos. Por ejemplo, en el caso de las células tumorales del colon-recto en fase avanzada, una terapia farmacológica a base de 5-fluorouracilo (5FU) muestra una respuesta eficaz en únicamente el 10-15% de las células y una combinación de 5FU con fármacos nuevos, tales como irinotecán y oxaliplatino, conduce a un incremento de la mortalidad celular de hasta un 40-50%, un valor que sigue siendo completamente insatisfactorio para una acción terapéutica eficaz contra enfermedades neoplásicas.

25

30

[0005] En Clinical Cancer Research vol. 8 (2002) p. 1224-1233, Uckun F.M. y col. demostraron la actividad quimiosensibilizadora de LFM A 13 dirigido a la BTK en células de leucemia.

[0006] Los resultados mostrados en Biorganic & Medicinal Chemistry vol. 15 (2007) p. 800-814 de Uckun F.M. y col. indican que LFM A13 es un inhibidor de proteínas quinasas que tiene un efecto antiproliferativo sobre las células de cáncer de mama humano y células de glioblastoma.

35

[0007] El documento WO 02/38797 notifica la secuencia de nucleótidos (nº de registro en Genbank X58957) y la secuencia de aminoácidos (nº de registro en Genbank CAA41728) de la BTK humana.

40

[0008] En los últimos años se ha descubierto un fenómeno celular denominado "interferencia del ARN" (ARNi) por medio del cual se silencia la expresión génica de un modo específico. Aprovechando dicho proceso, es posible obtener la silenciación selectiva de los genes con una función desconocida, de modo que permite la definición de su función específica a través del estudio del fenotipo obtenido. Aplicando técnicas de ARNi y estudiando los resultados fenotípicos, es además posible asignar nuevas funciones a los genes ya conocidos.

45

[0009] Hoy en día, los genes implicados en el fenómeno de resistencia a los fármacos de las células tumorales se desconocen en su gran mayoría.

[0010] Por tanto, existe una gran necesidad de identificar nuevos genes implicados en la resistencia a fármacos y de diseñar procedimientos y compuestos capaces de disminuir sustancialmente la resistencia de las células tumorales a fármacos.

50

Descripción de la invención

55

[0011] El problema subyacente a la presente invención es el de disponer de compuestos capaces de reducir la resistencia a los fármacos de las células tumorales de tipo epitelial, con el fin de permitir la fabricación de medicamentos destinados a la terapia de enfermedades neoplásicas relacionadas.

[0012] La invención se refiere a una proteína aislada de la secuencia de aminoácidos SEC ID Nº 2 que codifica una isoforma de la proteína BTK y el polinucleótido aislado que codifica la misma, teniendo dicho polinucleótido aislado la secuencia del primer exón correspondiente a la SEC ID Nº 1.

60

[0013] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4 y el kit farmacéutico de acuerdo con la reivindicación 7.

65

Breve descripción de las figuras

[0014] Las características y ventajas de la invención estarán más claras a partir de la siguiente descripción detallada de las pruebas y resultados que han conducido a su definición, indicada con referencia al conjunto de figuras en el que:

- 5
- La Figura 1 es un gráfico que ilustra los resultados de la inhibición de la capacidad para formar colonias de células tumorales resistentes a fármacos del colon tratado con los compuestos de acuerdo con la invención y un fármaco quimioterapéutico.
 - 10 - Las Figuras 2a y 2b son gráficos que muestran los resultados de un análisis de inversión de la resistencia de una línea de células tumorales a dos fármacos quimioterapéuticos diferentes por medio de la silencianción de las isoformas alfa y beta del gen GSK3,
 - Las Figuras 3a - 3c son gráficos que ilustran los resultados de las pruebas de inversión de la resistencia a un fármaco quimioterapéutico diferente de tres líneas de células tumorales diferentes del colon por medio de la silencianción del gen GSK3beta,
 - 15 - La Figura 4a es un gráfico que ilustra los resultados de las pruebas de inversión de la resistencia a un fármaco quimioterapéutico diferente de dos líneas de células tumorales diferentes del colon por medio de la silencianción del gen GSK3beta,
 - La Figura 4b es un gráfico que ilustra los resultados de un análisis de inversión de la resistencia de una línea de células tumorales a la combinación de dos fármacos quimioterapéuticos diferentes por medio de la silencianción de la isoforma beta del gen GSK3,
 - 20 - La Figura 5 es un conjunto de imágenes que ilustran la localización del citocromo C para la muerte celular inducida por 5FU en ausencia de GSK3.
 - La Figura 6 es un gráfico que ilustra los resultados de los ensayos de activación de la caspasa 3 y la caspasa 7 en respuesta al tratamiento con 5FU de células de carcinoma de colon HCT116p53KO con silencianción de los genes HCT116 y GSK3alfa, GSK3beta,
 - 25 - La Figura 7 es un conjunto de imágenes que ilustran la translocación de AIF al núcleo durante la muerte celular inducida por 5FU en ausencia de GSK3,
 - La Figura 8 es un gráfico que ilustra la inversión de la resistencia a un fármaco quimioterapéutico de una línea de células tumorales llevada a cabo mediante el bloqueo funcional del gen de la BTK obtenido con procedimientos diferentes,
 - 30 - La Figura 9 es un gráfico que ilustra el porcentaje de muerte celular inducida por 5FU sobre la sobreexpresión de BTK en células de carcinoma de colon HCT116,
 - Las Figuras 10a y 10b son gráficos que ilustran la inversión de la resistencia a fármacos quimioterapéuticos por medio del bloqueo funcional del gen de la BTK en diferentes líneas celulares tumorales de colon,
 - 35 - La Figura 11 es un análisis de transferencia de tipo Western que muestra la expresión de BTK en varias líneas de células tumorales derivadas de diferentes cánceres epiteliales,
 - Las Figuras 12a y 12b son gráficos que ilustran la inversión de la resistencia a fármacos quimioterapéuticos por medio del bloqueo funcional del gen de la BTK en diferentes líneas celulares tumorales de colon,
 - 40 - La Figura 13 es un conjunto de imágenes que ilustran la acumulación en el citoplasma del citocromo C en células tratadas con 5FU sobre la inhibición de BTK,
 - La Figura 14 es un gráfico que ilustra los resultados de los ensayos fluorimétricos de activación de la caspasa tras 72 horas y 96 horas en células de carcinoma de colon HCT116 y HCT116p53KO tratadas con 5FU, inhibición de BTK o la combinación de ambos,
 - 45 - La Figura 15a es una imagen de la transferencia de tipo Western que muestra que el anticuerpo sc-1696 reconoce específicamente la proteína BTK y que en las células de carcinoma epitelial (HCT116p53KO) la BTK tiene un peso molecular aparente de ~67 kDa y que la misma forma de la proteína está presente, junto con la forma de 77 kDa "clásica", también en células de leucemia (Nalm6),
 - La Figura 15b es una imagen de la transferencia de tipo Western – inmunoprecipitación que confirma que también un anticuerpo diferente (BL7) identifica la proteína BTK como de ~67 kDa en células HCT116p53KO y que esta isoforma está presente en células de leucemia (Nalm6) junto con la forma de 77 kDa "clásica",
 - 50 - La Figura 16 es una imagen que ilustra los resultados de un experimento de PCR que muestra que el extremo 5' cadena arriba del nucleótido 202 en el ARNm que codifica la BTK de las células HCT116p53KO está ausente o es diferente del extremo 5' del ARNm de BTK de células mononucleares de sangre periférica (PBMC),
 - 55 - La Figura 17 es una imagen que ilustra los resultados de una alineación ClustalW del transcrito de BTK identificado con el número de registro en GenBank #NM_000061, y el transcrito nuevo identificado en las células HCT116p53KO mediante PCR de 5'RACE, seguida de clonación y secuenciación (identificados como *alternativos*), el recuadro que destaca la parte de la secuencia de BTK (a partir del nucleótido 131 del transcrito conocido) común entre ARNm de BTJ que deriva de #NM_000061 y el nuevo transcrito de BTK hallado en HCT116p53KO,
 - 60 - La Figura 18 es una imagen que ilustra los resultados de una alineación Blast frente a una base de datos genómicos de los exones 1-5 del transcrito de BTK identificado por el número de registro en GenBank # NM_000061 y los mismos exones del nuevo transcrito de BTK, en la que los puntos indican la posición sobre el cromosoma X de los diferentes exones de BTK,
 - 65 - La Figura 19 es una imagen que ilustra los resultados de un experimento de PCR anidada que muestra que el nuevo transcrito de BTK se expresa en tejidos tumorales incluidos en parafina fijados con formalina (IPFF) de

pacientes con carcinoma de colon.

Metodología de identificación de los genes que modulan la resistencia a fármacos en células tumorales epiteliales y pruebas de validación relacionadas

5 [0015] El problema técnico mencionado anteriormente se abordó sometiendo varias líneas de células tumorales epiteliales a una serie de pruebas y análisis puestos en marcha para identificar y caracterizar los genes capaces de dar lugar a la expresión fenotípica de interés, es decir la inversión de la resistencia a la apoptosis inducida por fármacos quimioterapéuticos.

10 [0016] Dicha identificación se realizó por medio de cribado fenotípico de una línea celular representativa de las células tumorales epiteliales siguiendo la silenciación selectiva de un grupo extendido de genes por medio de ARNi.

