

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 116**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00	(2006.01)	G01N 33/15	(2006.01)
A61K 31/7105	(2006.01)	G01N 33/48	(2006.01)
A61K 31/713	(2006.01)	G01N 33/50	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 35/04	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		
C12N 15/113	(2010.01)		
C12Q 1/04	(2006.01)		
C12Q 1/68	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2011** **E 11817992 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2606909**

54 Título: **Procedimiento y composición para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de cáncer que contiene células madre de cáncer o derivados de las mismas**

30 Prioridad:
20.08.2010 JP 2010184764

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2016

73 Titular/es:
3-D MATRIX, LTD. (50.0%)
3-2-4, Kojimachi
Chiyoda-kuTokyo 102-0083, JP y
NATIONAL CANCER CENTER (50.0%)

72 Inventor/es:
OCHIYA, TAKAHIRO

74 Agente/Representante:
FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 586 116 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

Método y composición para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de cáncer que contiene células madre de cáncer o derivados de las mismas

5

Campo de la técnica

La invención se refiere a un método y composición para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de cáncer que contiene células madre de cáncer o derivados de las mismas apuntando al gen RPN2.

10

Técnica anterior

Las pruebas acumuladas sugieren que los tumores no son uniformes, pero a menudo están compuestos por tipos de células heterogéneas, cuyos subconjuntos son responsables de la supresión, de la resistencia a los fármacos, y de la metástasis tumoral. Tales células se denominan células madre de cáncer (o células iniciadoras del tumor). Cuando las células madre de cáncer son el objetivo, cabe esperar que se pueda tratar y prevenir el desarrollo, la metástasis y la recurrencia del cáncer. Sin embargo, los marcadores que definen las células madre de cáncer son desconocidos debido a que la base molecular del fenotipo de células madre de cáncer sigue estando en gran medida poco claro. Además, no se ha establecido método alguno para el tratamiento o la prevención utilizando como objetivo las células madre del cáncer.

15

20

Los inventores demostraron previamente que la riboforina II (RPN2), un componente del complejo de la oligosacárido transferasa (OST), controlaba la resistencia a los fármacos de las células de cáncer de mama y que el silenciamiento de RPN2 era una estrategia prometedora para la superación de la resistencia del tumor a los fármacos (documento WO2007/144985). Sin embargo, los mecanismos, tales como la inhibición de la proliferación de células cancerosas mediante la supresión de la expresión de RPN2, siguen sin estar claros.

25

Bibliografía de la técnica anterior

Bibliografía de patentes

30

En cada uno de estos documentos, Ochiya, T. (2010) *Saishin igaku* 65(6):1343–52, Takahashi et al (2009) Annual meeting of the Japan cancer association *Kiji* 68:69 y Ochiya, T. (2010) *Seikagaku* 82(1):34-8, se describe la expresión de RPN2 en células madre de cáncer de mama y se propone el uso de ARNip para reprimir su expresión en el tratamiento o prevención del cáncer. No se hace relación con p53.

35

Divulgación de la invención**Problemas que ha de resolver la invención**

40

El objetivo de la invención es proporcionar un método y composición para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de cáncer que contiene células madre de cáncer.

Medios para resolver los problemas

45

En la presente solicitud, los inventores demuestran que RPN2 se expresaba a altos niveles en la fracción de células madre de cáncer de las células de cáncer de mama y que la inactivación de RPN2 inhibía la capacidad de la colonización e invasión de las células madre de cáncer *in vitro*. Un análisis adicional demostró que la inactivación de RPN2 reducía la formación de tumores y suprimía la capacidad de metástasis *in vivo*. Un análisis de proteómica global demostró que la inactivación de RPN2 alteraba la expresión de 14-3-3ζ, que se sabe que regula la ruta de TGF-β/Smad. Por lo tanto, los inventores proporcionan pruebas genéticas y biológicas de que RPN2 puede ser importante en el mantenimiento del fenotipo de las células madre de cáncer y que RPN2 puede ser un objetivo prometedor para la terapia de células madre de cáncer.

50

55

La presente invención se refiere a

[1] una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de RPN2 para el tratamiento o prevención del cáncer que contiene células madre de cáncer o deriva de ellas, en la que las células madre de cáncer portan un gen p53 mutado;

60

[2] una composición farmacéutica de acuerdo con [1], en la que el inhibidor de RPN2 es un ARNip contra el gen de RPN2;

[3] un método para la detección de células madre de cáncer, que comprende determinar la presencia o el nivel de expresión de RPN2 y que comprende además la detección de un gen p53 mutado.

Efectos de la invención

La invención proporciona un método y composición para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de cáncer que contiene células madre de cáncer o derivados de las mismas apuntando al gen RPN2.

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La figura 1 (A) proporciona una división desigual de las células madre de cáncer CD44⁺CD24⁻.

La figura 1 (B) proporciona el análisis de la expresión de RPN2 mediante RT-PCR.

[Fig.2] La Figura 2 proporciona efectos de la inactivación de RPN2 sobre el número de células madre de cáncer CD44⁺CD24⁻.

[Fig.3] La figura 3 (A) proporciona efectos de la inactivación de RPN2 sobre la actividad de formación de colonias.

La figura 3 (B) proporciona efectos de la inactivación de RPN2 sobre el número de colonias formadas.

[Figura 4] La figura 4 proporciona efectos de la inactivación de RPN2 sobre la tumorigenicidad.

[Figura 5] La figura 5 proporciona efectos de la inactivación de RPN2 sobre la metástasis tumoral.

[Figura 6] La figura 6 proporciona efectos de la inactivación de RPN2 sobre la letalidad.

[Fig.7] La figura 7 (A) proporciona efectos de la inactivación de RPN2 sobre la expresión de p53 mutado.

La figura 7 (B) proporciona efectos de la inactivación de RPN2 sobre la expresión de E-cadherina.

[Figura 8] La figura 8 proporciona efectos de la inactivación de RPN2 sobre la expresión de 14-3-3ζ.

[Figura 9] La figura 9 proporciona la tinción inmunohistoquímica de tumores formados mediante trasplante de células MM231-LN en un animal.

[Figura 10] La figura 10 proporciona RPN2 y expresiones de p53 mutado en tejido de cáncer de mama de un paciente humano con cáncer de mama.

[Figura 11] La figura 11 proporciona la apoptosis tumoral analizada mediante el ensayo TUNEL. Se ha demostrado que la apoptosis tumoral del cáncer de mama estar fuertemente inducida por la administración intratumoral de Rpn2-sirna/A6K al tercer día desde la administración.

[Fig. 12] La figura 12 proporciona un análisis de la inactivación de RPN2 en el cáncer de mama canino. El ARNip de RPN1/A6K mostró una inhibición de aproximadamente el 50 % del ARNm de RPN2 en comparación con el control (solución salina) (n = 3, p <0,001).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un inhibidor de RPN2 para el tratamiento o prevención del cáncer que contiene células madre de cáncer o deriva de las mismas. Además, la invención proporciona un método para el tratamiento o prevención del cáncer que contiene células madre de cáncer o deriva de las mismas, que comprende administrar la composición farmacéutica de la invención a un sujeto.

La expresión "células madre de cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a células cancerosas que tienen pluripotencia y capacidad de autorenovación (también denominado en el presente documento capacidad de autorenovación y diferenciación). Las células de cáncer incluyen cualquier célula de cáncer, tales como células de cáncer de mama, de estómago, colorrectal, de pulmón, de próstata y de cáncer hematopoyético. Además de la capacidad de autorenovación y diferenciación, las células madre de cáncer pueden ser resistentes a agentes contra el cáncer (resistencia a fármacos) y tienen una capacidad para invadir los tejidos circundantes y/o producir metástasis en sitios distantes en el cuerpo (capacidad de invasión y metástasis). Se considera que el desarrollo, la metástasis y la recurrencia del cáncer podrían tratarse y prevenirse usando las células madre de cáncer como objetivo. La invención es útil para dicho tratamiento y prevención del cáncer usando las células madre de cáncer como objetivo.

