

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 883**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2013 PCT/US2013/047925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14011398**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2013 E 13735529 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2870261**

54 Título: **Biomarcadores asociados con inhibidores de CDK**

30 Prioridad:

09.07.2012 US 201261669534 P

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

04.04.2018

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (33.3%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH;
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(33.3%) y
BROAD INSTITUTE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CAPONIGRO, GIORDANO;
DELACH, SCOTT;
GARRAWAY, LEVI;
JAGANI, ZAINAB;
KIM, SUNKYU y
KRYUKOV, GREGORY**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 661 883 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

Biomarcadores asociados con inhibidores de CDK

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la farmacogenómica y al uso de biomarcadores útiles para determinar la sensibilidad celular a un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, métodos de tratamiento y cribado de compuestos.

Antecedentes

10 La ciclina D3 humana (CCND3) se clonó primero en 1992, mediante el cribado de genes que regularían el ciclo celular, específicamente en la progresión de la fase G1-S (Xiong et al., *Genomics* 1992, 13: 575-584, Motokura et al., *J. Biol. Chem.* 1992, 267: 20412 - 20415). Es una de las tres ciclinas de tipo D (ciclinas D1, D2 y D3). Se descubrió que CCND3 como una ciclina de tipo D se ensamblaría con quinasas dependientes de ciclina CDK4 y CDK6 para formar holoenzimas que facilitan la progresión a través de G1 del ciclo celular (Bates et al., *Oncogene* 1994, 9: 71-79). Una vez que se supera el G1 tardío, ya no es necesario CCND3 para la progresión del ciclo celular (Sherr, *Trends in Bio. Sci* 1995, 20 (5) 187-190).

15 Estructuralmente, CCND3 contiene un dominio ciclina y dos dominios PEST. Los dominios PEST se utilizan para la degradación mediada por ubiquitina y se encuentran en proteínas que la célula necesita para regular o recambiar rápidamente. Los dominios PEST están enriquecidos en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) y varían de 12 a 60 aminoácidos de longitud. La CCND3 humana contiene un dominio PEST en los aminoácidos 256-268 (inclusive) y 271-291 (inclusive). Al investigar el papel de los dominios PEST, los
20 investigadores encontraron que un SNP de un solo alelo en CCND3 dio como resultado un cambio de aminoácido de serina por alanina en el aminoácido 259 (S259A). El cambio de S259A rompió el dominio PEST y, como resultado, la CCND3 variante tenía estabilidad aumentada cuando se comparó con el alelo no mutado (Savas et al., *OMICS* 2007, 11 (2): 200-208).

25 Se requiere CCND3 en el desarrollo de linfocitos. Cuando se generaron ratones con inactivación de CCND3 (CCND3^{-/-}) para probar la función de CCND3 (Sicinska et al., *Cancer Cell* 2003, 4 (6): 451-461), estos ratones con inactivación no experimentaron una expansión normal de células T inmaduras, un defecto muy específico del tejido. Para abordar el papel que puede jugar CCND3 en las neoplasias de células T, los ratones con inactivación de
30 CCND3 se cruzaron con ratones que sobreexpresan p56LCK, que muestran un gran número de tumores de células T. Los ratones que expresan CCND3/p56LCK de tipo silvestre formaron neoplasias de células T rápidamente. Por el contrario, la formación de neoplasias de células T se retrasó 6-8 semanas en ratones con inactivación de CCND3/p56LCK. Usando estos datos para investigar neoplasias humanas, el mismo grupo usó un enfoque de ARNip para la inhibición de CCND3 en líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda (T-ALL) de células T humanas. La inactivación de CCND3 en las 12 líneas celulares analizadas inhibió significativamente la proliferación celular, confirmando los datos del ratón y demostrando la importancia de CCND3 en las neoplasias de células T
35 humanas.

Las mejoras en la facilidad, velocidad y costo de las tecnologías de secuenciación de ADN han permitido a los investigadores examinar el genoma completo de una célula cancerosa para detectar alteraciones. Tomando este enfoque, dos grupos realizaron un análisis genómico completo del linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) con el fin de encontrar genes específicos y vías que pueden ser responsables de este cáncer (Pasqualucci et al., *Nature Genetics* 2011, 43 (9): 830 - 837; Morin et al., *Nature* 2011, 476: 298 - 303). Este enfoque encontró mutaciones de
40 CCND3 en 3/54 de los DLBCL probados.

En esta divulgación, se usa una mutación de CCND3 en un dominio PEST como un biomarcador o indicador, prediciendo y seleccionando pacientes para una terapia específica. Encontrar biomarcadores que indiquen qué
45 paciente debe recibir un tratamiento terapéutico es útil, especialmente con respecto al cáncer. Esto permite un tratamiento más oportuno y agresivo en comparación con un enfoque de prueba y error. Además, el descubrimiento de biomarcadores que indican que las células continúan siendo sensibles a la terapia después de la administración también es útil. Estos biomarcadores se pueden usar para monitorizar la respuesta de aquellos pacientes que reciben el tratamiento. Si los biomarcadores indican que el paciente se ha vuelto insensible al tratamiento, entonces la dosis administrada puede aumentarse, disminuirse, suspenderse por completo o administrarse una terapia
50 terapéutica adicional. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar biomarcadores asociados con inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (CDK). Este enfoque asegura que los pacientes correctos reciban el tratamiento apropiado y durante el transcurso del tratamiento se puede controlar al paciente para determinar la sensibilidad continua al inhibidor de CDK.

En el desarrollo de inhibidores de CDK, los biomarcadores específicos ayudarán a comprender el mecanismo de acción tras la administración. El mecanismo de acción puede implicar una cascada compleja de mecanismos reguladores en el ciclo celular y la expresión génica diferencial. Este análisis se realiza en la etapa preclínica del desarrollo del fármaco con el fin de determinar la sensibilidad particular de las células cancerosas al candidato del inhibidor de CDK y la actividad del candidato. De particular interés en la investigación farmacodinámica es la identificación de marcadores específicos de sensibilidad y actividad, tal como las descritas aquí.

Sumario de la invención

La divulgación permite que la mutación en el dominio PEST de la ciclina D3 (en adelante "CCND3") actúe como un biomarcador específico para determinar la sensibilidad de las células a los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina 4 y/o la quinasa dependiente de ciclina 6 (en adelante "CDKi"). La divulgación incluye un análisis de mutaciones de CCND3 que da como resultado una "firma genética" para CDKi que ha aumentado la precisión y la especificidad en la predicción de qué células cancerosas son sensibles a un CDKi. El método analiza la mutación de CCND3 en un dominio PEST, en una muestra de cáncer tomada de un paciente y se compara con un control no canceroso o normal y predice la sensibilidad de la muestra de cáncer a un CDKi. El análisis de la mutación de CCND3 puede ser indicativo de una respuesta favorable o desfavorable. La invención es un ejemplo de "medicina personalizada" en la que los pacientes se tratan basándose en una firma genómica funcional que es específica para ese individuo.

El valor predictivo de las mutaciones CCND3 en el dominio PEST también se puede usar después del tratamiento con un CDKi para determinar si el paciente permanece sensible al tratamiento. Una vez que se ha administrado el agente terapéutico CDKi, se puede usar una mutación de CCND3 en el dominio PEST como un biomarcador para monitorizar la sensibilidad continua del paciente al tratamiento con CDKi. Esto es útil para determinar que los pacientes reciban el tratamiento correcto. La divulgación comprende un método para predecir y controlar la sensibilidad de un paciente al tratamiento con CDKi. El método incluye la etapa de administración de un CDKi a un paciente y el análisis de una mutación de CCND3 en una muestra biológica obtenida del paciente tratado y la comparación de CCND3 en una muestra no cancerosa o normal. La respuesta del paciente se evalúa en función de la detección de una mutación de CCND3 en un dominio PEST. Además, la detección y/o alteración en el nivel de expresión de la proteína CCND3 de una célula que contiene una mutación de CCND3 en comparación con una célula control normal o de tipo silvestre puede ser predictiva de la sensibilidad del paciente al tratamiento. El patrón de cambios en el nivel de expresión de la proteína mutante CCND3 puede ser indicativo de una respuesta favorable o una respuesta desfavorable del paciente.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de la proteína CCND3 y ciertas mutaciones. Los dominios PEST de CCND3 son los aminoácidos 256-268 y 271-291 de CCND3 humana.

La Figura 2A es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 de tipo silvestre que demuestran insensibilidad a CDKi (1).

La Figura 2B es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 mutante que demuestra sensibilidad a CDKi (1).

La Figura 2C es un diagrama de caja de valores de EC^{50} para líneas celulares de CCND3 mutadas y de tipo silvestre tratadas con CDKi (1).

La Figura 3A es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 de tipo silvestre que demuestran insensibilidad a CDKi (2).

La Figura 3B es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 mutante que demuestran sensibilidad a CDKi (2).

La Figura 3C es un diagrama de caja de los valores de EC^{50} para las líneas celulares de CCND3 mutadas y de tipo silvestre tratadas con CDKi (2).

La Figura 4A es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 de tipo silvestre que demuestran insensibilidad a CDKi (3).

La Figura 4B es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 mutante que demuestran insensibilidad a CDKi (3).

La Figura 4C es un diagrama de caja de los valores de EC⁵⁰ para las líneas celulares de CCND3 mutadas y de tipo silvestre tratadas con CDKi (3).

Las Figuras 5A/B son transferencias Western que demuestran que las mutaciones CCND3 dan como resultado una mayor estabilidad de la proteína.

- 5 La Figura 6A es una transferencia Western que muestra que las células que contienen una mutación de CCND3 dan como resultado niveles más altos de proteína mutante CCND3.

La Figura 6B es una representación gráfica de la expresión de ARNm en líneas celulares de tipo silvestre y líneas celulares que contienen una mutación de CCND3.

Descripción de la invención

- 10 Un método para determinar la sensibilidad de una célula cancerosa a un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDKi), comprendiendo el método: a) ensayar una mutación de ciclina D3 (CCND3) en una célula cancerosa; en el que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST y b) comparación de la mutación de CCND3 con una célula de control no cancerosa o normal, en la que presencia de una mutación de CCND3 en la célula cancerosa indica que es sensible a un CDKi; en donde la célula cancerosa se selecciona del grupo que consiste en: linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda de células B y linfoma de Burkitt.

El método, en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO. 2

El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO. 2

- 20 El método en el que la mutación de CCND3 es cualquier mutación en la Tabla 2.

El método en el que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina por lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina por treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina por leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina por serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina por ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).

- 25 El método en el que la CDKi se selecciona de la Tabla 1.

- Un método para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para el tratamiento con un CDKi, comprendiendo el método: a) ensayar una mutación de CCND3 en una muestra de cáncer obtenida del paciente; en el que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST y b) comparación de la mutación de CCND3 con una muestra control no cancerosa o normal en la que la presencia de una mutación de CCND3 en la muestra de cáncer indica que el paciente es sensible al tratamiento con un CDKi; en el que la muestra de cáncer se selecciona del grupo que consiste en: linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia aguda de células B linfoblásticas y linfoma de Burkitt.

- 30 El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO. 2

- 35 El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO. 2

El método en el que la mutación de CCND3 es cualquier mutación en la Tabla 2.

- 40 El método en el que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina por lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina por treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina por leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina por serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina por ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).

El método en el que la CDKi se selecciona de la Tabla 1.

- 45 El método que comprende adicionalmente: c) medir la expresión de proteína diferencial de CCND3 en una muestra de cáncer obtenida del paciente; y d) comparar la expresión de proteína de CCND3 en la muestra de cáncer con la expresión de proteína CCND3 de una muestra de control no cancerosa o normal, donde los niveles incrementados de proteína CCND3 en la muestra de cáncer indican que el paciente es sensible al tratamiento con un CDKi.

