

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 124**

21 Número de solicitud: 201730304

51 Int. Cl.:

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

08.03.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.09.2018

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN IMDEA ALIMENTACIÓN (100.0%)
Carretera de Cantoblanco, 8 Pabellón Central del
Antiguo Hospital de Cantoblanco
28049 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**AGUIRRE PORTOLÉS, Cristina;
REGLERO RADA, Guillermo y
RAMÍREZ DE MOLINA, Ana**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **USOS MÉDICOS DE LA APOLIPOPROTEÍNA A Y DE ACTIVADORES DE LA MISMA**

57 Resumen:

Usos médicos de la apolipoproteína a y de activadores de la misma.

La presente invención se refiere a un uso de la apolipoproteína A, de un péptido mimético de la misma o de un activador de la misma para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer. La invención también se refiere a un método para determinar el estadio de un tumor colorrectal en un paciente que comprende determinar en un biofluido de dicho paciente los niveles de ApoA1, en donde niveles reducidos de ApoA1 con respecto a un valor de referencia indican un estadio más avanzado del tumor, así como a un método para seleccionar el tratamiento de un paciente con cáncer que comprende determinar en un biofluido de dicho pacientes los niveles de ApoA1, en donde niveles reducidos de ApoA1 con respecto a un valor de referencia indican que la terapia de elección es una terapia basada en la apolipoproteína A, en un péptido mimético de la misma o en un activador de la misma.

ES 2 681 124 A1

DESCRIPCIÓN

Usos médicos de la apolipoproteína a y de activadores de la misma

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un nuevo uso médico de la apolipoproteína A, de un péptido mimético de la misma, o de un activador de la misma en el tratamiento o la prevención del cáncer.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El último Informe Mundial sobre el Cáncer mostró que durante el año 2012 se registraron unos 14 millones de casos nuevos y hubo 8,2 millones de muertes asociadas a esta enfermedad (International Agency for Research on Cancer, 2014). Según las previsiones, en los próximos 20 años el número de nuevos casos aumentará aproximadamente en un 70%. Hasta la fecha se han estudiado en detalle la mayoría de los pasos que dan lugar a la formación de un tumor, sin embargo, nuestro conocimiento de los procesos metastásicos se puede considerar somero. Los tumores primarios son la causa del 10% de las muertes por cáncer mientras que la metástasis es la responsable del fallecimiento del paciente en el 90% de los casos. Teniendo en cuenta estas premisas se hace patente la necesidad de encontrar nuevos mecanismos que permitan frenar la colonización de tejidos distantes al tumor primario.

25 En 2014, Teodoro Vargas y colaboradores demostraron que la activación de los genes ABCA1, ACSL1, AGPAT1 y SCD constituía el factor principal en la progresión maligna en pacientes con cáncer colorrectal en estadio II (II-CRC) (T Vargas, J Moreno-Rubio, J Herranz, et al. Genes associated with metabolic syndrome predict disease-free survival in stage II colorectal cancer patients: A novel link between metabolic dysregulation and colorectal cancer. Mol Oncol. 2014 diciembre; 8 (8):1469-81). De entre ellos, ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) es una proteína transportadora cuya principal función es extraer de la célula el colesterol que será captado por la apolipoproteína A-1 (ApoA1) para dar lugar a lipoproteínas de alta densidad (HDL). En 2013, Mohelnikova-Duchonova y sus colaboradores reportaron aumentos en los niveles de expresión de ABCA1 en uno de los cánceres más resistentes a terapias, el cáncer de páncreas (Mohelnikova-Duchonova B BV, Oliverius M, Honsova E, et al. Differences in transcript levels of ABC transporters between

35

pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. *Pancreas* 2013; 42:707–716). Sin embargo, el laboratorio de Angela H. Ting muestra niveles disminuidos de ABCA1 en pacientes con cáncer maligno de próstata en contraposición a aquellos pacientes con tumores benignos (Lee BH, Taylor MG, Robinet P, et al. Dysregulation of cholesterol homeostasis in human prostate cancer through loss of ABCA1. *Cancer Res* 2013; 73:1211–8). En el caso del cáncer de ovario, los niveles elevados de ABCA1 se han relacionado con una mala prognosis de la enfermedad (Hedditch EL, Gao B, Russell AJ, et al. ABCA transporter gene expression and poor outcome in epithelial ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014; 106(7):766–76.); sin embargo, la disminución en los niveles de expresión mediante la hipermetilación de su promotor, se ha relacionado también con una mala prognosis (Chou JL, Huang RL, Shay J, et al. Hypermethylation of the TGF- β target, ABCA1 is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Clin Epigenetics* 2015 enero 14; 7(1):1).