En una realización, las células madre de cáncer tienen un mayor nivel de expresión de riboforina II (RPN2). "RPN2" es uno de los componentes (subunidad) del complejo oligosacárido transferasa (OST), que existe en el retículo endoplásmico rugoso y funciona añadiendo una cadena de azúcar unida a N a una cadena polipeptídica naciente. La RPN2 humana es una proteína de membrana básica que consiste en 631 aminoácidos. Las fuentes de la RPN2 incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, animales, preferentemente mamíferos, más preferentemente primates, e incluso más preferentemente seres humanos. "Gen RPN2" es un gen que codifica RPN2. La secuencia de bases del gen RPN2 humano se muestra en SEQ ID NO: 1.

Los inventores encontraron que la inactivación de la expresión RPN2 con un ARN de horquilla corta (ARNhc) en la fracción de células madre de cáncer CD44⁺/CD24⁻ del cáncer de mama inhibía la capacidad de formación de colonias y la invasión de las células madre de cáncer *in vitro* y anulaba la tumorigenicidad y la invasión y la capacidad de metástasis en un animal inmunodeficiente (es decir, *in vivo*). Como se ha descrito anteriormente, las células madre de cáncer pueden tener capacidad de autorenovación y diferenciación, resistencia a fármacos y capacidad de metástasis e invasión. Por lo tanto, la RPN2 implicada en todos estos servirá como marcador de las células madre de cáncer. Además, el uso como objetivo de RPN2 puede permitir el tratamiento y la prevención de los cánceres que contengan células madre de cáncer o deriven de las mismas.

En otra realización, las células madre de cáncer portan un gen p53 mutado. "P53" es un producto del gen supresor tumoral. Se han encontrado mutaciones en el gen p53 en muchos cánceres humanos (Adorno, M. et al., Cell, 137: 87–98 (2009); Wang, S.P. et al., Nat. Cell Biol., 11: 694–704 (2009); Muller, P.A. et al., Cell, 139: 1327–1341 (2009); Morton, J.P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107:246–251 (2010)). Las mutaciones en el gen p53 incluyen, preferentemente, pero no se limitan a, mutaciones puntuales sustituidas (mutaciones de sentido erróneo), que no producen mutaciones de desplazamiento de marco, o mutaciones de delección (mutaciones de delección de codón).

Los inventores encontraron que la inactivación de la expresión de RPN2 en líneas celulares con p53 mutado reducía el nivel de la proteína p53 mutada y suprimía la expresión de E-cadherina. Además, los inventores encontraron que la expresión de 14-3-3 ζ se reducía en las células de cáncer con expresión alta de RPN2 y se incrementaba por la inactivación de RPN2. Se sabe que 14-3-3 ζ actúa degradando el p53 mutado a través de mdm2.

Las células cancerosas exhiben un fenómeno que se conoce como transición epitelio-mesenquimal (TEM). La expresión de E-cadherina implicada en la adhesión celular se reduce tras la TEM, lo que da lugar a la invasión o la metástasis de las células cancerosas. Los resultados anteriores sugieren que RPN2 reduce la expresión de 14-3-3 ζ para estabilizar el p53 mutado y causa TEM en las células cancerosas, lo que da lugar a la invasión o la metástasis de las células cancerosas.

El P53 mutado está implicado en las capacidades de autorenovación y diferenciación y de invasión y metástasis de las células cancerosas. Se han realizado muchos estudios sobre p53. Sin embargo, no se ha publicado ningún informe sobre el éxito del tratamiento o la prevención del cáncer usando p53 como objetivo. RPN2 está implicada en las capacidades de autorenovación y diferenciación e invasión y metástasis, además de la resistencia a los fármacos. Por lo tanto, la inhibición de RPN2 no solo elimina la resistencia a los fármacos de las células cancerosas, sino que también inhibe las capacidades de autorenovación y diferenciación e invasión y metástasis de las células cancerosas a través de la inhibición de los efectos de p53 mutado aguas arriba. La detección de la presencia de p53 mutado, así como la expresión de RPN2, permite una identificación más precisa de las células cancerosas que tienen p53 mutado, para el que la inhibición de RPN2 es eficaz. Además, la inhibición de RPN2 permite un tratamiento y prevención más eficaz de los cánceres asociados con p53 mutado que cuando se usa el p53 como objetivo.

El término "inhibidor de RPN2", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que inhibe la expresión génica de RPN2 o los efectos del producto del gen de RPN2. RPN2 se expresa poco en los tejidos normales, con excepción de la placenta. Por lo tanto, los inhibidores de la RPN2 no tienen efectos sustanciales sobre las células distintas de las células de cáncer en los sujetos, con excepción de las mujeres embarazadas, y son útiles como agentes terapéuticos específicos para el cáncer sin efectos adversos. Los sujetos incluyen, preferentemente, pero no se limitan a, por ejemplo, animales, mamíferos, más preferentemente primates, e incluso más preferentemente seres humanos.

Por ejemplo, las sustancias que inhiben la transcripción génica de RPN2, las que se unen a transcritos de RPN2 o los degradan y las que se unen a la proteína RPN2 se pueden utilizar como inhibidores de RPN2. Ejemplos de sustancias que se unen a la proteína RPN2 incluyen un anticuerpo anti-RPN2 o fragmentos del mismo (Fab, F(ab')₂, etc.) y otros componentes que se unen a RPN2 en el complejo de oligosacárido transferasa (OST). Entre los ejemplos de sustancias que se unen a transcritos de RPN2 o los degradan se incluyen ARN antisentido, ribozimas, ARN de interferencia pequeño (ARNip), y microARN (miARN) contra el gen RPN2.

Como inhibidores de RPN2 se prefieren, preferentemente, ARNip, miran, y similares, que causan interferencia por ARN (ARNi). La interferencia por ARN se refiere a un fenómeno en el que la expresión del gen es suprimida por una molécula de ARN bicatenario (bc) de una manera específica de secuencia. Por ejemplo, los resultados de la interferencia por ARN de la escisión del ARNm diana por ARNip, el silenciamiento génico a través de la formación de heterocromatina en una región de ADN diana por ARNip y la represión de la transcripción y la traducción y la degradación del ARNm por miARN. Preferentemente, el ARNip se usa en la presente invención porque su secuencia se puede diseñar basándose en la secuencia del gen de RPN2 diana y se puede sintetizar artificialmente.

Dicho ARNip se puede obtener mediante cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, el ARNip se puede sintetizar químicamente mediante el método de fosfoamidita, que también se usa para la síntesis química del ADN, mediante la reacción de condensación secuencia de una sola base cada vez en dirección 5' a 3'. Preferentemente, los grupos hidroxilo de los extremos 2' de ribonucleótidos individuales están protegidos para evitar la degradación por la ARNasa durante la síntesis. Dichos grupos protectores incluyen los grupos 2'-O-t-butildimetilsililo (2'-TBDMS), 2'-O-(triisopropilsililo)metilo (2'-TOM), y 5'-silyl-2'-acetoxietoxi (2'-ACE).

El ARNip contra el gen RPN2 tiene una secuencia correspondiente a una secuencia predeterminada del gen RPN2, es decir, una secuencia que corresponde a una parte de una secuencia de ARNm diana. Por ejemplo, el ARN bc (secuencia A) que consiste en los ARN de SEQ ID NOS: 2 (cadena sentido) y 3 (cadena antisentido), que corresponde a la posición de 1.194–1.212 de la secuencia del gen RPN2 (SEQ ID NO: 1), se puede usar como ARNip. Este ARN bicatenario tiene salientes de 2 bases en los extremos 3' de cada cadena. Por lo tanto, la región bicatenaria tiene una longitud de 19 bases. Las SEQ ID N°: 4-25 muestran las secuencias de las cadenas sentido y

antisentido de los ARNip (secuencias B-L) contra el gen RPN2, divulgadas en el documento WO 2007144985. Estos pares (ARN bc) se pueden utilizar como inhibidores de RPN2 en la presente invención.