15 [0017] Este complejo trabajo de cribado se posibilitó debido a una biblioteca de vectores retrovirales pRetroSuper (pRS) fabricada recientemente por los laboratorios Bernards. Se sabe que dichos vectores son capaces de expresar una molécula de oligonucleótidos específica de un modo estable, conocida como ARN de interferencia pequeño, abreviado a siARN, capaz de bloquear el proceso de traducción de un ARN mensajero (ARNm) específico en la proteína correspondiente. Dicho mecanismo, para resumir, prevé que la molécula de siARN (o en su lugar, un filamento de la misma) esté asociada con el complejo enzimático RISC, que lo activa, de un modo tal que el último puede reconocer y unirse al ARNm complementario al siARN asociado al mismo, y, después, degradarlo. Se deduce que el ARNm, identificado de un modo específico por el siARN, no se puede traducir en la correspondiente cadena de aminoácidos, de modo que se obtiene la silenciación del gen a partir del cual se transcribió el ARNm. El proceso de interferencia es específico, de modo que la molécula de siARN normalmente es capaz de degradar únicamente un ARNm y, por tanto, de silenciar un único gen. Por otro lado, en su lugar es posible que se pueda degradar el mismo ARNm, a través de RISC, por un siARN diferente.

30 [0018] Este mecanismo es uno de los diferentes posibles modos de bloquear funcionalmente un gen (inactivación funcional). No obstante, la consiguiente degradación del siARN mediante RISC produce únicamente un efecto transitorio sobre los niveles de proteínas, de modo que se permite únicamente experimentos a corto plazo cuyos resultados pueden no ser relevantes a largo plazo. Para superar este problema, se usaron ARN cortos de horquilla (shARN), una secuencia de ARN plegada en forma de horquilla, como mecanismo de inactivación funcional. En resumen, se usa un vector para introducir e incorporar el shARN en el cromosoma celular. La transcripción del ADN produce shARN, que después se escinde a través de la maquinaria celular, DICER, en siARN. Después, el siARN funciona como se ha mencionado anteriormente, la incorporación del vector de shARN en el cromosoma celular permite que la silenciación génica la hereden las células hijas. Por tanto, el uso de shARN permite que se puedan usar las células inactivadas funcionalmente para los experimentos a largo plazo.

40 [0019] También se sabe por la literatura que la eficiencia de la transfección para los siARN nunca es del 100%. Por tanto, el uso de siARN transfectados no garantiza que todas las células tratadas sean privadas con éxito de una proteína diana. La ausencia de un marcador seleccionable crea además un problema al trabajar con poblaciones homogéneas de células. Usando un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a la puomicina, junto con una biblioteca de retrovirus, permite la recuperación de únicamente las células portadoras de shARN. Además, tras la selección de la expresión de shARN, solo se seleccionan los genes cuya silenciación es compatible con la supervivencia y la proliferación de las células normales. La ausencia de estos genes no influye sobre la fisiología de las células normales, sino solo sobre la respuesta a fármacos anticancerosos, una consideración muy importante a la hora de desarrollar terapias anticancerosas.

50 [0020] No obstante, es importante especificar que, en general, se puede alcanzar el mismo efecto actuando en cualquier otra etapa de un proceso de codificación de proteínas de un gen, tal como, por ejemplo, la etapa de la transcripción del gen en ARNm, o la etapa de transducción del ARNm, o por medio de la inhibición de la proteína que resulta del proceso de codificación.

55 [0021] Es evidente que la etapa esencial y crucial en la resolución del problema se representa por la identificación del gen o genes responsables del fenotipo deseado.

[0022] La biblioteca retroviral organizada por los laboratorios Bernards consiste en aproximadamente 25.000 elementos diferentes capaces de silenciar aproximadamente 8.300 genes del genoma humano, con una proporción de aproximadamente 3 vectores diferentes por cada gen.

60 [0023] Las pruebas se realizaron inicialmente *in vitro* y después se validaron *ex vivo* sobre diferentes líneas de células tumorales epiteliales caracterizadas por la ausencia del gen p53, o la mutación del mismo, y, por tanto, que poseían una marcada resistencia a fármacos quimioterapéuticos.

65 [0024] Con detalle, se estableció una biblioteca de ARNi humano (biblioteca NKi) consistente en 8.300 genes objetivo de la silenciación. Los genes objetivo incluyeron genes de quinasas, fosfatasas, oncogenes, supresores tumorales, factores de transcripción, genes implicados en los procesos de transformación, metástasis, ciclo celular,

diferenciación, apoptosis, metabólicos y anabólicos. Se siguió un protocolo similar al mencionado en una publicación anterior (Berns y col., NATURE vol. 428, 25 March 2004).

5 **[0025]** La secuencia del ARNm para cada gen objetivo se seleccionó de UniGene. Las secuencias se
 10 enmascararon usando RepeatMasker para eliminar secuencias repetitivas y se buscó con NCBI BLAST contra
 UniVec para enmascarar la contaminación vectorial. Se diseñaron tres secuencias diferentes de 19 nucleótidos (19
 unidades) para silenciar cada gen objetivo para un total de aproximadamente 25.000 oligonucleótidos de 59
 unidades que especifican ARNs cortos en horquilla (shARN). Las secuencias de 19 unidades se seleccionaron
 usando un criterio de selección como se ha mencionado en la publicación de Berns, en la que a) no había tiras de
 15 cuatro o más residuos de T o A consecutivos (para evitar las señales prematuras de terminación de la transcripción
 de la polimerasa III); b) que tienen 30-70% del contenido gomal de GC; c) que están dentro de la secuencia de
 codificación del gen objetivo; d) que comienzan con un residuo de G o C (consistente con las normas recientemente
 establecidas de sesgos de hebras); e) que comienzan después de un dímero AA en la secuencia flanqueante en 5';
 f) que finalizan justo antes de un doblete TT, TG o GT en la secuencia flanqueante en 3'; g) que no contienen sitios
 20 para las enzimas de restricción *XhoI* o *EcoRI* para facilitar el posterior barajado del casete de inactivación en las
 estructuras de los vectores; h) que comparten una identidad de secuencia mínima con otros genes; i) que están
 dirigidos a todas las variantes de transcritos representadas por los ARNm de RefSeq; y j) que no solapan con otras
 19 unidades seleccionadas de la misma secuencia objetivo. Los oligonucleótidos de 59 unidades se diseñaron de
 modo que contuvieran una secuencia de 19 unidades, su secuencia de 19 unidades complementaria, el sitio de
 25 inicio de la transcripción de la polIII, el sitio de terminación de la polIII y los sitios de clonación de *HindIII/BglII*.
 Usando los sitios de clonación de *HindIII/BglII*, los oligonucleótidos se ligaron en los vectores retrovirales
 pRetroSuper (pRS), que incluían un casete de selección para la resistencia a la puomicina. Se combinó el ADN de
 los tres vectores diferentes dirigidos al mismo gen y se produjo el virus para infectar las células objetivo.

25 EJEMPLO 1

[0026] La línea de células tumorales usada inicialmente fue HCT116p53KO (que difiere de la HCT116 wt silvestre
 debido a la ausencia del gen p53), relacionada con el tumor de colon, mientras que se llevaron a cabo otros estudios
 detallados de genes específicos con otras líneas de células tumorales resistentes a fármacos, tales como DLD-1 y
 30 SW480, así como con otras líneas de células tumorales de pulmón y de ovarios. En concreto, todas las líneas
 celulares, objeto del análisis, estaban relacionadas con los tumores de tipo epitelial.

[0027] Previamente, las líneas celulares HCT116p53KO, DLD-1 y SW480 se trataron con fármacos
 35 quimioterapéuticos habituales con el fin de confirmar su resistencia a la apoptosis inducida por fármacos.

[0028] Los fármacos quimioterapéuticos útiles de acuerdo con la presente invención pueden ser cualquier tipo
 adecuado para inducir el proceso de apoptosis en las células tumorales afectadas, tales como, por ejemplo, un
 antimetabolito o cualquier agente que daña el ADN que comprende inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de
 40 la topoisomerasa II, los compuestos de coordinación del platino y agentes alquilantes.

[0029] Las pruebas preliminares citadas anteriormente han demostrado cómo, después del tratamiento durante 72
 horas en 5FU 200 μ M, la mortalidad celular fue inferior al 10%, frente a una mortalidad de las células HCR116 wt
 superior al 95%.

45 **[0030]** Además, con pruebas complementarias de ensayos de formación de colonias (EFC) se ha demostrado
 cómo dicha resistencia a fármacos era de tipo transitorio.

[0031] Una vez confirmada la resistencia a la apoptosis inducida por fármacos quimioterapéuticos, se infectaron
 50 200×10^6 células HCT116p53KO con la biblioteca pRetroSuper identificada anteriormente proporcionada por los
 laboratorios Bernards. Cada vector de esta biblioteca se equipó ventajosamente con un casete de selección de un
 gen de resistencia a la puomicina, de modo que fuera posible seleccionar las células HCT116p53KO realmente
 infectadas por los vectores de la biblioteca mediante tratamiento con puomicina (2 mg/l en el medio de cultivo
 durante dos días).

55 **[0032]** Al final del tratamiento antibiótico, se recogieron las células todavía vivas, que, por consiguiente,
 comprendían todas las células infectadas por los retrovirus de la biblioteca cuyos genes silenciados no eran
 incompatibles con la supervivencia celular.

