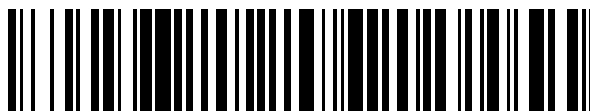


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 882**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2008 PCT/US2008/058065**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2008 WO08118877**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2008 E 08744278 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2132331**

54 Título: **Procedimiento de clasificación del cáncer de endometrio**

30 Prioridad:

**23.03.2007 US 896884 P**  
**23.10.2007 US 982093 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.02.2017**

73 Titular/es:

**THE TRANSLATIONAL GENOMICS RESEARCH  
INSTITUTE (50.0%)**  
**445 N. 5th Street, Suite 600**  
**Phoenix, Arizona 85004, US y**  
**WASHINGTON UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**POLLOCK, PAMELA y**  
**GOODFELLOW, PAUL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 600 882 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

Procedimiento de clasificación del cáncer de endometrio

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos y kits para diagnosticar, clasificar, y tratar el cáncer de endometrio.

### Antecedentes de la invención

10 El cáncer de endometrio es el trastorno maligno del tracto reproductor femenino que se diagnostica más comúnmente en los Estados Unidos. Se estima que se diagnosticarían 39.080 nuevos casos de cáncer de cuerpo uterino y que morirían 7.400 mujeres en 2007 por esta enfermedad en los Estados Unidos (Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. CA Cancer J Clin 2007 Ene-Feb; 57(1):43-66). La mayoría de mujeres que presentan un cáncer de endometrio se curan quirúrgicamente con una histerectomía; sin embargo, aproximadamente el 15 % de las mujeres presentan tumores persistentes o recurrentes que son refractarios a las quimioterapias actuales. Para estas mujeres con un estadio avanzado, progresivo o de enfermedad recurrente, la supervivencia es baja ya que no hay terapias adyuvantes que hayan probado su eficacia. La supervivencia media tras la recurrencia es de diez meses (Jerezek- Fossa B, Badzio A, Jassem J., Int J Gynecol Cancer 1999 Jul; 9(4):285-94) y la supervivencia a los cinco años para las pacientes que tienen recurrencia es solo del 13 % (Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, y col., Lancet 2000 Abr 22; 355(9213):1404-11).

20 Los carcinomas malignos a menudo presentan mutaciones en múltiples oncogenes y genes supresores del tumor, presentan alteraciones en la expresión de cientos de genes, y contienen distintas anomalías cromosómicas. A pesar de esta complejidad genómica, se ha demostrado que dirigiéndose a anomalías moleculares específicas se produce una rápida regresión de los tumores humanos, tal como se ha visto con los inhibidores de tirosina cinasa Imatinib (Gleevec) y Gefitinib (Iressa). Para explicar este fenómeno, Bernard Weinstein introdujo la expresión "adicción oncogénica". Él propuso que el circuito de señalización de una célula tumoral se reprograma en presencia de una actividad oncogénica de manera que la célula tumoral depende de esta actividad oncogénica para la supervivencia y crecimiento celular (Weinstein IB. Science 2002 Jul 5; 297(5578):63-4). Además, los datos experimentales y clínicos apoyan este concepto de adicción oncogénica, y además, sugieren que pueden estar implicados en la adicción oncogénica múltiples mecanismos de activación oncogénica, que incluyen la mutación, reordenación, y sobre-expresión (Weinstein IB, Joe AK., Nat Clin Pract Oncol 2006 Ago; 3(8):448-57).

30 Se ha informado de una variedad de defectos genéticos somáticos en el carcinoma de endometrio. Los carcinomas de endometrio endometrioides representan aproximadamente el 80 % de los cánceres uterinos. Se caracterizan por una alta frecuencia de mutaciones inactivadoras de PTEN (26-80 %), mutaciones activadoras KRAS2 (13-26 %) y mutaciones de  $\beta$ -catenina de ganancia de función (25-38 %) (Hecht JL, Mutter GL., J Clin Oncol 2006 Oct 10; 24(29):4783-91, Shiozawa T, Konishi I., Int J Clin Oncol 2006 Feb; 11(1):13-21). Se ha informado de mutaciones de ganancia de función de la línea germinal en FGFR1, 2 y 3 en una variedad de síndromes de craneosinostosis y síndromes de condrodisplasia. Las correlaciones genotipo/fenotipo en esos trastornos son complejas, con más de 14 síndromes clínicos asociados con mutaciones en uno de los tres receptores y varios síndromes clínicos, por ejemplo, el síndrome de Pfeiffer y Crouzon asociado con mutaciones en diferentes receptores (Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Serie AL, Alonso LG y Kitoh H. (1999), Hum Mutat 14: 115-125, Wilkie AO, Patey SJ, Kan SH, van den Ouweland AM y Hamel BC. (2002), Am J Med Genet 112: 266-278).

40 Aunque se han hecho muchos progresos en el entendimiento de la base biológica del cáncer y en su diagnóstico y tratamiento, sigue siendo una de las causas principales de muerte en los Estados Unidos. Las dificultades inherentes al diagnóstico y el tratamiento del cáncer incluyen entre otras cosas, la existencia de muchos subgrupos diferentes de cáncer y la variación concomitante en las estrategias apropiadas de tratamiento para maximizar la probabilidad de un resultado positivo para el paciente. Además, hay un amplio intervalo de subgrupos de cáncer de endometrio y variaciones en la progresión de la enfermedad. Para tratar apropiadamente el cáncer de endometrio y para maximizar las oportunidades de un tratamiento satisfactorio es importante que se identifique el tipo o subtipo de cáncer de endometrio lo antes posible.

50 Por lo tanto, existe actualmente la necesidad de un procedimiento para detectar y clasificar el cáncer de endometrio con el fin de seleccionar el régimen de tratamiento óptimo y apropiado. Una vez detectado y clasificado, existe la necesidad adicional de procedimientos mejorados para tratar el cáncer de endometrio basándose en el tipo de cáncer de endometrio para maximizar las oportunidades de un tratamiento satisfactorio o para inhibir la recurrencia de la enfermedad en el sujeto.

### Sumario de la invención

55 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Identificando y correlacionando las mutaciones de activación del receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2) con el cáncer de endometrio, los inventores proporcionan en el presente documento herramientas útiles para diagnosticar, clasificar, y tratar el cáncer de endometrio en un sujeto.

Así, la invención proporciona:

1. Un procedimiento de clasificación del tipo de cáncer de endometrio como un cáncer de endometrio inducido por la activación del receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la exploración *in vitro* de una mutación de receptor en un FGFR2 en una muestra biológica que contiene células del cáncer de endometrio, en el que la mutación del FGFR2 se asocia con activación del receptor FGFR2 que aumenta el nivel de actividad de la ruta de transducción de la señal de FGFR2 en comparación con un control, y clasificar el tipo de cáncer de endometrio como un cáncer de endometrio inducido por la activación del FGFR2 al detectar una mutación de activación del FGFR2 en las células de cáncer de endometrio, en el que la mutación es una sustitución de un aminoácido del FGFR2 que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

- (a) una mutación de S por W en la posición 252 de SEQ ID NO: 2 o 3;
- (b) una mutación de K por R en la posición 310 de SEQ ID NO: 2 o 3;
- (c) una mutación de A por T en la posición 315 de SEQ ID NO: 3;
- (d) una mutación de S por C en la posición 373 de SEQ ID NO: 2 o la posición 372 de SEQ ID NO: 3;
- (e) una mutación de Y por C en la posición 376 de SEQ ID NO: 2 o la posición 375 de SEQ ID NO: 3;
- (f) una mutación de C por R en la posición 383 de SEQ ID NO: 2 o la posición 382 de SEQ ID NO: 3;
- (g) una mutación de M por R en la posición 392 de SEQ ID NO: 2 o la posición 391 de SEQ ID NO: 3;
- (h) una mutación de I por V en la posición 548 de SEQ ID NO: 2 o la posición 547 de SEQ ID NO: 3;
- (i) una mutación de N por K en la posición 550 de SEQ ID NO: 2 o la posición 549 de SEQ ID NO: 3; o
- (j) una mutación de K por E en la posición 660 de SEQ ID NO: 2 o la posición 659 de SEQ ID NO: 3,

o la mutación es una sustitución en un nucleótido que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

- (i) una mutación de A por G en la posición 929 de SEQ ID NO: 1;
- (ii) una mutación de T por G en la posición 1650 de SEQ ID NO: 1;
- (iii) una mutación de C por G en la posición 755 de SEQ ID NO: 1;
- (iv) una mutación de T por A en la posición 1650 de SEQ ID NO: 1;
- (v) una mutación de A por G en la posición 1127 de SEQ ID NO: 1;
- (vi) una mutación de C por G en la posición 1118 de SEQ ID NO: 1;
- (vii) una mutación de T por C en la posición 1147 de SEQ ID NO: 1;
- (viii) una mutación de T por G en la posición 1175 de SEQ ID NO: 1;
- (ix) una mutación de A por G en la posición 1642 de SEQ ID NO: 1;
- (x) una mutación de A por G en la posición 1978 de SEQ ID NO: 1.

2. El procedimiento del párrafo 1, en el que cuando la mutación de FGFR2 es una sustitución de un nucleótido, la sustitución en un nucleótido se explora en el ADN, ARN y/o ADNc genómicos.

3. El procedimiento del párrafo 1, en el que se detectan al menos dos mutaciones de activación de receptor del FGFR2 en las células del cáncer de endometrio.

4. El procedimiento del párrafo 1, en el que también se detecta una mutación inactivadora de PTEN en la muestra biológica.

5. El procedimiento del párrafo 1, en el que se utiliza la clasificación para desarrollar un tratamiento para un sujeto que tiene un cáncer de endometrio.

6. El procedimiento del párrafo 1, en el que la mutación da como resultado un aumento de la unión al ligando, una afinidad promiscua por el ligando, dimerización constitutiva del receptor, reciclado deficiente con retraso de la degradación, o activación de cinasas, activando de esta manera el receptor FGFR2.

7. El procedimiento del párrafo 1, en el que el cáncer es un subtipo histológico endometriode.

8. El procedimiento del párrafo 1, en el que el sujeto es un ser humano y el FGFR2 es un mutante constitutivamente activo.

Preferentemente, la etapa de detección comprende la exploración en la muestra biológica de al menos una mutación de nucleótidos de FGFR2 en al menos un ácido nucleico del ADN, ARN o ADNc genómico. En ciertas realizaciones la mutación de activación da como resultado al menos una sustitución de aminoácidos en FGFR2.

También se describen en el presente documento pero no se reivindican explícitamente las mutaciones de activación de FGFR2 que incluyen al menos una mutación que se selecciona de entre el grupo que consiste en: una mutación en la unión entre los dominios tipo inmunoglobulina (Ig) II y III (por ejemplo, una mutación de S por W, F o L en la posición 252; una mutación de P por R en la posición 253; una mutación de P por L en la posición 263; una mutación de S por P en la posición 267, todas ellas de SEQ ID NO: 2 o 3); una mutación en el dominio Ig III (por ejemplo, una mutación de F por V en la posición 276; una mutación de C por Y o F en la posición 278; y una mutación de Y por C en la posición 281; una mutación de I por S en la posición 288; una mutación de Q por P en la posición 289; y una mutación

de Y por C, G o R en la posición 290; una mutación de K por E en la posición 292; una mutación de D por A en la posición 321; una mutación de Y por C en la posición 328; todas ellas de SEQ ID NO: 2 o 3); una mutación en la unión entre el dominio Ig III y el dominio transmembrana (TM) (por ejemplo, una mutación en S por C o T en la posición 354 o 353; una mutación V por F en la posición 359 o 358; una mutación de A por S en la posición 362 o 361; una mutación de S por C en la posición 371; una mutación de Y por C en la posición 374; todas ellas de SEQ ID NO: 2 o 3, respectivamente); una mutación del dominio TM (por ejemplo, una mutación de G por R en la posición 380 o 379; una mutación de G por R en las posiciones 384 o 383; todas ellas en SEQ ID NO: 2 o 3, respectivamente); una mutación en la unión entre el dominio TM y el dominio tirosina cinasa I (por ejemplo, una mutación de corte y empalme IVS10+2A > C); una mutación en el dominio tirosina cinasa I (por ejemplo, una mutación I por V en la posición 538 o 537; una mutación de N por K en la posición 540; una mutación de N por H en la posición 549 o 548; una mutación de E por G en la posición 565 o 564; todas ellas en SEQ ID NO: 2 o 3, respectivamente); o una mutación en el dominio tirosina cinasa II (por ejemplo una mutación de K por R en la posición 641 o 640; una mutación de K por E en la posición 650 o 649; una mutación de K por N en la posición 659 o 658; una mutación de G por E en la posición 663 o 662; una mutación de R por G en las posiciones 678 o 677, todas ellas en SEQ ID NO: 2 o 3, respectivamente); una mutación de la fase de lectura producida por la eliminación de los nucleótidos C y T en la posición 2290-91 de SEQ ID NO: 1). Otros ejemplos de mutaciones de activación preferidas del dominio Ig III incluyen por ejemplo una mutación de N por I en la posición 331; una mutación de A por P en la posición 337; una mutación de G por P o R en la posición 338; una mutación de Y por C o H en la posición 340; una mutación de T por P en la posición 341; una mutación de C por F, G, R, S, W o Y en la posición 342; una mutación de A por G o P en la posición 344; una mutación de S por C en la posición 347; una mutación de S por C en la posición 351, todas ellas en SEQ ID NO: 2, y las mutaciones equivalentes en SEQ ID NO: 3. Es importante señalar que se pueden detectar más de una mutación de activación de FGFR2 en una muestra biológica, por ejemplo, se detectan al menos dos mutaciones de activación de receptor de FGFR2 en ciertas realizaciones.

El cáncer de endometrio que se detecta puede ser de cualquier subtipo, por ejemplo, de los subtipos histológicos, seroso, mucinoso, y endometriode. En una realización preferida, sin embargo, el cáncer que se detecta es del subtipo histológico endometriode.

También se describe en el presente documento pero no se reivindica explícitamente un procedimiento de diagnóstico o clasificación del cáncer de endometrio en un sujeto, que comprende la evaluación del nivel de actividad de una ruta de transducción de la señal de FGFR2 en un sujeto de ensayo y compararlo con el nivel de actividad de un sujeto de control, en el que el aumento de actividad de la ruta de FGFR2 en el sujeto de ensayo en comparación con el sujeto de control es indicativo de cáncer de endometrio. El nivel de actividad de la ruta puede evaluarse, por ejemplo, por la evaluación del aumento en el nivel de expresión o actividad de una proteína FGFR2. De manera alternativa, el nivel de expresión o actividad puede evaluarse, por ejemplo, determinando la cantidad de ARNm que codifica el FGFR2, preferentemente un FGFR2 mutado que da como resultado la activación del receptor. Por ejemplo, el cáncer de endometrio se asocia con la sobre-expresión de FGFR2 debido a la amplificación genómica, y el ensayo se diseña específicamente para detectar la sobre-expresión de FGFR2.

También se describe en el presente documento pero no se reivindica explícitamente un kit para el diagnóstico o clasificación del cáncer de endometrio que comprende un oligonucleótido que se hibrida específicamente con o es adyacente al sitio de la mutación de un gen FGFR2 que da como resultado un aumento de actividad de la proteína FGFR2 codificada por el gen, y las instrucciones de uso en el diagnóstico de un cáncer de endometrio. El sitio de la mutación, puede comprender, por ejemplo, un nucleótido que se selecciona de entre el grupo que consiste en los nucleótidos 755, 929, 943, 1118, 1147, 1642, 1650, 1978 y 2290-91 de SEQ ID NO: 1 y los nucleótidos equivalentes de SEQ ID NO: 7. En una realización preferida, el kit comprende al menos una sonda que comprende el sitio de la mutación.

También se describe en el presente documento pero no se reivindica explícitamente un kit para diagnosticar o clasificar el cáncer de endometrio, que comprende un anticuerpo que reconoce específicamente una mutación en una proteína FGFR2, e instrucciones de uso. Opcionalmente la mutación da como resultado un aumento de actividad en comparación con una proteína FGFR2 no mutada, tal como la de SEQ ID NO: 2 y 3. Preferentemente, el anticuerpo se dirige contra una mutación específica de la proteína FGFR2 que se selecciona de entre el grupo que consiste en una mutación en la unión entre los dominios tipo inmunoglobulina II y III; una mutación en el dominio Ig III; una mutación en la unión entre el dominio Ig III y el dominio transmembrana (TM); una mutación en el dominio TM; una mutación en la unión entre el dominio TM y el dominio tirosina cinasa I; una mutación en el dominio tirosina cinasa I o una mutación en el dominio tirosina cinasa II. Más preferentemente el anticuerpo se dirige a una mutación que se selecciona de entre el grupo que consiste en: (a) una mutación de S por W en la posición 252 de SEQ ID NO: 2 (NP\_075259.2) o 3 (NP\_000132.1); (b) una mutación de K por R en la posición 310 de SEQ ID NOS: 2 o 3; (c) una mutación de A por T en la posición 315 de SEQ ID NO: 3; (d) una mutación de S por C en la posición 373 de SEQ ID NO: 2 o la posición 372 de SEQ ID NO: 3; (e) una mutación de Y por C en la posición 376 de SEQ ID NO:2 o la posición 375 de SEQ ID NO: 3; (f) una mutación de C por R en la posición 383 de SEQ ID NO: 2 o la posición 382 de SEQ ID NO:3; (g) una mutación de M por R en la posición 392 de SEQ ID NO: 2 o la posición 391 de SEQ ID NO: 3; (h) una mutación de I por V en la posición 548 de SEQ ID NO: 2 o la posición 547 de SEQ ID NO: 3; (i) una mutación de N por K en la posición 550 de SEQ ID NO: 2 o la posición 549 de SEQ ID NO: 3; o (j) una mutación de K por E en la posición 660 de SEQ ID NO: 2 o la posición 659 de SEQ ID NO: 3.