5 El ARNip es una molécula de ARN pequeña que no codifica ninguna proteína. En el genoma existen varios cientos de tipos de miARN. El miARN se transcribe en nucleótidos de varios cientos a varios miles de bases y, finalmente, sufre un procesamiento en dímeros de nucleótidos de 19-24 bases para suprimir la expresión génica a través de la represión de la traducción, degradación y regulación de la transcripción del ARNm que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la del miARN. La expresión de RPN2 también está regulada por varios miARN. Dichos miARN se pueden sintetizar artificialmente para su uso en la presente invención como inhibidores de RPN2 con el fin de suprimir la expresión génica de RPN2. Las secuencias del miARN conocidas que pueden inhibir la expresión del gen de RPN2 pueden recuperarse de bases de datos públicas (por ejemplo, TargetScan Release 3.1).

15 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante administración sistémica o local. La vía de administración puede ser cualquier vía, tal como las vías intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular e intranasal. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además cualquier ingrediente utilizado en el campo de la formulación farmacéutica, tales como excipientes, diluyentes y estabilizantes. Por ejemplo, si un inhibidor de RPN2 es una proteína como un anticuerpo, la composición farmacéutica puede contener además ingredientes utilizados habitualmente en el campo de la formulación de proteínas. Por ejemplo, si un inhibidor de RPN2 es un ácido nucleico como ARNip, puede estar contenido cualquier sustancia (por ejemplo, liposoma) para la introducción de un ácido nucleico. El agente de transfección que contiene un tensioactivo peptídico, descrito en el documento WO 2010/024262, se puede utilizar adecuadamente para la presente invención, ya que muestra una toxicidad baja, alta eficiencia para que un gen diana alcance una zona afectada, y una eficiencia alta de la supresión del gen diana y, por lo tanto, se puede administrar por vía sistémica.

25 La cantidad de un inhibidor de RPN2, contenido en la composición farmacéutica de la presente invención, varía de acuerdo con los métodos de administración, los tipos y tamaños de los tumores, las afecciones del paciente, y los fármacos concomitantes, y los expertos en la materia pueden determinarla adecuadamente. Por ejemplo, cuando se usa un ARNip como inhibidor de RPN2, la cantidad es, deseablemente, de 1 - 10 nmol/kg para la administración local y de 2-50 nmol/kg para la administración sistémica.

30 La presente invención proporciona un método de detección de células madre de cáncer, que comprende determinar la presencia o nivel de expresión de RPN2.

35 La RPN2 existe en el citoplasma. Por lo tanto, para detectar RPN2, se prepara un extracto que contiene ARN y proteínas a partir de células o tejidos obtenidos de un sujeto. En el extracto se detectan productos de la transcripción (ARNm de RPN2) y de la traducción (proteína RPN2) de los transcritos. Para la detección de la proteína RPN2, se puede usar cualquier método conocido en la materia, tales como transferencia Northern y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Para la detección de la proteína RPN2, se puede usar cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, métodos inmunológicos utilizando un anticuerpo anti-RPN2 (transferencia Western y ELISA). La RPN2 se expresa poco en los tejidos normales, con excepción de la placenta. Por lo tanto, la presencia de la expresión de RPN2 o la expresión RPN2 de alto nivel indica la participación de RPN2 en el cáncer. Para el tratamiento y la prevención de tales tipos de cáncer, son eficaces los tratamientos con la composición farmacéutica de la presente invención, que contienen un inhibidor de RPN2.

45 En una realización, el método de detección de la presente invención comprende además la detección de un gen p53 mutado. Un gen p53 mutado se puede detectar mediante cualquiera de los métodos de detección y análisis de ácido nucleico conocidos en la materia, que utilizan hibridación, electroforesis, amplificación de ácido nucleico y secuenciación. Como se ha descrito anteriormente, cuando existe un p53 mutado en células de cáncer que expresan RPN2, los cánceres asociados con el p53 mutado pueden tratarse y prevenirse con eficacia mediante la inhibición de RPN2. Por lo tanto, el método de detección de la presente invención es útil como método de diagnóstico para la determinación de los métodos de tratamiento y prevención eficaces.

55 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle utilizando ejemplos. No obstante, la invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

60 La línea celular de cáncer de mama humano MCF7 ADR se dividió en dos fracciones de células CD44⁺CD24⁻ y CD44⁺CD24⁺, y se cultivaron durante siete días. Solo la fracción CD44⁺CD24⁻ tenía una división desigual, una propiedad de las células madre de cáncer (Figura 1A).

65 La expresión de riboforina II (RPN2) se analizó mediante RT-PCR. Como resultado, la expresión de RPN2 en CD44⁺CD24⁻ (células madre de cáncer) se multiplicó por aproximadamente 20 en comparación con CD44⁺CD24⁺ (células madre no cancerosas) (Figura 1B).

Ejemplo 2

Se generaron células de cáncer de mama humanas con expresión de RPN2 inactivada de forma constitutiva utilizando el vector shRPN2. Se utilizaron tres líneas celulares de cáncer de mama humano, MCF7, MCF7-ADR, y MDA-MB-231LN (MM231-LN). MCF7 es la línea celular parental de MCF7 ADR (línea celular resistente a los fármacos), es decir, las células de cáncer de mama no malignas positivas para el receptor hormonal y sensibles a fármacos. MM231-LN es una línea celular altamente metastásica y altamente maligna negativa para los receptores hormonales.

Las respectivas células obtenidas se incubaron en presencia de docetaxel 10 nM durante 96 horas. Posteriormente, se contaron las células madre de cáncer CD44⁺CD24⁻. Como resultado, el número de células madre de cáncer CD44⁺CD24⁻ se redujo significativamente para las células MCF7-ADR y MM231-LN en las que se introdujo el vector shRPN2, en comparación con aquellas en las que se introdujo un vector control (shNC) (Figura 2).

Ejemplo 3

Una característica de las células madre de cáncer es una capacidad de formación de colonias en cultivo plano (placa). Como se muestra en la Figura 3A (superior) (MM231-LN-SHNC), las células MM231-LN formaron muchas colonias. La capacidad de formación de colonias se suprimió significativamente cuando se introdujo el vector shRPN2 (Figura 3A, inferior, MM231-LN-shRPN2). La figura 3B muestra el número de colonias formadas.

Ejemplo 4

Otra característica de las células madre de cáncer es que incluso un pequeño número de células puede formar un tumor establecido cuando se trasplantan en un animal. En el presente estudio, se compararon dos líneas de células de cáncer de mama humano, MCF7 ADR-y-MM231 LN, con (shRPN2) o sin (shNC) inactivación de RPN2. Las células en las que se introdujo el vector shRPN2 se transplantaron en el lado derecho de la parte trasera de un ratón (ratón NOD–Scid hembra de 6 semanas de edad), mientras que aquellas en las que se introdujo el vector shNC se transplantaron en el lado izquierdo. El número de células trasplantadas fue de 1×10^4 células/sitio para MCF7 ADR y de 1×10^2 células/sitio para MM231-LN.