- Una CDKi para uso en un método para tratar a un paciente con cáncer, comprendiendo el método: a) ensayar mutaciones de CCND3 en una muestra de cáncer obtenida del paciente; en donde la mutación de CCND3 está en un dominio PEST b) comparar el estado mutacional de CCND3 en la muestra de cáncer con una muestra control no cancerosa o normal en donde la presencia de una mutación de CCND3 indica que el paciente es sensible al tratamiento con un CDKi; c) administrar al paciente un CDKi; y d) ensayar la supresión del crecimiento tumoral; en el que la muestra de cáncer se selecciona del grupo que consiste en: linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia aguda de células B linfoblásticas y linfoma de Burkitt.
- 5
- La CDKi para uso en un método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO. 2
- 10
- La CDKi para su uso en un método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO. 2
- La CDKi para uso en un método en el que la mutación de CCND3 es cualquier mutación en la Tabla 2.
- La CDKi para uso en un método en el que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina por lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina por treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina por leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina por serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina por ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).
- 15
- La CDKi para uso en un método en el que la CDKi se selecciona de la Tabla 1.
- Un método para el cribado de candidatos a CDKi, comprendiendo el método: a) poner en contacto una célula que contiene una mutación de CCND3 con un candidato a CDKi en el que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST; b) medir la reducción en la viabilidad celular; y c) comparar la reducción en la viabilidad celular de la célula mutante CCND3 puesta en contacto con el candidato a CDKi con la viabilidad celular de la célula mutante CCND3 puesta en contacto con un CDKi de control; en el que la célula que contiene una mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia aguda de células B linfoblásticas y linfoma de Burkitt.
- 20
- El método en el que el CDKi de control se selecciona de la Tabla 1.
- 25
- El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO. 2
- El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO. 2
- 30
- El método en el que la mutación de CCND3 es cualquier mutación en la Tabla 2.
- El método en el que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina por lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina por treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina por leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina por serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina por ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).
- 35
- Definiciones
- Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de las mismas.
- 40
- Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, que incluyen intervalos, son aproximaciones que se varían (+) o (-) en incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no siempre se indica explícitamente, que los reactivos descritos en este documento son meramente ejemplos y que se conocen en la técnica equivalentes de los mismos.
- 45
- Los términos "marcador" o "biomarcador" se usan indistintamente en este documento. Un biomarcador es un ácido nucleico o polipéptido y la presencia o ausencia de una mutación o expresión diferencial del polipéptido se usa para determinar la sensibilidad a cualquier CDKi. Por ejemplo, CCND3 es un biomarcador en una célula cancerosa cuando está mutado en comparación con CCND3 en células normales (no cancerosas) o células de control.

Una célula es "sensible" o muestra "sensibilidad" para la inhibición con un CDKi cuando la viabilidad celular se reduce tras el tratamiento con la CDKi en comparación con un control no tratado.

5 "CCND3" se refiere al gen D3 de ciclina. A menos que se indique específicamente lo contrario, CCND3 como se usa en este documento, se refiere a CCND3 humana, números de acceso BC011616 (ácido nucleico de CCND3 (SEQ ID NO: 1)) y AAH11616 (proteína CCND3 (SEQ ID NO: 2)).

Un "tipo silvestre", "normal" o "no mutante" se refiere a las secuencias de CCND3 que comprende los números de acceso BC011616/AAH11616 (ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) y proteína (SEQ ID NO: 2) respectivamente).

10 Un "mutante" o "mutación" es cualquier cambio en la secuencia de ADN o proteína que se desvía de CCND3 de tipo silvestre. Esto incluye sin limitación: cambios de ácido nucleico de base única o cambios, inserciones, supresiones y truncamientos de aminoácidos únicos del gen de CCND3 y su proteína correspondiente.

Una "célula de control", "célula normal" o "de tipo silvestre" se refiere a tejido o células no cancerosas.

Un "tejido de control", "tejido normal" o "de tipo silvestre" se refiere a tejido o células no cancerosas.

15 Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un
20 polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, pueden impartirse modificaciones a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcación. El término también se refiere a moléculas de cadena doble y sencilla. A menos
25 que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de esta invención que sea un polinucleótido abarca tanto la forma de doble cadena como cada una de las dos formas complementarias de cadena sencilla o se predice que constituyen la forma de doble cadena.

30 Un "gen" se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto (ORF) que es capaz de codificar un polipéptido o proteína particular después de transcribirse y traducirse. Se puede usar una secuencia de polinucleótidos para identificar fragmentos más grandes o secuencias de codificación de longitud completa del gen con el que están asociados. Los expertos en la técnica conocen métodos para aislar secuencias de fragmentos más grandes.

"Expresión génica" o alternativamente un "producto génico" se refiere a los ácidos nucleicos o aminoácidos (por ejemplo, péptido o polipéptido) generados cuando se transcribe y traduce un gen.

35 El término "polipéptido" se usa de manera intercambiable con el término "proteína" y en su sentido más amplio se refiere a un compuesto de dos o más aminoácidos de subunidades, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades se pueden unir mediante enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar unida por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc.

40 Como se usa en este documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, y a los isómeros ópticos D y L, a los análogos de aminoácidos, y a los peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina comúnmente oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina comúnmente polipéptido o proteína.

45 El término "aislado" significa separado de constituyentes, celulares y de otro tipo, en los que el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento o fragmentos de los mismos, normalmente están asociados en la naturaleza. Por ejemplo, un polinucleótido aislado se separa de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con los que normalmente está asociado dentro de su entorno nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento o fragmentos de los mismos, que no son de origen natural, no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su
50 contraparte natural. Además, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento o fragmentos de los mismos, un polinucleótido "concentrado", "separado" o "diluido", se distingue de su homólogo natural en que la concentración o el número de moléculas por volumen es mayor en una versión "concentrada" o menor que en una versión "separada" que la de su contraparte natural. Un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento o fragmentos de los mismos, que difiere de su contraparte de origen natural en su secuencia primaria o,

por ejemplo, por su patrón de glicosilación, no necesita estar presente en su forma aislada ya que puede distinguirse de su contraparte de origen natural por su secuencia primaria o, alternativamente, por otra característica como el patrón de glicosilación. Por lo tanto, se proporciona un polinucleótido no natural como una realización separada del polinucleótido natural aislado. Se proporciona una proteína producida en una célula bacteriana como una realización separada de la proteína de origen natural aislada de una célula eucariota en la que se produce en la naturaleza.

Una "sonda" cuando se usa en el contexto de la manipulación de polinucleótidos se refiere a un oligonucleótido que se proporciona como un reactivo para detectar un objetivo potencialmente presente en una muestra de interés mediante hibridación con el objetivo. Usualmente, una sonda comprenderá una etiqueta o un medio por el cual se puede unir una etiqueta, ya sea antes o después de la reacción de hibridación. Los marcadores adecuados incluyen, pero sin limitación, radioisótopos, fluorocromos, compuestos quimioluminiscentes, colorantes y proteínas, incluidas las enzimas.

Un "cebador" es un polinucleótido corto, generalmente con un grupo 3'-OH libre que se une a un objetivo o "molde" potencialmente presente en una muestra de interés hibridando con el objetivo, y que promueve después la polimerización de un polinucleótido complementario al objetivo. Una "reacción en cadena de la polimerasa" ("PCR") es una reacción en la que se elaboran copias replicadas de un polinucleótido objetivo usando un "par de cebadores" o un "conjunto de cebadores" que consiste en un cebador "en dirección 5'" y "en dirección 3'", y un catalizador de polimerización, tal como una ADN polimerasa, y típicamente una enzima polimerasa térmicamente estable. Los métodos para la PCR son bien conocidos en la técnica, y se enseñan, por ejemplo, en PCR: A Practical Approach, M. MacPherson et al., IRL Press en Oxford University Press (1991). Todos los procesos de producción de copias replicadas de un polinucleótido, tales como PCR o clonación de genes, se denominan colectivamente aquí como "replicación". También puede usarse un cebador como sonda en reacciones de hibridación, tales como análisis de transferencia Southern o Northern (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición (1989)).

Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso mediante el cual el ADN se transcribe en ARNm y/o el proceso mediante el cual el ARNm transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir empalme del ARNm en una célula eucariota.

"Expresado de manera diferencial" como se aplica a un gen, se refiere a la producción diferencial del ARNm transcrito y/o traducido del gen o producto proteico codificado por el gen. Un gen expresado diferencialmente puede ser sobreexpresado o subexpresado en comparación con el nivel de expresión de una célula normal o de control. Sin embargo, como se usa aquí, la sobreexpresión es un aumento en la expresión génica y generalmente es al menos 1,25 veces o, alternativamente, al menos 1,5 veces o, alternativamente, al menos 2 veces, o alternativamente, al menos 3 veces o alternativamente, al menos 4 veces la expresión sobre la detectada en una célula o tejido homólogo normal o de control. Como se usa en este documento, subexpresión, es una reducción de la expresión génica y generalmente es al menos 1,25 veces, o alternativamente, al menos 1,5 veces, o alternativamente, al menos 2 veces o alternativamente, al menos 3 veces o alternativamente, al menos 4 veces la expresión inferior a la detectada en una célula o tejido homólogo normal o de control. El término "expresado diferencialmente" también se refiere a dónde se detecta la expresión en una célula cancerosa o tejido canceroso, pero la expresión en una célula de control o tejido normal (por ejemplo, célula o tejido no canceroso) es indetectable.

Se puede producir un alto nivel de expresión del gen debido a la sobreexpresión del gen o un aumento en el número de copias del gen. El gen también se puede traducir en un aumento de los niveles de proteína debido a la desregulación o la ausencia de un regulador negativo. Por último, puede producirse una alta expresión del gen debido al aumento de la estabilización o la degradación reducida de la proteína, lo que da como resultado la acumulación de la proteína.

Un "perfil de expresión génica" o "firma genética" se refiere a un patrón de expresión de al menos un biomarcador que se repite en muestras múltiples y refleja una propiedad compartida por esas muestras, tal como mutación, respuesta a un tratamiento particular, o activación de un proceso o ruta biológica particular en las células. Un perfil de expresión génica diferencia entre muestras que comparten esa propiedad común y aquellas que no lo hacen con una precisión mayor que la que probablemente se lograría al asignar las muestras a los dos grupos al azar. Un perfil de expresión génica puede usarse para predecir si las muestras de estado desconocido comparten esa propiedad común o no. Es de esperar cierta variación entre el biomarcador o biomarcadores y el perfil típico, pero la similitud general del biomarcador o biomarcadores con el perfil típico es tal que es estadísticamente improbable que se observe similitud por casualidad en muestras que no comparten la propiedad común que reflejan el biomarcador o biomarcadores.

El término "ADNc" se refiere a ADN complementario, es decir, moléculas de ARNm presentes en una célula u organismo transformado en ADNc con una enzima tal como transcriptasa inversa. Una "biblioteca de ADNc" es una colección de todas las moléculas de ARNm presentes en una célula u organismo, todas convertidas en moléculas de ADNc con la enzima transcriptasa inversa, luego insertadas en "vectores" (otras moléculas de ADN que pueden continuar replicándose después de la adición de ADN foráneo). Los ejemplos de vectores para bibliotecas incluyen

bacteriófagos (también conocidos como "fagos"), virus que infectan bacterias, por ejemplo, fagos lambda. La biblioteca puede ser probada para el ADNc específico (y, por lo tanto, ARNm) de interés.

Como se usa en el presente documento, "soporte de fase sólida" o "soporte sólido", usado indistintamente, no está limitado a un tipo específico de soporte. Por el contrario, hay una gran cantidad de soportes disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Los soportes de fase sólida incluyen geles de sílice, resinas, películas plásticas sometidas a derivación, perlas de vidrio, perlas de plástico, geles de alúmina, microarreglos y chips. Como se usa en el presente documento, "soporte sólido" también incluye matrices sintéticas presentadores de antígeno, células y liposomas. Se puede seleccionar un soporte de fase sólida adecuado con base en el uso final deseado y la idoneidad para diversos protocolos. Por ejemplo, para la síntesis de péptidos, el soporte en fase sólida puede referirse a resinas tales como poliestireno (por ejemplo, resina PAM obtenida a través de Bachem Inc., Península Laboratories), resina polyHIPE(R)^{MR} (obtenida a través de Aminotech, Canadá), resina de poliamida (obtenido a través de Península Laboratories), resina de poliestireno injertada con polietilenglicol (TentaGelR^{MR}, Rapp Polymere, Tubingen, Alemania), o resina de polidimetilacrilamida (obtenida a través de Milligen/Biosearch, California).

Un polinucleótido también se puede unir a un soporte sólido para uso en ensayos de cribado de alto rendimiento. El documento PCT WO 97/10365, por ejemplo, describe la construcción de chips de oligonucleótidos de alta densidad. Véase también, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.405.783; 5.412.087 y 5.445.934. Usando este método, las sondas se sintetizan en una superficie de vidrio sometida a derivación para formar arreglos de chips. Las fosforamiditas nucleósido fotoprotectadas se acoplan a la superficie del vidrio, se desprotegen selectivamente por fotólisis a través de una máscara fotolitográfica y se hacen reaccionar con una segunda fosforamidita nucleósido protegida. El proceso de acoplamiento/desprotección se repite hasta que se completa la sonda deseada.

Como ejemplo, la actividad transcripcional puede evaluarse midiendo los niveles de ARN mensajero usando un chip génico tal como el Affymetrix® HG-U133-Plus-2 GeneChips (Affymetrix, Santa Clara, CA). De este modo, en un sistema reproducible es posible la cuantificación en tiempo real y a gran escala del ARN de un gran número de genes de interés.