También se describe en el presente documento pero no se reivindica explícitamente un procedimiento de tratamiento de un cáncer o pre-cáncer de endometrio en un sujeto. Preferentemente el sujeto es un ser humano afectado por un cáncer de endometrio (por ejemplo, de los subtipos histológicos, seroso, mucinoso, y endometriode). El procedimiento comprende preferentemente la administración de una cantidad eficaz de un inhibidor de FGFR2 con un vehículo farmacéuticamente aceptable al sujeto que tiene un cáncer o un pre-cáncer de endometrio que se caracteriza por la activación de FGFR2, por ejemplo, una forma de FGFR2 mutada que es activa constitutivamente de manera independiente del ligando o dependiente del ligando, en el que el inhibidor de FGFR2 inhibe la expresión o actividad de FGFR2, inhibiendo eficazmente de esta manera el crecimiento o proliferación del cáncer de endometrio en el sujeto. El inhibidor de FGFR2 preferentemente induce detención del ciclo celular y/o apoptosis de las células del cáncer de endometrio. El inhibidor de FGFR2 se puede administrar al sujeto después del tratamiento quirúrgico del cáncer de endometrio para inhibir la recurrencia del cáncer de endometrio tras la cirugía. El inhibidor FGFR2 se puede administrar a los pacientes con cáncer de endometrio persistente o recurrente que no sea posible eliminar quirúrgicamente.

El inhibidor de FGFR2 que se utiliza puede inhibir la expresión de un gen FGFR2 o un producto de expresión FGFR2. El agente puede ser un ácido nucleico FGFR2 antisentido, preferentemente un ácido nucleico antisentido que se hibride con un segmento de SEQ ID NO: 1 que comprenda al menos una sustitución de nucleótido que se selecciona de entre una sustitución de A por G en la posición 929; una sustitución de T por G en la posición 1650; una sustitución de C por G en la posición 755; una sustitución de T por A o G en la posición 1650; una sustitución de A por G en la posición 1127; una sustitución de C por G en la posición 1175; una sustitución de A por G en la posición 1642; una sustitución de A por G en la posición 1978; un intrón 10A>C+2; o una eliminación de CT en las posiciones 2290-91, y las sustituciones equivalentes de SEQ ID NO: 7.

El inhibidor de FGFR2 puede inhibir la actividad de FGFR2 bloqueando el dominio FGFR2. Por ejemplo, el inhibidor FGFR2 es un anticuerpo inhibidor anti-FGFR2 dirigido contra la región del engarce entre los dominios tipo inmunoglobulina (Ig) II y III de FGFR2; el dominio Ig III de FGFR2; la unión entre el dominio Ig III y el dominio transmembrana (TM) de FGFR2; el dominio TM; la unión entre el dominio TM y el dominio tirosina cinasa I de FGFR2; el dominio tirosina cinasa I de FGFR2, o el dominio tirosina cinasa II de FGFR2. Por ejemplo, el inhibidor de FGFR2 interfiere con el plegamiento de FGFR2, la estructura tridimensional de FGFR2, la unión al ligando, o la unión al sustrato, por ejemplo, ATP.

Ejemplos preferidos del inhibidor de FGFR2 incluyen un anticuerpo que reconoce específicamente una secuencia de aminoácidos de FGFR2 que comprende mutaciones que se seleccionan de entre las siguientes: (a) una mutación de S por W en la posición 252 de SEQ ID NO: 2 (NP\_075259.2) o 3 (NP\_000132.1); (b) una mutación de K por R en la posición 310 de SEQ ID NO: 2 o 3; (c) una mutación de A por T en la posición 315 de SEQ ID NO: 3; (d) una mutación de S por C en la posición 373 de SEQ ID NO: 2 o la posición 372 de SEQ ID NO: 3; (e) una mutación de Y por C en la posición 376 de SEQ ID NO: 2 o la posición 375 de SEQ ID NO: 3; (f) una mutación de C por R en la posición 383 de SEQ ID NO: 2 o la posición 382 de SEQ ID NO: 3; (g) una mutación de M por R en la posición 392 de SEQ ID NO: 2 o la posición 391 de SEQ ID NO: 3; (h) una mutación de I por V en la posición 548 de SEQ ID NO: 2 o la posición 547 de SEQ ID NO: 3; (i) una mutación de N por K en la posición 550 de SEQ ID NO: 2 o la posición 549 de SEQ ID NO: 3; o (j) una mutación de K por E en la posición 660 de SEQ ID NO: 2 o la posición 659 de SEQ ID NO: 3. El anticuerpo se puede dirigir contra una mutación de S por W en la posición 252 de SEQ ID NO: 2 o 3. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, tal como un anticuerpo monoclonal.

El inhibidor de FGFR2 puede ser un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un ARN horquillado pequeño (ARNhp), o una ribozima. El inhibidor de FGFR2 puede ser un ARNhp, preferentemente un ARNhp que se dirige al exón 2 de FGFR2 (SEQ ID NO: 4) y/o el exón 15 de FGFR2 (SEQ ID NO: 5), o el inhibidor FGFR2 puede ser PD173074.

La invención permite a un usuario clasificar apropiadamente el tipo de cáncer de endometrio de manera que pueda utilizar un tratamiento apropiado y específico basándose en el tipo de cáncer de endometrio que tiene el sujeto. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además la determinación de si la mutación de FGFR2 induce la activación del FGFR2.

### **Breve descripción de los dibujos**

Las FIG. 1A-E muestra los resultados de la caída de FGFR2 mediada por ARNhp en células AN3CA y MFE296, que da como resultado la muerte de las células del cáncer de endometrio. La FIG. 1A y 1B muestran el efecto del ARNhp de FGFR2 sobre la proliferación de las células de endometrio cancerosas. Se realizó la transducción en las células AN3CA (FIG. 1A) o MFE296 (FIG. 1B) con un vector vacío, no silenciante, o dos construcciones de ARNhp de FGFR2 independientes dirigidas a dos exones diferentes de FGFR2 (X2 o X15) y el efecto sobre la proliferación celular que se evaluó utilizando el ensayo SRB. El tratamiento con ARNhp de FGFR2 suprimía la proliferación de ambas líneas celulares. El control ARNhp no silenciante no tenía efecto sobre la proliferación celular. FIG. 1C. Efecto de caída de FGFR2 sobre la activación de ERK1/2 y AKT. Después de la transducción con ARNhp, se privaron de suero las células AN3CA en un 0,2 % de FBS durante 18 horas o se mantuvieron en medio de cultivo completo que contenía un 10 % de FBS. Se recolectaron los lisados y se analizaron por transferencia de Western en cuanto a la expresión de FGFR2 y la activación de ERK1/2 y AKT. La caída de FGFR2 daba como resultado la reducción de activación de ERK1/2 en FBS al 0,2 % y al 10 %, una modesta reducción de la fosforilación en AKT en FBS al 10 %, y no tenía efecto sobre la activación de AKT en FBS al 0,2 %. FIG. 1D. Muerte celular después de la

caída de FGFR2. Se transfectaron células AN3CA con ARNip no silenciante (NS) de control o ARNip de FGFR2 X2 utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000. 48 horas después de la transfección, se recolectaron las células, se tiñeron con 500 ng/ml de Anexina V-FITC y 1 [µg/ml] de yoduro de propidio, y se analizó en cuanto a las células positivas a Anexina-FITC por citometría de flujo. La caída de FGFR2 daba como resultado un aumento de células positivas a Anexina V, lo que indicaba apoptosis. Se analizaron 30 µg de proteína total de los lisados por análisis de transferencia de Western para confirmar la caída de FGFR2. Esta caída se consiguió más con las construcciones de ARNip que con las de ARNhp ya que en esta última también se expresaba GFP, que tiene un espectro de emisión que se solapa con FITC. La FIG. 1E muestra la expresión de PTEN en líneas celulares de cáncer de endometrio. Los lisados celulares de cáncer de endometrio se recolectaron y evaluaron por análisis de transferencia de Western en cuanto a la expresión de PTEN.

FIG. 2A-B. Las células del cáncer de endometrio que expresan FGFR2 activado son sensibles a PD173074, un inhibidor pan-FGFR. Curvas de respuesta a la dosis de seis líneas celulares de cáncer de endometrio. La viabilidad celular con el ensayo SRB se midió 72 horas después de la adición de PD173074. Las células AN3CA y MFE296 portaban la mutación N550K de FGFR2. HEC1A, Ishikawa, KLE, y RL952 son de origen natural para FGFR2. El PD173074 tiene un profundo efecto negativo sobre la viabilidad celular de las líneas celulares que expresan FGFR2 mutante en comparación con las que expresan el FGFR2 de tipo silvestre. Valores de CI50 de PD173074: AN3CA = 61,7 nM; MFE296 = 284,3 nM; HEC1A > 3000 nM; Ishikawa = 2920,7 nM; KLE > 1000 nM; RL952 > 1000 nM. La FIG. 2B muestra el estado de activación de PLCg después del tratamiento con PD 173074.

Las células se privaron de suero en FBS al 0,2 % durante 18 horas, y luego se trataron con concentraciones crecientes de PD173074 durante tres horas. Los lisados se recolectaron y se evaluaron por análisis de transferencia de Western en cuanto a la activación de PLCg. La FIG. 2C muestra la proliferación celular en ausencia de y en respuesta a FGF2. La mutación N550K del dominio cinasa de FGFR2 constitutivamente activa da como resultado un aumento en la proliferación por encima del que inducía el receptor de tipo silvestre (TS) tanto en ausencia (-FGF2) como en presencia (+FGF2) de ligando FGF2 exógeno. Estos datos sugieren que aunque la mutación N550K es constitutivamente activa, también necesita un ligando para la actividad completa.

FIG. 3A-B. La inhibición del FGFR2 por medio de PD 173074 induce la muerte celular y la detención del ciclo celular en las células del cáncer de endometrio con FGFR2 activado. (FIG. 3A) La tinción con Anexina revela la muerte celular de células AN3CA después del tratamiento con el inhibidor pan-FGFR, PD 173074. Las células AN3CA que se colocaron en placas a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pocillo se trataron con DMSO (vehículo control) o 1 µM de PD173074. 48, 72, o 96 horas más tarde, se recolectaron las células, se tiñeron con 500 ng/ml de anexina-FITC y 1 µg/ml de yoduro de propidio, y se analizaron por triplicado en cuanto a células positivas a anexina por citometría de flujo. Las células tratadas con PD173074 mostraban un aumento de tinción de Anexina-V en comparación con las células tratadas solo con DMSO, lo que indicaba apoptosis. (FIG. 3B) El PD173074 da lugar a la detención del ciclo celular G1 en células AN3CA. Las células se colocaron en placas por triplicado en placas de 6 pocillos y se trataron con 1 µM de PD173074. Se midió el ciclo celular por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo 72 h después de la adición de PD173074.

FIG. 4. Estado de activación de moléculas de señalización claves después del tratamiento con concentraciones crecientes de PD173074. Las células se trataron con concentraciones crecientes de PD173074 en FBS al 10 % durante 3 horas. Se recolectaron los lisados y se evaluaron por análisis de transferencia de western en cuanto a la activación de ERK1/2, AKT, STAT3, y p38. El tratamiento con PD173074 daba como resultado la supresión de la activación de ERK1/2, una modesta supresión de fosforilación de AKT, pero no tenía efecto sobre la activación de STAT3/5, o p38 en células AN3CA y MFE296. El PD173074 no tenía efecto sobre la activación de ERK1/2, AKT, STAT3, o p38 en células HEC1A.

FIG. 5A-B. Estado de activación de moléculas de señalización claves durante el tiempo posterior al tratamiento con PD173074. (FIG. 5A) Las células se trataron con 1 µM de PD173074 en FBS al 10 % durante los tiempos indicados de 0 a 72 horas. Se recolectaron los lisados y se evaluaron por análisis de transferencia de Western en cuanto a la activación de ERK1/2, AKT, STAT3, y p38. El tratamiento con PD173074 daba como resultado la supresión de la activación de ERK1/2 y la supresión parcial de la fosforilación de AKT, pero no tenía efecto sobre la activación de STAT3 o p38 en células AN3CA y MFE296. El PD173074 no tenía efecto sobre la activación de ERK1/2, AKT, STAT3 o p38 en células HEC1A. (FIG. 5B) Las células se privaron en FBS al 0,2 % durante una noche y luego se trataron con 1 µM de PD173074 en FBS al 0,2 % durante los tiempos indicados de 0 a 72 horas. Se recolectaron los lisados y se evaluaron por análisis de transferencia de Western en cuanto a la activación de ERK1/2, AKT, STAT3, y p38. El tratamiento con PD173074 daba como resultado la supresión de la activación de ERK1/2 y una modesta supresión de la fosforilación de AKT en células AN3CA y MFE296. El PD 173074 no tenía efecto de activación de ERK1/2 o AKT en células HEC1A.

La FIG. 6 es una representación esquemática de las mutaciones de FGFR2. La mutación FGFR2 se mapea en dominios funcionales. Las mutaciones somáticas identificadas en cánceres de endometrio primarios y líneas celulares se presentan por encima de la representación esquemática de la proteína y se numeran con respecto a FGFR2b (SEQ ID NO: 2; NP\_075259.2). Las mutaciones de la línea germinal se asocian con una variedad de síndromes craneosinostosis y se numeran con respecto a FGFR2c (SEQ ID NO: 3; NP\_000132.1). Cuatro mutaciones somáticas de FGFR2 de endometrio, de las que no se había informado anteriormente en la línea germinal, tienen un cambio sin sentido idéntico al informado en la posición paróloga de FGFR3c en una

condrodisplasia esquelética (indicada con \*\*). Las nuevas mutaciones están subrayadas. <sup>a</sup> La mutación IVS10+2A >C probablemente da como resultado un aumento relativo en la proporción de la forma de corte y empalme +VT. <sup>b</sup> FS se refiere a una eliminación de 2 pb CT en 2290-91 que da como resultado un cambio de la fase de lectura y un truncado prematuro.

## 5 **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

La invención se describirá ahora en referencia a las realizaciones preferidas de la invención.

La invención, en parte, se basa en el descubrimiento de que las mutaciones en el receptor FGFR2 que inducen la activación del receptor se pueden utilizar para detectar y clasificar eficazmente el cáncer o pre-cáncer de endometrio en un sujeto. La presente invención se basa además en el descubrimiento de que la inhibición del gen FGFR2 o sus productos de expresión es eficaz en el tratamiento del cáncer de endometrio.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “cáncer de endometrio” engloba todas las formas y subtipos de la enfermedad, incluyendo, por ejemplo, los subtipos histológicos, seroso, mucinoso, y endometriode. El cáncer de endometrio es un cáncer que comienza en el endometrio, el revestimiento del útero (matriz).

En el contexto de la presente invención, el gen FGFR2 engloba un gen, preferentemente de origen humano, una secuencia de nucleótidos codificante que se expone en SEQ ID NO: 1, 7, o las homólogas que incluyen las variantes alélicas y ortólogas. La proteína FGFR2 engloba una proteína, también preferentemente de origen humano, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o 3, o las homologas, que incluyen las ortólogas de las mismas. La FIG. 6 muestra los dominios funcionales de los dominios FGFR2 de la proteína FGFR2 y las mutaciones de FGFR2 mapeadas en relación con los dominios funcionales. El FGFR2 es una glucoproteína que pertenece a una familia de receptores relacionados estructuralmente con la tirosina cinasa (FGFR 1-4) que están codificados por cuatro genes diferentes. El FGFR2 es una glucoproteína compuesta por tres dominios tipo inmunoglobulina (Ig) extracelulares, un dominio transmembrana, y un dominio tirosina cinasa dividido. El corte y empalme alternativo en el dominio Ig III es un determinante primario de ambos patrones de redundancia y especificidad en la unión y señalización FGF/FGFR. Este evento de corte y empalme es específico del tejido y da lugar a las isoformas de receptor IHb y IIIc para FGFR1-FGFR3 que poseen distintas especificidades de ligando (Mohammadi M, Olsen SK e Ibrahimi OA. (2005), Cytokine Growth Factor Rev 16: 107-137, Ornitz DM e Itoh N. (2001). Genome Biol 2: REVIEWS3005). Para el FGFR2, las células de linaje epitelial solamente expresan la isoforma “IIIb” codificada por el exón 8 (FGFR2b; SEQ ID NO: 2, NP\_07529.2), mientras que las células derivadas del mesénquima solamente expresan la isoforma “IIIc” que utiliza el exón 9 (FGFR2c; SEQ ID NO: 3; NP\_000132.1) (Scotet E y Houssaint E. (1995). Biochim Biophys Acta 1264: 238-242). La isoforma FGFR2b se une predominantemente a FGF1, FGF3, FGF7 y FGF10, mientras que FGFR2c no se une a FGF7 y FGF10 pero se une a FGF1, FGF2, FGF4, FGF6, y FGF8 con alta afinidad (Ibrahimi OA, Zhang F, Eliseenkova AV, Itoh N, Linhardt RJ y Mohammadi M. (2004), Hum Mol Genet 13: 2313-2324).

Un “aumento de actividad” o una “mutación de activación” de FGFR2 en un sujeto o una muestra biológica de ensayo se refiere a una actividad total de FGFR2 más alta en el sujeto o la muestra biológica de ensayo en comparación con un control, por ejemplo, un sujeto sano, o una muestra de referencia. Preferentemente, aunque no necesariamente, la actividad es al menos un 10 %, más preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 100 %, y mucho más preferentemente al menos un 150 % mayor en el sujeto o la muestra de ensayo que en el control. El aumento de actividad, por ejemplo, puede ser el resultado de un aumento de la actividad basal de FGFR2, la estimulación prolongada, el retraso de la degradación, o la sobre-expresión, por ejemplo, debido a una mayor unión al ligando, una unión al ligando promiscua o inapropiada, una dimerización constitutiva del receptor, un reciclado deficiente que da como resultado un aumento de la señalización, retraso de la degradación, o activación de cinasas.

Un mayor nivel de expresión de FGFR2 puede ser el resultado, por ejemplo, de una mutación en una región no codificante de un gen FGFR2 o una mutación en un gen codificante o no codificante implicado en la transcripción o traducción de FGFR2. El nivel de expresión de FGFR2 se puede determinar, por ejemplo, comparando el ARNm FGFR2 o el nivel de proteína FGFR2 en un sujeto de ensayo con comparación con un control, por ejemplo, comparando el tumor con el endometrio normal (por ejemplo, una muestra de endometrio normal adyacente). “Variantes conservadoras de función” son en las que se ha cambiado un determinado resto de aminoácido de una proteína o enzima sin alterar la conformación y función completas del polipéptido, que incluye, pero no se limita a, sustitución de un aminoácido por uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlaces hidrógeno, ácido, básico, hidrofobia, aromático, y similares). Los aminoácidos con propiedades similares se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la arginina, histidina y lisina son aminoácidos hidrófilos básicos y pueden intercambiarse. De manera similar, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede sustituirse por leucina, metionina o valina. Se espera que dichos cambios tengan poco o ningún efecto sobre el peso molecular aparente o el punto isoeléctrico de la proteína o el polipéptido.

Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden ser diferentes en una proteína o enzima de manera que el porcentaje de similitud de secuencia proteica o de aminoácidos entre dos proteínas cualquiera con función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, desde un 70 % a un 99 % como se determina de acuerdo a un esquema de alineamiento tal como el Procedimiento Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una “variante” incluye también un polipéptido o enzima que tiene una identidad de aminoácidos de al menos un 60 %

según se determina por el algoritmo BLAST o FASTA, preferentemente al menos de un 75 %, más preferentemente al menos un 85 %, e incluso más preferentemente al menos un 90 %, y más preferentemente al menos un 95 %, y que tiene las mismas propiedades o funciones, o sustancialmente similares, que la proteína o enzima nativa o parental con la que se compara. Una variante particular es una variante “con ganancia de función”, que significa una variante de polipéptido en el que el cambio de al menos un resto de aminoácido determinado en una proteína o enzima mejora una función específica del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a la actividad proteica. El cambio de un resto de aminoácido puede ser la sustitución de un aminoácido por uno con propiedades similares.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “homólogo” y “similar” se refiere a la relación entre las proteínas que poseen un “origen evolutivo común”, incluyendo las proteínas de superfamilias (por ejemplo, la superfamilia de las inmunoglobulinas) y proteínas homólogas de diferentes especies. Dichas proteínas (y sus genes codificantes) tienen una homología de secuencia, como se refleja en su similitud de secuencia, en términos de porcentaje de similitud o por la presencia de restos o motivos específicos en posiciones conservadas.

Dos secuencias de ADN son “sustancialmente homólogas o similares” cuando al menos aproximadamente el 80 %, y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % (o al menos el 95 %) de los nucleótidos coinciden en tramos definidos de las secuencias de ADN, como se determina por los algoritmos de comparación de secuencias, tales como, BLAST, FASTA, DNA Strider, etc.

Los términos “mutante” y “mutación” significan cualquier cambio detectable en el material genético, por ejemplo, en el ADN, o cualquier proceso, mecanismo, o resultado de dicho cambio. Cuando se compara con un material de control, se puede hacer referencia a dicho cambio como una “anormalidad”. Esto incluye las mutaciones genéticas, en las que se altera la estructura (por ejemplo, la secuencia de ADN) de un gen, surge un gen o ADN a partir de un proceso de mutación, y cualquier producto de expresión (por ejemplo, una proteína) que expresa un gen o secuencia de ADN modificados. El término “variante” puede utilizarse también para indicar un gen, secuencia de ADN, enzima, célula, etc. que se han modificado o alterado, es decir, cualquier tipo de mutante.

Como se utiliza en el presente documento, “oligonucleótidos específicos de secuencia” se refiere a grupos de oligonucleótidos relacionados que se pueden utilizar para detectar variaciones o mutaciones específicas en el gen FGFR2, preferentemente una mutación de activación de FGFR2.

Una “sonda” se refiere a un ácido nucleico u oligonucleótido que forma una estructura híbrida con una secuencia en una región diana debido a la complementariedad de al menos una secuencia de la sonda con una secuencia en la proteína diana del sujeto.

Como se describe en el presente documento, ácidos nucleicos antisentido (que incluyen las ribozimas), que se pueden utilizar para inhibir la expresión de FGFR2. Un “ácido nucleico antisentido” es preferentemente una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que, al hibridarse en condiciones citoplasmáticas con bases complementarias en una molécula de ADN o ARN, inhibe el papel de estos últimos. Si el ARN es una transcripción de ARN mensajero, el ácido nucleico es una contra-transcripción o un ácido nucleico interferente complementario del ARNm. Como se utiliza actualmente, “antisentido” incluye ampliamente interacciones ARN-ARN, interacciones ARN-ADN, ribozimas, complejos silenciadores inducidos por ARN, y detención mediada por RNasa-H. Las moléculas de ácido nucleico antisentido puede codificarlas un gen recombinante para la expresión en una célula (por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N° 5.814.500; Pat. de EE. UU. N° 5.811.234), o de manera alternativa se pueden preparar sintéticamente (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N° 5.780.607). Los oligonucleótidos sintéticos son adecuados para su uso antisentido.

#### PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS

De acuerdo con la presente invención que se define en las reivindicaciones adjuntas, las mutaciones del receptor FGFR2 que inducen la activación del receptor, incluyendo la sobre-expresión y la degradación retardada, se pueden detectar para diagnosticar o clasificar el cáncer o pre-cáncer de endometrio en un sujeto. Como se utiliza en el presente documento, un “sujeto” es un mamífero humano o no humano, por ejemplo, un primate, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato, o roedor, que tenga probabilidad de desarrollar un cáncer de endometrio. En todas las realizaciones se prefieren los sujetos humanos. Preferentemente el sujeto es un ser humano que es sospechoso de tener un cáncer de endometrio, que se ha diagnosticado que tiene un cáncer de endometrio, o que tiene una historia familiar de cáncer de endometrio. Los procedimientos para identificar sujetos sospechosos de tener un cáncer de endometrio pueden incluir la exploración física, el historial médico familiar del sujeto, la historia médica del sujeto, una biopsia de endometrio, o varias tecnologías de imagen tales como ultrasonografía, tomografía computarizada, imagen de resonancia magnética, espectroscopia de resonancia magnética, o tomografía de emisión de positrones. El procedimiento de diagnóstico para el cáncer de endometrio y la planificación clínica de los diagnósticos de cáncer de endometrio son bien conocidos por el experto en la técnica médica.

En consecuencia, los procedimientos de diagnóstico pueden comprender por ejemplo, la detección de una mutación en el gen FGFR2, en el que la mutación da como resultado un aumento de la actividad del receptor FGFR2. La mutación de FGFR2 puede afectar especialmente a una región codificante del gen FGFR2, tal como, por ejemplo, una mutación en el dominio Ig II o Ig III del gen FGFR2. La mutación puede ser una mutación sin sentido, preferentemente una mutación sin sentido que dé como resultado una sustitución, o una eliminación en el ácido



nucleico, o una combinación de ambas. Preferentemente, la mutación da como resultado una, y a veces más, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, por ejemplo, véase la Tabla 2 posteriormente.

Como se define en las reivindicaciones adjuntas la invención engloba la detección de una mutación en la proteína FGFR2, en particular una mutación que da como resultado un aumento de la actividad de la proteína FGFR2.

- 5 También se describe en el presente documento pero no se reivindica explícitamente al menos una mutación en FGFR2 que se selecciona de entre el grupo que consiste en: una mutación en la unión entre los dominios tipo inmunoglobulina (Ig) II y III; una mutación en el dominio Ig III, una mutación en la unión entre el dominio Ig III y el dominio transmembrana (TM); una mutación en el dominio TM, una mutación en la unión entre el dominio TM y el dominio tirosina cinasa I; una mutación en el dominio tirosina cinasa I, o una mutación en el dominio tirosina cinasa II. La mutación puede inducir una sustitución de aminoácidos en FGFR2, por ejemplo, la mutación puede consistir en una eliminación de nucleótidos C y T en la posición 2290-91 de SEQ ID NO: 1 (NM-02297.2); SEQ ID NO: 7; o una mutación de corte y empalme IVS10+2A>C.

- 10 Típicamente, una mutación de activación del receptor FGFR2 que se detecta aumenta la activación del receptor, por ejemplo, por aumento de la unión al ligando, alteración de la afinidad al ligando (promiscua), dimerización constitutiva del receptor, degradación retardada, reciclado deficiente desde la membrana celular, sobre-expresión, o activación de cinasas, activando de esta manera el receptor FGFR2.

Como se utiliza en el presente documento, el término “diagnóstico” se refiere a la identificación de la enfermedad en cualquier estadio de su desarrollo, y también incluye la determinación de una predisposición de un sujeto para desarrollar la enfermedad o la recaída.

- 20 La expresión “muestra biológica” se refiere a cualquier fuente celular a partir de la cual se pueda obtener ADN. Preferentemente la muestra biológica se obtiene del área del útero o cerca de la misma para asegurar que están presentes las células de revestimiento del útero en la muestra biológica. En una realización, la muestra biológica está en forma de sangre, por ejemplo, sangre uterina de pérdidas menstruales o post menopáusicas.

- 25 También se describe en el presente documento pero no se reivindica explícitamente un procedimiento para diagnosticar un cáncer de endometrio en un sujeto que comprende la evaluación del nivel de expresión, degradación retardada o actividad de la proteína FGFR2 en células de endometrio de un sujeto de ensayo y compararlos con el nivel de expresión o actividad en células de endometrio de un sujeto de control, en el que el aumento de la expresión y/o actividad de la proteína FGFR2 en el sujeto de ensayo en comparación con el sujeto de control es indicativo de cáncer o pre-cáncer de endometrio.

- 30 El nivel de expresión o degradación retardada de FGFR2 puede evaluarse determinando la cantidad de ARNm que codifica la proteína FGFR2 en una muestra biológica, o determinando la concentración de proteína FGFR2 en una muestra biológica. El nivel de actividad de FGFR2 se puede evaluar determinando el nivel de actividad del flujo de señalización en una ruta de señalización FGFR2, por ejemplo, midiendo la actividad de FGFR2 en una muestra o un sujeto, como se describe en el presente documento.

- 35 Ensayos basados en ácido nucleico

- De acuerdo con la invención, se pueden detectar las formas mutadas de los ácidos nucleicos FGFR2, es decir, en el ADN FGFR2 o sus transcripciones, así como la expresión mal regulada, por ejemplo, la sobre-expresión, de FGFR2 u otros componentes de una ruta FGFR2 por una variedad de procedimientos adecuados. Se pueden emplear procedimientos convencionales para analizar y secuenciar el ácido nucleico contenido en una muestra biológica y para diagnosticar un trastorno genético, y muchas de las estrategias para el análisis genotípico las conocen los expertos en la técnica.

- 45 En una realización preferida, la determinación de mutaciones en el gen FGFR2 engloba el uso de secuencias de ácido nucleico tal como oligonucleótidos específicos, para detectar mutaciones en el ADN o ARNm FGFR2 genómico en una muestra biológica. Dichos oligonucleótidos pueden hibridarse específicamente con un sitio de mutación, o con una región adyacente al sitio de mutación presente en un ácido nucleico FGFR2. Se pueden emplear también cebadores que permitan la amplificación de todo o parte del FGFR2. De manera alternativa, o en combinación con dichas técnicas, se puede aplicar la secuenciación de oligonucleótidos descrita en el presente documento o la que conozca el experto en la técnica para detectar las mutaciones FGFR2.

- 50 Un experto en la técnica puede utilizar sondas de hibridación en solución y en realizaciones que empleen procedimientos en fase sólida. En realizaciones que implican procedimientos de fase sólida, el ácido nucleico de ensayo se adsorbe o se fija de alguna manera a una matriz o la superficie seleccionada. El ácido nucleico de cadena sencilla fijado se somete entonces a una hibridación específica con sondas seleccionadas.

- 55 En otra realización, un experto en la técnica puede utilizar oligonucleótidos cebadores en una técnica de amplificación, tal como PCR o PCR inversa (“reacción en cadena de la polimerasa inversa”), para amplificar específicamente el ADN o ARNm diana, respectivamente, que potencialmente está en la muestra biológica.

Los oligonucleótidos útiles incluyen cebadores que permiten la amplificación de exones FGFR2.

La presente invención se dirige más particularmente a un procedimiento *in vitro* que comprende las etapas de: a) poner en contacto una muestra biológica que contiene ADN con oligonucleótidos específicos que permiten la amplificación de todo o parte del gen FGFR2, haciendo accesible el ADN contenido en la muestra, si es apropiado, para la hibridación, y en condiciones que permitan una hibridación de los cebadores con el ADN contenido en la muestra biológica; b) amplificar dicho ADN; c) detectar los productos de la amplificación; d) comparar los productos amplificados obtenidos con los productos amplificados obtenidos con una muestra biológica de control normal, y de esta manera detectar una posible anomalía en el gen FGFR2. En ciertas realizaciones, el ADN de una muestra biológica se secuencía directamente sin necesidad de amplificación. En estas realizaciones, el ADN secuenciado se compara con una secuencia de control para detectar posibles anomalías en el gen FGFR2.

El procedimiento de la invención también se puede aplicar a la detección de una anomalía en la transcripción del gen FGFR2, por ejemplo, amplificando los ARNm contenidos en una muestra biológica, por ejemplo, por RT-PCR.

Por lo tanto, otro sujeto de la presente invención es un procedimiento *in vitro* como se ha definido anteriormente que comprende las etapas de: a) producir un ADNc a partir de un ARNm contenido en la muestra biológica; b) poner en contacto dicho ADNc con oligonucleótidos específicos que permitan la amplificación de todas o parte de las transcripciones del gen FGFR2, en condiciones que permitan una hibridación de los cebadores con dicho ADNc; c) amplificar dicho ADNc; d) detectar los productos de la amplificación; e) comparar los productos amplificados que se obtienen con los productos amplificados obtenidos con una muestra biológica de control normal, y de esta manera detectar una posible anomalía en la transcripción del gen FGFR2.

Un control puede ser cualquier muestra de control de endometrio normal conocida por los expertos en la técnica, por ejemplo, una muestra de endometrio adyacente normal o un ADN normal, que se obtiene de la sangre o de una torunda bucal.

Para los análisis de ARN, la muestra biológica puede ser de cualquier fuente de células, como se ha descrito anteriormente, tal como un tejido de biopsia, a partir del que se aísla el ARN utilizando procedimientos convencionales bien conocidos por el experto en la técnica, tal como extracción en tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Chomczynski y col., Anal. Biochem., 1987,162:156). El ARN aislado se somete entonces a transcripción inversa acoplada y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando oligonucleótidos cebadores específicos que son específicos para un sitio seleccionado. Las condiciones para la hibridación del cebador se escogen para asegurar la transcripción inversa y amplificación; por lo tanto la aparición de un producto de amplificación es diagnóstica de la presencia de una variación genética en particular. En otra realización, el ARN se transcribe inversamente y se amplifica, después de lo cual las secuencias amplificadas se identifican, por ejemplo, por secuenciación directa. En otra realización más, se puede clonar y secuenciar el ADNc obtenido a partir del ARN para identificar una mutación. Los ácidos nucleicos FGFR2 descritos en el presente documento también se pueden utilizar como sondas, por ejemplo, en ensayos terapéuticos y diagnósticos. Por ejemplo, la presente invención proporciona una sonda que comprende un oligonucleótido sustancialmente purificado, cuyo oligonucleótido comprende una región que tiene una secuencia de nucleótido que es capaz de hibridarse específicamente a una región de un gen FGFR2 que se diferencia del gen de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1 y 7), por ejemplo, una región mutante o polimórfica. Dichas sondas se pueden utilizar entonces para detectar específicamente cuál es la mutación del gen FGFR2 presente en una muestra extraída del sujeto. La región mutante o polimórfica se puede localizar en las secuencias del promotor, exón, o intrón del gen FGFR2.

Las sondas particularmente preferidas tienen un número de nucleótidos suficiente para permitir la hibridación específica a la secuencia de nucleótido diana. Por lo tanto, las sondas de longitudes adecuadas que se basan en SEQ ID NO: 1-3 y complementarias a las secuencias mutantes que se proporcionan en el presente documento las pueden construir y ensayar un experto en la técnica para que tengan un nivel apropiado de especificidad dependiendo de la aplicación que se pretenda. Cuando la secuencia de nucleótido diana está presente en un fragmento de ADN grande, tal como un fragmento de ADN genómico de varias decenas o cientos de kilobases, el tamaño de la sonda puede ser más largo para proporcionar una hibridación suficientemente específica, en comparación con una sonda que se utiliza para detectar una secuencia diana que está presente en un fragmento más corto de ADN. Por ejemplo, en algunos procedimientos de diagnóstico se puede amplificar primero una parte del gen FGFR2 y así aislarse del resto del ADN cromosómico y luego se hibrida con una sonda. En dicha situación, una sonda más corta proporcionará probablemente suficiente especificidad de hibridación. Por ejemplo, una sonda que tiene una secuencia de nucleótidos de aproximadamente 10 nucleótidos puede ser suficiente, aunque se prefieren las sondas de aproximadamente 15 nucleótidos, incluso más preferentemente de 20 nucleótidos.

En una realización preferida, la sonda o cebador comprende además un marcador unido a ellos, que preferentemente es capaz de ser detectado. El marcador se puede seleccionar, por ejemplo, de entre radioisótopos, compuestos fluorescentes, enzimas, y cofactores enzimáticos.

El ácido nucleico aislado, el cual se utiliza, por ejemplo, como una sonda o un cebador, se puede modificar, de manera que se vuelva más estable. Las moléculas de ácido nucleico ejemplares que están modificadas incluyen análogos de ADN fosfoamidato, fosfotioato y metilfosfonato (véase también las Pat. de EE. UU. N° 5.176.996; 5.264.564; y 5.256.775). En otra realización más, se pueden utilizar técnicas de HPLC o la HPLC desnaturizante (DHPLC) para analizar los ácidos nucleicos FGFR2. La DHPLC se desarrolló cuando se observó que, cuando se llevaba a cabo el

análisis HPLC a una temperatura parcialmente desnaturizante, es decir, una temperatura suficiente para desnaturizar un heterodúplex en el sitio de no coincidencia de un par de bases, se podían separar los homodúplex de los heterodúplex que tenían la misma longitud de pares de bases (Hayward-Lester, y col., *Genome Research*, 1995, 5:494; Underhill, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93: 193; Doris, y col., *DHPLC Workshop*, 1997, Stanford University). Por lo tanto, el uso de DHPLC se aplicó para la detección de mutaciones (Underhill, y col., *Genome Research*, 1997, 7:996; Liu, y col., *Nucleic Acid Res.*, 1998, 26; 1396). La DHPLC puede separar un heterodúplex que se diferencia solo en un par de bases. La "cromatografía de polinucleótido de ion coincidente" (MIPC), o la "cromatografía de polinucleótido de ion coincidente" desnaturizante (DMIPC) como se describen en las Pat. de EE. UU. N° 6.287.822 o 6.024.878, son procedimientos de separación que pueden ser útiles también en conexión con la presente invención.