60 **[0033]** Las células recogidas de este modo se trataron después con 5FU 200 μ M durante 72 horas, mientras al
 mismo tiempo las células HCT116 wt y las células HCT116p53KO no infectadas también se sometieron al mismo
 tratamiento como controles.

65 **[0034]** Al final del tratamiento se encontró que aproximadamente la mitad de las células estaban flotando en el
 medio de cultivo, por lo que estaban muertas. Dichas células representaban el fenotipo buscado después, por lo que
 se recogieron y sometieron al tratamiento necesario para la identificación de los genes silenciados mediante la
 biblioteca retroviral.

- 5 **[0035]** En resumen, dichos tratamientos comprendían la extracción del ADN y la amplificación por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de una región de 643 pares de bases que contiene la región H1 de un promotor específico y la región adyacente que codifica la secuencia de nucleótidos de interés. La amplificación mediante PCR se realizó usando el cebador directo pRS: 5'-CCCTTGAACCTCCTC GTTCGACC-3' y el cebador inverso pRS: 5'-GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC-3'. Los productos obtenidos mediante la amplificación se unieron después en los vectores retrovirales pRS y el proceso de infección de las células HCT115p53KO se repitió completamente con los nuevos vectores para perfeccionar el cribado. Los productos se digirieron con *EcoRI/XhoI* y se volvieron a clonar en pRS.
- 10 **[0036]** Los productos obtenidos del segundo tratamiento de amplificación con PCR con el ADN recogido de las células muertas después del nuevo tratamiento con 5FU se aislaron de nuevo y se unieron en vectores retrovirales pRS y después se usaron para transformar bacterias DH5alfa cuyos respectivos plásmidos se secuenciaron para la identificación de los genes que dieron lugar a la expresión fenotípica de interés.
- 15 **[0037]** Una vez obtenidos e identificados los genes únicos cuya silenciación por medio de interferencia con ARN dio lugar a la inversión de la resistencia de las células tumorales analizadas al 5FU, tuvo lugar la validación separada e independiente de los genes únicos.
- 20 **[0038]** En primer lugar, la validación se llevó a cabo *in vitro* en muestras de células tumorales HCT116p53KO, cada una de las cuales se infectó por separado con uno de los plásmidos fabricados previamente, para silenciar de un modo específico y estable uno de los genes indicados por el cribado precedente y verificar su capacidad para modular la resistencia a los fármacos. Después, se seleccionaron las muestras con puromicina, se colocaron en placas Petri a una confluencia del 50% y se trataron con 5FU 200 μ M durante 12 horas.
- 25 **[0039]** La evaluación de la inversión de la resistencia a los fármacos se llevó a cabo por medio de observación de la formación de colonias de acuerdo con el protocolo definido por la CFA y su comparación con una muestra de HCT116 wt y una muestra de HCT116p53KO sin infectar.
- 30 **[0040]** En la figura 1, los resultados se indican en un gráfico que se obtuvo a partir de esta primera validación *in vitro*. Como claramente se muestra en el gráfico, un elevado porcentaje de genes identificados es capaz, cuando están bloqueados funcionalmente, de invertir consistentemente la capacidad formadora de colonias de las células HCT116p53KO tratadas con 5FU. HCT116 y KO representan los controles positivos y negativos.
- 35 **[0041]** Esta primera validación ha permitido, en concreto, identificar un grupo de genes cuya silenciación específica ha dado lugar a una inhibición inducida por 5FU del crecimiento de colonias tumorales superior al 50% con respecto a la muestra HCT116p53KO.
- 40 **[0042]** Estos genes, conocidos y caracterizados, se enumeran más adelante con su símbolo oficial junto con su número de identificación (entre paréntesis) indicados en el banco de datos NCBI Entrez Gene:
- 45 EphA1 (2041), EphA2 (1969), EphA8 (2046), EphB2 (2048), CSF1R (1436), VEGFR2 (3791), RAMP2 (10266), RAMP3 (10268), CLRN1 (7401), MAPK4 (5596), PIK3C2A (5286), PIK3CG (5294), GSK3beta (2932), IRAK3 (11213), DAPK1 (1612), JAK1 (3716), CHEK1 (1111), PIM1 (5292), TRB3 (57761), BTG1 (694), LATS1 (9113), LIMK2 (3985), MYLK (4638), PAK1 (5058), PAK2 (5062), CDC2 (983), BTK (695), PNRC2 (55629), NCOA4 (8031), NR2C1 (7181), TPR (7185), RBBP8 (5932), TRPC7 (57113), FXYD1 (5348), ERN1 (2081), PRSS16 (10279), RPS3 (6188), CCL23 (6368) y SERPINE1 (5054).
- 50 **[0043]** Entre los genes indicados anteriormente, también se puede identificar un primer subgrupo de genes cuya silenciación conduce de forma ventajosa a una inhibición superior al 75% del crecimiento de células tumorales.
- [0044]** Este primer subgrupo está formado por los siguientes genes:
- 55 EphA1 (2041), EphA2 (1969), EphA8 (2046), EphB2 (2048), CSF1R (1436), VEGFR2 (3791), RAMP2 (10266), RAMP3 (10268), MAPK4 (5596), PIK3C2A (5286), PIK3CG (5294), GSK3beta (2932), IRAK3 (11213), DAPK1 (1612), JAK1 (3716), CHEK1 (1111), PIM1 (5292), TRB3 (57761), BTG1 (694), LATS1 (9113), LIMK2 (3985), BTK (695), PNRC2 (55629), NCOA4 (8031), NR2C1 (7181), TPR (7185), TRPC7 (57113), FXYD1 (5348), ERN1 (2081), RPS3 (6188) y SERPINE1 (5054).
- 60 **[0045]** De un modo más ventajoso, se identificó un segundo subgrupo de genes cuya silenciación conduce de forma ventajosa a una inhibición superior al 95% del crecimiento de células tumorales.
- [0046]** Dicho subgrupo está formado por los siguientes genes:
- 65 EphA1 (2041), EphA2 (1969), EphA8 (2046), RAMP3 (10268), PIK3C2A (5286), GSK3beta (2932), IRAK3 (11213), DAPK1 (1612), CHEK1 (1111), PIM1 (5292), BTK (695), NCOA4 (8031), TPR (7185).

[0047] El gen GSK3alfa (2931), isoforma del gen GSK3beta, debe añadirse a los genes indicados anteriormente; en pruebas distintas cuyos resultados se muestran en los gráficos de las 2a y 2b se ha demostrado una eficiencia óptima de la inversión de la resistencia a 5FU y al oxaliplatino en las células HCT116p53KO, completamente comparable con su isoforma beta. Con detalle, la figura 2a compara los porcentajes de muertes celulares en ausencia (símbolo "-") y presencia (símbolo "+") de 5FU 200µM (tratamiento de 72 horas) con las células HCT116 silvestres (wt), las células resistentes a fármacos HCT116p53KO, las células con los genes GSK3alfa y GSK3beta silenciados. En comparación con las células resistentes a fármacos HCT116p53KO, las células HCT116p53KO con los genes GSK3alfa y GSK3beta silenciados tuvieron como resultado un elevado porcentaje de muerte de células tumorales en presencia de 5FU. La figura 2b compara los porcentajes de muertes celulares en ausencia (símbolo "-") y presencia (símbolo "+") de oxaliplatino 50 µM (tratamiento de 72 horas) con las células HCT116 wt, las células resistentes a fármacos HCT116p53KO, las células con los genes GSK3alfa y GSK3beta silenciados. En comparación con las células resistentes a fármacos HCT116p53KO, las células HCT116p53KO con los genes GSK3alfa y GSK3beta silenciados también tuvieron como resultado un elevado porcentaje de muerte de células tumorales en presencia de oxaliplatino.

[0048] La confirmación oficial de la silenciación de los genes específicos por medio de interferencia se llevó a cabo mediante análisis de transferencia de tipo Western de los niveles de la proteína codificada por ellos si el anticuerpo estaba disponible comercialmente (EphA1, EphA2, CSF1R, VEGFR, GSK3, JAK1, CHEK1, LIMK2, CDC2, BTK). El análisis de transferencia de tipo Western se realizó lisando las células seleccionadas con puromicina en tampón E1A (Hepes 50 mM a pH 8; NaCl 500 mM; 0,1% de NP 40; DTT 1M; EDTA 1Mm). Se usó electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 8-12% para separar 30 µg de proteína, que después se transfirió a membranas de difluoruro de polivinilideno. Después se usaron anticuerpos para sondar las transferencias de tipo Western.

[0049] La eficacia de los plásmidos capaces de silenciar los genes pertenecientes al grupo identificado anteriormente se analizó después en DLD-1 y SW480, otras líneas de células tumorales del colon que se sabe que tienen el p53 mutado y por su resistencia a los fármacos.

[0050] Generalmente se confirmó la capacidad para disminuir la resistencia a fármacos quimioterapéuticos, incluso con diferentes rendimientos. En concreto, el porcentaje de inhibición del crecimiento de las colonias tras el tratamiento con fármacos en las tres líneas celulares fue óptimo cuando se silenciaron los genes siguientes: EphA1 (2041), EphA2 (1969), EphA8 (2046), EphB2 (2048), CSF1R (1436), VEGFR2 (3791), PIK3C2A (5286), PIK3CG (5294), GSK3alfa (2931), GSK3beta (2932), IRAK3 (11213), CDC2 (983), CHEK1 (1111), LATS1 (9113), TRB3 (57761), JAK1 (3716), BTK (695), PIM1 (5292), LIMK2 (3985), PAK2 (5062).