Como resultado, ambas líneas celulares en las que se introdujo el vector shRPN2 perdieron tumorigenicidad, como se muestra en el estudio de imagen del ratón (Figura 4, centro, (MCF7-ADR-luc) y derecho (MM231-LN-luc)). Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Línea celular	Número de células	Tumorigenicidad	
		shNC	shRPN2
MCF7–ADR–luc	1×10^4 células/sitio	4/4	1/4
MM231–LN–luc	1×10^2 células/sitio	5/5	0/5

Ejemplo 5

La célula MM231-LN es altamente maligna y altamente metastásica. Esta célula produce metástasis en los ganglios linfáticos de la axila y el pecho, lo que da lugar a una letalidad del 100 % cuando se implanta en la glándula mamaria de ratón. En este sistema, las células en las que se introdujo el vector shRPN2 se compararon con aquellas en las que se introdujo el vector shNC. Como resultado, la metástasis en los ganglios linfáticos se suprimió significativamente en el grupo del vector shRPN2 (Figura 5). Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Línea celular	Número de células	Tumorigenicidad (metástasis)	
		shNC	shRPN2
MM231–LN–luc	1×10^2 células/sitio	5/5 (3/5)	1/5 (0/5)
	1×10^3 células/sitio	5/5 (5/5)	1/5 (0/5)

Ejemplo 6

Como resultado de la observación a largo plazo de los ratones de acuerdo con el Ejemplo 5, todos los ratones a los que se transplantaron 1×10^2 o 1×10^3 células para el grupo de shNC murieron, mientras que todos los ratones a los que se transplantaron 1×10^2 o 1×10^3 células para el grupo shRPN2 sobrevivieron (Figura 6). En la Figura 6, los ejes vertical y horizontal representan la supervivencia libre de metástasis (%) y de tiempo (días), respectivamente.

Ejemplo 7

Se examinaron dos líneas celulares, MCF7-ADR y MM231-LN, con RPN2 inactivada por la introducción del vector shRPN2, respecto a la expresión de la proteína p53 mutada mediante transferencia Western. Como resultado, la expresión de p53 mutado se redujo significativamente en ambas líneas celulares (Figura 7A).

Además, se demuestra que la inactivación de RPN2 con shRPN2 indujo expresión de E-cadherina (Figura 7B). La figura 7B (izquierda) indica los resultados para shNC. La figura 7B (izquierda) indica los resultados para shRPN2. La figura 7B (derecha) indica los índices de células a E-cadherina (%).

La expresión de E-cadherina desaparece cuando las células cancerosas exhiben transición epitelio-mesenquimal (TEM). Se dice que las células de cáncer con expresión reducida de E-cadherina son más propensas a producir metástasis. La inactivación de la expresión de RPN2 en las células con expresión elevada de RPN2 usando shRPN2 aumentó la expresión de E-cadherina. Este hecho apoya el hecho de que PRN2 induce TEM.

Ejemplo 8

Para investigar el mecanismo por el que la expresión de p53 mutado está regulada por RPN2, se analizaron las proteínas cuyas expresiones se alteraron mediante la introducción del vector shRPN2 en una célula usando una técnica de proteoma. Como resultado, se demostró la participación de 14-3-3ζ (Figura 8). 14-3-3ζ actúa degradando el p53 mutado a través de mdm2. En las células con RPN2 aumentada, el p53 mutado se estabiliza y la E-cadherina disminuye, porque la expresión de 14-3-3ζ se reduce. Por lo tanto, es posible que las células puedan estar destinadas a dirigir la TEM implicada en la metástasis.

Ejemplo 9

Las células MM231-LN se trasplantaron en un animal. El tumor formado se examinó mediante tinción inmunohistoquímica usando tres colores: DAPI para tinción específica del núcleo (azul), anticuerpo anti-RPN2 (verde y anti-anticuerpo anti-p53 mutado (rojo) (Figura 9, izquierda). Los patrones de tinción de las células positivas para RPN2 y positivas para p53 mutado fueron consistentes. Además, la expresión de RPN2 se examinó mediante tinción con el método ABC (Figura 9, en medio). En las células de cáncer con una expresión de RPN2 alta, fuertemente teñidas en la Figura 9 (en medio), la expresión de E-cadherina se redujo (Figura 9, derecha).

Ejemplo 10

Las muestras de tejido de cáncer de mama obtenidas de dos pacientes humanos con cáncer de mama se analizaron mediante inmunotinción fluorescente usando tres colores: DAPI para tinción específica del núcleo (azul), anticuerpo anti-RPN2 (verde y anti-anticuerpo anti-p53 mutado (rojo). Las muestras de tejido se obtuvieron a partir de tumores primarios y todas fueron positivas para metástasis en los ganglios linfáticos. En ambas muestras, los patrones de tinción de las células positivas para RPN2 y positivas para p53 mutado fueron consistentes. Esto apoya los resultados *in vitro* en el Ejemplo 9 (Figura 10).

Ejemplo 11

La apoptosis de las células de cáncer de mama y la reducción del tamaño del tumor de cáncer de mama mediante la administración de ARNip contra el gen RPN2 en un perro con cáncer de mama espontáneo

El análisis de PCR de tejido de cáncer espontáneo (incluyendo cáncer de la glándula mamaria) de un perro demostró que RPN2 tendía a expresarse altamente también en el tejido de cáncer de mama de un perro. Se diseñó ARNip contra RPN2 canina y se mezcló con la solución acuosa del vehículo transportador de ácido nucleico (vehículo transportador que contiene un tensioactivo peptídico (A₆K: publicación de patente 2010-222338) se usó como vehículo transportador de ácido a una concentración final de 0,5 %) para preparar un complejo de ARNip-vehículo (concentración final: 1 mg/ml).

El complejo de ARNip-vehículo anterior se administró localmente en el tumor de cáncer de mama espontáneo de un perro (*Golden retriever* de un peso de aproximadamente 40 kg) dos veces cada tres días. El tumor se resecó mediante cirugía el día 3 después de la última administración. Como control se administró solución salina o vehículo (A₆K) individualmente.

Antes de la administración del complejo ARNip-vehículo, tamaño del tumor macroscópico fue de 36,3 mm de diámetro largo y 17,1 mm de diámetro corto. El día 3 después de la última administración, el tamaño era de 24,9 mm de diámetro largo y 15,6 mm de diámetro corto (reducción del 43 % del volumen tumoral macroscópico (VTM)).

La observación de secciones finas y el ensayo TUNEL del tejido tumoral resecado por cirugía demostraron células tumorales apoptóticas causadas por la administración del complejo ARNip-vehículo. No se observó ninguna estructura característica del tejido tumoral después de la administración (Figura 11, derecha). La administración de

A₆K solo no causó ninguna alteración significativa en el tejido tumoral (Figura 11, izquierda). La administración del complejo ARNip-vehículo inactivó el ARNm de RPN2 aproximadamente el 50 % (Figura 12).

Aplicabilidad industrial

5 La invención proporciona un método y composición para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de cáncer que contiene células madre de cáncer o derivados de las mismas apuntando al gen RPN2.