El término "condiciones de hibridación rigurosas" se refieren a las condiciones en las que una sonda de ácido nucleico se hibridará específicamente con su subsecuencia objetivo, y a ninguna otra secuencia. Las condiciones que determinan la rigurosidad de la hibridación incluyen: temperatura, fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturizantes tales como formamida. La variación de uno de estos factores puede influir en otro factor y un experto en la técnica apreciará los cambios en las condiciones para mantener el nivel deseado de rigurosidad. Un ejemplo de una hibridación altamente rigurosa es: cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 65-68°C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M, y formamida al 50% a 42°C (véase Sambrook, citado más arriba). Un ejemplo de hibridación "moderadamente rigurosa" son las condiciones de: cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 50-65°C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 20% a 37-50°C. Las condiciones moderadamente rigurosas se usan cuando se desea una cantidad moderada de falta de coincidencia de ácidos nucleicos. Un experto en la materia apreciará que el lavado es parte de las condiciones de hibridación. Por ejemplo, las condiciones de lavado pueden incluir 0,2X-0,1X SSC/0,1% de SDS y temperaturas de 42-68°C, donde el aumento de la temperatura aumenta la rigurosidad de las condiciones de lavado.

Cuando se produce la hibridación en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos de cadena sencilla, la reacción se denomina "hibridación" y esos polinucleótidos se describen como "complementarios". Un polinucleótido de cadena doble puede ser "complementario" u "homólogo" de otro polinucleótido, si puede producirse una hibridación entre una de las cadenas del primer polinucleótido y la segunda. La "complementariedad" u "homología" (el grado en que un polinucleótido es complementario con otro) es cuantificable en términos de la proporción de bases en cadenas opuestas que se espera formen enlaces de hidrógeno entre sí, de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases generalmente aceptadas.

Un polinucleótido o región de polinucleótido (o un polipéptido o región de polipéptido) tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Eds., (1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferiblemente, se usan parámetros predeterminados para la alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, usando parámetros predeterminados. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP, utilizando los siguientes parámetros predeterminados: código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; esperar = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTAJE ALTO; Bases de datos = no redundante.

El término "trastornos proliferativos celulares" incluye la desregulación de la función fisiológica normal caracterizada por un crecimiento celular anormal y/o división o pérdida de función. Los ejemplos de "trastornos proliferativos celulares" incluyen, pero no se limitan a, hiperplasia, neoplasia, metaplasia y diversos trastornos autoinmunes, por ejemplo, los caracterizados por la desregulación de la apoptosis de las células T.

Como se usa en el presente documento, los términos "células neoplásicas", "enfermedad neoplásica", "neoplasia", "tumor", "células tumorales", "cáncer" y "células cancerosas" (usados indistintamente) se refieren a células que exhiben un crecimiento relativamente autónomo, de modo que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular (es decir, división celular desregulada). Las células neoplásicas pueden ser malignas o benignas. Una "célula o tejido metastásico" significa que la célula puede invadir y destruir las estructuras corporales vecinas. El cáncer puede incluir, entre otros, linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda de células B y linfoma de Burkitt.

El término "PBMC" se refiere a células mononucleares de sangre periférica e incluye "PBL" - linfocitos de sangre periférica.

"Suprimir" o "supresión" del crecimiento tumoral indica una reducción en el crecimiento de células tumorales cuando se ponen en contacto con un CDKi en comparación con el crecimiento tumoral sin contacto con un compuesto CDKi. El crecimiento de células tumorales se puede evaluar por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, medir el tamaño del tumor, determinar si las células tumorales están proliferando usando un ensayo de incorporación de 3H-timidina, medir la captación de glucosa mediante imagenología FDG-PET (tomografía de emisión de positrones de fluorodesoxiglucosa), o conteo de células tumorales. "Suprimir" el crecimiento de células tumorales significa una cualquiera o todas las siguientes etapas: ralentizar, retrasar y detener el crecimiento tumoral, así como la contracción del tumor.

Una "composición" es una combinación de agente activo y otro vehículo, por ejemplo, compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizador, reguladores, sales, disolventes lipófilos, conservantes, adyuvantes o similares. Los vehículos también incluyen excipientes y aditivos farmacéuticos, por ejemplo: proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos y oligosacáridos, azúcares sometidos a derivación tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares, y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes solos o en combinación, que comprenden solos o en combinación 1-99,99% en peso o en volumen. Los excipientes de carbohidratos incluyen, por ejemplo: monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

Los ejemplos de excipientes de proteína incluyen albúmina de suero tal como albúmina de suero humano (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y similares. Los componentes representativos de aminoácidos/anticuerpos, que también pueden funcionar para amortiguación, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares.

El término "vehículo" incluye además un regulador o un agente de ajuste del pH; típicamente, el regulador es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánico. Los reguladores representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o reguladores de fosfato. Los vehículos adicionales incluyen excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficolles (un azúcar polimérico), dextranos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxiopropil-quadrature-ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes saborizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos tensoactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como TWEEN 20^{MR} y TWEEN 80^{MR}), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol) y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

Como se usa en este documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" abarca cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tales como una solución salina regulada con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y varios tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizadores y conservantes y cualquiera de los vehículos indicados anteriormente con la condición adicional de que sean aceptables para uso *in vivo*. Para ejemplos de vehículos, estabilizadores y adyuvantes, véase Remington's Pharmaceutical Science., 15^a ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y en Physician's Desk Reference, 52^a ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998).

Una "cantidad efectiva" es una cantidad suficiente para obtener resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones.

Un "sujeto", "individuo" o "paciente" se usa de forma intercambiable en la presente memoria, que se refiere a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, ratones, simios, humanos, animales de granja, animales de deporte y mascotas.

Un "inhibidor" de CDK (CDKi) como se usa en la presente memoria reduce la asociación de CCND3 y CDK4 y/o CDK6. Esta inhibición puede incluir, por ejemplo, reducir la asociación de CCND3 y CDK4/6 antes de que se unan, o reducir la asociación de CCND3 y CDK4/6 después de que se unan, liberando así ambas moléculas. La reducción puede variar desde una cantidad baja pero detectable hasta la disociación completa de las moléculas.

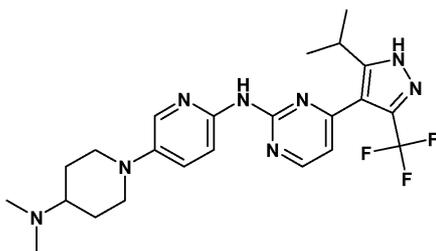
- 5 Se han identificado varias mutaciones de CCND3 como biomarcadores para CDKi. Una mutación de CCND3 en un dominio PEST se puede utilizar para determinar la sensibilidad del paciente a cualquier CDKi. Las mutaciones CCND3 incluyen, sin limitación, inserciones, supresiones, cambios del marco de lectura y una o más mutaciones puntuales en un dominio PEST. Por ejemplo y sin limitación, la mutación de CCND3 en el dominio PEST incluye:
- 10 cambio de isoleucina por lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina por treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina por leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina por serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina por ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D). Por ejemplo, una mutación en CCND3 en un dominio PEST en el aminoácido 290 de isoleucina por treonina (I290T), indica que un paciente con cáncer es sensible a y respondería favorablemente a la administración de cualquier CDKi.

- 15 Los inhibidores de CDK (CDKi) son compuestos que son inhibidores de la asociación CCND3 - CDK4/6, y son útiles junto con los métodos de la invención. Los CDKi son útiles en composiciones farmacéuticas para uso humano o veterinario donde la inhibición de la asociación CCND3 - CDK4/6 está indicada, por ejemplo, en el tratamiento de tumores y/o crecimiento de células cancerosas. Los compuestos CDKi son útiles en el tratamiento, por ejemplo, del linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda de células B y linfoma de Burkitt.

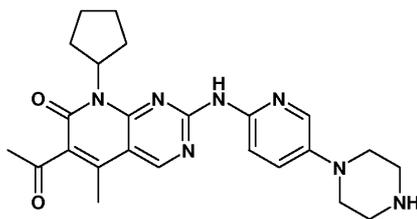
20

Tabla 1 - Compuestos CDKi

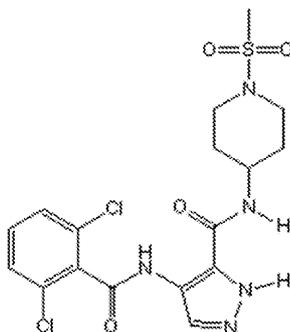
CDKi(1)



CDKi(2)



CDKi(3)



ES 2 661 883 T3

CDKi(4)

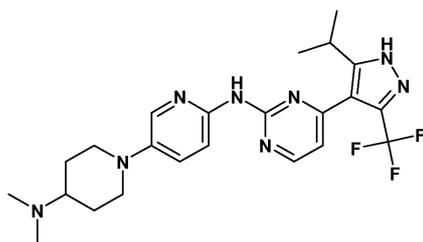


Tabla 2

Símbolo Hugo	Línea Celular	Cambio de ADNc	Cambio de Proteína	Posición de AA UniProt	Frecuencia del alelo iMutante	Predicción PolyPhen	Predicción simple	Subtipo Histológico
CCND3	a4fuk	c.889T>A	p.I290K	290	0,509091	Benigno	LEVE	Linfoma difuso de células B
CCND3	bl70	c.801_802insC	p.P267fs	267_268	0,52			Linfoma, célula B, no Hodgkin, Burkitt
CCNP3	dohh2	c.869T>C	p.I290T	290	0,45283	Benigno	LEVE	Linfoma difuso de células B grandes
CCND3	mc116	c.868_874delA TACACC	p.I290fs	290_292	0,38			Linfoma de células B, no Hodgkin, inespecífico
CCND3	meet	c.860T>A	p.v287D	287	8,662308	Probablemente perjudicial	Cambio de sentido perjudicial	Leucemia linfocítica crónica
CND3	nudh1	c.850C>T	p.P284S	284	0,589189	Probablemente perjudicial	Cambio de sentido perjudicial	Linfoma difuso de células B grandes
CCND3	sem	c.869T>C	p.I290T	290	0,520661	Benigno	LEVE	Leucemia de células B linfoblásticas
CCND3	st486	c.851C>T	p.P284L	284	0,39881	Probablemente perjudicial	Cambio de sentido neutral	Linfoma de Burkitt
CCND3	sudh10	c.869T>C	p.I290T	290	0,439024	Benigno	LEVE	Linfoma difuso de células B grandes

Detección de mutaciones de CCND3

La detección de mutaciones de CCND3 puede realizarse de varias maneras, por ejemplo: secuenciación de ADN, métodos basados en PCR, que incluyen RT-PCR, análisis de microarreglos, transferencia Southern, transferencia Northern y análisis de tira reactiva.

5 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede usarse para amplificar e identificar mutaciones de CCND3 a partir de ADN o ARN genómico extraído de tejido tumoral. La PCR es bien conocida en la técnica y se describe con detalle en Saiki et al., Science 1988, 239: 487 y en la patente de los Estados Unidos N° 4.683.195 y la patente de los Estados Unidos N° 4.683.203.

10 Se proporcionan métodos para detectar mutaciones de CCND3 por hibridación. El método comprende identificar una mutación de CCND3 en una muestra poniendo en contacto ácido nucleico de la muestra con una sonda de ácido nucleico que es capaz de hibridar con ácido nucleico con una mutación de CCND3 o fragmento de la misma y detectar la hibridación. La sonda de ácido nucleico se marca de manera detectable con un marcador tal como un radioisótopo, un agente fluorescente o un agente cromogénico. Los radioisótopos pueden incluir sin limitación; ³H, ³²P, ³³P y ³⁵S, etc. Los agentes fluorescentes pueden incluir sin limitación: FITC, rojo Texas, rodamina, etc.

15 La sonda utilizada en la detección que es capaz de hibridar con ácido nucleico con una mutación de CCND3 puede ser de aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 75 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos. La sonda o sondas pueden proporcionarse en un kit, que comprende al menos una sonda de oligonucleótidos que se hibrida con o hibrida junto a una mutación de CCND3. El
20 kit también puede proporcionar instrucciones para el análisis de muestras de cáncer de pacientes que pueden contener una mutación de CCND3, y las mutaciones de CCND3 indican que el paciente es sensible o insensible al tratamiento con un CDKi.

El polimorfismo conformacional de una sola cadena (SSCP) también puede usarse para detectar mutaciones de CCND3. Esta técnica está bien descrita en Orita et al., PNAS 1989, 86: 2766-2770.