De manera alternativa, se puede utilizar un procedimiento DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante), o el procedimiento SSCP (Polimorfismo de conformación de cadena sencilla) para detectar una anomalía en el gen FGFR2. El DGGE es un procedimiento para redisolver dos fragmentos de ADN de longitudes idénticas basándose en las diferencias de secuencia de solo un único cambio de pares de bases, utilizando una electroforesis a través de un gel que contiene concentraciones variables de desnaturizante (Guldberg y col., *Nuc. Acids Res.* 1994, 22:880). El SSCP es un procedimiento para detectar diferencias de secuencia entre dos ADN, que comprende la hibridación de las dos especies con detección posterior de no coincidencias por electroforesis en gel (Ravnik-Glavac y col., *Hum. Mol. Genet.* 1994,3:801). También se puede utilizar la "Escisión HOT", un procedimiento para detectar diferencias de secuencia entre dos ADN, comprende la hibridación de dos especies con detección de no coincidencias posterior por escisión química (Cotton, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85:4397). Dichos procedimientos se continúan preferentemente con una secuenciación directa. De manera ventajosa, se puede utilizar un procedimiento RT-PCR para detectar anomalías en la transcripción FGFR2, ya que permite visualizar las consecuencias de una mutación de corte y empalme tal como el salto de exón o un corte y empalme aberrante debido a la activación de un sitio crítico. Preferentemente este procedimiento se continúa también con una secuenciación directa.

También se pueden implementar ventajosamente técnicas que utilizan micromatrices, preferentemente técnicas de micromatrices que permiten una exploración de alto rendimiento, para detectar una anomalía en el gen FGFR2 o para ensayar la expresión del gen FGFR2 o el gen de otro componente de la ruta FGFR2 que dé como resultado un aumento de la señalización como se describe en el presente documento. Las micromatrices se pueden diseñar de manera que el mismo grupo de oligonucleótidos idénticos se una a al menos dos regiones seleccionadas de la matriz por separado, de manera que se pueda comparar fácilmente una muestra normal, que se pone en contacto con una de dichas regiones seleccionadas de la matriz, contra una muestra de control, que se pone en contacto con otra de dichas regiones seleccionadas. Estas matrices evitan la mezcla de la muestra normal y la muestra de ensayo, utilizando conducciones de microfluidica. Las técnicas de micromatrices útiles incluyen las que desarrolla Nanogen, Inc (San Diego, Calif.) y las que desarrolla Affymetrix. Sin embargo, todos los tipos de micromatrices, también llamados "chips genéticos" o "chips de ADN", se pueden adaptar para la identificación de mutaciones. Dichas micromatrices se conocen bien en la técnica.

El soporte sólido al que se unen los oligonucleótidos se puede fabricar de cristal, silicona, plástico (por ejemplo, polipropileno, nilón), poliacrilamida, nitrocelulosa, u otros materiales. Un procedimiento para unir los ácidos nucleicos a una superficie es imprimiéndolos en placas de cristal, como describe en general Schena y col., *Science* 1995, 270:457-470. Este procedimiento es especialmente útil para preparar micromatrices de ADNc. Véase también DeRisi y col., *Nature Genetics* 1996, 14:457-460; Shalon y col., *Genome Res.* 1996, 6:639- 645; y Schena y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 93:10539-11286.

Se pueden utilizar también otros procedimientos para fabricar micromatrices, por ejemplo, por enmascaramiento (Maskos y Southern, *Nuc. Acids Res.* 1992, 20:1679-1684). Principalmente, se podría utilizar cualquier tipo de matriz, por ejemplo, transferencias puntuales en una membrana de hibridación de nilón (véase Sambrook y col., *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), aunque, como apreciarán los expertos en la técnica, se preferirán las matrices muy pequeñas debido a que los volúmenes de hibridación serán más pequeños. Para estos ensayos se escogen condiciones de hibridación de ácidos nucleicos y lavado de manera que los oligonucleótidos unidos se "unan específicamente" o se "hibriden específicamente" con al menos una parte del gen FGFR2 presente en la muestra ensayada, es decir, la sonda se hibrida, forma un dúplex o se une al locus FGFR2 con una secuencia de ácido nucleico complementaria pero no se hibrida con un sitio que tenga una secuencia de ácido nucleico no complementaria. Como se utiliza en el presente documento, una secuencia de polinucleótido se considera complementaria de otra cuando, si el polinucleótido más corto es menor o igual a 25 bases, no hay faltas de coincidencias utilizando las reglas de emparejamiento de bases convencional, o si el polinucleótido más corto es mayor de 25 bases, no tiene más de un 5 % de falta de coincidencias. Preferentemente, los polinucleótidos son perfectamente complementarios (no hay falta de coincidencia). Se puede demostrar fácilmente que las condiciones de hibridación dan como resultado una hibridación específica llevando a cabo un ensayo de hibridación que incluye los controles negativos (véase, por ejemplo, Shalon y col., supra, y Chee y col., *Science* 1996,274:610-614).

Están disponibles una variedad de procedimientos para la detección y análisis de los eventos de hibridación. Dependiendo del grupo indicador (fluoróforo, enzima, radioisótopo, etc.) que se utilice para marcar la sonda de ADN, se llevan a cabo la detección y el análisis de manera fluorimétrica, colorimétrica o por autorradiografía. Observando y midiendo la radiación emitida, tal como la radiación fluorescente o una emisión de partículas, se puede obtener la

información sobre los eventos de hibridación.

5 Cuando se utilizan las sondas marcadas fluorescentemente, las emisiones de fluorescencia en cada sitio de la matriz de transcripción se pueden detectar preferentemente por exploración con microscopía láser confocal. En una realización, se lleva a cabo una exploración por separado, utilizando la línea de excitación apropiada, para cada uno de los dos fluoróforos que se utilicen. De manera alternativa, se puede utilizar un láser que permita la iluminación simultánea de los especímenes con las longitudes de onda específicas de los dos fluoróforos y se pueden analizar las emisiones de los dos fluoróforos simultáneamente (véase Shalon y col. *Genome Res.* 1996, 6:639-695).

Ensayos basados en proteínas

10 Como alternativa al análisis de ácidos nucleicos FGFR2, se puede evaluar el FGFR2 basándose en las mutaciones en la proteína, o la producción mal regulada, por ejemplo, sobre-producción, de la proteína.

15 En realizaciones preferidas, se detecta el FGFR2 por inmunoensayo. Por ejemplo, la transferencia de Western permite la detección de una variante específica, o la presencia o ausencia de FGFR2. En particular, un inmunoensayo puede detectar una secuencia de aminoácidos específica (de tipo silvestre o mutante) en una proteína FGFR2. También se pueden utilizar otros formatos de inmunoensayo en lugar de la transferencia de Western, como se describe posteriormente por la producción de anticuerpo. Uno de estos es el ensayo ELISA.

20 En los ensayos ELISA, se inmoviliza un anticuerpo contra FGFR2, un fragmento epitópico de FGFR2, en una superficie seleccionada, por ejemplo, una superficie capaz de unirse a proteínas tales como pocillos de poliestireno de una placa de microtitulación. Tras el lavado para eliminar los polipéptidos adsorbidos incompletamente, se puede unir una proteína no específica tal como una solución de albúmina sérica bovina (BSA) a una superficie seleccionada. Esto permite bloquear los sitios de adsorción no específica sobre la superficie inmovilizada y permite por tanto reducir el fondo producido por las uniones no específicas de antisuero en la superficie. La superficie inmovilizada se pone en contacto con una muestra, que se va a ensayar de manera conductiva a la formación de complejos inmunitarios (antígeno/anticuerpo). Esto puede incluir la dilución de la muestra con diluyentes, tales como las soluciones de BSA, gamma globulina bovina (BGG) y/o solución salina tampón fosfato/Tween. La muestra se deja incubando durante 2 a 4 horas, a temperaturas entre aproximadamente 24 a 37 grados C. Después de la incubación, la superficie que se pone en contacto con la muestra se lava para retirar el material que no forme inmunocomplejos. El procedimiento de lavado puede incluir lavar con una solución, tal como PBS/Tween o tampón de borato. Después de la formación de inmunocomplejos específicos entre la muestra de ensayo y el anticuerpo unido, y el lavado posterior, se puede determinar si se produjo e incluso la cantidad de formación de inmunocomplejos sometiéndolo a un segundo anticuerpo contra los mutantes FGFR2, que reconozca un epítipo mutado en la proteína. Para proporcionar los medios de detección, el segundo anticuerpo puede tener una actividad asociada tal como una actividad enzimática que generará, por ejemplo, el desarrollo de un color al incubarlo con un sustrato cromogénico apropiado. La cuantificación se puede conseguir entonces midiendo el grado de generación de color utilizando, por ejemplo, un espectro visible en un espectrofotómetro.

35 Típicamente el anticuerpo de detección se conjuga con una enzima tal como la peroxidasa y la proteína se detecta por la adición de un sustrato de cromóforo peroxidasa soluble tal como el tetrametilbencidina seguido por 1 M de ácido sulfúrico. La concentración de la proteína de ensayo se determina por comparación con curvas de referencia.

Estos protocolos se detallan en *Current Protocols in Molecular Biology*, V. 2 Ch. 11 y *Antibodies*, a *Laboratory Manual*, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) pp 579-593.

40 De manera alternativa, se puede utilizar un ensayo bioquímico para detectar la expresión, o acumulación de FGFR2, por ejemplo, detectando la presencia o ausencia de una banda en las muestras analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida; por la presencia o ausencia de un pico cromatográfico en las muestras analizadas por uno cualquiera de los distintos procedimientos de cromatografía líquida de altas prestaciones, incluyendo de fase inversa, de intercambio iónico, de permeabilidad en gel; por la presencia o ausencia de FGFR2 por cromatografía o electroforesis capilar analítica, o cualquier otra técnica bioquímica cuantitativa o cualitativa que se conozca en la técnica. Los inmunoensayos que se trataron anteriormente implican la utilización de anticuerpos dirigidos contra la proteína FGFR2 o fragmentos de la misma. La producción de dichos anticuerpos se describe posteriormente.

Anticuerpos anti-FGFR2

50 Dichos anticuerpos incluyen pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena única, fragmentos Fab, bibliotecas de expresión de Fab, y por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Se pueden utilizar varios procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales contra polipéptidos FGFR2 o derivados o análogos de los mismos. Para la producción de anticuerpos, se pueden inmunizar distintos animales huésped por inyección con el polipéptido antigénico, que incluyen pero no se limitan a conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc.

55 Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos FGFR2, se puede utilizar cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en

cultivo. Estas incluyen pero no se limitan a la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256:495- 497, 1975), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor y col., Immunology Today 4:72, 1983; Cote y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030, 1983), y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985). En una realización adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales se pueden producir en animales libres de gérmenes (Publicación de Patente Internacional N° WO 89/12690, publicada el 28 de Dic de 1989).

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Pat. de EE. N° 5.476.786 y 5.132.405 de Huston; Pat de EE. UU. N° 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla específica del polipéptido FGFR2. Además, estos genes se pueden suministrar para su expresión *in vivo*. Las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión Fab (Huse y col., Science 246:1275-1281, 1989) se pueden utilizar para permitir una rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada por un polipéptido FGFR2, o sus derivados u análogos.

Los fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo de la molécula de anticuerpo se puede generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen pero no limitan a: el fragmento F(ab')<sub>2</sub> que se puede producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que se pueden generar por la reducción de puentes disulfuro del fragmento F(ab')<sub>2</sub>, y los fragmentos Fab se pueden generar tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

En la producción de anticuerpos, se puede conseguir la exploración del anticuerpo deseado por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de aglutinación *in situ* (utilizando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisótopos, por ejemplo), transferencias de western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del anticuerpo, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A, y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. En una realización, la unión de los anticuerpos se detecta detectando un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta detectando la unión con un anticuerpo secundario o reactivo contra el anticuerpo primario. En una realización más, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen muchos medios en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo y están en el ámbito de la presente invención.

#### Kits de diagnóstico

También se describen en el presente documento pero no explícitamente en las reivindicaciones kits para la determinación de la secuencia con el gen FGFR2 en un sujeto para diagnosticar o clasificar el cáncer de endometrio. Los kits comprenden un medio para determinar la secuencia de las posiciones variantes, y puede incluir opcionalmente datos para el análisis de mutaciones. Los medios para la determinación de la secuencia pueden comprender reactivos inmunológicos y basados en ácidos nucleicos adecuados. Preferentemente, los kits comprenden también tampones adecuados, reactivos de control, si es apropiado, y direcciones para determinar la secuencia en una posición variante y para diagnosticar o clasificar el cáncer de endometrio en un sujeto.

#### Kits diagnósticos basados en ácido nucleico

Como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona procedimientos basados en ácido nucleico para detectar variaciones genéticas de FGFR2 en una muestra biológica. La secuencia en posiciones particulares del gen FGFR2 se determina utilizando cualquier medio adecuado conocido en la técnica, incluyendo sin limitación una o más hibridaciones con sondas específicas para la amplificación por PCR, fragmentación de restricción, secuenciación directa, SSCP, y otras técnicas conocidas en la técnica.

Los kits de diagnóstico incluyen los siguientes componentes: a) Sonda de ADN: La sonda de ADN se puede pre-marcar, de manera alternativa la sonda de ADN puede estar sin marcar y los ingredientes para el marcado pueden incluirse en el kit en envases separados; y b) Reactivos de hibridación: El kit también puede contener otros reactivos y materiales envasados adecuadamente necesarios para el protocolo de secuenciación en particular, incluyendo matrices en fase sólida, si fueran aplicables, y referencias.

En otra realización, los kits de diagnóstico incluyen: a) cebadores de determinación de secuencia: Los cebadores de secuenciación se pueden pre-marcar o pueden contener un resto de purificación por afinidad o unión; y b) Reactivos de determinación de secuencia: El kit puede contener otros reactivos y materiales envasados adecuadamente y para el protocolo de secuenciación particular.

El kit puede comprender un panel de cebadores de secuenciación, cuyas secuencias se corresponden con secuencias adyacentes a las posiciones variantes.

## Kits de diagnóstico basado en anticuerpos

- Como se define en las reivindicaciones la invención también proporciona procedimientos basados en anticuerpos para detectar las proteínas FGFR2 mutantes (o de tipo silvestre) en una muestra biológica. Los procedimientos comprenden las etapas de: (i) poner en contacto una muestra con una o más preparaciones de anticuerpo, en las que cada una de las preparaciones de anticuerpo es específica para el FGFR2 mutante (o de tipo silvestre) en condiciones en las que se pueda formar un complejo antígeno-anticuerpo estable entre el anticuerpo y el FGFR2 de la muestra biológica; y (ii) detectar cualquier complejo antígeno-anticuerpo que se forme en la etapa (i) utilizando cualquier medio adecuado conocido en la técnica, en el que la detección de un complejo indica la presencia de FGFR2 mutante (o de tipo silvestre).
- 5
- 10 Típicamente, los inmunoensayos utilizan un anticuerpo marcado o un componente antigénico marcado (por ejemplo, que compita con el antígeno de la muestra por la unión al anticuerpo). Los marcadores adecuados incluyen sin limitación, moléculas basadas en enzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas o colorantes. También se conocen ensayos que amplifican las señales de la sonda, tales como, por ejemplo, los que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos marcados con una enzima, tales como los ensayos ELISA.
- 15 Los kits de diagnóstico incluyen típicamente uno o más de los siguientes componentes:
- (i) Anticuerpos específicos de FGFR2: Los anticuerpos se pueden pre-marcar; de manera alternativa, el anticuerpo puede estar sin marcar y los ingredientes para marcar se pueden incluir en el kit en envases separados, o se proporciona un anticuerpo secundario marcado; y
- (ii) Componentes de reacción: El kit puede contener también otros reactivos y materiales envasados adecuadamente necesarios para el protocolo del inmunoensayo particular, que incluye matrices de fase sólida, si fueran aplicables, y referencias.
- 20

Los kits a los que se ha hecho referencia anteriormente preferentemente incluyen instrucciones para llevar a cabo y leer el ensayo para diagnosticar o clasificar el cáncer de endometrio. Además, los kits de diagnóstico se adaptan a su realización de alto rendimiento y/o automática.

## 25 Procedimientos para tratar el cáncer de endometrio

También se describe en el presente documento pero no se reivindica explícitamente un procedimiento para tratar el cáncer de endometrio que se caracterice por la activación de FGFR2. El procedimiento de tratamiento comprende preferentemente la inhibición de la actividad de FGFR2 en un sujeto. En general, el procedimiento comprende la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un agente que module la expresión o actividad de FGFR2, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un ácido nucleico FGFR2 antisentido, un anticuerpo inhibidor intracelular anti-FGFR2 o un inhibidor de molécula pequeña.

30

Las composiciones de tratamiento comprenden, como agente de principio activo un inhibidor de FGFR2. Ejemplos de inhibidores adecuados incluyen los inhibidores que inhiben la síntesis de ADN FGFR2 y sus productos de expresión (por ejemplo, ARN o proteína FGFR2). El inhibidor puede ser un inhibidor de FGFR2 de molécula pequeña, por ejemplo, PD173074. Se puede utilizar un ARN de interferencia, en el que el inhibidor es un reactivo que inhibe la síntesis y/o traducción de ARN, por ejemplo, un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un ARN horquillado pequeño (ARNhp), un microARN (miARN), o una ribozima.

35

El inhibidor puede comprender anticuerpos dirigidos contra FGFR2, preferentemente un FGFR2 mutado, y particularmente contra al menos un dominio Ig del mismo. Preferentemente los anticuerpos son específicos para una región de engarce entre los dominios Ig II e Ig III de FGFR2, por ejemplo, contra la mutación S252W. En general, los anticuerpos preferidos son monoclonales, y particularmente anticuerpos modificados de manera que no induzcan reacciones inmunogénicas en un sujeto humano (por ejemplo, anticuerpos humanizados). Los anticuerpos que bloquean la actividad de FGFR2 se pueden producir y seleccionar de acuerdo con cualquier procedimiento bien conocido por un experto en la técnica, tal como los que se describen anteriormente en el contexto de las aplicaciones diagnósticas.