EJEMPLO 2 (EJEMPLO COMPARATIVO)

[0051] Como ejemplo, en los gráficos de las figuras 3a-3c se indican las siguientes pruebas de silenciación del gen GSK3beta en las tres líneas de células tumorales analizadas, en las que la fracción de células muertas tras el tratamiento con 5FU en las muestras infectadas con los vectores capaces de silenciar el gen citado anteriormente se indica y se compara con las muestras infectadas con vectores vacíos. Con detalle, la figura 3a compara los porcentajes de muertes celulares en ausencia (símbolo "-") y presencia (símbolo "+") de 5FU 200µM (tratamiento de 72 horas) con las células HCT116 wt, las células resistentes a fármacos HCT116p53KO y las células con el gen GSK3beta silenciado. En comparación con las células resistentes a fármacos HCT116p53KO, las células HCT116p53KO con el gen GSK3beta silenciado tuvieron como resultado un elevado porcentaje de muerte de células tumorales en presencia de 5FU. La figura 3b compara los porcentajes de muertes celulares en ausencia (símbolo "-") y presencia (símbolo "+") de 5FU 200µM (tratamiento de 72 horas) sobre las células DLD-1 wt y las células DLD-1 con el gen GSK3beta silenciado. En comparación con las células DLD-1 wt, las células DLD-1 con el gen GSK3beta silenciado tuvieron como resultado un elevado porcentaje de muerte de células tumorales en presencia de 5FU. La figura 3c compara los porcentajes de muertes celulares en ausencia (símbolo "-") y presencia (símbolo "+") de 5FU 200µM (tratamiento de 72 horas) sobre las células SW480 wt y las células SW480 con el gen GSK3beta silenciado. En comparación con las células SW480 wt, las células SW480 con el gen GSK3beta silenciado tuvieron como resultado un elevado porcentaje de muerte de células tumorales en presencia de 5FU.

[0052] Además del 5FU, un ejemplo representativo de la familia de fármacos quimioterapéuticos del tipo antimetabólico, la inversión de la resistencia a los fármacos también se analizó con fármacos quimioterapéuticos de diferentes tipos, tales como oxaliplatino.

[0053] En la figura 4a, las fracciones de células muertas inducidas por un tratamiento con oxaliplatino (50 µM) se indican en las muestras de las líneas de células tumorales de colon DLD-1 y SW480, infectadas respectivamente con vectores vacíos y con vectores que silencian el gen GSK3beta.

[0054] La disminución sustancial de la resistencia a la apoptosis inducida por oxaliplatino en la muestra en la que se silenció GSK3beta es evidente. En la figura 4b se indica un gráfico en el que los resultados de una prueba análoga se indican en la línea celular SW480, en la que el fármaco usado era una combinación de 5FU y oxaliplatino.

[0055] Como se ha mencionado anteriormente y se muestra en las figuras 2a y 2b, la silencianción de GSK3alfa tiene el mismo efecto que GSK3beta en la modulaci3n de la respuesta apopt3tica al 5FU y al oxaliplatino.

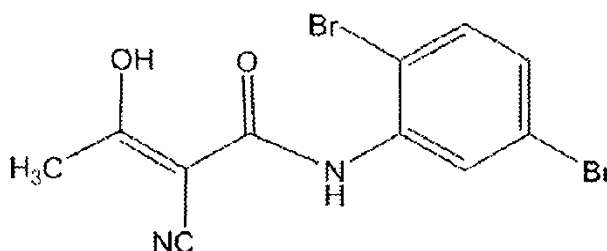
5 [0056] Se realiz3 otro estudio para determinar si la muerte celular inducida por 5FU en ausencia de GSK3 era dependiente o independiente del citocromo C. Usando anti-citocromo C y tinci3n con DAPI, como se muestra en la figura 5, se encontr3 que la muerte celular inducida por 5FU en ausencia de GSK3 es independiente del citocromo C. M3s espec3ficamente, usando anti-AIF y tinci3n con DAPI, como se muestra en la figura 7, se descubri3 que en ausencia de GSK3, AIF se transloca al n3cleo, lo que tiene como resultado la muerte celular. Esto se respald3 adicionalmente con el hallazgo de que las caspasas 3 y 7 no estaban activadas durante la muerte celular inducida por 5FU en c3lulas con GSK3 silenciado, como se muestra en la figura 6.

EJEMPLO 3

15 [0057] Otro ejemplo particularmente representativo del grupo g3nico identificado anteriormente est3 constituido por el gen de BTK sobre el cual se han realizado diversas investigaciones.

20 [0058] La BTK quinasa es una prote3na tirosina quinasa citoplasm3tica crucial para el desarrollo y diferenciaci3n de los linfocitos B. La mutaci3n en BTK es responsable de la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), una inmunodeficiencia primaria caracterizada principalmente por la ausencia de linfocitos B maduros as3 como niveles bajos de inmunoglobulinas. En los linfocitos B, se ha notificado que la BTK tiene funciones pro-apopt3ticas o anti-apopt3ticas. Adem3s, hasta ahora se ha supuesto que la BTK se expresa solo en algunos linajes derivados de m3dula 3sea, tal como linfocitos B y mastocitos, progenitores eritroides, plaquetas. El hallazgo de los inventores de que la BTK es un gen cuya silencianción invierte la resistencia a la acci3n citot3xica del 5FU demostr3 por primera vez que la BTK se expresa tambi3n en tipos celulares distintos de las c3lulas de linaje hematopoy3tico. En primer lugar, se analiz3 la eficacia de la inversi3n de la resistencia a los f3rmacos en las c3lulas tumorales HCT116p53KO tratadas con un compuesto inhibidor de la prote3na BTK, para demostrar c3mo el bloqueo funcional del gen de inter3s se puede llevar a cabo mediante formas alternativas a la silencianción por medio de ARNi.

30 [0059] El compuesto usado en estas pruebas fue (2Z)-2-cian-N-(2,5-dibromofenil)-3-hidroxi-2-butenamida, conocida como LFM-A13, cuya f3rmula estructural se indica a continuaci3n en la F3rmula 1.



F3rmula 1

35 [0060] En la figura 8, los resultados de la prueba de comparaci3n se indican en un gr3fico del bloqueo funcional del gen de BTK por medio de pl3smidos, ARNsi o LFM-A13 en muestras de c3lulas HCT116p53KO tratadas con 5FU. F3cilmente se puede observar c3mo el nivel obtenido de inversi3n de la resistencia a los f3rmacos, expresada por medio del porcentaje de la fracci3n de c3lulas muertas, es completamente comparable. Con detalle, la figura 8 compara los porcentajes de muertes celulares en presencia de 5FU 200μM (tratamiento de 72 horas) sobre las c3lulas HCT116 wt y las c3lulas resistentes a f3rmacos HCT116p53KO con o sin depleciones (s3mbolo de "vac3o" y "-") espec3ficas de BTK tras la transfecci3n transitoria de ARNsi (s3mbolo "BTKi"), la interferencia de ARN mediada por retrovirus estables (s3mbolo "shBTK") y usando LFM-A13, un compuesto inhibidor de BTK.

45 [0061] De acuerdo con el efecto protector de BTK revelado por los experimentos de inhibici3n descritos anteriormente, la sobreexpresi3n de BTK protege las c3lulas HCT116 wt sensibles de la muerte celular inducida por 5FU. Con detalle, la figura 9 compara los porcentajes de muertes celulares en presencia de 5FU 200μM (tratamiento de 72 horas) sobre las c3lulas HCT116 wt infectadas con el vector pBabe vac3o, las c3lulas HCT116 wt infectadas con el vector pBabe BTK y las c3lulas resistentes a f3rmacos HCT116p53KO.

50 [0062] Tambi3n se determin3 que la inhibici3n de BTK invierte la resistencia tambi3n al oxaliplatino (figura 10a) y DLD-1 (figura 10b).

55 [0063] La disminuci3n de la resistencia a los f3rmacos quimioterap3uticos tras el bloqueo funcional del gen de BTK por medio de LFM-A13 se confirm3 adicionalmente mediante las pruebas realizadas *in vitro* sobre las l3neas celulares tumorales epiteliales diferentes de las del colon. En la figura 11 se han investigado los niveles de BTK por medio de transferencia de tipo western en varias l3neas de c3lulas de carcinoma epitelial diferentes que muestran

que la quinasa se expresa en la mayoría de ellas. En concreto, en las figuras 12a y 12b, en los gráficos se indicaron las pruebas de la inversión obtenidas con las líneas celulares SKOV (relacionadas con tumor de ovarios) y las líneas celulares A549 (relacionadas con un tumor de pulmón).

5 **[0064]** Con detalle, la figura 12a compara los porcentajes de muertes celulares en ausencia (símbolo "NT" y "-") y presencia de 5FU 200µM, OxPt 50µM y la combinación de las dos células de ovarios resistentes (SKOV) con o sin inhibición de BTK a través del uso de LMFA13. En comparación con las células SKOV sin LMFA13, las células SKOV con LMFA13 tuvieron como resultado un elevado porcentaje de muerte de las células tumorales. La figura 12b compara los porcentajes de muertes celulares en ausencia (símbolo "NT" y "-") y presencia de 5FU 200µM, OxPt 50µM y la combinación de las dos células de pulmón resistentes (A549) con o sin inhibición de BTK a través del uso de LMFA13. En comparación con las células A549 sin LMFA13, las células A549 con LMFA13 tuvieron como resultado un elevado porcentaje de muerte de las células tumorales.