25 Los anticuerpos dirigidos contra CCND3 pueden ser útiles en la detección de cáncer y la detección de formas mutadas de CCND3. Se pueden generar anticuerpos que reconocen y se unen específicamente solo a un mutante específico de CCND3 y no se unen (o se unen débilmente) a CCND3 de tipo silvestre. Estos anticuerpos serían útiles para determinar qué mutación específica estaba presente y también para cuantificar el nivel de proteína CCND3. Por ejemplo, un anticuerpo puede dirigirse contra el cambio de isoleucina por treonina en la posición del
30 aminoácido 290 (I290T). Un anticuerpo que reconoce este cambio de aminoácido y no se une específicamente a CCND3 de tipo silvestre podría identificar la mutación específica en secciones de tejido y también los niveles de proteína mediante transferencia Western. Tales anticuerpos se pueden generar contra una mutación de CCND3 usando péptidos que contienen la mutación de CCND3 específica de interés.

35 Los anticuerpos que pueden distinguir entre epítopos fosforilados y no fosforilados son conocidos en la técnica (Luca et al., PNAS USA 1986 83 (4): 1006-1010). Los anticuerpos dirigidos contra la forma no fosforilada de CCND3 en la treonina en la posición 283 (T283) en el dominio PEST también pueden ser útiles en la detección de formas mutantes de CCND3. Por ejemplo, una mutación en un dominio PEST de CCND3 puede reducir o prevenir la fosforilación de T283. Un procedimiento de tinción con un anticuerpo que reconoce solo la forma no fosforilada de CCND3 combinada con un anticuerpo que reconoce solo una forma mutante de CCND3 validaría y confirmaría
40 además que la muestra del paciente es sensible a un CDKi. En otro ejemplo, la PCR podría realizarse en una muestra de cáncer para detectar la mutación de CCND3, usando técnicas de PCR convencionales como se describió anteriormente. Si una mutación de CCND3 está indicada por PCR, la proteína de la muestra de cáncer puede analizarse mediante un anticuerpo anti-CCND3 que se dirige al epítipo fosforilado. Un resultado positivo de la reacción de PCR y una tinción positiva del anticuerpo que indique que CCND3 no está fosforilado, determinaría que
45 el paciente sería sensible al tratamiento con un CDKi.

Se puede lisar una célula cancerosa que se cree que contiene una mutación de CCND3 y se realiza una transferencia Western para cuantificar la cantidad de proteína mutante de CCND3, usando una célula que contiene CCND3 de tipo silvestre como control. Poca o ninguna detección de la forma fosforilada de CCND3, combinada con la detección de mayores niveles de proteína en la célula cancerosa en comparación con CCND3 de tipo silvestre en
50 una célula normal indicaría que se ha producido una mutación en el CCND3 en la célula cancerosa que reduce o evita la fosforilación y, por lo tanto, esta célula cancerosa sería sensible a un CDKi.

Medición de la expresión génica

La detección de la expresión génica puede realizarse mediante cualquier método apropiado, que incluye, por ejemplo, detectar la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen o la cantidad de ADNc producido a partir de la

transcripción inversa del ARNm transcrito a partir del gen o la cantidad del polipéptido o proteína codificada por el gen. Estos métodos se pueden realizar en una muestra con base en la muestra misma o modificada para análisis de alto rendimiento. Por ejemplo, usando chips de microarreglos Affymetrix^{MR} U133.

5 En un aspecto, la expresión génica se detecta y se cuantifica por hibridación con una sonda que hibrida específicamente con la sonda apropiada para ese biomarcador. Las sondas también se pueden unir a un soporte sólido para usar en ensayos de cribado de alto rendimiento usando métodos conocidos en la técnica. El documento WO 97/10365 y las patentes de Estados Unidos Nos. 5.405.783, 5.412.087 y 5.445.934, por ejemplo, divulgan la construcción de chips de oligonucleótidos de alta densidad que pueden contener una o más de las secuencias divulgadas en este documento. Usando los métodos divulgados en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.405.783, 10 5.412.087 y 5.445.934, las sondas de esta invención se sintetizan en una superficie de vidrio con formación de derivados. Las fosforamidas de nucleósidos fotoprotectidos se acoplan a la superficie del vidrio, se desprotegen selectivamente por fotólisis a través de una máscara fotolitográfica y se hacen reaccionar con una segunda fosforamida de nucleósido protegido. El proceso de acoplamiento/desprotección se repite hasta que se completa la sonda deseada.

15 En un aspecto, el nivel de expresión de un gen se determina a través de la exposición de una muestra de ácido nucleico al chip modificado de la sonda. El ácido nucleico extraído se marca, por ejemplo, con una etiqueta fluorescente, preferiblemente durante una etapa de amplificación. La hibridación de la muestra marcada se realiza a un nivel de rigurosidad apropiado. El grado de hibridación sonda-ácido nucleico se mide cuantitativamente usando un dispositivo de detección. Véanse las patentes de Estados Unidos Nos. 5.578.832 y 5.631.734.

20 Alternativamente, cualquier número de copia de genes, transcripción o traducción puede determinarse usando técnicas conocidas. Por ejemplo, un método de amplificación tal como PCR puede ser útil. Los procedimientos generales para PCR se enseñan en MacPherson et al., PCR: A Practical Approach, (IRL Press en Oxford University Press (1991)). Sin embargo, las condiciones de PCR utilizadas para cada reacción de aplicación se determinan empíricamente. Varios parámetros influyen en el éxito de una reacción. Entre ellos están la temperatura y el tiempo 25 de hibridación, el tiempo de extensión, la concentración de Mg²⁺ y/o ATP, el pH y la concentración relativa de cebadores, moldes y desoxirribonucleótidos. Después de la amplificación, los fragmentos de ADN resultantes se pueden detectar mediante electroforesis en gel de agarosa, seguido de visualización por tinción con bromuro de etidio e iluminación ultravioleta.

30 En una realización, los ácidos nucleicos hibridados se detectan mediante la detección de una o más etiquetas unidas a los ácidos nucleicos de la muestra. Las etiquetas pueden incorporarse mediante cualquiera de una serie de medios bien conocidos por los expertos en la materia. Sin embargo, en un aspecto, la etiqueta se incorpora simultáneamente durante la etapa de amplificación en la preparación del ácido nucleico de la muestra. Por lo tanto, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores marcados o nucleótidos marcados proporcionará un producto de amplificación marcado. En una realización separada, la amplificación de la 35 transcripción, como se describió anteriormente, usando un nucleótido marcado (por ejemplo, UTP y/o CTP marcados con fluoresceína) incorpora una etiqueta en los ácidos nucleicos transcritos.

Alternativamente, se puede añadir un marcador directamente a la muestra de ácido nucleico original (por ejemplo, ARNm, poliA, ARNm, ADNc, etc.) o al producto de amplificación después de que se complete la amplificación. Los expertos en la técnica conocen bien los medios de unión de marcadores a ácidos nucleicos e incluyen, por ejemplo, 40 traducción de muescas o marcación final (por ejemplo, con un ARN marcado) mediante quinasa del ácido nucleico y posterior unión (ligadura) de un enlazador de ácido nucleico que une el ácido nucleico de la muestra a una etiqueta (por ejemplo, un fluoróforo).

Los marcadores detectables adecuados para uso en la presente divulgación incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. 45 Los marcadores útiles en la presente invención incluyen biotina para tinción con conjugado de estreptavidina marcado, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads^{MR}), colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P) enzimas (por ejemplo, Peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras comúnmente usadas en un ELISA), y etiquetas calorimétricas tales como perlas de oro coloidal o de vidrio coloreado o plásticas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes que enseñan el uso de tales etiquetas incluyen las patentes de Estados 50 Unidos Nos. 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149, y 4.366.241.

La detección de etiquetas es bien conocida por los expertos en la técnica. De este modo, por ejemplo, las etiquetas radioactivas pueden detectarse usando una película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar la luz emitida. Las etiquetas enzimáticas se 55 detectan normalmente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las etiquetas calorimétricas se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada.

El marcador detectable se puede añadir al ácido o ácidos nucleicos objetivo (muestra) antes o después de la hibridación, tal como se describe en el documento WO 97/10365. Estas etiquetas detectables se unen directamente o se incorporan en el ácido nucleico objetivo (muestra) antes de la hibridación. Por el contrario, los "marcadores indirectos" se unen al dúplex híbrido después de la hibridación. En general, el marcador indirecto se une a un residuo de unión que se ha unido al ácido nucleico objetivo antes de la hibridación. Por ejemplo, el ácido nucleico objetivo puede biotinilarse antes de la hibridación. Después de la hibridación, un fluoróforo conjugado con avidina se unirá a los dúplex híbridos que portan biotina proporcionando una etiqueta que se detecta fácilmente. Para una revisión detallada de los métodos de marcación de ácidos nucleicos y detección de ácidos nucleicos hibridados marcados, véase *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 24: *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Detección de polipéptidos

Las mutaciones de CCND3 cuando se traducen en proteínas se pueden detectar mediante anticuerpos específicos. Las mutaciones en la proteína CCND3 pueden cambiar la antigenicidad de la proteína CCND3, de modo que un anticuerpo producido contra un antígeno mutante de CCND3 (por ejemplo, un péptido específico que contiene una mutación) se unirá específicamente al CCND3 mutante y no reconocerá el tipo silvestre.

El nivel de expresión de las mutaciones de CCND3 también se puede determinar examinando la expresión de la proteína o el producto proteico de los mutantes de CCND3. La determinación del nivel de proteína implica medir la cantidad de cualquier unión inmuno-específica que se produce entre un anticuerpo que reconoce selectivamente y se une al polipéptido del biomarcador en una muestra obtenida de un paciente y comparándola con la cantidad de unión inmuno-específica de al menos un biomarcador en una muestra de control. La cantidad de expresión de proteína de la CCND3 puede aumentarse o reducirse cuando se compara con la expresión de control.

Una variedad de técnicas está disponible en el arte para el análisis de proteínas. Incluyen, pero no se limitan a radioinmunoensayos, ELISA (ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas), inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos *in situ* (utilizando, por ejemplo, etiquetas de oro coloidal, enzimas o radioisótopos), análisis de transferencia western, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos inmunofluorescentes, citometría de flujo, inmunohistoquímica, microscopía confocal, ensayos enzimáticos, resonancia de plasmón de superficie y PAGE-SDS.

Ensayo de biomarcadores y tratamiento con CDKi

Una vez que se ha analizado el estado de CCND3 de un paciente y se predice que es sensible a un CDKi, la administración de cualquier CDKi a un paciente puede efectuarse en una dosis, de forma continua o intermitente a lo largo del curso del tratamiento. Los métodos para determinar los medios más eficaces y la dosis de administración son bien conocidos por los expertos en la técnica y variarán con la composición utilizada para la terapia, el objetivo de la terapia, la célula objetivo que está siendo tratada y el sujeto que está siendo tratado. Las administraciones únicas o múltiples pueden llevarse a cabo con el nivel de dosis y el patrón seleccionados por el médico tratante. Las formulaciones de dosificación adecuadas y los métodos de administración de los agentes pueden ajustarse empíricamente.

Las mutaciones de CCND3 pueden analizarse después de la administración de CDKi para determinar si el paciente permanece sensible al tratamiento con CDKi. Además, las mutaciones de CCND3 se pueden analizar en múltiples puntos de tiempo después de una única administración de CDKi. Por ejemplo, se administra un bolo inicial de un CDKi, se puede analizar una mutación de CCND3 durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después del primer tratamiento.

Se pueden analizar las mutaciones de CCND3 después de cada administración de CDKi, por lo que, si hay múltiples administraciones de CDKi, el análisis de las mutaciones de CCND3 después de cada administración puede determinar la sensibilidad continua del paciente. El paciente podría someterse a múltiples administraciones de CDKi y luego analizar las mutaciones de CCND3 en diferentes momentos. Por ejemplo, un curso de tratamiento puede requerir la administración de una dosis inicial de CDKi, una segunda dosis un período de tiempo especificado posterior y aún una tercera dosis horas después de la segunda dosis. Las mutaciones de CCND3 se pueden analizar durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración de cada dosis de CDKi.

Finalmente, se pueden administrar CDKi diferentes y seguir ensayando una mutación de CCND3. En esta realización, se elige y administra más de un CDKi al paciente. La mutación de CCND3 puede analizarse después de la administración de cada CDKi diferente. Este ensayo también puede realizarse en múltiples puntos de tiempo después de la administración de los diferentes CDKi. Por ejemplo, un primer CDKi podría administrarse al paciente y la mutación de CCND3 ensayada durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración. Luego se podría administrar un segunda

CDKi y la mutación de CCND3 se puede analizar de nuevo en 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración del segundo CDKi.

5 Se pueden elaborar kits para evaluar la actividad de cualquier CDKi. Por ejemplo, un kit que comprende cebadores de ácido nucleico para PCR o para hibridación de microarreglos para una mutación de CCND3 puede usarse para evaluar la sensibilidad al CDKi. Alternativamente, un kit provisto de anticuerpos para las mutaciones de CCND3 enumeradas en la Tabla 2 sería útil para analizar la sensibilidad a CDKi.