15 Por tanto, existe una necesidad en la técnica de identificación de nuevos tratamientos para pacientes de cáncer, así como métodos para identificar pacientes que sean candidatos a presentar una buena respuesta a dicho tratamiento.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 Los autores de la presente invención han observado que, de forma sorprendente, la apolipoproteína A, un péptido mimético de la misma o de un activador de la misma son capaces de inhibir la proliferación, migración e invasión de células cancerígenas, en particular de células cancerígenas que presentan sobreexpresión de ABCA1. Los inventores han descubierto también que pacientes diagnosticados con tumores en estadios avanzados de la enfermedad presentan niveles reducidos de expresión de ApoA1 en una muestra del tumor con respecto a pacientes diagnosticados con tumores en estadios más tempranos. Asimismo, los inventores han descubierto que pacientes que sufren metástasis presentan niveles de ApoA1 en plasma reducidos con respecto a pacientes diagnosticados con un tumor primario.

30

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un uso de la apolipoproteína A, de un péptido mimético de la misma o de un activador de la misma para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

35

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para determinar el estadio de un tumor colorrectal en un paciente que comprende determinar en un biofluido de dicho paciente los niveles de ApoA1, en donde niveles reducidos de ApoA1 con respecto a un valor de referencia indican un estadio más avanzado del tumor.

5

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar el tratamiento de un paciente con cáncer que comprende determinar en un biofluido de dicho pacientes los niveles de ApoA1, en donde niveles reducidos de ApoA1 con respecto a un valor de referencia indican que la terapia de elección es una terapia basada en la apolipoproteína A, en un péptido mimético de la misma o en un activador de la misma.

10

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. A) Niveles de expresión de RNA mensajero de ApoA1 analizados por PCR cuantitativa (** valor $p = 0.0020$). **B)** Curva de proliferación en un ensayo de viabilidad llevado a cabo mediante la tecnología *XCELLigence* (ACEA Biosciences, Inc.). La gráfica muestra el crecimiento de las células DLD1 control frente a células DLD1 (células epiteliales derivadas de cáncer de colon) que sobreexpresan ApoA1. **C)** Ensayos de invasión llevados a cabo en placas Corning® BioCoat™ Matrigel (#354480). Cada punto en la gráfica representa un inserto analizado. Los resultados se muestran normalizados respecto al control y representan el área invadida en la zona inferior de la matriz a través de la cual migran las células (* valor $p = 0.0218$).

15

20

FIGURA 2. A) Niveles de mRNA de ApoA1 en pacientes del Hospital Universitario de La Paz. Las muestras CTR corresponden a tejido sano de un determinado paciente. Cada muestra SII o SIII corresponde a muestra tumoral del mismo paciente cuyo tejido sano fue también analizado (** valor $p = 0.0141$; *** valor $p = 0.0005$). **B)** Niveles de ApoA1 analizados mediante un ensayo ELISA sobre plasmas derivados de pacientes del Hospital Universitario de La Paz diagnosticados de tumor primario de colon frente a pacientes metastásicos.

25

30

FIGURA 3. A) Curva de proliferación en un ensayo de viabilidad llevado a cabo mediante la tecnología *XCELLigence* (ACEA Biosciences, Inc.). La gráfica muestra el crecimiento de las células DLD1 control frente a células DLD1 (células epiteliales derivadas de cáncer de colon) en ausencia y presencia de ApoA1 (40µg/ml durante 96 horas previas al experimento y 20µg/ml durante la adquisición de datos). **B)** Ensayos de migración e invasión llevados a

35

cabo en placas Corning® BioCoat™ Control (#354578) y Corning® BioCoat™ Matrigel (#354480) respectivamente. Cada punto en la gráfica representa un inserto analizado. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia de ApoA1 40µg/ml las 72 horas previas al experimento. Los ensayos se realizaron en presencia de ApoA1 20µg/ml.

- 5 Los resultados se muestran normalizados respecto al control y representan el área ocupada o invadida en la zona inferior de la matriz a través de la cual migran las células. (**** valor p = 0.0001; * valor p = 0.0386).

FIGURA 4. A) Curva de proliferación en un ensayo de viabilidad llevado a cabo mediante la tecnología *XCELLigence*. Crecimiento de células DLD1 tratadas con DMSO como vehículo del fármaco y con Rvx-208 (30 µM). En el panel derecho se muestran las diferencias significativas que existen en la pendiente de la gráfica y, por tanto, en la dinámica de crecimiento de las células tratadas (** valor p = 0.0087). **B)** Niveles de expresión de las proteínas E-cadherina y Vimentina en presencia y ausencia de Rvx-208. El análisis realizado por PCR cuantitativa. Se muestran los niveles de expresión relativos normalizados frente al control no tratado.

FIGURA 5. A) Niveles de RNA mensajero de ABCA1 en la línea celular DLD1 generada para la sobreexpresión estable de la misma (** valor p = 0.093). **B)** Curva de proliferación en un ensayo de viabilidad llevado a cabo mediante la tecnología *XCELLigence*. Se muestra el índice celular normalizado para la línea celular control (NoORF, *No Open Reading Frame*) y la línea que sobreexpresa ABCA1. **C)** Ensayos de migración e invasión. Los datos fueron recogidos y procesados 72 horas después de iniciar el experimento. (**** valor p < 0.0001; *** valor p = 0.0009).