40

45

Los anticuerpos intracelulares (a los que se hace referencia a veces como "intracuerpos") se han utilizado para regular la actividad de proteínas intracelulares en varios sistemas (véase, Gene Ther. 1997, 4:11; Chen y col., Hum. Gene Ther. 1994, 5:595), por ejemplo, infecciones víricas (Marasco y col., Hum. Gene Ther. 1998, 9:1627) y otras enfermedades infecciosas (Rondon y col., Annu. Rev. Microbiol. 1997, 51:257), y oncogenes tales como p21 (Cardinale y col., FEBS Lett. 1998, 439:197-202; Cochet y col., Cancer Res. 1998, 58: 1170-6), myb (Kasono y col., Biochem Biophys Res Commun. 1998, 251:124-30), erbB-2 (Graus-Porta y col., Mol Cell Biol. 1995, 15:1182-91), etc. Esta tecnología se puede adaptar para inhibir la actividad de FGFR2 por expresión de un anticuerpo intracelular anti-FGFR2.

50

Otros inhibidores que serían adecuados incluyen oligonucleótidos antisentido dirigidos contra FGFR2, más preferentemente una isoforma de FGFR2 mutada. Los vectores que comprenden una secuencia que codifica un

55

ácido nucleico antisentido de acuerdo con la invención se pueden administrar por cualquier procedimiento conocido, tal como los procedimientos para terapia genética disponibles en la técnica. Para revisiones generales de los procedimientos de terapia genética, véase, Goldspiel y col., *Clinical Pharmacy* 1993, 12:488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 1991, 3:87-95; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993, 32:573-596; Mulligan, *Science* 1993, 260:926-932; y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 1993, 62: 191-217; May, *TIBTECH* 1993, 11:155-215. Los procedimientos conocidos comúnmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar se describen en Ausubel y col., (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli y col., (eds.), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY.

El término "tratamiento" como se utiliza en el presente documento es intervenir terapéuticamente en el desarrollo o progresión de un cáncer de endometrio en un sujeto. El término "tratamiento" también engloba la prevención del desarrollo o la recurrencia de un cáncer de endometrio en un sujeto al que se ha diagnosticado que tiene una mutación de activación de FGFR2 conocida.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se utiliza en el presente documento para significar una cantidad o dosis suficiente para modular, por ejemplo, disminuir el nivel de actividad de FGFR2, por ejemplo, aproximadamente un 10 por ciento, preferentemente aproximadamente un 50 por ciento, y más preferentemente aproximadamente un 90 por ciento. Preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede mejorar, o presentar un déficit clínicamente significativo de, la actividad, función y respuesta del sujeto. De manera alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para causar una mejoría en una afección clínicamente significativa en el sujeto.

El inhibidor de FGFR2 inhibe la actividad o expresión de FGFR2 y se formula ventajosamente en una composición farmacéutica, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta sustancia puede llamarse entonces principio activo o agente terapéutico contra el cáncer de endometrio.

La concentración o cantidad del principio activo depende de la dosificación y el régimen de administración deseados, como se trata posteriormente. Los intervalos de dosis adecuados dependen mucho del inhibidor de FGFR2 que se utilice, pero puede incluir, con fines solo ejemplares, desde aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también otros compuestos biológicamente activos. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son tolerables fisiológicamente y no producen típicamente una alergia o reacción inapropiada similar, tal como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferentemente, como se utiliza en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal o que está en una lista de la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua o aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua o soluciones acuosas, soluciones salinas y solución acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferentemente como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

Las composiciones farmacéuticas se pueden introducir por vía parenteral, transmucosa, por ejemplo, vía oral (per os), nasal, vaginal, o rectal, o por vía transdérmica. Las vías parenterales incluyen la administración intravenosa, intra-arteriolar, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Puede ser ventajoso dirigirse directamente al útero, por ejemplo, por administración directa al útero o revestimiento del útero. Se puede suministrar un compuesto terapéutico en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, se puede administrar un polipéptido utilizando una infusión intravenosa con una bomba continua, en una matriz de polímero tal como ácido poliláctico/glutámico (PLGA), un aglomerado que contiene una mezcla de colesterol y el principio activo (SilasticR.TM.; Dow Coming, Midland, Mich.; véase la Pat. de EE. UU. N° 5.554.601) implantado subcutáneamente, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración.

Se proporcionan ejemplos de la invención, y se entiende que son solo ejemplares, y no limitan el ámbito de la invención o las reivindicaciones adjuntas. Un experto habituado en la técnica apreciará que la invención puede practicarse de cualquier manera de acuerdo con las reivindicaciones y la divulgación del presente documento.

### Ejemplo 1

Detección de mutaciones activadoras de FGFR2. Los hallazgos de los inventores muestran que la activación y sobre-expresión de FGFR2 tiene un papel en la tumorigénesis de endometrio. El exón 8 tiene tres nucleótidos más que el exón 9, mientras que la isoforma FGFR2b tiene un codón más que la isoforma FGFR2c. También se proporciona especificidad de señalización por la expresión tisular específica de receptores, ligandos y proteoglicanos de sulfato de heparina (Allen y col., 2001; Fiore, 2001). Debido a las diferencias de longitud de las isoformas "b" y "c" de FGFR2, todas las mutaciones se numeran con respecto a la isoforma FGFR2b (SEQ ID NO: 2; NP\_075259.2)

que se expresa epitelialmente. Para las que se producen corriente abajo del exón 8 los inventores proporcionan en el presente documento la mutación equivalente numerada con respecto a la isoforma FGFR2c (SEQ ID NO: 3; NP\_000132.1) entre paréntesis y en la Tabla 2. La variante N550K (N549K) identificada en las dos líneas celulares de endometrio probablemente daba como resultado la activación del receptor como los cambios sin sentido de la línea germinal idénticos o similares que se habían informado en FGFR2 y FGFR3 en pacientes con síndrome de

5 Crouzon (Kan y col., 2002) e hipocondroplasia (Bellus y col., 1995) (FIG. 1).

Lo siguiente que los inventores buscaron fue determinar el espectro y frecuencia de las mutaciones de activación de FGFR2 en los cánceres uterinos primarios. Se llevó a cabo la secuenciación directa de los exones en los que se habían identificado previamente las mutaciones activadoras de FGFR2 y FGFR3 en la línea germinal (exones 7, 8, 10, 13 y 15) en 187 cánceres uterinos primarios, que representaban todos los grados y estadios de tumor y los subtipos histológicos principales de carcinoma de endometrio (Tabla 1).

10

**Tabla 1.** Demografía de pacientes con cáncer uterino, características de la enfermedad y estado de la mutación de FGFR2

	Cohorte n=187	
	Cohorte completa con cáncer uterino n ( %)	Casos con mutaciones de FGFR2 n ( %)
Edad (años)	66,5 ± 11,1*	
Raza		
Blanca	150 (80)	18 (12)
Afroamericana	33 (18)	1 (3)
Otra o no especificada	4 (2)	0 (0)
Histología		
Endometriode	115 (61)	18 (16)
Seroso o mezclado de seroso/endometriode	45 (24)	1 (2)
Células claras	8 (4)	0 (0)
Adenocarcinoma no especificado de otra manera	1 (<1)	0 (0)
Carcinosarcoma	17 (9)	0 (0)
Sarcoma del estroma uterino	1 (<1)	0 (0)
Estadio		
I	79 (42)	9 (11)
II	16 (9)	1 (6)
III	67 (36)	6 (9)
IV	25 (13)	3 (12)
Grado FIGO		
1	49 (26)	7 (14)
2	39 (21)	9 (23)
3†	99 (53)	3 (3)

\*Media ± desviación estándar

†Todos los carcinomas con características serosa y de células claras junto con carcinosarcomas y sarcomas se clasificaron como de grado 3

15 Se debería señalar que la A315T que se informa en ESS-1 derivado de un sarcoma del estroma de endometrio que se produce en la isoforma expresada en el mesénquima (FGFR2c) y todos los carcinosarcomas (tumores con ambos elementos, epitelial y del estroma) también se exploraron respecto a mutaciones en el exón 9 (NM\_000141). Para un subgrupo de tumores (32 cánceres de endometrio endometrioides más 17 carcinosarcomas) se secuenciaron los exones 5-18 que englobaban el segundo y el tercer dominio de inmunoglobulina (a los que se hace referencia a partir de aquí como D2 y D3), el dominio transmembrana y el dominio cinasa completo para determinar la existencia relativa de nuevas mutaciones somáticas. Además de las mutaciones encontradas en los exones 7, 10, 13 y 15, se identificó una mutación adicional en esta exploración de mutaciones más extensa, una eliminación de 2 pb en el exón 18. Las mutaciones se identificaron en 19 casos (un 10 %). Dieciocho de 115 cánceres de endometrio endometrioides (un 16 %) tenían mutaciones y un único carcinoma seroso (1 de 45, un 2 %) albergaba una mutación. No se apreciaron mutaciones en carcinosarcomas o cánceres de células claras.

20

25



Tabla 2. Espectro de mutaciones de FGFR2 en cánceres de endometrio primarios

Caso ID	Nucleótido FGFR2b <sup>a</sup>	Codón FGFR2b <sup>b</sup>	Codón FGFR2c <sup>c</sup>	Histotipo	Estadio	Grado	Estado MSI
AN3 CA <sup>d</sup>	A929G	K310R	K310R	endometriode			positivo
AN3 CA <sup>d</sup>	T1650G	N550K	N549K	endometriode			positivo
MFE296	T1650G	N550K	N549K	endometriode			negativo
ESS-1	G943A <sup>e</sup>		A315T <sup>f</sup>	sarcoma del estroma			negativo
1359	C755G	S252W	S252W	endometriode	I	2	positivo
1574	C755G	S252W	S252W	endometriode	I	2	positivo
1492 <sup>d</sup>	C755G	S252W	S252W	endometriode	I	1	negativo
1484	C755G	S252W	S252W	endometriode	III	3	negativo
1316	C755G	S252W	S252W	endometriode	III	1	negativo
1792	C755G	S252W	S252W	endometriode	III	1	positivo
1438	C755G	S252W	S252W	seroso	IV	3	negativo
1482	C755G	S252W	S252W	endometriode	IV	2	positivo
1267	T1650A	N550K	N549K	endometriode	II	2	positivo
1391	T1650A	N550K	N549K	endometriode	III	2	positivo
1528	T1650G	N550K	N549K	endometriode	IV	2	negativo
1655	A1127G	Y376C	Y375C	endometriode	III	2	positivo
1492 <sup>d</sup>	A1127G	Y376C	Y375C	endometriode	I	1	negativo
1684	C1118G	S373C	S372C	endometriode	I	1	positivo
1094	T1147C	C383R	C382R	endometriode	I	1	positivo
1361	T1175G	M392R	M391R	endometriode	I	1	positivo
1744	A1642G	I548V	I547V	endometriode	III	2	positivo
1717	A1978G	K660E	K659E	endometriode	I	2	negativo
1272	Intrón 10 A>C+2			endometriode	I	1	negativo
1289	elim CT 2290-91	Cambio de la fase de lectura	Cambio de la fase de lectura	endometriode	I	3	positivo

<sup>a</sup> Numeración respecto a NM\_022970.2

<sup>b</sup> Numeración respecto a P\_075259.2

<sup>c</sup> Numeración respecto a NP\_000132.1

<sup>d</sup> Dos mutaciones en una muestra.

<sup>e</sup> Numeración de acuerdo con NM\_000141 ya que ESS-1 se derivaba de un sarcoma del estroma que expresa la isoforma FGFR2c.

<sup>f</sup> Falta una alanina en la posición equivalente en FGFR2b.

- 5 Para todas las mutaciones, se secuenció el ADN constitutivo para confirmar que la mutación aparecía somáticamente. Entre los casos endometrioides, había un exceso de mutaciones de FGFR2 en los casos con deficiencia de reparación de no coincidencias (11 de 49, un 22 %) en comparación con los casos con una reparación de no coincidencias normal (6 de 61, un 10 %), aunque esto no alcanzaba una significación estadística ( $p = 0,10$ ). Se debería señalar que el estado de inestabilidad microsatélite no se determinó en cinco tumores. Los inventores no incluyeron la eliminación de 2 pb en un caso de MSI positivo ya que es improbable que sea activadora y por lo tanto puede representar un testigo de mutación. Aunque hay un exceso de mutaciones en tumores que demuestran una
- 10 inestabilidad microsatélite, los inventores argumentarían que estas mutaciones en FGFR2 son patógenas debido al hecho de que las mismas mutaciones se observan en tumores primarios positivos a MSI y de microsatélite estable (MSS) y que la mayoría de las mutaciones son idénticas a las mutaciones activadoras identificadas en la línea germinal, una coincidencia que no se esperaría si fueran mutaciones testigo asociadas con inestabilidad de microsatélite.
- 15 De las 11 mutaciones diferentes identificadas por los inventores, se había informado previamente que 7 estaban asociadas con craneosinostosis o síndromes de displasia esquelética, una (A315T) se producía en un resto de FGFR2c en el que se había informado una mutación sin sentido similar (A315S) y cuatro mutaciones eran nuevas (Figura 1). La distribución de las mutaciones de acuerdo con el histotipo tumoral, junto con el grado y estadio del tumor que albergaba las mutaciones FGFR2 se resumen en la Tabla 2. La mutación S252W era la mutación
- 20 identificada más común, que se veía en 8 tumores independientes. Esta mutación se produce en la región del engarce entre D2 y D3, que proporciona contactos clave con el ligando FGF. Las mutaciones S252W y la P253R adyacente producen el síndrome de Apert, el más grave de los síndromes de craneosinostosis que se caracteriza por craneosinostosis y sindactilia grave de las manos y pies (Park y col., 1995).

Una combinación de estudios que utilizan ensayos bioquímicos, estructurales y biológicos ha demostrado que la mutación S252W muestra un aumento de unión al ligando y promiscuidad de ligando (Ibrahimi y col., 2001; Ibrahimi y col., 2004; Yu y col., 2000). Se han llevado a cabo extensos estudios de afinidad *in vitro* con ambos receptores mutantes FGFR2c S252W y FGFR2b S252W demostrando que esta mutación aumenta la afinidad de unión del receptor por múltiples FGF en 2-8 veces, además de alterar las especificidades de unión al ligando atribuidas a las isoformas cortadas y empalmadas alternativamente (Ibrahimi y col., 2004).

La prevalencia de la mutación S252W en este panel de tumores sugiere una selección positiva para este mutante en cánceres de endometrio endometrioides. Aunque no se ha examinado la expresión de todos los ligandos FGF en el endometrio de ciclo normal y cánceres de endometrio, hay varios estudios que informan de la expresión de FGF2 predominantemente en la parte basal del epitelio luminal y glandular (Moller y col., 2001; Sangha y col., 1997). Varios estudios también han demostrado un aumento de la expresión de FGF2 en el epitelio glandular asociado con el complejo hiperplasia y adenocarcinoma (Gold y col., 1994). Las células epiteliales de endometrio normalmente expresan solo la isoforma FGFR2b que no se une a FGF2, Sin embargo la adquisición de la mutación S252W en estas células sería anticipada, dando como resultado una activación autocrina del receptor FGFR2b S252W. La mutación S252W también hace posible que el receptor mutante se una a FGF9 que solamente se expresa altamente en el estroma de endometrio (Tsai y col., 2002). La prevalencia de la mutación S252W sugiere que las diferentes isoformas FGFR2 tienen papeles importantes en la mediación de la señalización en dirección epitelial-mesenquimática en el endometrio.

Se identificaron cuatro mutaciones del dominio extracelular, K310R y A315T en las líneas celulares y S373C (S372C) y Y376C (Y375C) en tumores primarios, esta última mutación se encontró en dos tumores independientes (Figura 1, Tabla 2). Los estudios funcionales que se llevaron a cabo en estas mutaciones extracelulares en FGFR2c (o el parólogo FGFR3) daban como resultado la pérdida o la ganancia de un resto de cisteína adicional lo que ha demostrado que estos cambios sin sentido daban como resultado la dimerización constitutiva del receptor debido a la formación de puentes disulfuro inter-moleculares más que intra-moleculares (Naski y col., 1996). En la línea germinal, se ha informado de mutaciones extracelulares yuxtamembrana S372C y Y375C de FGFR2c en varios individuos con síndrome de *cutis gyrata* de Beare-Stevenson, un síndrome de craneosinostosis con un amplio intervalo de características clínicas (Przylepa y col., 1996). Las mutaciones parálogas en FGFR3c (G370C y Y373C) también se asocian con una condrohiperplasia grave, displasia tanatofórica tipo I (Rousseau y col., 1996). Al igual que con la mutación A315S, la mutación A315T es probable que confiera en FGFR2c la capacidad de unirse a FGF10 de manera ilegítima (Ibrahimi y col., 2004).

Los inventores identificaron dos mutaciones; C383R (C382C) y M392R (M391E) en el dominio transmembrana. La mutación C383R que identificaron los inventores es similar a la mutación sin sentido conservadora en la posición paróloga en FGFR3 (G380R) que se encuentra en más del 95 % de los pacientes con acondroplasia (Shiang y col., 1994). Se ha informado que la mutación G380R de FGFR3 aumenta la semivida del receptor y hace que el receptor sea resistente a la internalización inducida por el ligando (Mon-sonego-Ornan y col., 2000). Un estudio más reciente mostraba que mientras que el receptor de tipo silvestre sufre la degradación lisosómica tras la estimulación por el ligando, el receptor mutante G380R se recicla de nuevo a partir de los lisosomas en la membrana plasmática aumentando la señalización de FGF (Cho y col., 2004). La nueva mutación M392R está en dos restos proximales a la mutación bien estudiada A391E de FGFR3 asociada con el síndrome de Crouzon con *acanthosis nigricans* (Meyers y col., 1995). Los análisis biofísicos de la mutación A391E demostraban un cambio en la energía libre de dimerización del dominio transmembrana de FGFR3 consistente con la estabilización del dímero (Li y col., 2006). Aunque la mutación C382R en FGFR2c había demostrado previamente que daba como resultado la fosforilación del receptor constitutivo y la transformación de las células NIH3T3 (Li y col., 1997), el esclarecimiento del mecanismo exacto de la activación del receptor por estas mutaciones de FGFR2b transmembrana sigue estando por explorar.