10 Es bien conocido en la técnica que los cánceres pueden hacerse resistentes al tratamiento quimioterapéutico, especialmente cuando ese tratamiento es prolongado. El ensayo de una mutación de CCND3 se puede realizar después de un tratamiento prolongado con cualquier agente quimioterapéutico para determinar si el cáncer sería sensible al CDKi. Por ejemplo, los inhibidores de quinasas tales como Gleevec® inhibirán fuertemente una quinasa específica, pero también pueden inhibir débilmente otras quinasas. Si el paciente ha sido tratado previamente con otro agente quimioterapéutico u otro CDKi, es útil analizar una mutación de CCND3 para determinar si el tumor es sensible a un CDKi. Este ensayo puede ser especialmente beneficioso para el paciente si el cáncer entra en remisión y luego vuelve a crecer o ha hecho metástasis en un sitio diferente.

15 Detección de inhibidores de CDK

Es posible usar mutaciones de CCND3 para seleccionar otros CDKi. Este método comprende proporcionar una célula que contiene una mutación de CCND3 de la Tabla 2, poner en contacto la célula con un CDKi candidato y la IC₅₀ de la célula tratada se compara con un CDKi conocido que se pone en contacto con una célula que contiene una mutación de CCND3. Por ejemplo, para células que comprenden una mutación de CCND3 en un dominio PEST, el CDKi candidato tendrá un IC₅₀ mayor o igual que CDKi (1).

Ejemplos

Ejemplo 1: Agrupación de mutaciones de CCND3

25 El descubrimiento inicial de las mutaciones de CCND3 se realizó mediante la agrupación de los datos de secuenciación de CCLE. El panel de líneas celulares es el cubierto por la iniciativa de The Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (Barretina J., Caponigro G., et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia: using preclinical models to predict anticancer drug sensitivity, Nature 2012 483(7391): 603-607). Se realizó una caracterización genómica, genética y farmacológica detallada en las líneas celulares de la CCLE.

30 La biblioteca multiplexada para la secuenciación de captura del exoma se construyó utilizando el SureSelect Target Enrichment System personalizado (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El ADN genómico de las líneas celulares se cortó y se ligó a adaptadores de secuenciación Illumina que incluyen índices de 8 pb. El ADN ligado al adaptador se seleccionó luego por tamaño para longitudes entre 200-350 pb y se hibridó con un exceso de cebo en fase de solución.

35 Las bibliotecas de captura de exones con códigos de barras se agruparon y secuenciaron en instrumentos Illumina (lecturas en el extremo apareado de 76 pares de bases). El índice de 8 pb fue leído por el instrumento al comienzo de la lectura 2 y se usó para asignar lecturas de secuencia a una muestra particular en la fuente de información de agregación de datos secuencia abajo.

40 Las lecturas de secuencia se alinearon con NCBI Human Reference Genome GRCh37 mediante el software BWA (Li et al., Bioinformatics 2010 25: 1754-60). Las lecturas de secuencias correspondientes a las regiones genómicas que pueden albergar pequeñas inserciones o eliminaciones (Inserciones- eliminaciones) se realinearon conjuntamente usando el realineador local GATK (DePristo et al., Nat Genet 2011 43: 491-8) como se describe para mejorar la detección de Inserciones- eliminaciones y para disminuir el número de falsos positivos de variaciones de un solo nucleótido causadas por lecturas desalineadas, particularmente en el extremo 3'. Los sitios que probablemente contengan Inserciones- eliminaciones se definieron como sitios de variación conocida de indel de línea germinal a partir de la base de datos dbSNP (Sherry et al., Nucleic Acids Res 2001 29: 308-11) que contienen lecturas alineadas inicialmente por BWA con Inserciones- eliminaciones y sitios adyacentes a la agrupación de sustituciones de nucleótidos detectados.

Variantes de llamada, anotación y filtración.

50 Se detectaron sustituciones de nucleótidos con MuTect y se denominaron Inserciones- eliminaciones cortos con el software Indelocator desarrollado en el Instituto Broad. Ambos programas fueron evocados en el modo que no requiere que coincida con el ADN normal e identifica todas las variantes que difieren del genoma de referencia. Las variantes detectadas se anotaron utilizando transcripciones de referencia derivadas de las transcripciones de la pista "UCSC Genes" del navegador de UCSC Genome.

Exclusión de variantes con baja fracción alélica

Se calculó la fracción alélica para cada variante detectada en cada muestra como una fracción de lecturas que soporta el alelo alternativo (diferente del de referencia) entre las lecturas que solapan la posición. Para limitar los efectos de la posible contaminación de la muestra, los eventos subclonales y los falsos positivos debidos a los artefactos de alineación, solo se utilizaron mutaciones con una fracción alélica superior al 20% en el análisis posterior.

Exclusión de variantes comunes de línea germinal

Las variantes que se informaron previamente como polimorfismo de línea germinal y para las cuales la frecuencia global de alelos (GAF) en dbSNP134 o la frecuencia de alelos detectada en el Proyecto de Secuenciación de Exoma de NHLBI era superior a 0,1%, se excluyeron de análisis posteriores. Se sabe que la selección natural es muy eficiente para eliminar las mutaciones perjudiciales funcionales y, por lo general, no les permite alcanzar una frecuencia relativamente alta en las poblaciones; sin embargo, los polimorfismos en el extremo inferior de la frecuencia de la población pueden ser extremadamente nocivos y ser idénticos a algunas de las mutaciones somáticas. Por lo tanto, se conservaron pocas mutaciones idénticas a los polimorfismos de línea germinal conocidos, pero con una frecuencia de población igual o inferior al 0,1%.

Exclusión de variantes observadas en panel de normales

Las variantes detectadas también en un panel de 278 muestras de exomas completas secuenciadas en el Broad como parte del Proyecto 1000 Genomes se excluyeron de un análisis posterior. Además de eliminar la variación adicional de la línea germinal, esta etapa permitió la eliminación eficiente de falsos positivos comunes que se originan predominantemente de los artefactos de alineación.

Exclusión de mutaciones neutrales

Cualquier sustitución de aminoácidos que crea residuos observados como un tipo silvestre en la posición homóloga en ortólogos de proteínas en al menos dos vertebrados de sangre caliente, se excluyó del análisis adicional como probablemente neutral. Para este paso de filtrado, se utilizaron múltiples alineamientos de aminoácidos creados por el programa BLASTZ y obtenidos de la Universidad de California en Santa Cruz, repositorio del navegador Genome.

Identificación de mutaciones en el extremo terminal C de ciclina D3 (CCND3) como específicas para neoplasias hematológicas de células B

883 líneas celulares se clasificaron en 37 clases por su linaje celular y tipo de cáncer. En ese momento, se buscaron mutaciones que tuvieran una distribución no aleatoria estadísticamente significativa en todas las clases. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado después de la normalización para una tasa de mutación ampliamente diferente en diferentes tumores y para variar la profundidad de la secuenciación (que afecta el poder para detectar mutaciones). Uno de los genes que se mostró fuerte en este análisis fue el de CCND3. Las mutaciones en CCND3 estaban presentes en 10 líneas celulares establecidas a partir de neoplasias hematológicas, por ejemplo, linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda de células B y linfoma de Burkitt, pero estaban ausentes en líneas celulares derivadas de tumores sólidos, y esta información se presenta en la Tabla 2. Las mutaciones se localizaron en el dominio del extremo terminal C que se sabe que facilita la degradación de ciclina D3 y la localización nuclear (Figura 1).

Ejemplo 2: Células que contienen mutaciones de CCND3 muestran mayor sensibilidad a CDKi en relación con las células no mutantes

Usando la caracterización farmacológica de las líneas celulares CCLE, las líneas celulares que contienen mutaciones de CCND3 se probaron para determinar la sensibilidad a CDKi. Las células DOHH-2, NU-DHL-1, SEM, SU-DHL-4, SU-DHL-6 y SU-DHL-10 se adquirieron a través de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Las células DB y Pfeiffer se adquirieron a través de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células A4/FUK se adquirieron a través del Health Science Research Resources Bank (HSRRB). Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 (ATCC) complementado con suero fetal bovino al 10% (células A4/FUK, DB, DOHH-2, Pfeiffer y SEM) o al 20% (NU-DHL-1, SU-DHL-4, SU-DHL-6 y SU-DHL-10) (Gibco) y se incubaron a 37°C/5% de CO₂. Para la selección, se sembraron las células en 80 µL de medio en placas de 96 pozos (Costar No. 3904) a razón de 10.000 (DB, DOHH-2, NU-DHL-1, SEM, SU-DHL-4, SU-DHL-6 y SU-DHL-10), 15.000 (A4/FUK) o 20.000 (Pfeiffer) densidades de células y se incubaron durante la noche antes de la adición del compuesto. Las células A4/FUK, DOHH-2, NU-DHL-1, SU-DHL-10, DB, Pfeiffer, SU-DHL-4 y SU-DHL-6 son líneas celulares de linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). Las células SEM son células de leucemia linfoblástica aguda de células B.

El patrón del compuesto (5x) se preparó recientemente en el medio de cultivo apropiado, y se añadió manualmente a las placas mediante una pipeta electrónica multicanal. En un mínimo de tres replicas por pozo, el número y la viabilidad de las células en el momento de la adición del compuesto, así como los efectos del agente único después de 72 horas, se evaluaron mediante la cuantificación de los niveles celulares de ATP a través de Cell Titer Glo (Promega, Madison, WI) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El día 0 se calcularon las EC⁵⁰ restadas utilizando el ajuste estándar de cuatro parámetros (XLFit, modelo 205).

CDKi (1) -CDKi (3) se sintetizaron en Novartis Pharma AG, y los patrones del compuesto se prepararon en DMSO a una concentración final de 10 mM. Los patrones de trabajo se diluyeron en serie en el medio de cultivo celular apropiado en incrementos de 3 veces para alcanzar concentraciones finales de ensayo que varían de 10 µM a 1,5 nM.

Se muestran las curvas de EC⁵⁰ de día 0 sustraídas para modelos de DLBCL que albergan CCND3 de tipo silvestre como se muestra en la Figura 2A o CCND3 mutante como se muestra en la Figura 2B. Téngase en cuenta que las células que contienen CCND3^{TS} son sensibles al tratamiento con CDKi (1), y la viabilidad celular se reduce a una concentración estándar. Por el contrario, las células que contienen mutaciones de CCND3 muestran una viabilidad celular muy reducida cuando se tratan con CDKi (1), lo que demuestra una mayor sensibilidad a CDKi (1) en comparación con las células que contienen CCND3 de tipo silvestre.

Un resumen de esto se muestra en la Figura 2C. Se muestran diagramas de caja de los valores EC⁵⁰ restados del día 0 para CCND3 silvestre o mutado. Los cuadros rellenos centrales muestran los cuartiles inferior y superior, con la mediana del grupo indicada con una línea blanca. Los bigotes representan los mínimos de muestra (bigotes inferiores) y máximos (bigotes superiores), con círculos negros que representan máximos de muestra que podrían considerarse valores atípicos. El "Conteo" denota la cantidad de líneas celulares por grupo. Se observó un cambio mayor a 3x en la sensibilidad a CDKi (1) en modelos con mutación del dominio PEST en CCND3 en comparación con el tipo silvestre.

CDKi (2) es un compuesto diferente y también se conoce como PD0332991 (Fry et al., Mol. Cancer Ther. 2004, 3 (11): 1427-1438). CDKi (2) se probó en las mismas líneas celulares usando el mismo protocolo que CDKi (1) descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 3A y 3B. De forma similar a CDKi (1), las células que contenían CCND3^{TS} mostraron una sensibilidad normal al tratamiento con CDKi (2), con reducción de la viabilidad celular a concentraciones estándar. Cuando CDKi (2) se probó en células mutantes de CCND3, la viabilidad celular se redujo a concentraciones mucho más bajas, lo que indica que estas células eran más sensibles a CDKi (2) en comparación con las células que contenían CCND3^{TS}. El diagrama de caja en la Figura 3C muestra un cambio de 3 veces en la sensibilidad en las células con una mutación del dominio PEST en CCND3 en comparación con el tipo silvestre.

CDKi (3) es un inhibidor de pan-CDK, que actúa sobre todos los miembros de la familia de CDK con grados variables de inhibición. Cuando se probó CDKi (3), se descubrió que todos los tipos de células sometidos a prueba (tanto CCND3 como de tipo silvestre) eran más sensibles al inhibidor de pan-CDK que a los inhibidores de CDK 4/6 específicos. Esto se puede observar en las curvas de viabilidad celular en las Figuras 4A y 4B, y no hay diferencia en EC⁵⁰ como se muestra en la Figura 4C.