15 **[0065]** En ambos casos, se observa cómo el tratamiento de las líneas celulares con LFM-A13, el inhibidor funcional del gen de la BTK, conduce a un incremento considerable de la mortalidad celular tras la exposición a 5FU o a oxaliplatino o a ambos fármacos en combinación.

20 **[0066]** Además, la elevada eficacia de la acción de la disminución de la resistencia a los fármacos también en estas líneas celulares confirma que la validez de los resultados obtenidos en las pruebas precedentes se puede extender a, al menos, todos los tipos de tumores epiteliales, tales como tumor pulmonar, tumor de ovarios y tumor de mamas. Los resultados ópticos que se han destacado anteriormente han sugerido la validación del gen de BTK también a través del análisis *ex-vivo* sobre muestras de tumores epiteliales humanos. En primer lugar, mediante transferencia de tipo Western se verificó que los niveles de las proteínas de BTK eran elevados en el 30% de las muestras de células de tumores de ovarios extraídas de pacientes con la enfermedad en estado avanzado y/o resistentes a fármacos quimioterapéuticos. En segundo lugar se realizaron exploraciones con células madre tumorales de colon aisladas de pacientes con el fin de verificar si los genes investigados se expresaban (y en qué medida) también en este tipo celular. De hecho, de acuerdo con estudios recientes (Dean y col., 2005), estas células madre serían los responsables principales de la resistencia a los fármacos.

30 **[0067]** En las cuatro líneas de células madre tumorales analizadas, aisladas de diferentes pacientes, la expresión de la proteína BTK es muy elevada, al menos 4-5 veces mayor que la expresión detectada en las líneas celulares de carcinoma de colon usadas en los experimentos funcionales, lo que sugiere que la determinación de los niveles de BTK pueden usarse de forma ventajosa como procedimiento para definir las propiedades de las células madre de las células tumorales examinadas y, en consecuencia, también su resistencia a los fármacos quimioterapéuticos.

35 **[0068]** Los resultados han mostrado que los niveles de BTK determinan la sensibilidad de las células tumorales a 5FU y que la inhibición de BTK invierte la resistencia a los fármacos. La inmunotinción con anti-citocromo C en células tratadas con 5FU (figura 13) mostró acumulación citoplasmática tras el tratamiento con 5DU en células resistentes únicamente cuando se había inhibido la BTK, lo que respalda el hallazgo de que la inversión de la resistencia a los fármacos tras la inhibición de BTK se debe a la activación de la apoptosis. El mismo hallazgo también se respalda en el gráfico indicado en la figura 14, en el que se evalúa el nivel de activación de la caspasa 3/7 tras el tratamiento con 5FU en células resistentes HCT116p53KO en presencia o en ausencia del inhibidor de BTK LFM-A13. En las células HCT116p53KO tratadas con 5FU se observan niveles elevados de la activación de la caspasa 3/7, medida por medio de un ensayo luminométrico como ULR/número de células, únicamente cuando se inhibe la BTK.

50 **[0069]** El peso molecular predicho y notificado de la proteína BTK es 77 kDa. La proteína identificada en la transferencia de tipo western como BTK por un anticuerpo específico (sc-1696, de Santa Cruz Biotechnology) en células HCT116p53KO y en todas las demás líneas de células de carcinoma epitelial analizadas (6 líneas de células de mama, 3 líneas de células de ovarios, 7 de líneas de células de pulmón, 5 líneas de células de colon), en contraste, tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 65-68 kDa (figura 11, figura 15a), lo que sugiere que en las líneas de células epiteliales se expresa una isoforma de BTK más corta.

55 **[0070]** Para confirmar estos resultados se llevó a cabo un análisis de inmunoprecipitación usando dos anticuerpos de BTK diferentes y específicos (los anteriormente citados sc-1696 y BL7, amable regalo del Dr. Mike Tomlinson, University of Birmingham, Reino Unido). Los resultados de la figura 15b muestran en las líneas celulares epiteliales solo se expresa esta nueva isoforma, mientras que en una línea celular leucémica (Na/Im6), ya conocida por la literatura que expresa la forma clásica de 77 kDa, están presentes ambas isoformas.

60 **[0071]** Por tanto, se ha llevado a cabo un análisis bioinformático de la secuencia de codificación de (cds) de BTK y, en consecuencia, se ha identificado un segundo triplete de nucleótidos ATG (nt 428-430), en el marco con el conocido que se usa para traducir la BTK (nt 164-166) y susceptible para iniciar la traducción de una proteína. El peso molecular previsto de la supuesta proteína traducida comenzando a partir de este segundo ATG es de 67 kDa, consistente con el peso molecular aparente de la banda identificada mediante diferentes anticuerpos de la BTK en las células de carcinoma epitelial. Con el fin de identificar qué porción falta en el ARNm que codifica la isoforma más corta y nueva de la proteína BTK, se han realizado experimentos de PCR que usa diferentes pares de cebadores

(que hibridan en diferentes partes de las cds como se indica en el diagrama superior de la figura 16). Como se muestra en la figura 16, estos experimentos indican que el extremo 5', cadena arriba del nucleótido 202, está ausente o es diferente en las células HCT116p53KO.

5 **[0072]** Se han realizado experimentos 5'RACE/secuenciación con ARNm de las células HCT116p53KO con el fin de determinar la identificada del extremo 5' desconocido. Después, el análisis de la alineación entre el ADNc derivado del ARNm de las células HCT116p53KO y el ADNc que deriva del ARNm de BTK estándar, identificado por el número de registro en GenBank #NM_00061, usando el programa informático ClustalW (resultados mostrados en la figura 17) demostró que la secuencia cadena arriba del segundo exón (comenzando en el nt 134 de la cds) es diferente de lo comunicado en la literatura, es decir las células de carcinoma de colon epitelial expresan un primer exón diferente.

15 **[0073]** El análisis BLAST que usa una base de datos genómica (figura 18) localiza el primer exón del transcrito de BTK NM_000061 en 101160K en el cromosoma X contiguo, en correspondencia con el comienzo del locus de BTK. En variaciones, el primer exón del nuevo transcrito de BTK alinea 15.192 pb en 5' del primer exón de BTK conocido, inmediatamente cadena abajo del locus RPL36A, lo que sugiere que corresponde a un exón de BTK no reconocido hasta ahora. Además, este nuevo exón está presente en las células HCT116p53KO en lugar del primer exón "clásico", lo que sugiere que esta es un primer exón "alternativo", cuyo uso da lugar a un ARNm de BTK diferente, transcrito en células que expresan esta isoforma de BTK más corta. Los experimentos de PCR/secuenciación demostraron la expresión de este ARNm de BTK "alternativo" no solo en todas las líneas de células de carcinoma de colon analizadas (HCT116p53KO, DLD-1 y SW480) sino también en las 9/9 muestras IPFF de los pacientes de carcinoma de colon (figura 19).

25 **[0074]** Debe destacarse que el primer exón de BTK, como se identifica mediante el número de registro en GenBank # NM_000061, corresponde a la 5'UTR del ARNm, siendo el triplete ATG codificador del primer aminoácido Met de la proteína BTK localizada en el segundo exón. Las 5'UTR normalmente realizan funciones reguladoras, como dirigir la traducción dependiente de capuchón o independiente de capuchón mediada por IRES. Por tanto, un primer exón diferente, como se identifica en el nuevo transcrito, puede dictar si un ATG diferente (en este caso un ATG localizado en el 4º exón) tiene que usarse para iniciar la traducción de la proteína BTK y, por tanto, regula la expresión de diferentes isoformas.

[0075] La secuencia de nucleótidos del primer exón correspondiente a la 5'UTR del nuevo ARNm expresado por el gen de la BTK se comunica en la SEC ID N° 1, adjunta a la presente descripción.

35 **[0076]** La secuencia de aminoácidos de la nueva isoforma de la proteína BTK codificada por el nuevo transcrito se comunica en la SEC ID N° 2, adjunta a la presente descripción.

40 **[0077]** Los resultados anteriores sugieren un procedimiento para determinar la resistencia de las células tumorales a los fármacos quimioterapéuticos, así como un procedimiento para la identificación de la presencia de células madre tumorales en las que la expresión del gen de BTK comprende las etapas de verificar la presencia de la nueva isoforma de la proteína BTK.

45 **[0078]** La presencia de la nueva isoforma de la proteína BTK puede controlarse verificando la presencia de la proteína, por ejemplo usando transferencia de tipo Western o análisis de inmunoprecipitación o inmunohistoquímica o inmunofluorescencia o, preferentemente, verificando la presencia del ARNm que tiene el primer exón alternativo, cuyo ADNc muestra la secuencia de nucleótidos definida en la SEC ID N° 1. Este último puede llevarse a cabo de forma ventajosa por medio de análisis PCR, usando preferentemente cebadores que tienen una secuencia incluida en la SEC ID N° 1.

50 **[0079]** Cabe esperar que este nuevo procedimiento muestre ventajas relevantes con respecto a la técnica anterior conocida, en particular cuando se usa para analizar los tejidos tumorales extraídos de pacientes humanos.