Listado de secuencias

- 10 <110> National Cancer Center Research Institute 3-D Matrix, Ltd.
- <120> Método y composición para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de cáncer que comprende células madre de cáncer o derivados de las mismas
- 15 <130> FP-3367
- <160> 25
- 20 <210> 1
<211> 2509
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- 25 <400> 1

ES 2 586 116 T3

ttccagcgtt gcgagacggt cggttccaag tgggcctggg cgcgggggag aggcgggtct 60
 gtcctcggga actgcaaggc cctgtgagcg ggaggactgg gatcccggcc gcggctgctg 120
 gaagcgtcga agctcagcgg gccgcggaca tgacctgtgc ttagaactca tcctggcccg 180
 cagagcctgc cgcgagtccc tggcgtcccc tgtggcgggc tcttggagcc actttcccga 240
 gcggaagtca gcccgggct cggactccgg cgggacctgc tcggaggaat ggcgcgcccg 300
 ggttcaagca ctgtottcct gttggccctg acaatcatag ccagcacctg ggctctgacg 360
 cccactcact acctcaccaa gcatgacgtg gagagactaa aagcctcgtt ggatcgcctt 420
 ttcacaaatt tggaatctgc cttctactcc atcgtgggac tcagcagcct tgggtctcag 480
 gtgccagatg caaagaaagc atgtacctac atcagatcta accttgatcc cagcaatgtg 540
 gattccctct tctacgctgc ccaggccagc caggccctct caggatgtga gatctctatt 600
 tcaaatgaga ccaaagatct gcttctggca gctgtcagtg aggactcatc tgttaccag 660
 atctaccatg cagttgcagc tctaagtggc tttggccttc cottggcatc ocaagaagca 720
 ctcagtgcc ttactgctcg tctcagcaag gaggagactg tgctggcaac agtccaggct 780
 ctgcagacag catcccacct gtcccagcag gctgacctga ggagcatcgt ggaggagatt 840
 gaggaccttg ttgctcgcct ggatgaactc gggggcgtgt atctccagtt tgaagaagga 900
 ctggaacaa cagcgttatt tgtggctgcc acctacaagc tcatggatca tgtggggact 960
 gagccatcca ttaaggagga tcaggtcac cagctgatga acgcgatctt cagcaagaag 1020
 aactttgagt ccctctccga agccttcagc gtggcctctg cagctgctgt gctctcgcac 1080
 aatcgctacc acgtgccagt tgtggttgtg cctgagggct ctgcttccga cactcatgaa 1140
 caggctatct tgcggttgca agtcaccaat gttctgtctc agcctctgac tcaggccact 1200
 gttaaactag aacatgctaa atctgttgct tccagagcca ctgtcctcca gaagacatcc 1260
 ttcacccctg taggggatgt ttttgaacta aatttcatga acgtcaaatt ttccagtgg 1320
 tattatgact tccttgtcga agttgaaggt gacaaccggt atattgcaa taccgtagag 1380

ES 2 586 116 T3

ctcagagtca agatctccac tgaagttggc atcacaaatg ttgatctttc caccgtggat 1440
aaggatcaga gcattgcacc caaaactacc cgggtgacat acccagccaa agccaagggc 1500
acattcatcg cagacagcca ccagaacttc gccttgttct tccagctggt agatgtgaac 1560
actggtgctg aactcactcc tcaccagaca tttgtccgac tccataacca gaagactggc 1620
caggaagtgg tgtttggtgc cgagccagac aacaagaacg tgtacaagtt tgaactggat 1680
acctctgaaa gaaagattga atttgactct gcctctggca cctacactct ctacttaatc 1740
attggagatg ccactttgaa gaaccaatc ctctggaatg tggctgatgt ggtcatcaag 1800
ttcctgagg aagaagctcc ctogactgtc ttgtcccaga accttttcac tccaaaacag 1860
gaaattcagc acctgttccg cgagcctgag aagaggcccc ccaccgtggt gtccaataca 1920
ttcactgccc tgatcctctc gccgttgctt ctgctcttcg ctctgtggat ccggattggt 1980
gccaatgtct ccaacttcac ttttgctcct agcacgatta tatttcacct gggacatgct 2040
gctatgctgg gactcatgta tgtctactgg actcagctca acatgttcca gaccttgaag 2100
tacctggcca tcctgggcag tgtgacgttt ctggctggca atcggatgct ggcccagcag 2160
gcagtcaaga gaacagcaca ttagttccag aagaaagatg gaaattctga aaactgaatg 2220
tcaagaaaag gagtcaagaa caattcacag tatgagaaga aaaatggaaa aaaaaaactt 2280
tatttaaaaa agaaaaaagt ccagattgta gttatacttt tgcttgtttt tcagtttccc 2340
caacacacag cagatacctg gtgagctcag atagtctctt tctctgacac tgtgtaagaa 2400
gctgtgaata ttcctaactt acccagatgt tgcttttgaa aagttgaaat gtgtaattgt 2460
tttgaataa agagggtaac aataggaaca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2509

- <210> 2
- <211> 21
- 5 <212> ARN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Cadena sentido para la secuencia A

- <400> 2
- ggccacuguu aaacuagaac a 21

- <210> 3
- 15 <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 20 <223> Cadena antisentido para la secuencia A

- <400> 3
- uucuaguuuu acaguggccu g 21

- <210> 4
- 25 <211> 21
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 30 <223> Cadena sentido para la secuencia B

- <220>

ES 2 586 116 T3

	<221> misc_feature	
	<222> (20).. (21)	
	<223> n representa desoxitimidina (dT)	
5	<400> 4	
	cguguacaag uuugaacugn n	21
	<210> 5	
10	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cadena antisentido para la secuencia B	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (20).. (21)	
20	<223> n representa desoxitimidina (dT)	
	<400> 5	
	caguucaaac uuguacacgn n	21
25	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cadena sentido para la secuencia C	
	<220>	
	<221> misc_feature	
35	<222> (20).. (21)	
	<223> n representa desoxitimidina (dT)	
	<400> 6	
40	gccauccauu aaggaggaun n	21
	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> ARN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cadena antisentido para la secuencia C	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (20).. (20)	
	<223> n representa desoxitimidina (dT)	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (21).. (21)	
60	<223> n representa desoxicitidina (dC)	
	<400> 7	
	auccuccuua auggauggcn n	21
65	<210> 8	
	<211> 21	

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cadena sentido para la secuencia D

 <220>
 <221> misc_feature

 10 <222> (20).. (21)
 <223> n representa desoxitimidina (dT)

 <400> 8
 15 gcaaugugga uucccucuun n 21

 <210> 9
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cadena antisentido para la secuencia D

 <220>
 25 <221> misc_feature

 <222> (20).. (20)
 <223> n representa desoxitimidina (dT)

 30 <220>
 <221> misc_feature

 <222> (21).. (21)
 <223> n representa desoxiguanosina (dG)
 35
 <400> 9
 aagagggau ccacauugcn n 21

 <210> 10
 40 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Cadena sentido para la secuencia E

 <220>
 <221> misc_feature

 50 <222> (20).. (21)
 <223> n representa desoxitimidina (dT)

 <400> 10
 55 ggugccagau gcaagaaan n 21

 <210> 11
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Cadena antisentido para la secuencia E

 <220>
 65 <221> misc_feature

	<222> (20).. (20)	
	<223> n representa desoxitimidina (dT)	
5	<220> <221> misc_feature	
	<222> (21).. (21)	
	<223> n representa desoxiguanosina (dG)	
10	<400> 11 uuucuuugca ucuggcacn n	21
	<210> 12	
	<211> 21	
15	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cadena sentido para la secuencia F	
	<220>	
	<221> misc_feature	
25	<222> (20).. (21)	
	<223> n representa desoxitimidina (dT)	
	<400> 12 ggaugugaga ucucuauun n	21
30	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cadena antisentido para la secuencia F	
	<220>	
40	<221> misc_feature	
	<222> (20).. (20)	
	<223> n representa desoxitimidina (dT)	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (21).. (21)	
	<223> n representa desoxiguanosina (dG)	
50	<400> 13 aaauagagau cucacauccn n	21
	<210> 14	
	<211> 21	
55	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cadena sentido para la secuencia G	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (20).. (21)	
65	<223> n representa desoxitimidina (dT)	