Ejemplo 3: Las mutaciones de CCND3 dan como resultado una mayor estabilidad de la proteína

Las células se trataron con 100 µg/mL de cicloheximida y se recogieron un mínimo de 2 x 10⁶ células por punto de tiempo para el aislamiento total de proteínas. Los lisados celulares se prepararon cada 30 minutos durante 2 horas, y, cada 2 horas a partir de entonces hasta 8 horas de tratamiento. Las células DLBCL se lisaron en regulador que contenía Tris 50 mM, pH 7,2, NaCl 120 mM, EDTA 1 mM, EGTA 6 mM y proteasa NP40 plus al 1% (Roche # 05892791001, Nutley, NJ) e inhibidores de fosfatasa (Calbiochem # 524625, Billerica, MA). Después de la lisis, se determinó la concentración de proteína usando el método BCA (Pierce # 2325, Rockford, IL). Se separaron cantidades iguales de proteína total, por línea celular, en un gel Bis-Tris NuPAGE SDS al 4-12% (Invitrogen, Grand Island, NY) y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, Grand Island, NY) usando un sistema de transferencia en seco (Invitrogen iBLOT, Grand Island, NY). Las proteínas se detectaron usando los anticuerpos primarios apropiados y un sistema de detección de colorante infrarrojo (Odyssey IRDye, LI-COR, Lincoln, NE) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los anticuerpos monoclonales para el análisis de transferencia Western son los siguientes: ciclina D3 (BD Biosciences # 610279, Billerica, MA), Mcl-1 (Cell Signaling Technology # 4572, Danvers, MA) y β-actina (Ambion # 4302 Grand Island, NY). La cicloheximida se adquirió a través de Sigma (# C4859 St. Louis, MO).

En la Figura 5A, las células que contenían CCND3 de tipo silvestre se trataron con cicloheximida durante los tiempos indicados, y se separaron cantidades iguales de proteína total mediante SDS-PAGE. Se muestran los niveles de proteína de CCND3, β-actina y Mcl-1. La proteína Mcl-1 tiene una semivida corta y se usó como control. En las células DLBCL naturales, CCND3 se agota significativamente a las 4-6 horas de tratamiento. En la Figura 5B, las

células mutantes de CCND3 también se trataron con ciclohexamida y exhibieron poco o ningún agotamiento tan tardío como a las 8 horas. Por el contrario, la β -actina era igualmente estable, y Mcl-1 inestable en las diferentes líneas celulares. Estos datos sugieren que una mutación en el dominio PEST de CCND3 conduce a un aumento en la estabilidad de la proteína.

5 Esta estabilidad de la proteína puede conducir a la acumulación de la proteína CCND3. La Figura 6A es una transferencia Western que demuestra que en las células que contienen una mutación del dominio PEST de CCND3 tienen niveles de proteína más altos de CCND3 mutante. Cuando se compara el nivel de ARNm de las células mutantes CCND3 y CCND3^{TS}, los niveles de expresión son bastante similares, lo que indica que el aumento de la proteína CCND3 se debe probablemente a un aumento de la estabilidad de la proteína y no a un aumento de la expresión.
10

De este modo, sin estar ligado a ninguna teoría en particular, tal como una mutación de CCND3 no promueve o reduce la expresión de ARNm de CCND3, una mutación de CCND3 puede actuar en el nivel postraducciona. Una representación de la proteína CCND3 se muestra gráficamente en la Figura 1, y cuando la treonina en la posición del aminoácido 283 (T283) está fosforilada, esta conduce a la proteína CCND3 para ubiquitinación y posterior degradación. CCND3 tiene dominios PEST en los aminoácidos 256-268 y 271-291. Una mutación en un dominio PEST puede bloquear o reducir este evento de fosforilación, estabilizando por lo tanto a CCND3, lo que resulta en una mayor semivida y acumulación en la célula. Esta CCND3 estabilizada es libre de unirse y activar CDK4/CDK6, lo que inicia la proliferación celular descontrolada, que conduce al cáncer. Las células cancerosas son impulsadas o dependen de los niveles más altos de activación de CDK4/6, por lo que cualquier CDKi que se una a CDK4/6 y reduzca la asociación de CDK4/6 con CCND3 daría como resultado una reducción de la proliferación celular a pesar de los niveles elevados de CCND3.
15
20

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la sensibilidad de una célula cancerosa a un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (CDKi), comprendiendo el método:
- 5 a) ensayar una mutación de ciclina D3 (CCND3) en una célula cancerosa; en la que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST y
- b) comparar la mutación de CCND3 con una célula de control no cancerosa o normal, en la que la presencia de la mutación de CCND3 en la célula cancerosa indica que es sensible a un CDKi; en la que la célula cancerosa se selecciona del grupo que consiste en linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda de células B y linfoma de Burkitt.
- 10 2. Un método para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer al tratamiento con un CDKi, comprendiendo el método:
- a) ensayar una mutación de CCND3 en una muestra de cáncer obtenida del paciente; en la que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST y
- 15 b) comparar la mutación de CCND3 con una muestra de control no cancerosa o normal, en la que la presencia de la mutación de CCND3 en la muestra cancerosa indica que el paciente es sensible al tratamiento con un CDKi; en la que la muestra de cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda de células B y linfoma de Burkitt.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO. 2.
- 20 4. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO. 2.
5. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la mutación de CCND3 es cualquier mutación en la Tabla 2.
6. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina por lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina por treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina por leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina por serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina por ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).
- 25 7. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el CDKi se selecciona de la Tabla 1.
8. El método de la reivindicación 2, que comprende, además:
- c) medir la expresión diferencial de proteína de CCND3 en una muestra de cáncer obtenida del paciente; y
- 30 d) comparar la expresión de proteína de CCND3 en la muestra de cáncer con la expresión de proteína CCND3 de una muestra de control no cancerosa o normal, en la que los mayores niveles de proteína CCND3 en la muestra de cáncer indican que el paciente es sensible al tratamiento con un CDKi.
9. Un método de selección para candidatos a CDKi comprendiendo el método:
- a) poner en contacto una célula que contiene una mutación de CCND3 con un candidato a CDKi, en donde la mutación de CCND3 está en un dominio PEST;
- 35 b) medir la reducción en la viabilidad celular; y
- c) comparar la reducción en la viabilidad celular de la célula mutante de CCND3 puesta en contacto con el candidato a CDKi con la viabilidad celular de la célula mutante de CCND3 puesta en contacto con un CDKi de control; en la que la muestra de cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda de células B y linfoma de Burkitt.
- 40 10. Un CDKi para uso en un método para tratar a un paciente con cáncer, comprendiendo el método: a) ensayar mutaciones de CCND3 en una muestra de cáncer obtenida del paciente, en donde la mutación de CCND3 está en un dominio PEST; b) comparar el estado mutacional de CCND3 en la muestra de cáncer con una muestra de control no cancerosa o normal en la que la presencia de una mutación de CCND3 indica que el paciente es sensible al

tratamiento con un CDKi; c) administrar al paciente un CDKi; y d) ensayar la supresión del crecimiento tumoral, en el que la muestra de cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma difuso de células B grandes, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda de células B y linfoma de Burkitt.

- 5 11. El CDKi para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO. 2.
12. El CDKi para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO. 2.
13. El CDKi para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la mutación de CCND3 es cualquier mutación en la Tabla 2.
- 10 14. El CDKi para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina por lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina por treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina por leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina por serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina por ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).
- 15 15. El CDKi para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el CDKi se selecciona de la Tabla 1.

Representación gráfica de la proteína CCND3

<i>DLBCL</i>	Linfoma difuso de células B grandes
<i>FL</i>	Linfoma folicular de células B
<i>B-ALL</i>	Leucemia linfoblástica aguda de células B
<i>B-CLL</i>	Leucemia linfocítica crónica de células B
<i>BL</i>	Linfoma de Burkitt de células B
<i>BL-Un</i>	Linfoma de células B, no especificado

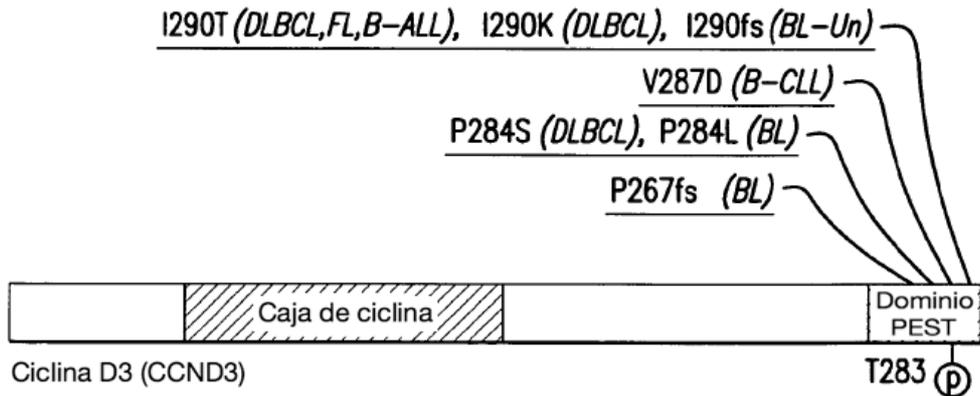


FIG. 1

Células que contienen CCND3 de tipo silvestre muestran sensibilidad normal a CDK4(1)

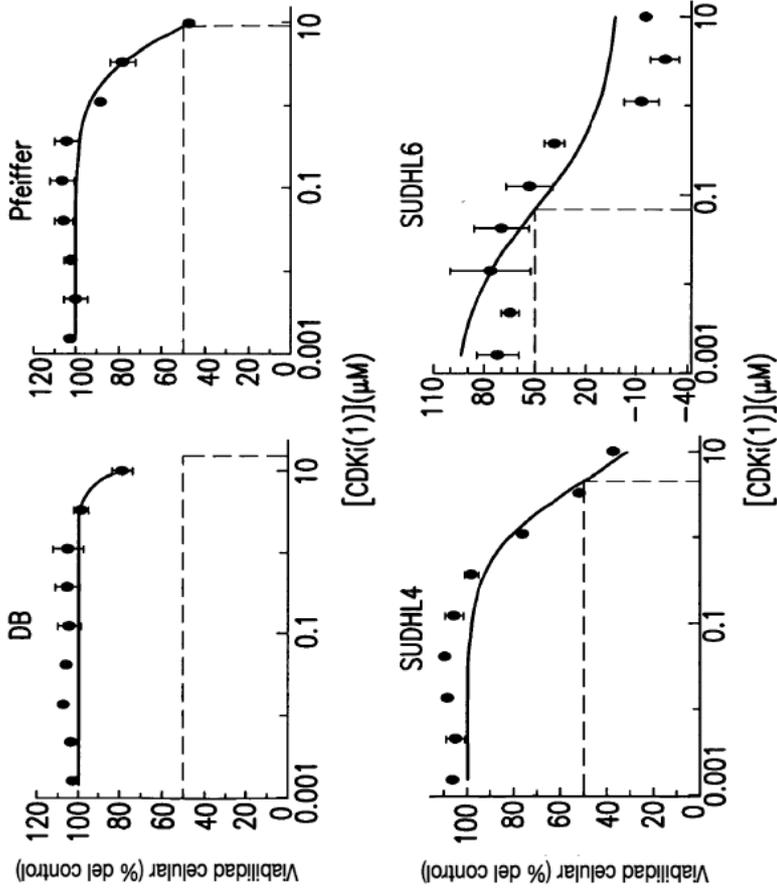


FIG.2A

Células que contienen mutaciones de CCND3 muestran mayor sensibilidad a CDKi(1)