Además de las mutaciones de los dominios extracelulares y transmembrana, se identificaron cuatro mutaciones diferentes en el dominio cinasa de FGFR2. Aunque dos de estas, N550K (N549K) y K660E (K659E), no se han identificado como mutaciones de la línea germinal en ningún síndrome de craneosinostosis, la mutación similar N549H en FGFR2c se ha asociado con el síndrome de Crouzon (Kan y col., 2002) y se han visto mutaciones idénticas en las posiciones parálogas en FGFR3 asociadas con hipocondrodisplasia (N540K) y displasia tanatofórica II (K650E) (Naski y col., 1996). Las estructuras cristalinas de las cinasas de FGFR2c mutante N549H y K650N muestran que estas mutaciones activan la cinasa por la pérdida del freno molecular autoinhibidor en la región bisagra de la cinasa (M. Mohammadi, resultados no publicados).

La consecuencia patológica de la nueva mutación de corte y empalme IVS10+2A>C es desconocida, sin embargo se ha intentado especular con que resultaría en un aumento de la señalización del receptor. Hay un corte y empalme alternativo en la región intracelular yuxtamembrana en FGFR1-3 que da lugar a la inclusión o exclusión de dos aminoácidos, valina y treonina (VT) corriente abajo del exón 10. La mutación IVS10+2A>C da como resultado un sitio donante GCAAGT no canónico y dado que se observa el par donante/receptor GC-AG de 15-30 x más frecuentemente en el genoma que el par donante/receptor GA-AG (Bursset y col., 2000; Chong y col., 2004) la mutación IVS10+2A>C puede dar como resultado el aumento de la proporción relativa de la isoforma +VT. La proteína de señalización del adaptador FRS2 que une FGFR a las rutas MAPK y PI3K se une a una secuencia en el dominio yuxtamembrana de FGFR1 murino que incluye el corte y empalme alternativo VT (Burgar y col., 2002). Por tanto, la mutación IVS10+2A>C probablemente dé como resultado un sitio donante al corte y empalme más eficaz

que aumenta los niveles de la transcripción +VT, que a su vez resultaría en un aumento de la señalización mediada por FRS2a.

5 Se demostró que un tumor de endometrio albergaba una nueva eliminación de 2 pb 2287-88 de CT, lo que da lugar a un cambio de la fase de lectura y un cambio de LTTNE por LTHNQParada con un truncamiento prematuro en el codón 766, el último codón del exón 18. Esta eliminación de 2 pb puede dar como resultado un receptor FGFR2 truncado que se activa constitutivamente de manera similar a la transcripción C3 truncada de manera similar en FGFR2 (Moffa y col., 2004) o de manera alternativa puede representar simplemente una mutación testigo.

10 Dos muestras de endometrio demostraron albergar dos mutaciones, la línea celular AN3CA con MSI positiva que albergaba N550K (N549K) y K310R y el tumor 1492 con MSI negativa que albergaba la S252W y Y376C (Y375C). El descubrimiento de dos mutaciones activadoras presumiblemente dominantes en el mismo tumor era inesperado. Es interesante señalar que en cada uno de los casos hay una mutación que se sabe que da como resultado una activación del receptor constitutivo independiente del ligando, junto con la S252W dependiente del ligando o la K310R sin caracterizar, sugiriendo que puede existir una presión selectiva adicional para el aumento de la activación de FGFR2 en el epitelio del endometrio.

## 15 **Ejemplo 2**

### Tratamiento de cáncer de endometrio por inhibición de FGFR2

#### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

##### Análisis de secuenciación

20 El análisis de la mutación se llevó a cabo como se había descrito previamente (8). Las secuencias de cebador de PCR eran M13 con cola y se llevó a cabo la secuenciación en dos direcciones. Las secuencias de cebador están disponibles por petición al autor.

##### Cultivos celulares y reactivos

25 La línea celular MFE296 de endometrio humana se obtuvo en la Colección Europea de Cultivos Celulares (Salisbury, Wiltshire, RU). Las líneas celulares de endometrio humanas AN3CA, HEC1A, Ishikawa, RL952, y KLE las proporcionó el Dr. Paul Goodfellow (Washington University, St. Louis, MO). Las células MFE296 se cultivaron en MEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina, y penicilina-estreptomina. Las células AN3CA se cultivaron en DMEM suplementado con un 10 % de FBS, aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, y penicilina-estreptomina. Las células HEC1A se cultivaron en un 50 % de DMEM y un 50 % de RPMI 1640, suplementado con un 10 % de FBS y penicilina-estreptomina. Las células Ishikawa y RLP952 se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de FBS, aminoácidos no esenciales y penicilina-estreptomina. Las células KLE se cultivaron en un 50 % de DMEM y un 50 % de medio F-12 suplementado con un 10 % de FBS y penicilina-estreptomina. Todos los medios, FBS, y suplementos se obtuvieron en Invitrogen (Carlsbad, CA). Todas las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 5 % de CO<sub>2</sub>. El PD173074 se obtuvo en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), reconstituido con DMSO con una concentración de reserva de 1 mM, y almacenado a -20 °C. El plásmido lentivector KH1-LV fue proporcionado amablemente por la Dra. Maria S. Soengas (University of Michigan, Ann Arbor, MI), y el paquete de plásmidos lentivíricos pNHP, pVSV-G, y pTAT fue proporcionado amablemente por el Dr. Matthew Huentelman (Translational Genomics Research Institute, Phoenix, AZ).

##### Diseño del ARNhp

40 Se diseñaron dos construcciones independientes de ARNhp, que se dirigían a dos exones diferentes de FGFR2 (exón 2 y exón 15), contra las siguientes secuencias: ARNhp dirigido al exón 2: TTAGTTGAGGATACCACATTA (SEQ ID NO: 4; nucleótidos 79-99, NM\_022970); ARNhp dirigido al exón 15: ATGTATTCATCGAGATTTA (SEQ ID NO: 5; nucleótidos 1866-1884, NM\_022970). También se diseñó una construcción de ARNhp no silenciante basándose en una secuencia de ARNhp no silenciante de Qiagen (SEQ ID NO: 6; AATTCTCCGAACGTGTACGT), y se utilizó como control negativo. Se hibridaron y clonaron los correspondientes oligonucleótidos en el lentivector KH1-LV. El vector lentivírico KH1-LV auto-inactivador permite la expresión de secuencias cortas horquilladas bajo el control del promotor de H1 y la expresión de GFP bajo el control del promotor de ubiquitina-C humana, haciendo posible la supervisión fácil de la eficacia de la transducción. Las estrategias de clonación están disponibles de los autores por petición.

##### Producción lentivírica

50 Se revistieron matraces de 75 cm<sup>2</sup> con 50 mg/ml de poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se sembraron las células HEK293FT (Invitrogen, Carlsbad, CA) con una densidad de 8x10<sup>6</sup> células por matraz. Al día siguiente, se transfectaron las células con 7,1 µg de pNHP, 2,8 µg de pVSV-G, 0,5 µg de pTAT, y 3,5 µg de KH1-LV utilizando el reactivo de transfección SuperFect (Qiagen, Valencia, CA) con una relación 4:1 de SuperFect (µl) respecto a ADN (µg), según el protocolo del fabricante. Los medios que contenían el virus se recolectaron a las 24 y 40 horas después, se combinaron, se filtraron a través de un filtro Durapore de unión a proteínas inferiores de 0,45 mm

(Millipore Corporation, Billera, MA) para eliminar los restos celulares, y se hicieron alícuotas de la preparación vírica y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### Transducción lentivírica

5 Las células se colocaron en placas con una densidad de  $4 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, las células se infectaron con las reservas lentivíricas en presencia de  $6\text{ }\mu\text{g/ml}$  de polibrene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El vector vacío y las infecciones con ARNhp no silenciante se utilizaron como controles para cada experimento. Se alcanzó una eficacia de transducción mayor del 90 % en cada experimento con ARNhp, como se determinó por la visualización eGFP (datos no mostrados).

#### Ensayo de inhibición del crecimiento

10 Veinticuatro horas tras la infección, se tripsinizaron las células y se colocaron en placas de 96 pocillos en medio de cultivo completo con una densidad de 5.000 células por pocillo, por triplicado, y se evaluó la proliferación utilizando el ensayo de sulforrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En los tiempos indicados, los pocillos se fijaron con un 10 % (p/vol) de ácido tricloroacético, teñido con SRB durante 30 min, y se lavaron con un 1 % (vol/vol) de ácido acético. El colorante unido a la proteína se disolvió en una solución de base Tris 10 mM, y se midió la absorbancia a 510 nm. Para los estudios farmacológicos de PD173074, las células se colocaron en placas en medio de cultivo completo a una densidad de 5.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Al día siguiente, se añadieron cantidades crecientes de PD173074 y se evaluó la proliferación 72 horas después utilizando el ensayo SRB.

#### Marcado con Anexina V-FITC de células apoptóticas

20 Se utilizó la tinción con Anexina V-FITC para medir la exposición a fosfatidilserina en las células que sufren apoptosis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioVision, Inc. Mountain View, CA). Se alcanzó la caída con las construcciones de ARNip más que con ARNhp ya que este último también expresaba GFP, que tenía un solapamiento del espectro de emisión con FITC. Se colocaron en placas  $2,5 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Veinticuatro horas más tarde, se transfectaron las células con 25 nM de ARNip no silenciante (NS) o ARNip FGFR2 x2 utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000. Se permitió que el dúplex ARNip formara un complejo con la Lipofectamina 2000 durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se llevó a cabo la transfección a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. 48 horas tras la transfección, se recolectaron las células flotantes y unidas, se lavaron en PBS frío, se resuspendieron en el tampón de unión a Anexina (10 mM de Hepes (pH 7,4), 140 mM de NaCl, 2,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ ), se tiñeron con 500 ng/ml de Anexina V-FITC y  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y se analizó en cuanto a las células positivas a anexina utilizando un citómetro de flujo ADP CyAn y el software Summit, versión 4.3 (Dako Cytomation, Carpinteria, CA). Para los estudios de PD173074, se colocaron las células en placas con una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 6 pocillos. 24 horas después, se trataron las células con  $1\text{ }\mu\text{M}$  de PD173074 o DMSO (vehículo control), y, en el punto de tiempo indicado, se tiñeron con Anexina V-FITC y se analizaron por citometría de flujo.

#### 35 Análisis del ciclo celular

Las células se colocaron en placas con una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, las células se trataron con  $1\text{ }\mu\text{M}$  de PD173074 o DMSO (vehículo control). 72 horas después, se tiñeron las células con yoduro de Propidio como se había descrito {Krishan, 1975 n° 28} y se analizaron por citometría de flujo. El análisis del ciclo celular se llevó a cabo utilizando el software ModFit (Verity Software House, Inc. Topsham, ME).

#### 40 Análisis de transferencia de Western

45 Las células se colocaron en placas en placas de  $60\text{ mm}^2$  con una densidad de  $2 \times 10^6$  células por placa. Al día siguiente, las células se privaron, una noche durante 18 horas, con un 0,2 % de FBS o se mantuvieron en medio de cultivo completo, y luego se incubaron con concentraciones crecientes de PD173074 durante tres horas. Las células se lavaron con PBS enfriado en hielo, se lisaron con tampón de cinasa [20 mM de Hepes pH 7,4, 2 mM de EGTA, un 1 % de Tritón x100, un 10 % de glicerol, 1 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM de NaF, 100  $\mu\text{M}$  de AEBSF, y 1 comprimido/10 ml de Mini inhibidor completo de proteasa (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)], se sonicó brevemente, y se estimaron las concentraciones de proteína utilizando el reactivo Quick Start Bradford con referencias de gamma globulina bovina (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se separaron cantidades iguales de proteína por SDS-PAGE en geles de gradiente del 4-12 % y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se inmunotransfirieron las membranas con anticuerpos para AKT, ERK1/2, p38, STAT-3 y STAT-5, PLC $\gamma$  fosforilados y totales y PTEN total (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). La expresión de FGFR2 se detectó con el anticuerpo BekC17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Se utilizaron anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón o anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano rústico (Biomedica, Foster City, CA), seguido por tinción quimioluminiscente. Para los estudios de ARNhp, se recolectaron los lisados 48 horas después de la transducción con ARNhp y se procesaron como se ha descrito anteriormente.

## Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando un GraphPad Prism versión 4.0 para Macintosh (GraphPad Software, San Diego, CA). Los valores de la CI50 se calcularon por el análisis de respuesta a la dosis utilizando una regresión no lineal de la respuesta sigmoidea a la dosis con pendiente variable. Los datos de apoptosis se analizaron por ANOVA de una vía. Las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento se determinaron utilizando un ensayo t de Student. Todos los valores de P se consideraban significativos cuando  $P < 0,05$ . Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SE.

## RESULTADOS

Patrones de las mutaciones de FGFR2, PTEN y KRAS2 en los cánceres de endometrio primarios: mutación concomitante de FGFR2 y PTEN y mutación mutuamente excluyente de FGFR2 y KRAS2.

Debido a que las mutaciones de PTEN y KRAS2 son comunes en el cáncer de endometrio endometriode, los inventores buscaron primero determinar si la activación de FGFR2 se producía en tumores que albergaran mutaciones de pérdida de función en PTEN y mutaciones de ganancia de función en KRAS. Los inventores secuenciaron los nueve exones de PTEN y el exón uno de KRAS en 116 tumores de endometrio de los que conocía el estado de mutación FGFR2. Debido a la cantidad limitada de ADN disponible, los inventores solo secuenciaron el exón uno de KRAS, ya que las mutaciones en el exón uno representan más de 96 % de las mutaciones de KRAS en el cáncer de endometrio endometriode (The Catalog of Somatic Mutations in Cancer, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). El análisis de mutación revelaba mutaciones de PTEN en el 70 % (82/116) de los tumores. De estos tumores con mutaciones de FGFR2, un 77 % (14/18) también albergaban una mutación de PTEN, demostrando que las mutaciones en FGFR2 se producen frecuentemente junto con las mutaciones en PTEN en los tumores de endometrio endometrioides. Las mutaciones en KRAS se identificaron en el 12 % (15/116) de los tumores. Las mutaciones activadoras en FGFR2 y KRAS eran mutuamente excluyentes. Se señala que un tumor poseía una mutación de cambio de fase de lectura en FGFR2 (2290-91 eliminación de CT) y contenía una mutación de KRAS. Sin embargo, como la naturaleza patogénica de esta mutación de FGFR2 es desconocida, los inventores concluyeron que las mutaciones activadoras en FGFR2 eran mutuamente excluyentes con las mutaciones activadoras en KRAS. Las mutaciones activadoras en PTEN se producían junto con las mutaciones en KRAS y en FGFR2 (Tabla 3).

Caso ID	Mutación en FGFR2	Mutación KRAS	Mutación en PTEN	Estadio	Grado	MS
AN3CA	p.Lys310Arg; Asn550Lys	ts	p.Arg130fsX4			+
MFE296	p.Asn550Lys	ts	ts			-
1359	p.Ser252Trp	ts	ts	I	2	+
1574	p.Ser252Trp	ts	p.[Gly44AlafsX7(+)+Y68X]	I	2	+
1492	p.Ser252Trp; Tyr376Cys	ts	p.Arg130Gly	I	1	-
1484	p.Ser252Trp	ts	p.[Arg130Gly(+)+F56V]	III	3	-
1316	p.Ser252Trp	ts	p.Leu112Val	III	1	-
1792	p.Ser252Trp	ts	ts	III	1	+
1482	p.Ser252Trp	ts	p.Thr319X	IV	2	+
1267	p.Asn550Lys	ts	p.Ala126Asp	II	2	+
1391	p.Asn550Lys	ts	p.Q245X	III	2	+
1528	p.Asn550Lys	ts	p.Arg130Gly	IV	2	-
1655	p.Tyr376Cys	ts	p.Arg308IlefsX5	III	2	+
1684	p.Ser373Cys	ts	p.Arg130Gly	I	1	+
1094	p.Cys383Arg	ts	p.Leu108-Asp109	I	1	+
1361	p.Met392Arg	ts	p.Thr319X	I	1	+
1744	p.Ile548Val	ts	p.[Phe21 SerfsX2(+)+K66N]	III	2	+
1717	p.Lys660Glu	ts	p.Ser59X	I	2	-
1272	c.1287+2A>C	ts	ts	I	1	-
1289	p.Thr762fsX3	p.Gly12Asp	ts	I	3	+
1284	ts	p.Gly12Asp	p.[Arg130Gly(+)+Gly 165Arg]	II	1	+
1606	ts	p.Gly12Asp	p.Val191GlyfsX7	I	1	-
1856	ts	p.Gly12Asp	ts	I	2	+
1411	ts	p.Gly12Ala	p.[Arg47Gly(+)+Gly165Arg]	III	2	+
1966	ts	p.Gly12Ala	p.[Arg 130X(+)+Ala148LysfsX3]	III	2	+
1393	ts	p.Gly12Cys	p.Ile4HisfsX5	III	2	+
1609	ts	p.Gly12Cys	p.Lys267ArgfsX8	I	3	+
1044	ts	p.Gly12Val	p.Arg130Gln	III	3	+
1599	ts	p.Gly12Val	p.[Arg130Gly(+)+Gln171X]	III	2	+
1873	ts	p.Gly12Val	p.V290X	I	1	+
1656	ts	p.Gly12Val	p.Gly251 ValfsX5	I	1	-
1664	ts	p.Gly12Asp	p.Tyr16LeufsX27	III	1	-
1287	ts	p.Gly13Asp	p.[H123Y(+)+Ala126Ser]	III	1	-

(continuación)

Caso ID	Mutación en FGFR2	Mutación KRAS	Mutación en PTEN	Estadio	Grado	MS
1576	ts	p.Gly13Asp	p.Arg130Gln	I	2	+

Numeración con respecto a la secuencia proteica de FGFR2 NP\_075259.2; Secuencia proteica de KRAS NP\_203524.1; Secuencia proteica de PTEN NP\_000305.3.