ES 2 586 116 T3

	<400> 14 ggugccagau gcaaagaan n	21
5	<210> 15 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cadena antisentido para la secuencia G	
	<220> <221> misc_feature	
15	<222> (20).. (20) <223> n representa desoxitimidina (dT)	
	<220> <221> misc_feature	
20	<222> (21).. (21) <223> n representa desoxiguanosina (dG)	
25	<400> 15 uuuuuugca ucuggaccn n	21
	<210> 16 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cadena sentido para la secuencia H	
35	<220> <221> misc_feature	
	<222> (20).. (21) <223> n representa desoxitimidina (dT)	
40	<400> 16 ggccacuguu aaacuagaan n	21
45	<210> 17 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cadena antisentido para la secuencia H	
	<220> <221> misc_feature	
55	<222> (20).. (20) <223> n representa desoxitimidina (dT)	
	<220> <221> misc_feature	
60	<222> (21).. (21) <223> n representa desoxiguanosina (dG)	
65	<400> 17 uucuaguuaa acaguggccn n	21

<210> 18
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cadena sentido para la secuencia I
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (20).. (21)
 <223> n representa desoxitimidina (dT)
 15 <400> 18
 gggugacaua cccagccaan n 21
 <210> 19
 <211> 21
 20 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena antisentido para la secuencia I
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20).. (21)
 30 <223> n representa desoxiguanosina (dG)
 <400> 19
 uggcugggu augucacccn n 21
 35 <210> 20
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cadena sentido para la secuencia J
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (20)..(21)
 <223> n representa desoxitimidina (dT)
 <400> 20
 50 ggguaacaau aggaacaaan n 21
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ARN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena antisentido para la secuencia J
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20).. (20)
 <223> n representa desoxitimidina (dT)
 65 <220>

	<221> misc_feature	
	<222> (21).. (21)	
	<223> n representa desoxicitidina (dC)	
5	<400> 21 uuuguuccua uuguuacccn n	21
10	<210> 22 <211> 25 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cadena sentido para la secuencia K	
	<400> 22 aagauagccu guucaugagu gucgg	25
20	<210> 23 <211> 25 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cadena antisentido para la secuencia K	
30	<400> 23 ccgacacuca ugaacaggcu aucuu	25
35	<210> 24 <211> 25 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cadena sentido para la secuencia L	
40	<400> 24 uuauaggaguc ggacaaaugu cuggu	25
45	<210> 25 <211> 25 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cadena antisentido para la secuencia L	
50	<400> 25 accagacauu uguccgacuc cauaa	25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de RPN2 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer que contiene células madre de cáncer o que deriva de las mismas, en la que las células madre de cáncer portan un gen p53 mutado,
en la que el inhibidor de RPN2 es un anticuerpo anti-RPN2 o fragmentos del mismo, ARN antisentido, ribozima, ARN de interferencia pequeño o micro ARN o un ARN de horquilla corta.
- 10 2. Un método para la detección de células madre de cáncer, que comprende determinar la presencia o el nivel de expresión de RPN2 y que comprende además la detección de un gen p53 mutado.