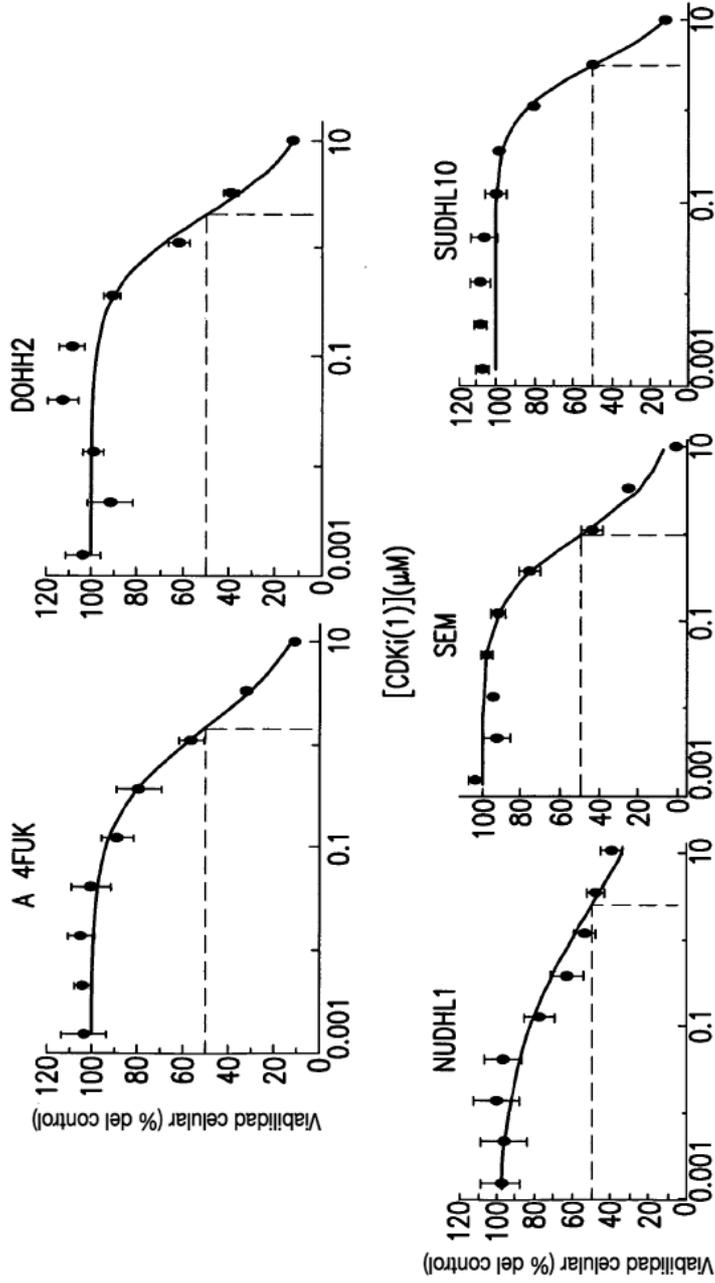


FIG.2B

Células que contienen mutaciones de CCND3 muestran mayor sensibilidad a CDKi(1) con respecto a células no mutantes coincidentes

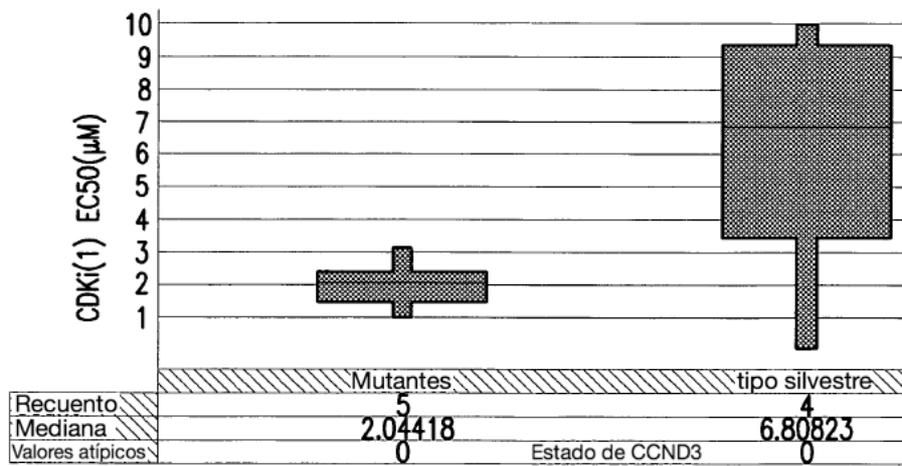


FIG.2C

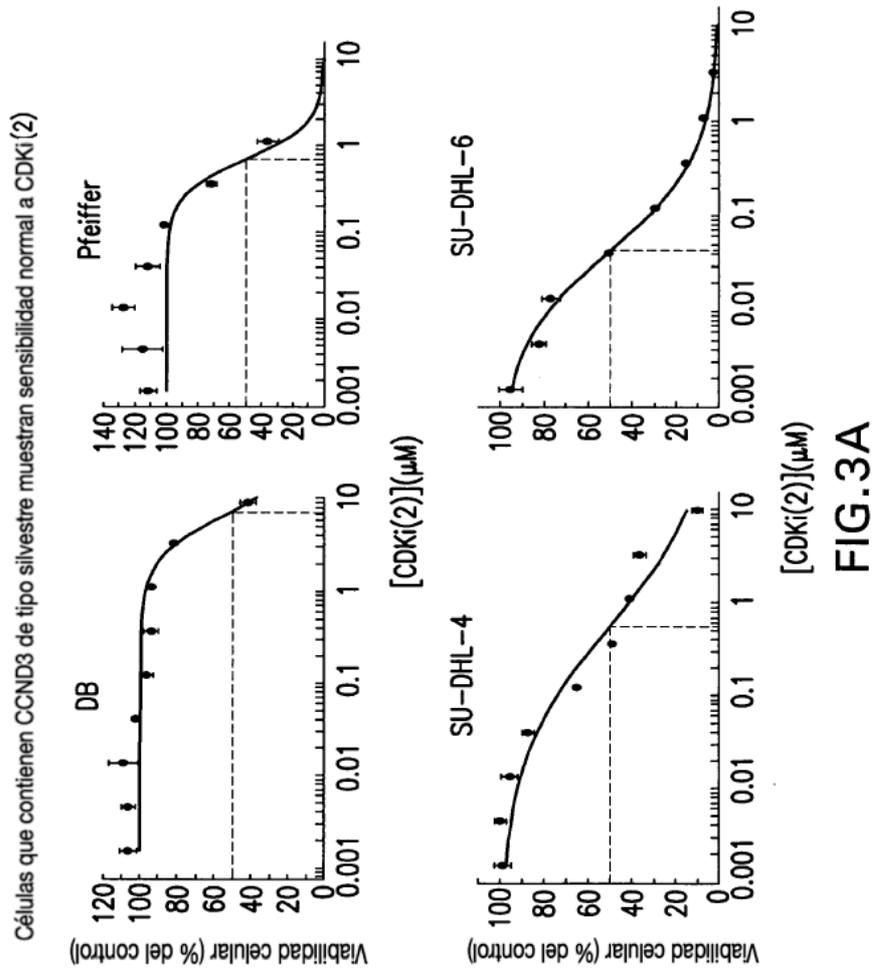


FIG.3A

Células que contienen mutaciones de CCND3 muestran mayor sensibilidad a CDK α (2)

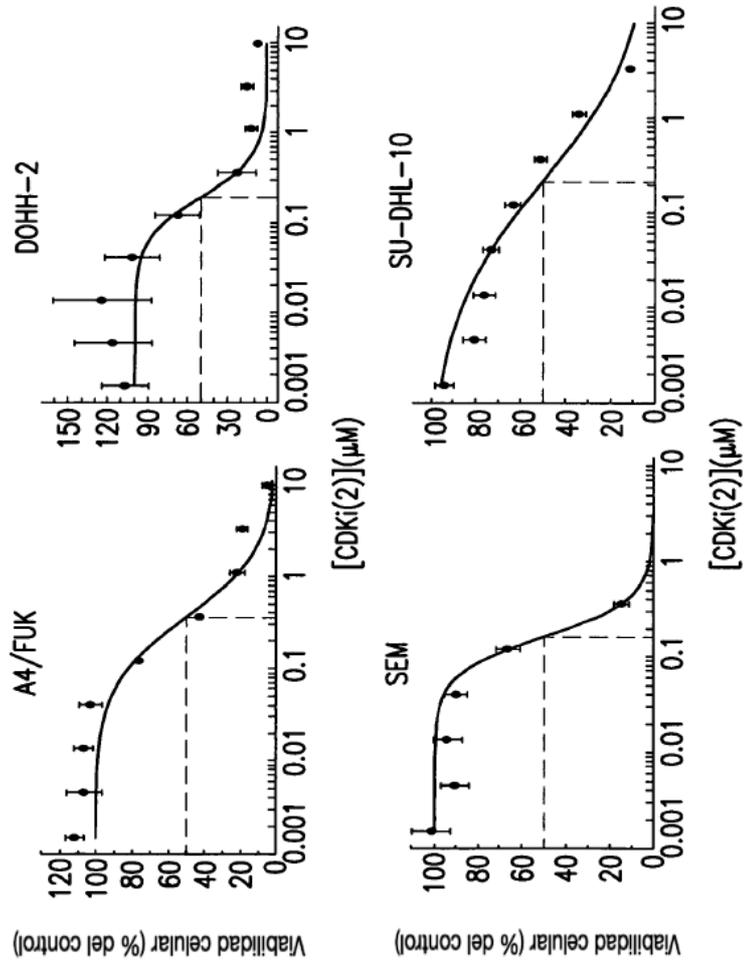


FIG.3B

Células que contienen mutaciones de CCND3 muestran mayor sensibilidad a CDKi(2), con respecto a células no mutantes coincidentes