La caída por ARNhp de FGFR2 induce la muerte celular en las células del cáncer de endometrio, a pesar de la inactivación de PTEN

5 Debido a la existencia de mutaciones de FGFR2 activadoras en el contexto de la inactivación de PTEN en el cáncer de endometrio y el papel conocido de la ruta PI3K/AKT en la promoción de la supervivencia celular, los inventores buscaron a continuación determinar si la inhibición del FGFR2 podía inducir la muerte celular en presencia de inactivación de PTEN. El impacto de caída por ARNhp de la expresión de FGFR2 sobre la proliferación celular se evaluó en las células de cáncer de endometrio AN3CA y MFE296, que albergaban ambas una mutación activadora de FGFR2. Además, las AN3CA tienen mutaciones en ambos alelos PTEN y no expresan PTEN (FIG. 1E). Las MFE296, por otra parte, son de tipo silvestre para PTEN y PIK3CA (The Catalog of Somatic Mutations in Cancer, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). Las células AN3CA y MFE296 se transdujeron lentivíricamente con dos ARNhp independientes que se dirigen a FGFR2. Se midió la proliferación y viabilidad celular en múltiples puntos de tiempo. La caída de FGFR2 inhibía la proliferación celular tanto en células AN3CA y MFE296 (Figura 1A, B), demostrando la eficacia de dirigirse a FGFR2 activado incluso en presencia de inactivación de PTEN. La caída de la expresión de FGFR2 se confirmó y se examinó la fosforilación de ERK1/2 y AKT por transferencia de Western 48 horas después de la transducción con ARNhp. Como se muestra en la Figura 1C, ambas construcciones de ARNhp FGFR2 daban como resultado la caída de más del 90 % de proteína FGFR2. Se apreciaba una disminución de los niveles de fosfo-ERK1/2 en células AN3CA después de la caída de FGFR2. El efecto era más prominente cuando las células se cultivaban en un 0,2 % de FBS. Sin embargo no se observó ningún cambio en la fosforilación en AKT en la serina 473 (Figura 1C), consistente con el estado de la mutación de PTEN de esta línea celular.

Para confirmar que la muerte que se observaba a continuación de la caída de FGFR2 era debida a la inducción de apoptosis, se transfectaron las células AN3CA con ARNip que se dirigía contra FGFR2 y se marcaron con Anexina V-FITC para detectar las expuestas a fosfatidilserina por citometría de flujo. Era evidente un aumento de la tinción positiva a Anexina V-FITC 48 horas después de la transfección con ARNip FGFR2 en comparación con el control de ARNip no silenciante, indicando que estas células sufrían apoptosis (Figura 1D). La drástica inhibición de la viabilidad celular que se observaba después de la caída de FGFR2 sugiere que estas células pueden demostrar una adicción oncogénica. El FGFR2 activado por lo tanto es una diana terapéutica en el cáncer de endometrio.

Las células del cáncer de endometrio que expresan FGFR2 activado son sensibles a PD173074, un inhibidor pan-FGFR

Se trataron seis líneas celulares de cáncer de endometrio (2 FGFR2 mutantes N550K, y 4 FGFR2 de tipo silvestre) con concentraciones crecientes de PD173074, un inhibidor de tirosina cinasa pan-FGFR. Este inhibidor demuestra una alta selectividad contra los FGFR (FGFR1, CI50~25 nM) y VEGF (VEGFR2, CI50~100 nM) y se ha demostrado que induce apoptosis en las células de mieloma con una translocación activadora t(4;14) y mutaciones activadoras en FGFR3 (10). Como se muestra en la Figura 2A, las dos líneas celulares de cáncer de endometrio con FGFR2 mutante eran de 10-40x más sensibles a la inhibición con PD173074 que las líneas celulares con el FGFR2 de tipo silvestre. La línea AN3CA, que tenía mutaciones de pérdida de función en ambos alelos de PTEN, era la línea celular más sensible. La marcación con Anexina V-FITC indicaba que ~70 % de las células AN3CA sufrían apoptosis 96 horas tras el tratamiento farmacológico (Figura 3A). Además el análisis del ciclo celular revelaba que el tratamiento con PD173074 inducía la detención de G1 de las células AN3CA (Figura 3B). Como se muestra en la FIG. 2C, la mutación constitutivamente activa N550K del dominio cinasa de FGFR2 da como resultado un aumento de la proliferación por encima de la inducida por el receptor de tipo silvestre (TS) tanto en ausencia (-FGF2) como en presencia (+FGF) de ligando FGF2 exógeno. Estos datos sugieren que aunque la mutación N550K es constitutivamente activa, también necesita el ligando para una actividad completa. La línea celular pro-B BaF3 dependiente de interleucina murina se utiliza de manera rutinaria como un sistema modelo para la evaluación de la función de receptor de tirosina cinasa. Aunque la proliferación y la supervivencia celular de BaF3 normalmente dependen de IL-3, la señalización del receptor de tirosina cinasa activado puede sustituirse por IL-3 para mantener la viabilidad y proliferación celular. Se llevaron a cabo ensayos de proliferación en ausencia de IL-3 y en presencia de 1 nM de FGF2 y 10 ug/ml de heparina y se ensayó la proliferación tras 5 días utilizando el kit de Proliferación/Citotoxicidad celular ViaLight (Lonza Rockland Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La muerte celular después de la inhibición pan-FGFR se asocia con inhibición de ERK, inhibición parcial de AKT, pero no con inhibición de STAT3 o activación de p38

Se ha informado que la inhibición de la fosforilación de ERK1/2, AKT, y STAT3/5, junto con la activación retardada de p38, es una característica común asociada a la inducción de muerte celular en las células que demuestran adicción oncogénica (17). Para determinar si el tratamiento con PD173074 daba como resultado una inhibición similar

de estas rutas, se evaluaron los niveles de fosforilación de ERK1/2, AKT, STAT3/5, y p38 por transferencia de Western en tres líneas celulares (dos sensibles y una resistente a PD173074). La expresión de STAT5 no era detectable por transferencia de Western en estas tres líneas celulares (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 4, el tratamiento con PD173074 durante tres horas daba lugar a una disminución dependiente de la concentración en la fosforilación de ERK1/2 en las células AN3CA y MFE296. Las células HEC1A que expresan un FGFR2 tipo silvestre y son resistentes a PD173074, no mostraban una disminución de la fosforilación en ERK1/2. Estos es consistente con una activación corriente abajo de la ruta MAPK en esta línea celular, debido a una mutación G12D en KRAS2 (The Catalog of Somatic Mutations in Cancer, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>).

El tratamiento con PD173074 también daba como resultado una moderada disminución de la fosforilación de AKT en la treonina 308 y serina 473 en células AN3CA y MFE296. No era evidente una disminución de la activación de AKT en células HEC1A. Extraordinariamente, el tratamiento con PD173074 no tenía efecto en la fosforilación de STAT3 o p38 en ninguna de las líneas celulares ensayadas (Figura 4). Los inventores examinaron también la activación de PLC $\gamma$ , ya que se había demostrado que los FGFR señalizaban a lo largo de esta ruta (18), no se observó ningún cambio en PCLY después del tratamiento con PD173074 (datos no mostrados).

Aunque no era evidente ningún cambio en la activación de STAT3 o p38 tres horas después del tratamiento con PD173074, los modelos previos de adicción oncogénica han demostrado que la activación de p38 está retardada, alcanzando el pico a las 8-24 horas después de la inhibición oncogénica {Sharma, 2006 n° 17}. Por lo tanto, los inventores evaluaron la activación de ERK1/2, AKT, STAT3, y p38 en varios puntos de tiempo que variaban de 0 a 72 horas después del tratamiento con PD173074. Consistentes con los datos presentados en la Figura 4, el tratamiento con PD173074 daba como resultado una rápida reducción de la activación de ERK1/2 en células MFE296 y AN3CA, pero no en células HEC1A (Figura 5A). El ERK1/2 fosforilado empieza a regresar a las 24-48 horas tras el tratamiento con PD173074 pero no había alcanzado la línea base de activación a las 72 horas. También se detectó una reducción de AKT fosforilada en células MFE296 y AN3CA, y era más evidente en la treonina 308 que en la serina 473 (Figura 5A). La disminución de la activación de AKT se retardaba en comparación con la rápida inhibición de la fosforilación de MAPK, con el mayor descenso de la fosforilación detectado a las 8 y 24 horas después del tratamiento con PD173074.

Extraordinariamente, no se detectó ningún cambio en la activación de STAT3 o p38 en células AN3CA y MFE296 en el transcurso de tiempo (Figura 5A). Cuando se cultivaban las células en medios con un 0,2 % de FBS, el tratamiento con PD173074 daba como resultado una reducción de la activación de MAPK tanto en AN3CA y MFE296 (Figura 5B), similar a la que se observaba en medios de cultivo completos. De manera interesante, el tratamiento con PD173074 en medios con un 0,2 % de FBS daba como resultado una modesta reducción en fosfo-AKT en la treonina 308 y una ligera reducción en serina 473 en células AN3CA y MFE296. La activación constitutiva de AKT en la línea celular AN3CA en un 0,2 % de FBS se debe probablemente a la inactivación en ambos alelos de PTEN; el mecanismo de la activación constitutiva de AKT es desconocido en células MFE296 ya que expresan PTEN tipo silvestre y PIK3CA.

## CONCLUSIÓN

El entendimiento de la base molecular de la progresión tumoral ha dado lugar al desarrollo y éxito de terapias dirigidas en una variedad de tipos de cáncer {Pickering, 2008 n° 27}. Hay una evidencia cada vez mayor de que las mutaciones activadoras en los genes implicados en varias rutas de señalización pueden dar como resultado la "adicción" de las células tumorales a estas rutas {Sharma, 2007 n° 31}. Además, estas mutaciones activadoras no solo sirven para identificar potenciales dianas terapéuticas sino que su presencia puede predecir la respuesta clínica a una inhibición de la ruta {Lynch, 2004 n° 30}. Sin embargo, cada vez se vuelve más claro que la respuesta a la inhibición de la diana está influenciada por el contexto molecular en que se producen estas mutaciones. Como los inventores habían identificado previamente mutaciones activadoras en FGFR2 en ~16 % de los tumores de endometrio endometrioides, los inventores buscaron investigar el contexto genético en el que se producen las mutaciones de FGFR2 en el cáncer de endometrio. También buscaron evaluar el potencial terapéutico del direccionamiento hacia el FGFR2 activado investigando la consecuencia biológica de la inhibición de FGFR2 en las células del cáncer de endometrio que poseen mutaciones activadoras en FGFR2.

En el presente estudio, los inventores evaluaron el estado de mutación en KRAS y PTEN de tumores de endometrio endometrioides con estado de mutación en FGFR2 conocido. Las mutaciones activadoras en KRAS y FGFR2 no se producían juntas en el mismo tumor, lo que es consistente con la tumorigénesis dirigida por FGFR2 por medio de la ruta MAPK. La activación de FGFR2 se producía junto con la inactivación de PTEN, sugiriendo que, al menos en las células de endometrio, el FGFR2 no media su efecto biológico a través de PI3K/AKT. Esto está apoyado por un informe previo en el que la estimulación por FGF7 o FGF10 de las células de endometrio se producía una activación de ERK1/2, pero no de AKT (19). Las mutaciones en PTEN y KRAS se producen en el mismo tumor, consistente con un informe previo (20).

Los inventores también han demostrado que la señalización de FGFR2 es esencial para la supervivencia y proliferación de las líneas celulares AN3CA y MFE296 de cáncer de endometrio, lo que sugiere fuertemente una adicción oncogénica. Esto está apoyado por los estudios de la  $Cl_{50}$  de PD173074 en los que los inventores demostraron que las dos líneas celulares con FGFR2 activado eran sensibles al inhibidor pan-FGFR, PD173074. Hay que tener en cuenta que las células AN3CA eran las más sensibles a PD173074 y son mutantes para PTEN. Esto es de particular importancia debido a la alta incidencia de las mutaciones PTEN en el cáncer de endometrio endometriode. Se

ha sugerido que la inactivación de PTEN puede transferir la “adicción oncogénica” celular de una ruta de receptor activado a una señalización PI3K-AKT activada constitutivamente, y de esta manera da lugar a resistencia a la inhibición del receptor (21). Además, el ErbB2 que se sobre-expresa en tumores de mama con PTEN reducido o ausente son relativamente resistentes a los regímenes de quimioterapia que contienen trastuzumab (22, 23). Hay que señalar que además de la pérdida de PTEN, la inhibición de FGFR2 con un inhibidor pan-FGFR induce la muerte celular y la detención del ciclo celular en células AN3CA. Por lo tanto, las células AN3CA son todavía adictas a la señal oncogénica de FGFR2. De manera interesante, el tratamiento con PD173074 inducía una detención del ciclo celular pero no daba como resultado un aumento de tinción con Anexina V en células MFE296 (datos no mostrados). Sigue por determinar si solo la detención del ciclo celular es responsable de la eficacia del PD173074 en células MFE296, o si está implicado también un mecanismo desconocido en la inducción de muerte celular negativa a Anexina V.

Se ha sugerido que la adicción oncogénica que resulta de la activación de Src, BCR-ABL y EGFR comparte una cascada de señalización común, ya que la inactivación oncogénica está asociada con una rápida pérdida de ERK, AKT y STAT3/5 fosforilados y la activación retardada de p38 (17). Los inventores informan en el presente documento que la inhibición de FGFR2 en medios de cultivo completos se asocia con una pérdida de ERK fosforilada y una inhibición parcial de AKT, pero no tiene efecto sobre el estado de fosforilación de STAT3 ni de p38. El mecanismo subyacente de la adicción al FGFR2 activado en células AN3CA y MFE296, por lo tanto, es distinto de otros modelos de adicción oncogénica.

La muerte celular inducida por la inhibición pan-FGFR con PD173074 se correlaciona con la inhibición completa de la activación de ERK1/2 en medios suplementados tanto con un 10 % de FBS como con un 0,2 % de FBS. De manera inesperada, debido al estado mutante de PTEN en células AN3CA, el tratamiento con PD173074 daba como resultado una pérdida parcial de la fosforilación de AKT en el medio que contenía un 10 % de FBS. Por lo tanto, es posible que el FGFR2 medie en la fosforilación de AKT corriente abajo de PTEN. Además, en queratinocitos de ratón, se ha demostrado que el factor de crecimiento tipo insulina I altera la fosforilación por medio de un mecanismo independiente de PI3K que implica la regulación de la proteína fosfatasa mediada por la proteína cinasa (24). El mecanismo responsable de la disminución de la fosforilación de AKT que se observa después del tratamiento con PD173074 en células AN3CA y MFE296 sigue por determinar. Sin embargo, la muerte celular inducida por PD173074 que se observa en las células AN3CA probablemente es independiente de esta desfosforilación de AKT. Las curvas de respuesta a la concentración que se llevan a cabo en un 0,2 % de FBS generaban una  $CI_{50}$  similar para las células AN3CA que la generada en un 10 % de FBS (datos no mostrados). Como las células AN3CA cultivadas en un 0,2 % de FBS no mostraban una desfosforilación pronunciada de AKT, estos datos en conjunto sugieren que la desfosforilación de AKT no es necesaria para la muerte celular inducida por PD173074 en esta línea celular.

En resumen, los inventores han demostrado que las mutaciones de FGFR2 coinciden con la inactivación de PTEN y que son mutuamente excluyentes con las mutaciones KRAS2 en los cánceres de endometrio endometrioides primarios.

El bloqueo de la señalización de FGFR2 por caída por ARNhp o el tratamiento con un inhibidor pan-FGFR, PD173074, daba como resultado la detención del ciclo celular y la muerte celular de las líneas celulares de cáncer de endometrio que expresan FGFR2 activado. Las rutas celulares que se alteran después de la inhibición de FGFR2, sin embargo, eran distintas que las que se observaban después de la inhibición de otros oncogenes en los que se ha demostrado adicción oncogénica. Un nuevo mecanismo de adicción oncogénica asociada con la activación de FGFR2 en el cáncer de endometrio parece probable. Estos datos en conjunto muestran que la inhibición del FGFR2 mutante constitutivamente activo es terapéuticamente beneficioso para los pacientes de cáncer de endometrio a pesar de la frecuente inactivación de PTEN en este tipo de cáncer.



## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de clasificación del tipo de cáncer de endometrio como un cáncer de endometrio inducido por la activación del receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la exploración *in vitro* de una mutación de receptor en un FGFR2 en una muestra biológica que contiene células del cáncer de endometrio, en el que la mutación del FGFR2 se asocia con activación del receptor FGFR2 que aumenta el nivel de actividad de la ruta de transducción de la señal de FGFR2 en comparación con un control, y clasificar el tipo de cáncer de endometrio como un cáncer de endometrio inducido por la activación del FGFR2 tras detectar una mutación de activación del FGFR2 en las células de cáncer de endometrio, en el que la mutación es una sustitución de un aminoácido del FGFR2 que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- 5
- 10 (a) una mutación de S por W en la posición 252 de SEQ ID NOS: 2 o 3;  
 (b) una mutación de K por R en la posición 310 de SEQ ID NOS: 2 o 3;  
 (c) una mutación de A por T en la posición 315 de SEQ ID NO: 3;  
 (d) una mutación de S por C en la posición 373 de SEQ ID NO: 2 o la posición 372 de SEQ ID NO: 3;  
 (e) una mutación de Y por C en la posición 376 de SEQ ID NO: 2 o la posición 375 de SEQ ID NO: 3;
- 15 (f) una mutación de C por R en la posición 383 de SEQ ID NO: 2 o la posición 382 de SEQ ID NO: 3;  
 (g) una mutación de M por R en la posición 392 de SEQ ID NO: 2 o la posición 391 de SEQ ID NO: 3;  
 (h) una mutación de I por V en la posición 548 de SEQ ID NO: 2 o la posición 547 de SEQ ID NO: 3;  
 (i) una mutación de N por K en la posición 550 de SEQ ID NO: 2 o la posición 549 de SEQ ID NO: 3; o  
 (j) una mutación de K por E en la posición 660 de SEQ ID NO: 2 o la posición 659 de SEQ ID NO: 3,
- 20 o la mutación es una sustitución en un nucleótido que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- (i) una mutación de A por G en la posición 929 de SEQ ID NO: 1;  
 (ii) una mutación de T por G en la posición 1650 de SEQ ID NO: 1;  
 (iii) una mutación de C por G en la posición 755 de SEQ ID NO: 1;  
 (iv) una mutación de T por A en la posición 1650 de SEQ ID NO: 1;
- 25 (v) una mutación de A por G en la posición 1127 de SEQ ID NO: 1;  
 (vi) una mutación de C por G en la posición 1118 de SEQ ID NO: 1;  
 (vii) una mutación de T por C en la posición 1147 de SEQ ID NO: 1;  
 (viii) una mutación de T por G en la posición 1175 de SEQ ID NO: 1;  
 (ix) una mutación de A por G en la posición 1642 de SEQ ID NO: 1;
- 30 (x) una mutación de A por G en la posición 1978 de SEQ ID NO: 1.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que cuando la mutación de FGFR2 es una sustitución en un nucleótido, la sustitución en el nucleótido se explora en ADN, ARN y/o ADNc genómicos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se detectan al menos dos mutaciones de activación del receptor FGFR2 en las células de cáncer de endometrio.
- 35 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que también se detecta una mutación inactivadora de PTEN en la muestra biológica.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la clasificación se utiliza para desarrollar un tratamiento para un sujeto que tiene un cáncer de endometrio.
- 40 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mutación da como resultado el aumento de la unión al ligando, afinidad de ligando promiscua, dimerización constitutiva del receptor, reciclado deficiente con degradación retardada, o activación de cinasas, activando de esta manera el receptor FGFR2.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cáncer es un subtipo histológico endometriode.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sujeto es un ser humano y el FGFR2 es un mutante constitutivamente activo.