55 **[0080]** En realidad, es bien conocido que los tejidos tumorales extraídos de pacientes humanos pueden contener una cantidad eficaz de linfocitos que también pueden expresar la proteína BTK, alterando de este modo la búsqueda de la proteína BTK expresada por las células tumorales.

60 **[0081]** No obstante, la proteína BTK expresada por los linfocitos es la isoforma "clásica" de la proteína BTK que tiene un peso molecular de 77 KDa, de modo que la búsqueda de la nueva isoforma de la proteína BTK puede llevarse a cabo sin ninguna interferencia, con un sencillo análisis de PCR para buscar la presencia de ARNm de BTK que tiene el primer exón alternativo.

LISTADO DE SECUENCIAS

65 **[0082]**

ES 2 447 868 T3

<120> Compuestos moduladores de resistencia a fármaco en células tumorales epiteliales
 <130> BE004398-PCT356

5 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1

<211> 300

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 1

```

ttttggtgga ctctgctacg tagtggcggt cagtgaagg agcagtgttt ttcccagatc      60
ctctggcctc cccgtccccg agggaagcca ggactagggc cgaatgaagg ggtcctccac      120
ctccacgttc cattcctggt ccacctcaag gtcactggga acacctttcg cagcaaactg      180
ctaattcaat gaagacctgg agggagccaa ttgttccagt tcatctatca catggccagt      240
tggtcattc aacaaatggt tattggatgc ccattatgtg gcaggcactg ttccggggga      300
  
```

20 <210> 2

<211> 571

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile Glu Arg Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val
 1           5           10           15

Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu Tyr Val Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu
          20           25           30

Arg Lys Arg Trp Ile His Gln Leu Lys Asn Val Ile Arg Tyr Asn Ser
          35           40           45

Asp Leu Val Gln Lys Tyr His Pro Cys Phe Trp Ile Asp Gly Gln Tyr
          50           55           60

Leu Cys Cys Ser Gln Thr Ala Lys Asn Ala Met Gly Cys Gln Ile Leu
65           70           75           80