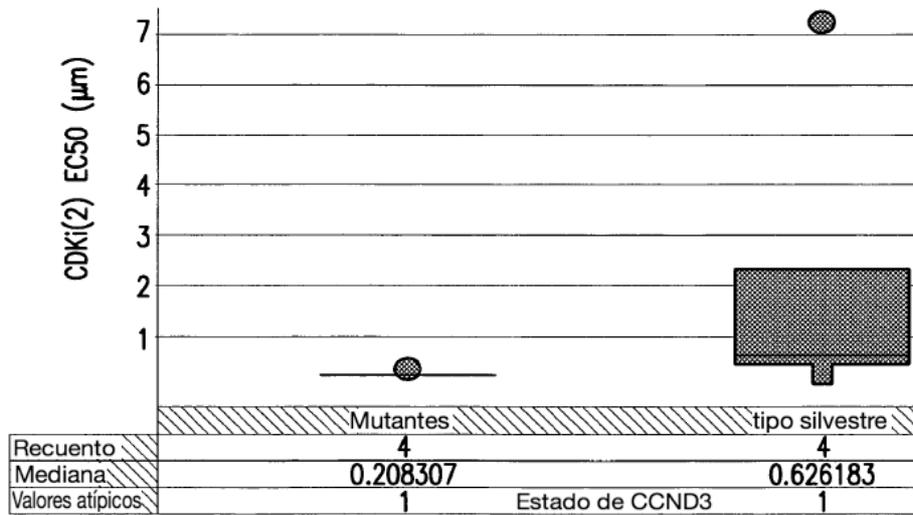


FIG.3C

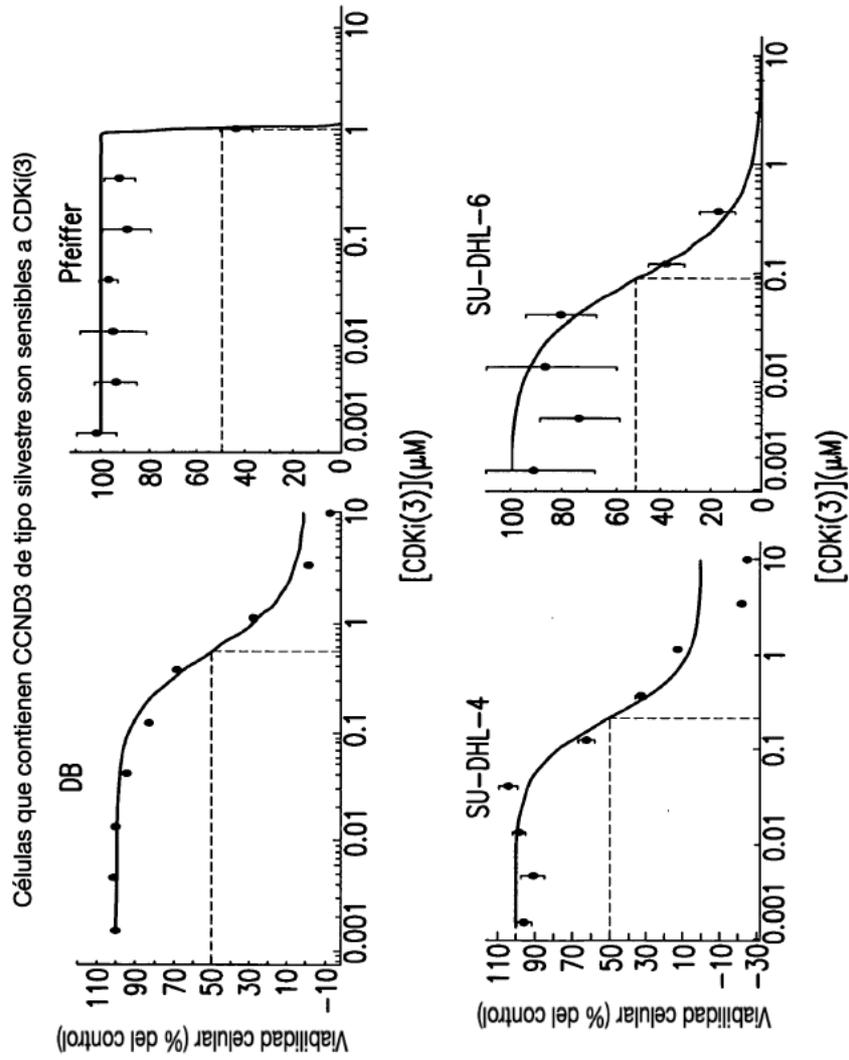


FIG.4A

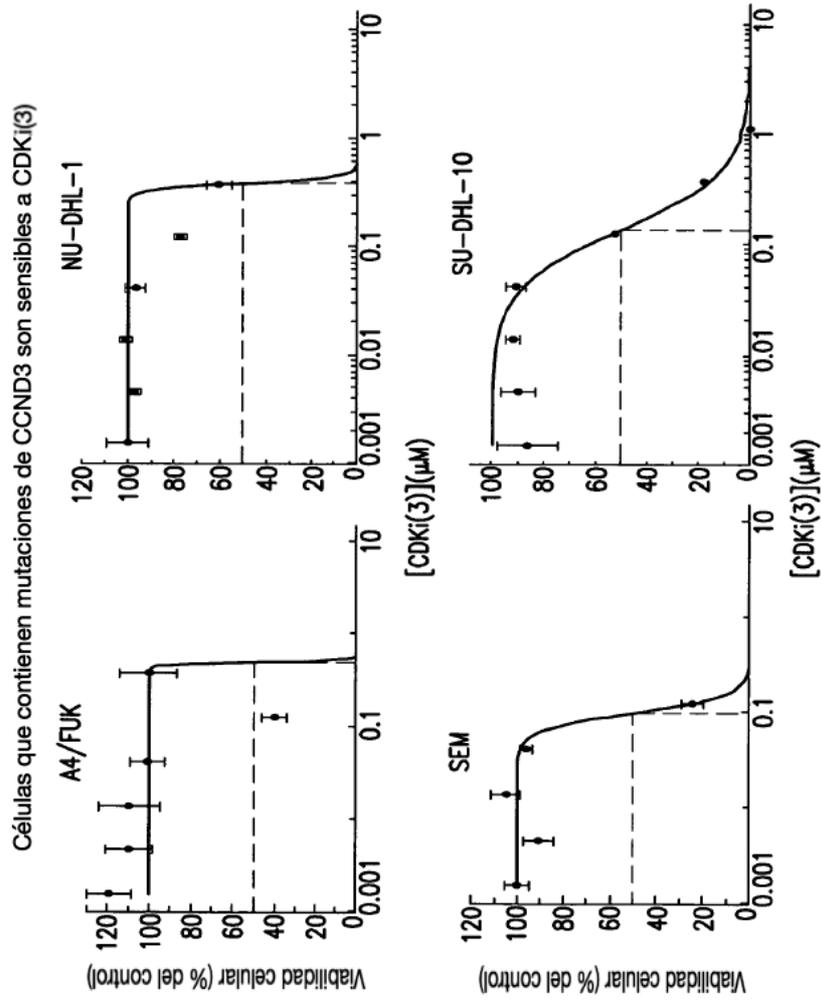


FIG.4B

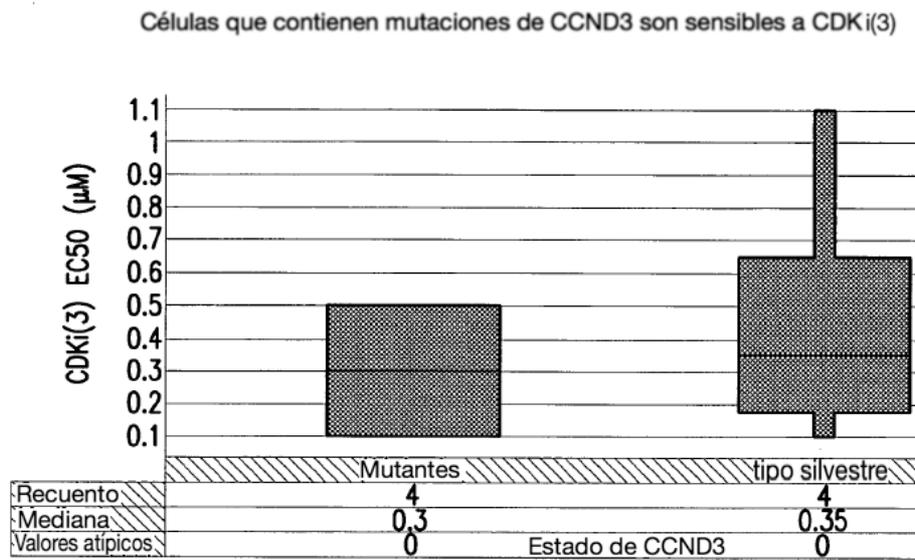


FIG.4C

Las mutaciones de CCND3 dan como resultado mayor estabilidad de la proteína

CCND3 de tipo silvestre

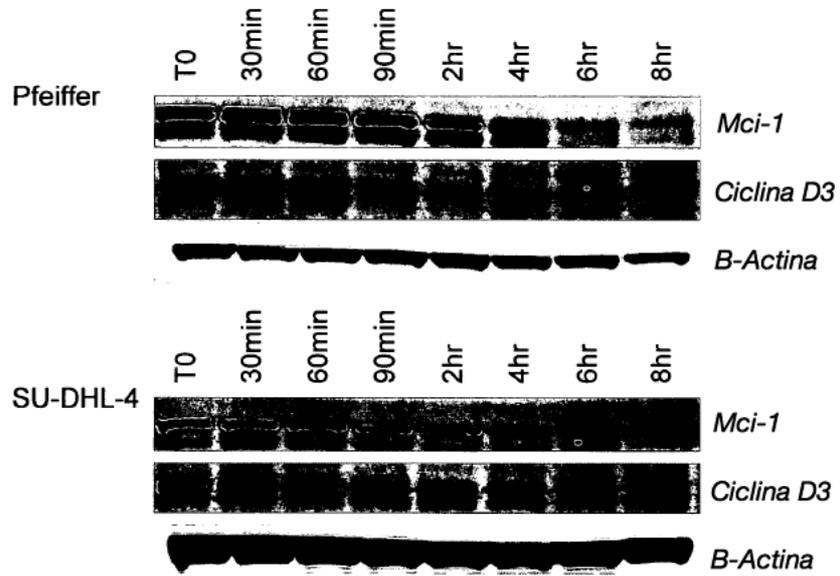


FIG.5A

Las mutaciones de CCND3 dan como resultado mayor estabilidad de la proteína

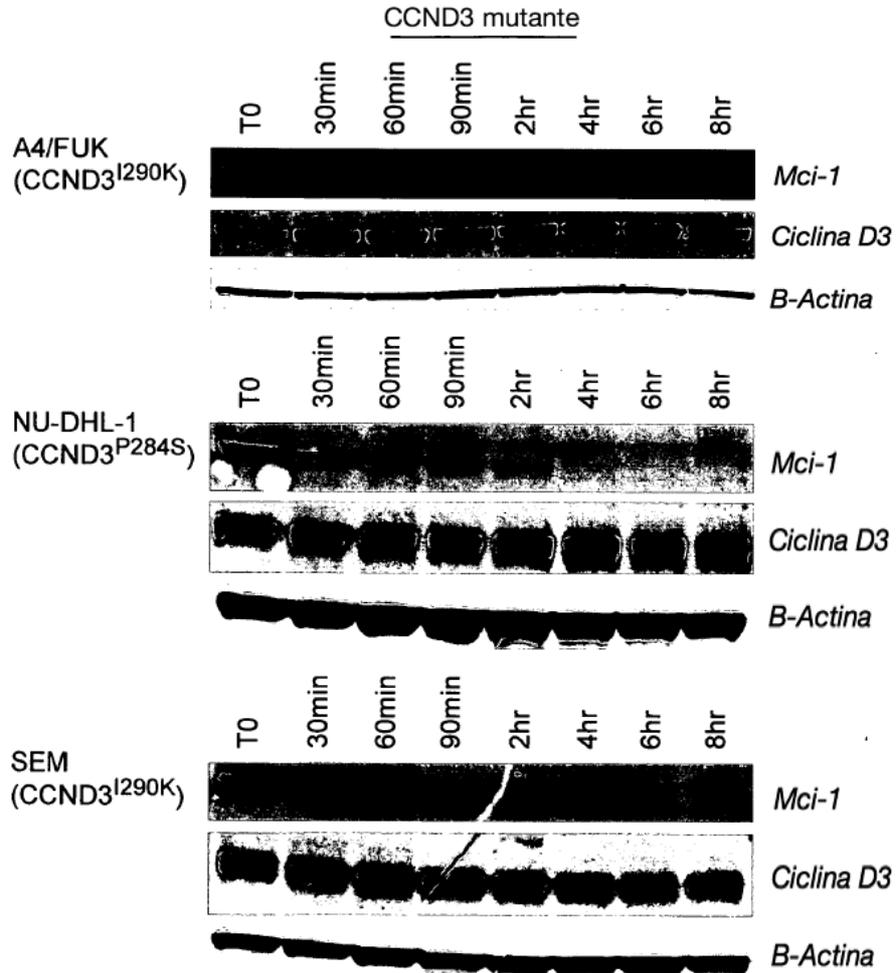


FIG.5B

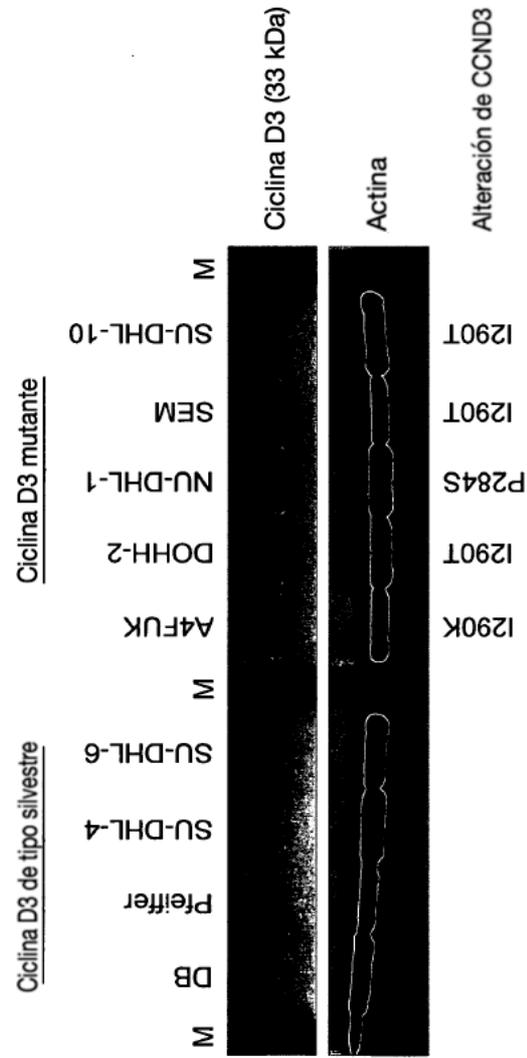


FIG.6A

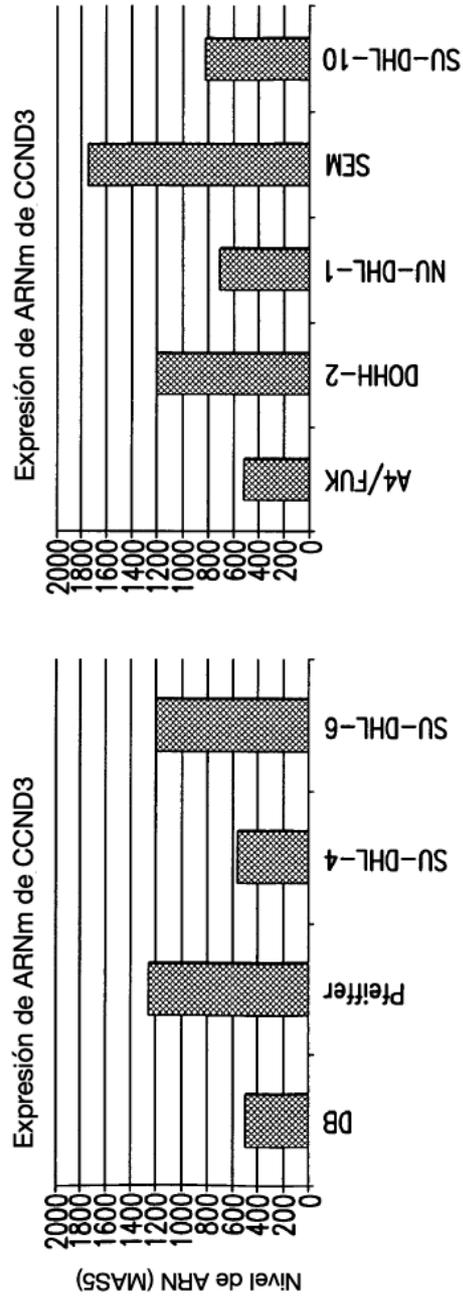


FIG. 6B