Figura 1

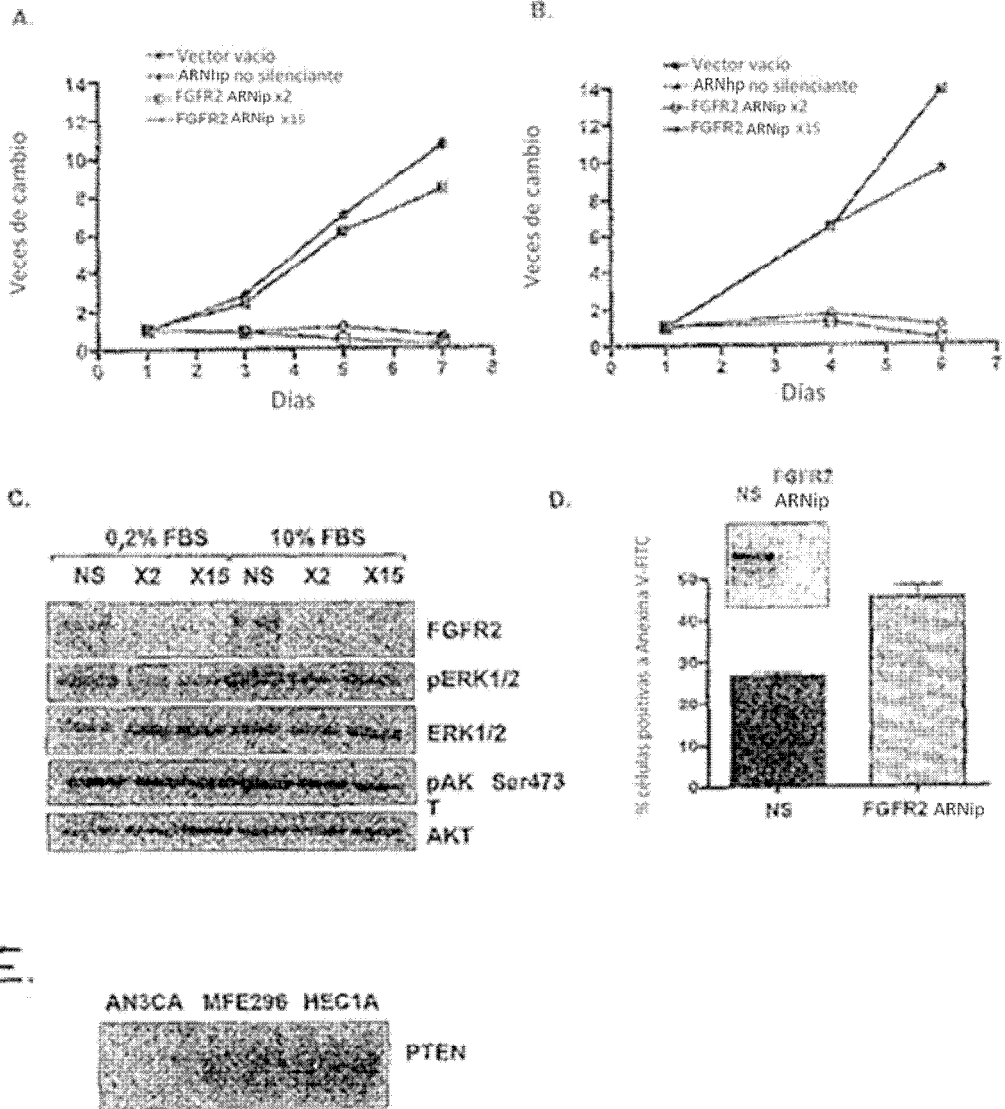
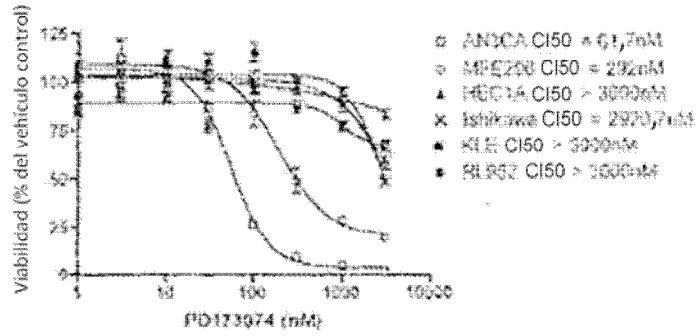
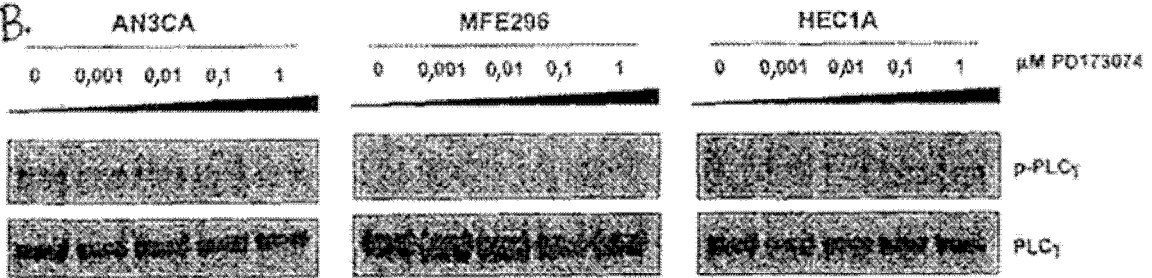


Figura 2

A.



B.



C.

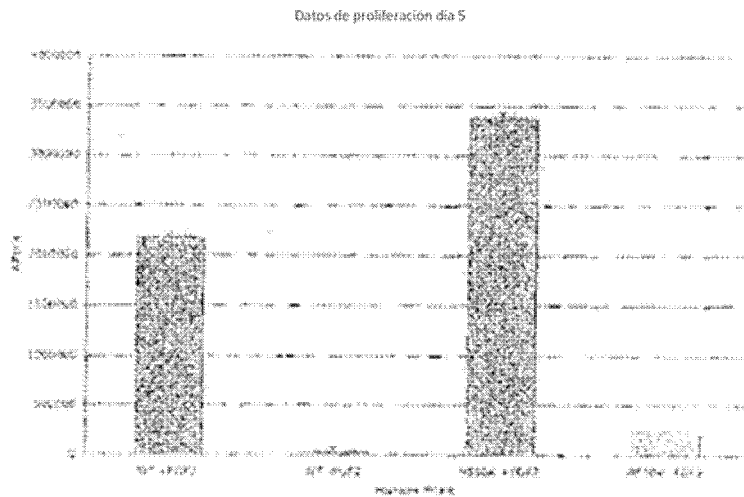


Figura 3

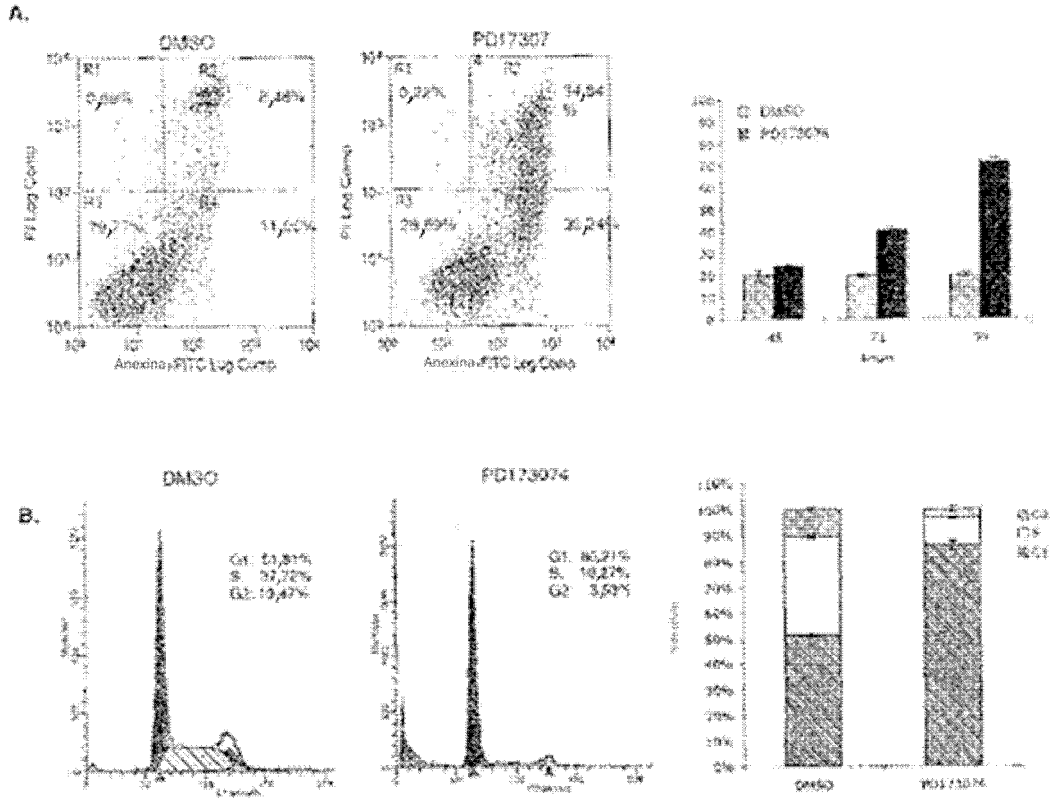


Figura 4

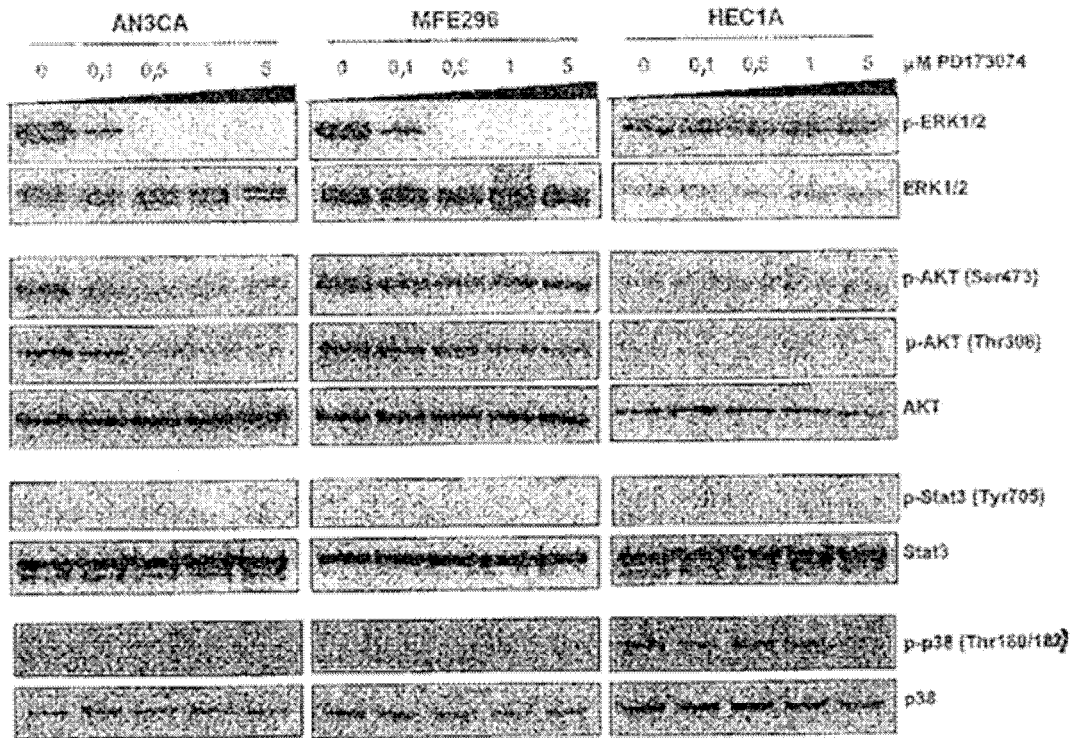
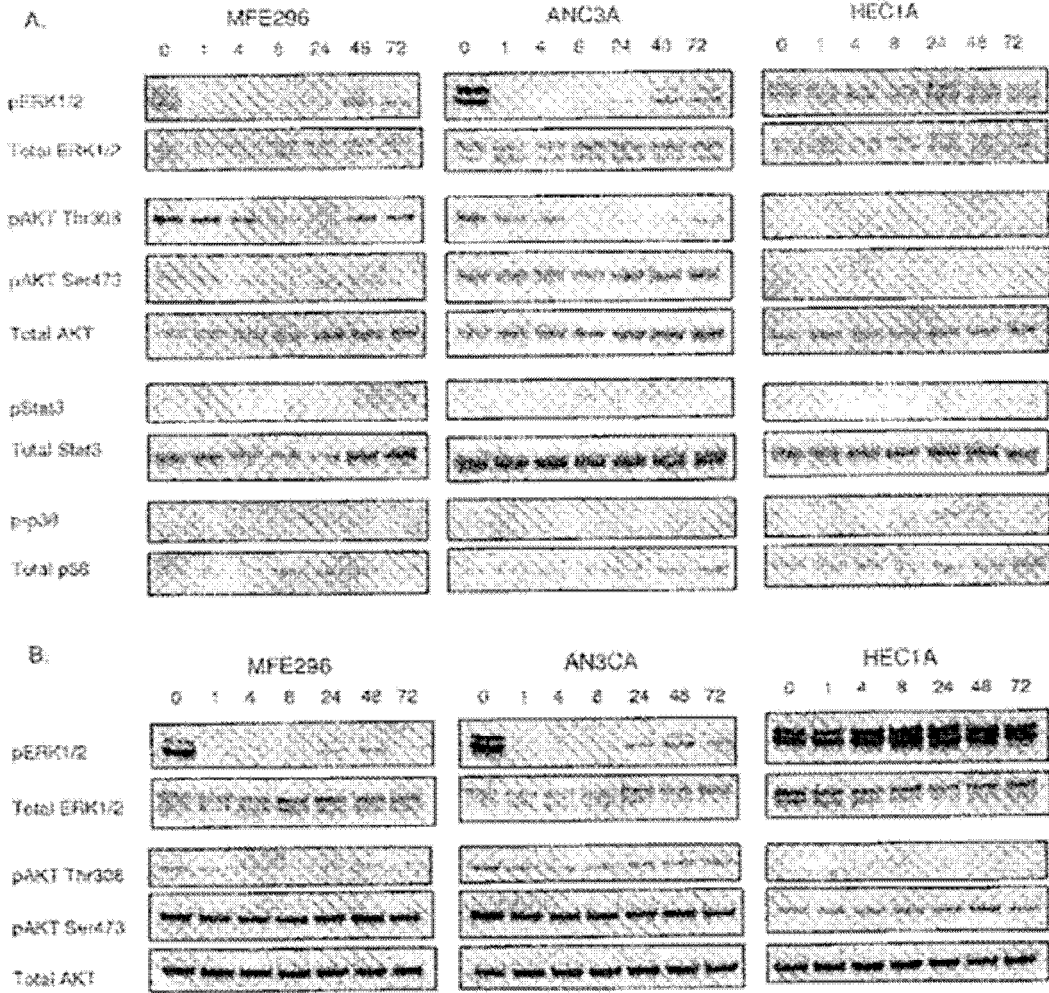


Figura 5



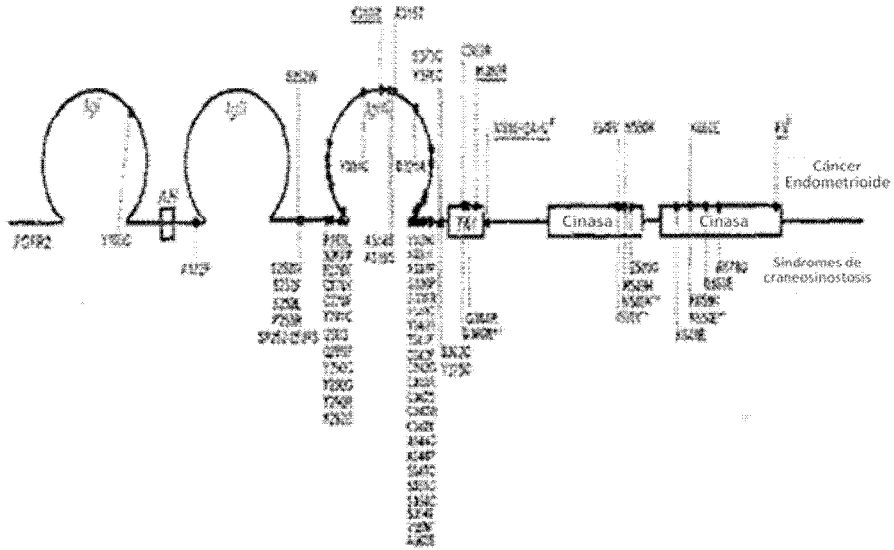


Figura 6