Figura 1

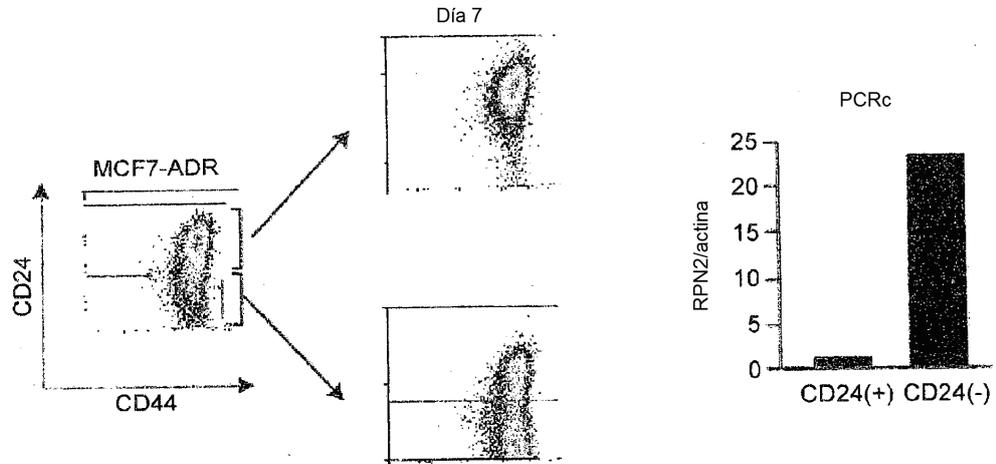


Figura 2

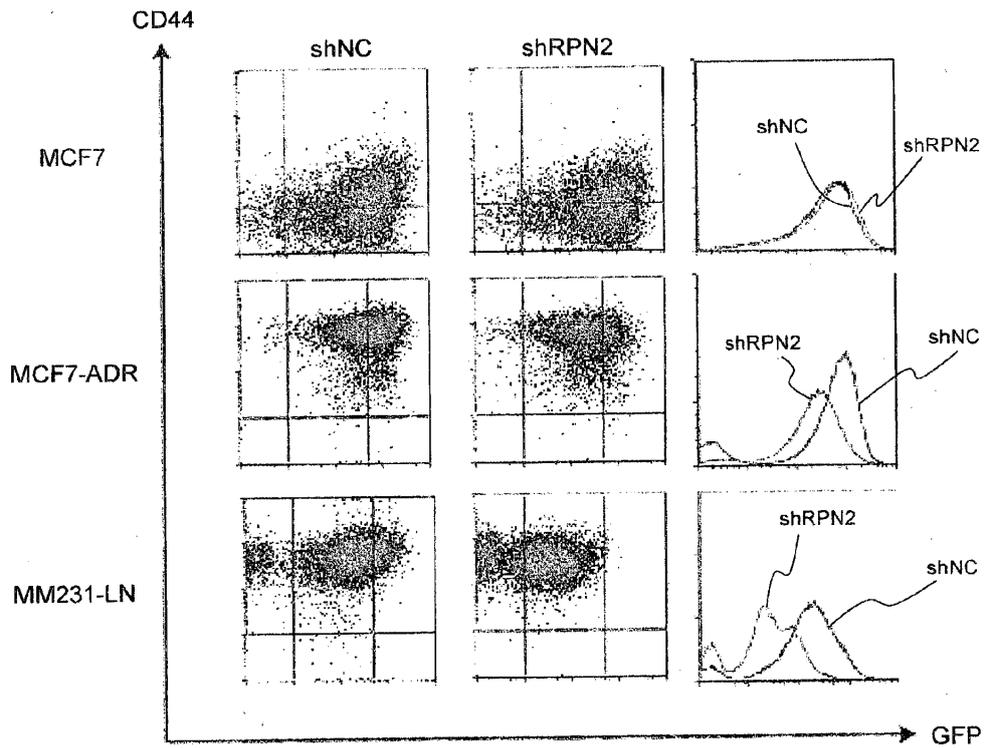


Figura 3

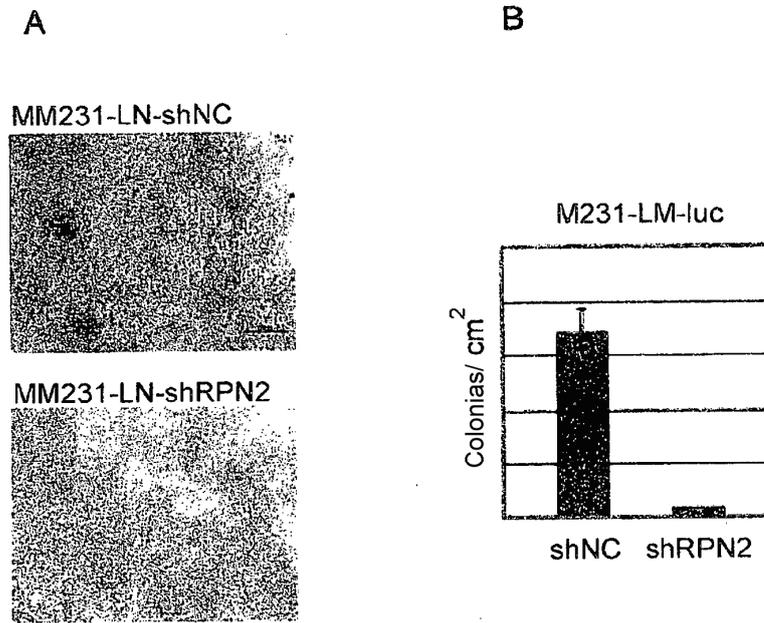


Figura 4



Figura 5

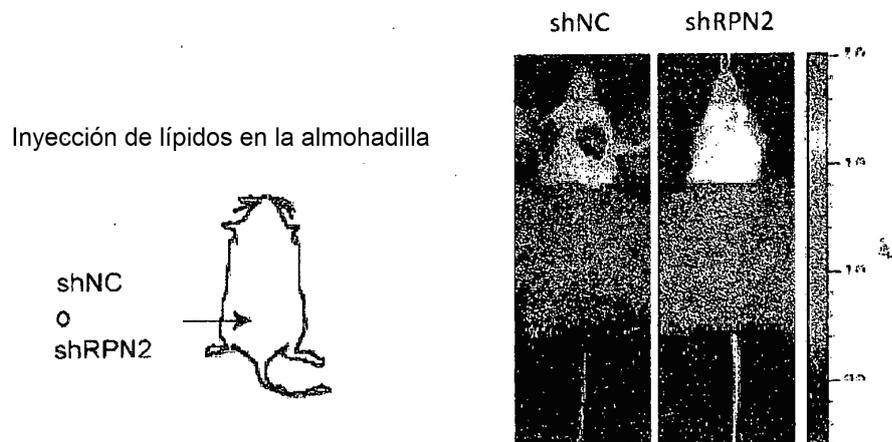


Figura 6

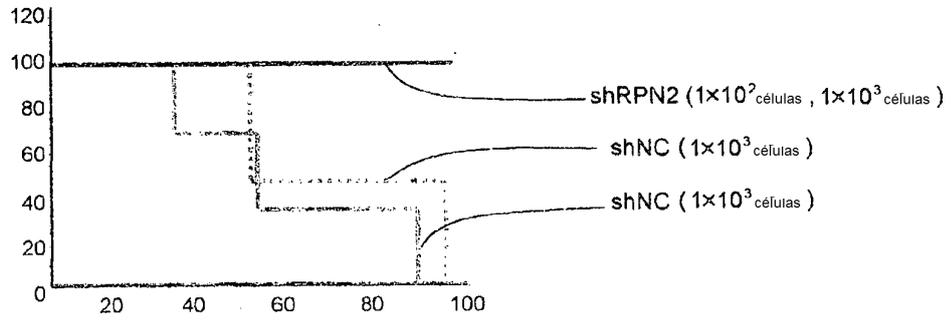


Figura 7

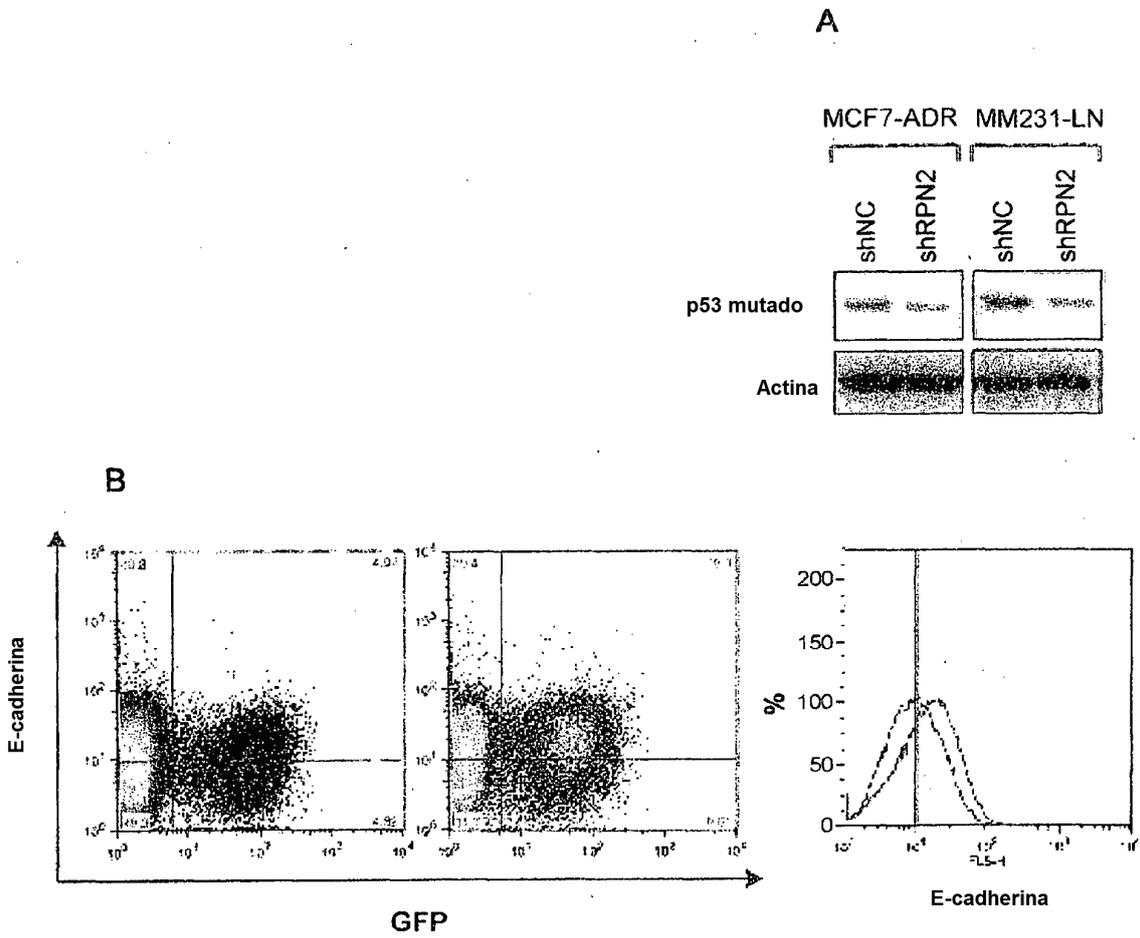
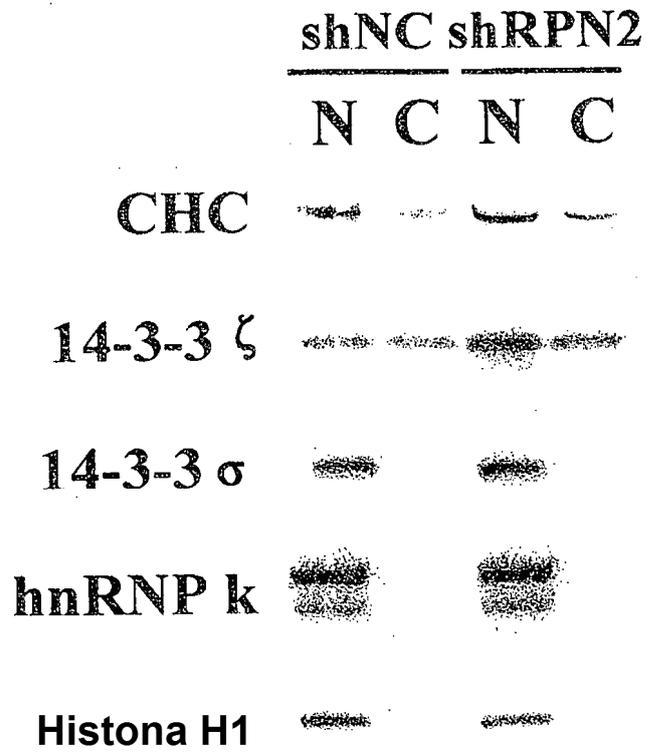