Glu Asn Arg Asn Gly Ser Leu Lys Pro Gly Ser Ser His Arg Lys Thr
  
```

25

ES 2 447 868 T3

				85						90				95			
Lys	Lys	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Pro	Glu	Glu	Asp	Gln	Ile	Leu	Lys	Lys		
			100					105					110				
Pro	Leu	Pro	Pro	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Ser	Thr	Ser	Glu	Leu		
		115					120					125					
Lys	Lys	Val	Val	Ala	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Met	Pro	Met	Asn	Ala	Asn	Asp		
		130				135					140						
Leu	Gln	Leu	Arg	Lys	Gly	Asp	Glu	Tyr	Phe	Ile	Leu	Glu	Glu	Ser	Asn		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Trp	Trp	Arg	Ala	Arg	Asp	Lys	Asn	Gly	Gln	Glu	Gly	Tyr	Ile		
				165					170					175			
Pro	Ser	Asn	Tyr	Val	Thr	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Ile	Glu	Met	Tyr	Glu		
			180					185					190				
Trp	Tyr	Ser	Lys	His	Met	Thr	Arg	Ser	Gln	Ala	Glu	Gln	Leu	Leu	Lys		
		195					200					205					
Gln	Glu	Gly	Lys	Glu	Gly	Gly	Phe	Ile	Val	Arg	Asp	Ser	Ser	Lys	Ala		
	210					215					220						
Gly	Lys	Tyr	Thr	Val	Ser	Val	Phe	Ala	Lys	Ser	Thr	Gly	Asp	Pro	Gln		
225					230					235					240		
Gly	Val	Ile	Arg	His	Tyr	Val	Val	Cys	Ser	Thr	Pro	Gln	Ser	Gln	Tyr		
				245					250					255			
Tyr	Leu	Ala	Glu	Lys	His	Leu	Phe	Ser	Thr	Ile	Pro	Glu	Leu	Ile	Asn		
			260					265					270				
Tyr	His	Gln	His	Asn	Ser	Ala	Gly	Leu	Ile	Ser	Arg	Leu	Lys	Tyr	Pro		
		275					280					285					
Val	Ser	Gln	Gln	Asn	Lys	Asn	Ala	Pro	Ser	Thr	Ala	Gly	Leu	Gly	Tyr		
		290				295					300						
Gly	Ser	Trp	Glu	Ile	Asp	Pro	Lys	Asp	Leu	Thr	Phe	Leu	Lys	Glu	Leu		
305					310					315					320		
Gly	Thr	Gly	Gln	Phe	Gly	Val	Val	Lys	Tyr	Gly	Lys	Trp	Arg	Gly	Gln		
				325					330					335			

ES 2 447 868 T3

Tyr Asp Val Ala Ile Lys Met Ile Lys Glu Gly Ser Met Ser Glu Asp
 340 345 350

Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys Val Met Met Asn Leu Ser His Glu Lys
 355 360 365

Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile
 370 375 380

Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu
 385 390 395 400

Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys Asp
 405 410 415

Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr Leu Glu Ser Lys Gln Phe Leu His Arg
 420 425 430

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Asn Asp Gln Gly Val Val Lys
 435 440 445

Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg Tyr Val Leu Asp Asp Glu Tyr Thr
 450 455 460

Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Pro Val Arg Trp Ser Pro Pro Glu Val
 465 470 475 480

Leu Met Tyr Ser Lys Phe Ser Ser Lys Ser Asp Ile Trp Ala Phe Gly
 485 490 495

Val Leu Met Trp Glu Ile Tyr Ser Leu Gly Lys Met Pro Tyr Glu Arg
 500 505 510

Phe Thr Asn Ser Glu Thr Ala Glu His Ile Ala Gln Gly Leu Arg Leu
 515 520 525

Tyr Arg Pro His Leu Ala Ser Glu Lys Val Tyr Thr Ile Met Tyr Ser
 530 535 540

Cys Trp His Glu Lys Ala Asp Glu Arg Pro Thr Phe Lys Ile Leu Leu
 545 550 555 560

Ser Asn Ile Leu Asp Val Met Asp Glu Glu Ser
 565 570

REIVINDICACIONES

1. Una proteína aislada de la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2, que codifica una isoforma de la proteína BTK.
- 5 2. Un polinucleótido aislado que codifica la proteína aislada de acuerdo con la reivindicación 1.
3. El polinucleótido de la reivindicación 2, que tiene la secuencia del primer exón correspondiente a la SEC ID N° 1.
- 10 4. Un procedimiento *in vitro* para reducir la resistencia a los fármacos de las células tumorales de tipo epitelial que comprende la etapa de bloquear de forma funcional y selectiva un gen de la BTK mediante:
 - a. una molécula de oligonucleótido de ARN de interferencia pequeño (siARN); o
 - b. LFM-A13, en el que el gen de BTK codifica una isoforma de la proteína que tiene un peso molecular entre 65 y 68 kDa de la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2
- 15 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dichas células tumorales son células madre.
- 20 6. El compuesto capaz de bloquear funcionalmente el gen de la BTK para uso en la disminución de la resistencia a fármacos quimioterapéuticos en el tratamiento terapéutico de las enfermedades tumorales epiteliales, en el que dicho compuesto es una molécula de oligonucleótidos de ARN de interferencia pequeño (siARN) o LEM-A13.
- 25 7. El kit farmacéutico que comprende una molécula de oligonucleótido de ARN de interferencia pequeño (siARN) o LFM-A13 capaz de bloquear de forma funcional y selectiva un gen de BTK, y un fármaco quimioterapéutico elegido del grupo que consiste en 5-fluorouracilo, oxaliplatino u oxaliplatino en mezcla con 5-fluorouracilo, en el que dicho kit es para uso en el tratamiento de enfermedades tumorales epiteliales.
8. El kit farmacéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las enfermedades tumorales epiteliales se eligen del grupo consistente en tumores de colon, de mama, de pulmón y de ovarios.

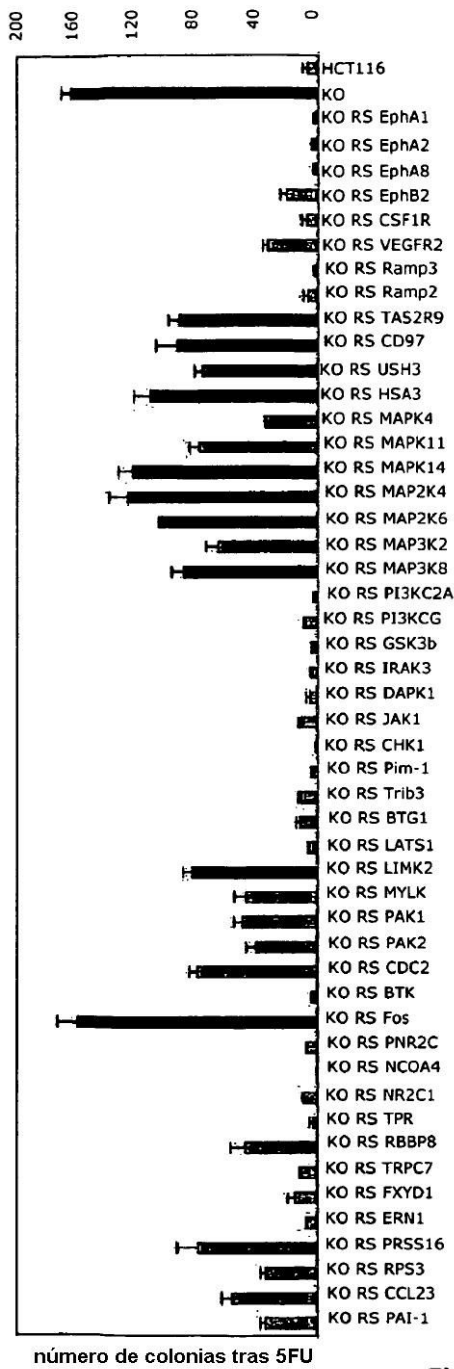


Fig. 1

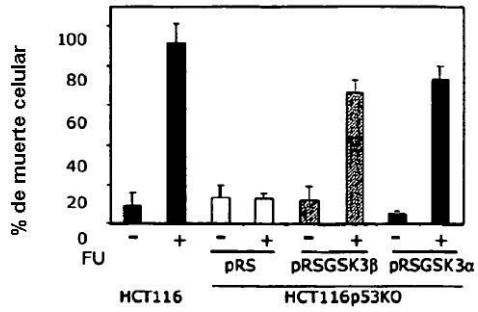


Fig. 2a

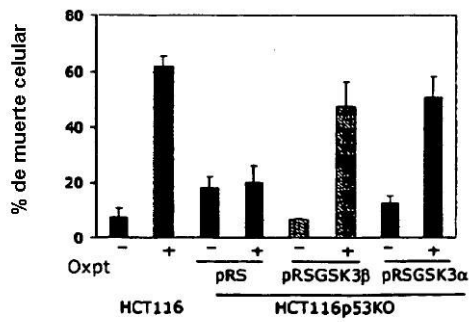


Fig. 2b

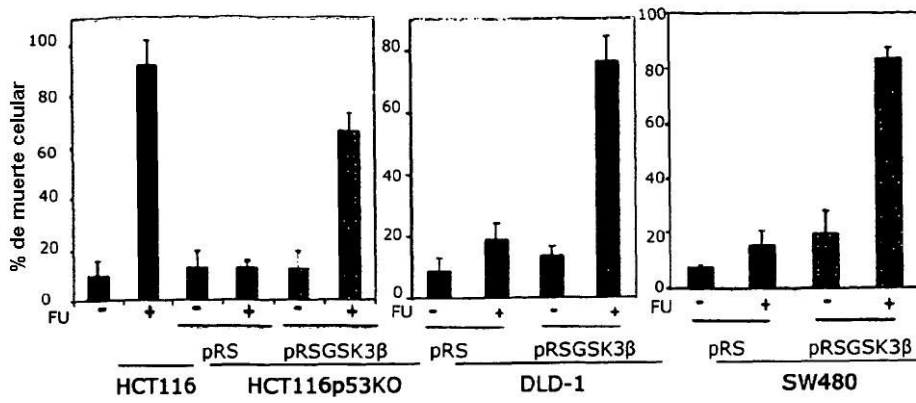


Fig. 3a

Fig. 3b

Fig. 3c

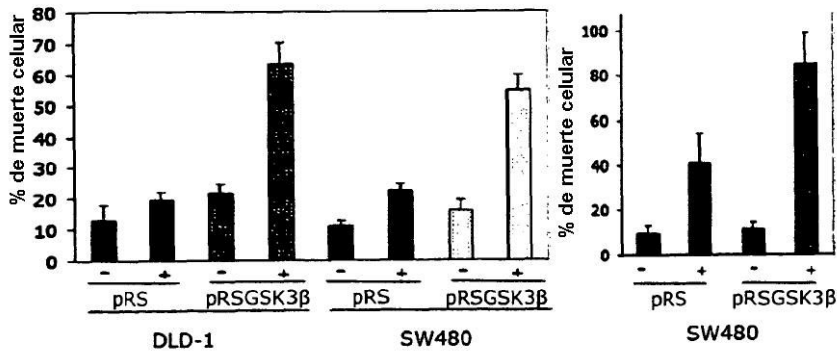


Fig. 4a

Fig. 4b

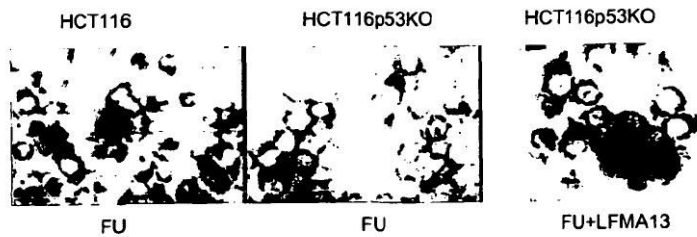


Fig. 13

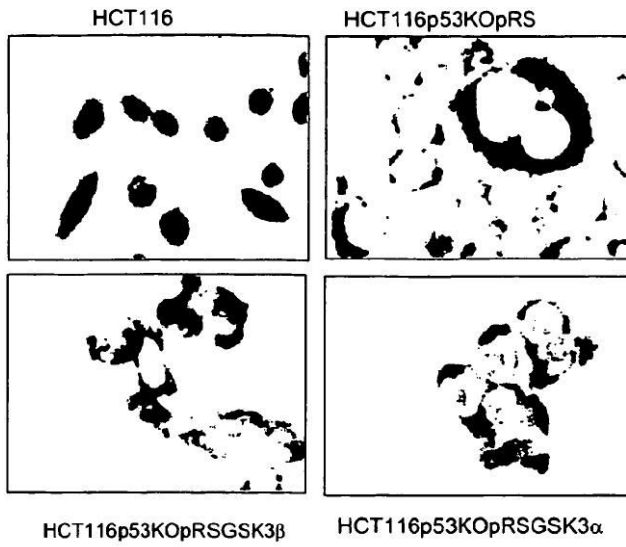


Fig. 5

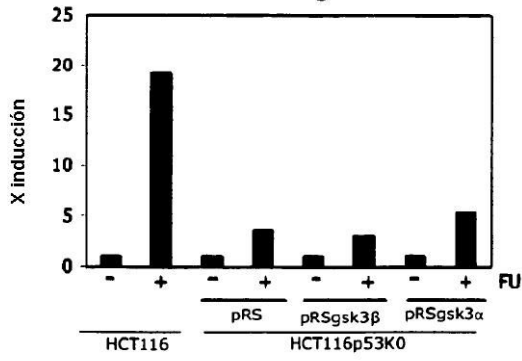


Fig. 6

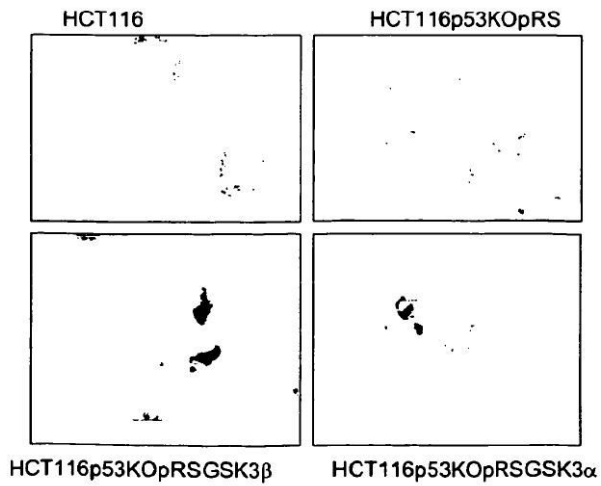


Fig. 7

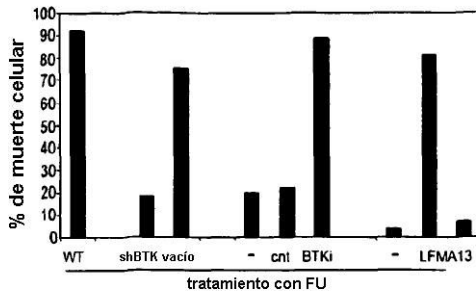


Fig. 8

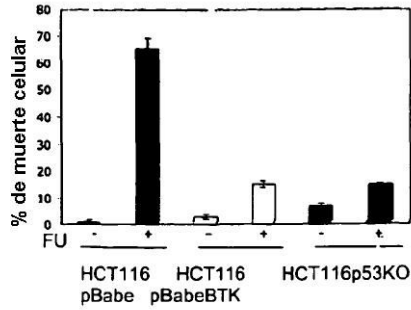


Fig. 9

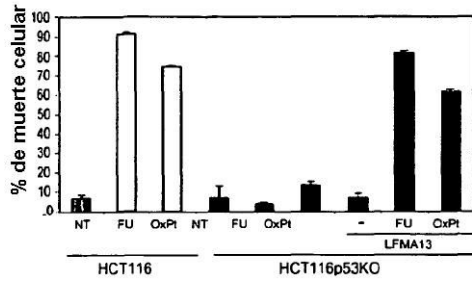


Fig. 10a

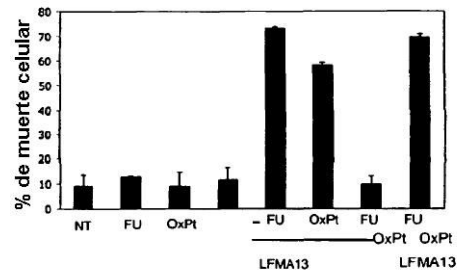
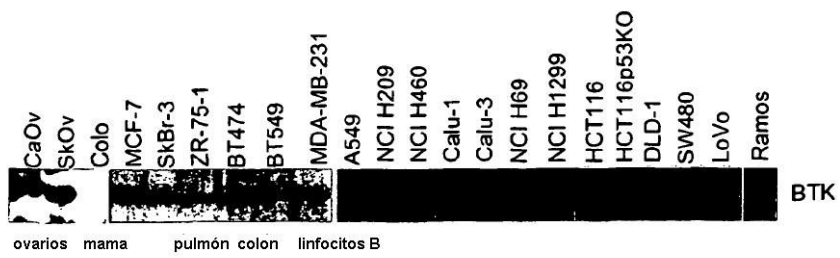


Fig. 10b

Fig. 11



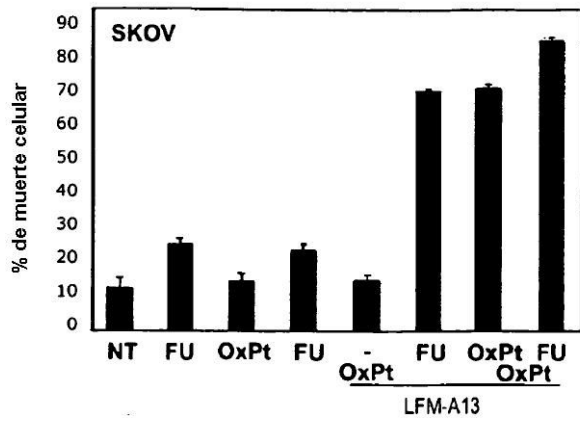


Fig. 12a

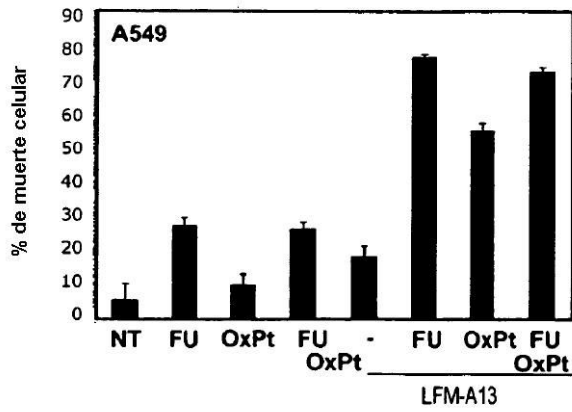


Fig. 12b

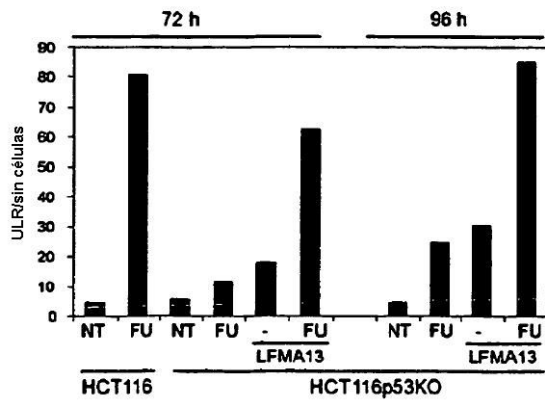
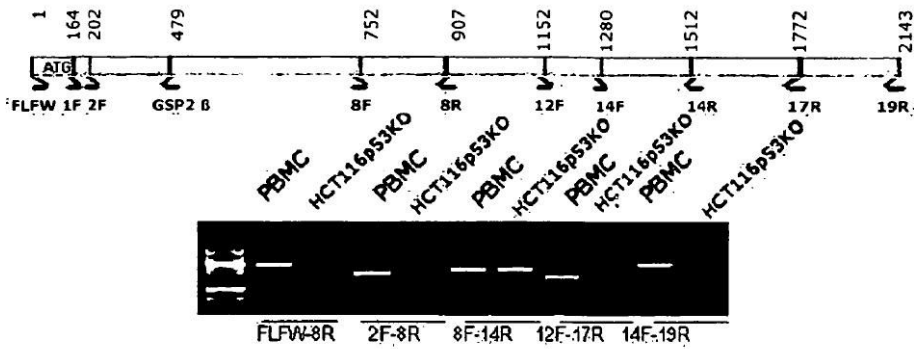
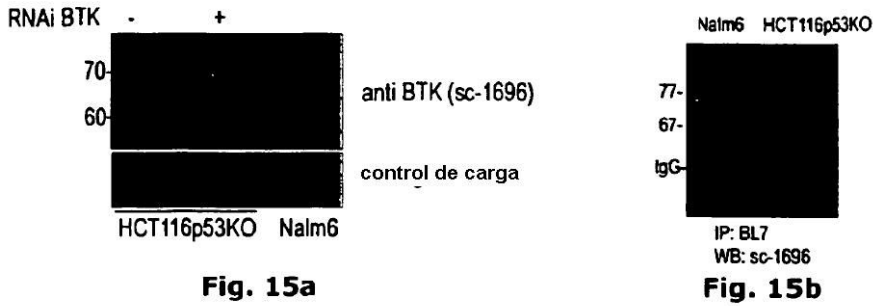


Fig. 14



CLUSTAL 2.0.3 alineación de secuencia múltiple