Figura 8



N: Fracción nuclear

C: Fracción del citosol

Figura 9

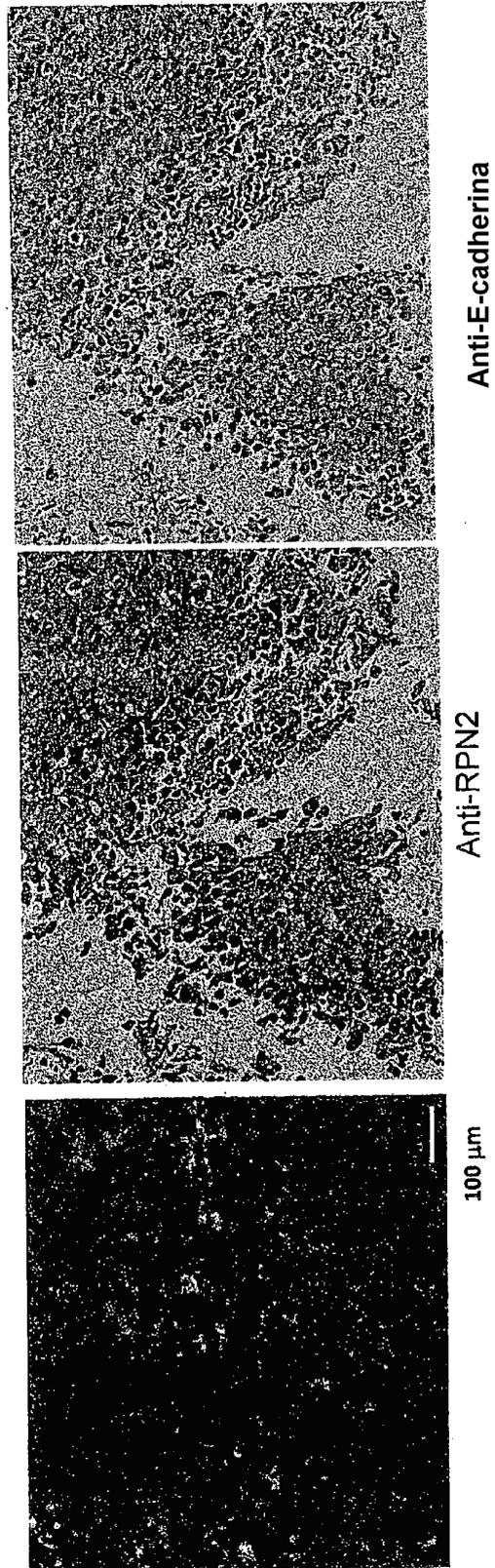
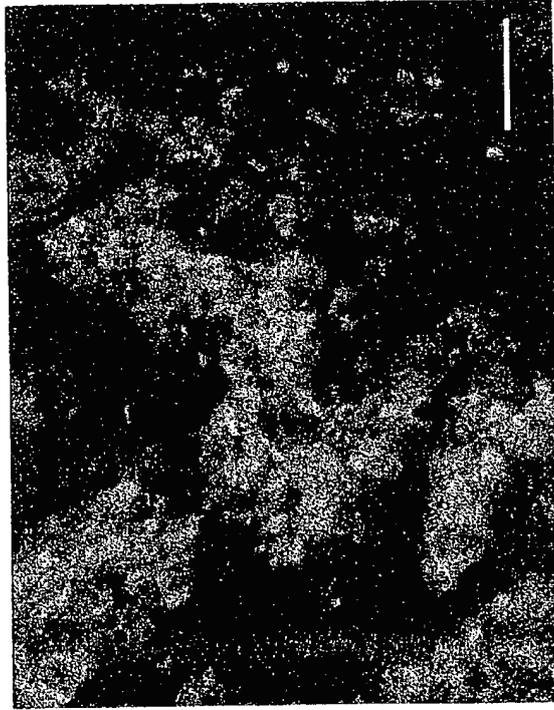
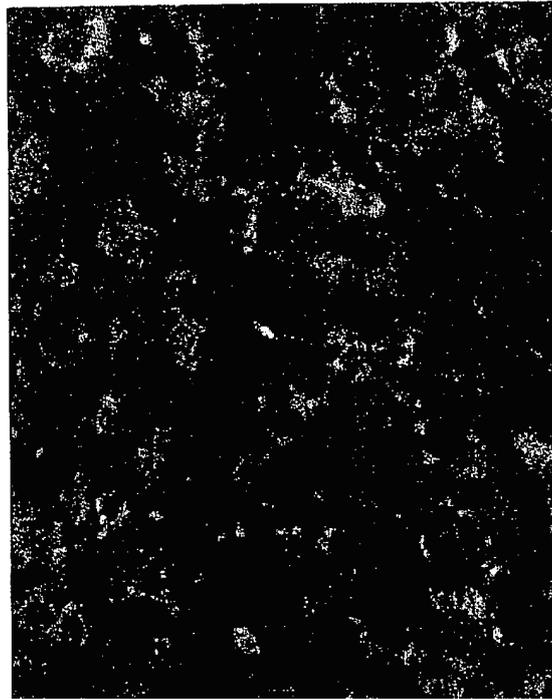


Figura 10



100 μ m

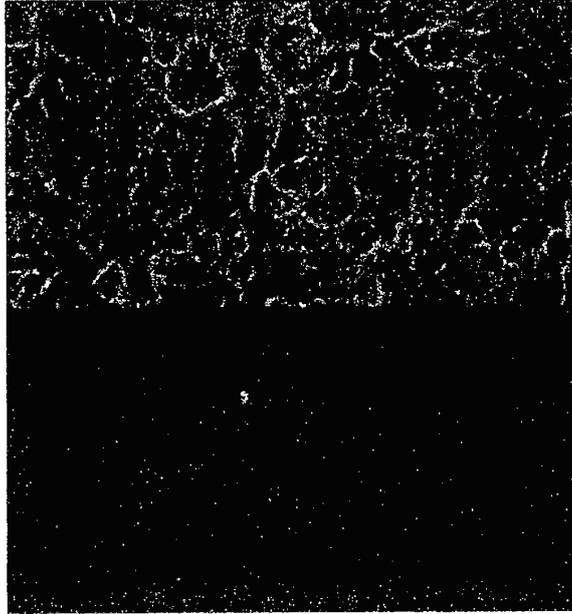
Fase T: T1b



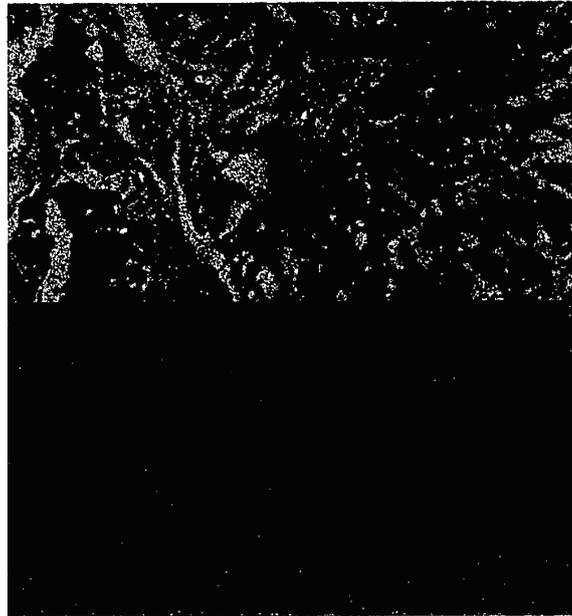
Fase T: T3

Metástasis en los ganglios linfáticos : 25/25 Metástasis en los ganglios linfáticos : 22/26

Figura 11



Complejo ARNip-vehículo



Vehículo (A_6K) solo

Figura 12