```

NM_000061
alternativa
-----
TTTTGGTGGACTCTGCTACGTAGTGGCGTTCAGTGAAGGGAGCAGTGTTCCTCCAGATC 60

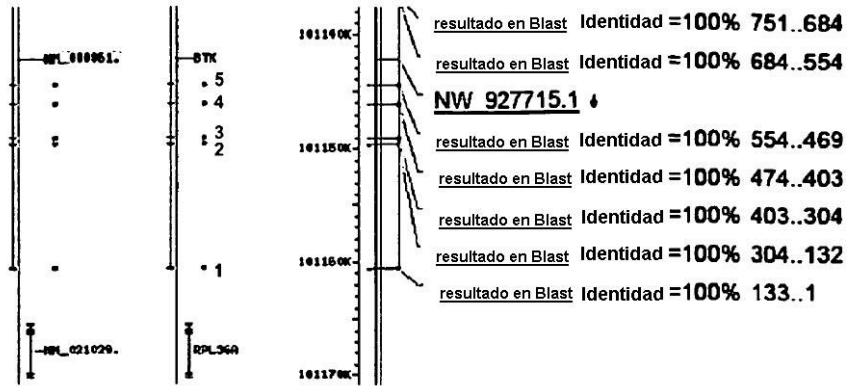
NM_000061
alternativa
-----
CTCTGGCCFCCCCGTCCCCGAGGGAAGCCAGGACTAGGGTCGAATGAAGGGGTCTCCAC 120

NM_000061
alternativa
-----CTCAGACTG 9
CTCCACGTTCCATTCCTGTTCCACCTCAAGGTCACATGGGAACACCTTTCGCAGCAAACATG 180
** **

NM_000061
alternativa
TCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATATGTCTCCAGGGCCAGT--GTCTGCTGCG-ATCGA 66
--CTAATCAATGAAGACCTGGAGGGAGCCAATGTTCAGTTCATCTATCAGATGGCCA 238
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
NM_000061
alternativa
GTCCCACCTTCCAAGTCCTGGCATCTCAATGCATCTGGGAAGCTACCTGCATTAAGTCAG 126
GTTGGTCCATTCACAAAATGGTATGGATGC--CCATTATGTGGCAGGCACCTGTTCGG 296
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
NM_000061
alternativa
GACTGAGCACACAGGTGAACCTCCAGAAAGAAGAAGCTATGGCCGCAAGTATTCTGGAGAG 186
GGGAGAGCACACAGGTGAACCTCCAGAAAGAAGAAGCTATGGCCGCAAGTATTCTGGAGAG 356
*
    
```

Fig. 17

Exones Blast 1-5 NM 000061 frente a genómicos



Exones Blast 1-5 alternativas del transcrito de BTK frente a genómicos

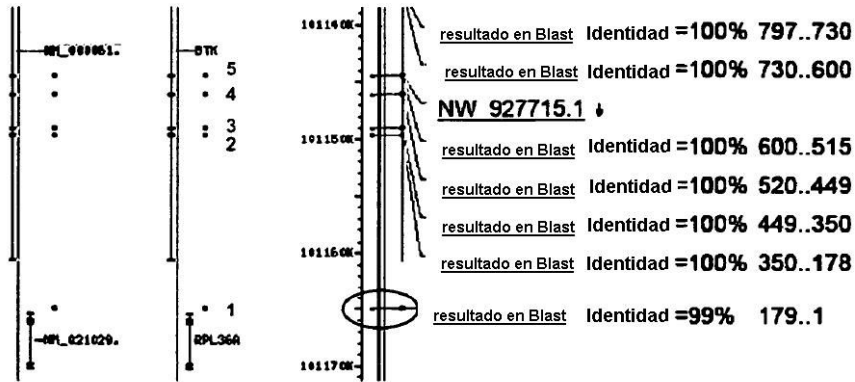


Fig.18

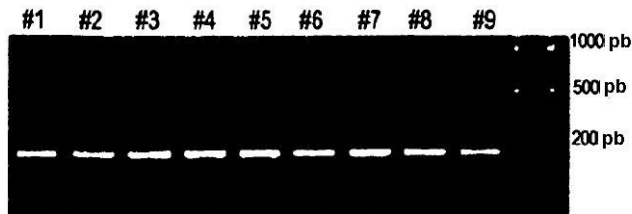


Fig. 19