FIGURA 6. A) Curva de proliferación en un ensayo de viabilidad llevado a cabo mediante la tecnología *XCELLigence*. Se muestran los resultados para la línea celular estable de sobreexpresión de ABCA1 en ausencia y presencia de ApoA1. Las células fueron tratadas durante las 72 horas previas al experimento con 40µg/ml de ApoA1 y con una concentración de 20µg/ml durante la adquisición. **B)** Ensayos de migración e invasión. El procedimiento seguido fue el mismo que el descrito en la figura 1. (** valor p = 0.003; **** valor p < 0.0001).

FIGURA 7. A) Curva de proliferación en un ensayo de viabilidad llevado a cabo mediante la tecnología *XCELLigence*. Crecimiento de células DLD1 tratadas con DMSO como vehículo del fármaco y con Rvx-208 (30 µM). En el panel derecho se muestran las diferencias significativas que existen en la pendiente de la gráfica y, por tanto, en la dinámica de

- crecimiento de las células tratadas (**** valor $p < 0.0001$). **B)** Ensayos de migración e invasión. El procedimiento seguido fue el mismo que el descrito en la figura 2 (* valor $p = 0.0407$; **** valor $p < 0.0001$). **C)** Niveles de expresión de las proteínas E-cadherina y Vimentina en presencia y ausencia de Rvx-208. El análisis realizado por PCR cuantitativa.
- 5 Se muestran los niveles de expresión relativos normalizados frente al control no tratado. Inmunodetección por *western blot* de ABCA1, Caveolina-1 y α -Tubulina. Esta última como control de carga. Se muestran los resultados de células tratadas con Rvx-208 (30 μ M) o con el vehículo DMSO.
- 10 **FIGURA 8: A)** Curva de proliferación en un ensayo de viabilidad llevado a cabo mediante la tecnología XCELLigence. Crecimiento de células DLD1 tratadas con DMSO como vehículo del fármaco y con Rvx-208 (30 μ M). En negro se muestran las células control (*scramble*, SCR). En gris, células transfectadas con short hairpin contra ApoA1. En los paneles derechos se muestran las diferencias significativas que existen en los valores de la
- 15 pendiente de las gráficas de la izquierda y, por tanto, en la dinámica de crecimiento de las células tratadas (* valor $p = 0.0471$; ** valor $p = 0.0067$; **** valor $p < 0.0001$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Uso médico de la apolipoproteína A, de un péptido mimético de la misma o de un activador de la misma

Los inventores han descubierto que la apolipoproteína A, un péptido mimético de la misma o de un activador de la misma son capaces de inhibir la proliferación, migración e invasión de

25 células cancerígenas, en particular de células cancerígenas que presentan sobreexpresión de ABCA1.

Por lo tanto, en un primer aspecto la invención se refiere a un uso de la apolipoproteína A, de un péptido mimético de la misma o de un activador de la misma para la preparación de

30 un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer.

En el contexto de la presente invención, la apolipoproteína A se selecciona de entre ApoA1, ApoA2, ApoA4 y ApoA5. En una realización particular, la apolipoproteína A es ApoA1.

35 En el contexto de la presente invención, se entiende por “apolipoproteína” una proteína que contiene y transporta lípidos en la sangre. Una apolipoproteína es una heteroproteína

anfipática con un grupo prostético lipídico que forma parte de las lipoproteínas. El prefijo apo- del término apolipoproteína significa que es la parte fundamental y proteica de las lipoproteínas, pero no se debe confundir la apolipoproteína con la apoproteína de la misma, que es la parte proteica. De cualquier manera, el término apolipoproteína usado en el contexto de la presente invención se refiere indistintamente a la apolipoproteína y a la apoproteína correspondiente.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "ApoA1" un gen que codifica la apolipoproteína A1. El gen humano se muestra en la base de datos de Ensembl con el número de registro ENSG00000118137.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "ApoA2" un gen que codifica la apolipoproteína A2. El gen humano se muestra en la base de datos de Ensembl con el número de registro ENSG00000158874.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "ApoA4" un gen que codifica la apolipoproteína A4. El gen humano se muestra en la base de datos de Ensembl con el número de registro ENSG00000110244.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "ApoA5", también conocido como APOA-V, RAP3, APOAV, un gen que codifica la apolipoproteína A5. El gen humano se muestra en la base de datos de Ensembl con el número de registro ENSG00000110243.

En el contexto de la presente invención los términos "cáncer" y "tumor" se refieren a la condición fisiológica en mamíferos caracterizada por un crecimiento celular descontrolado, en el que se rompe el balance entre la multiplicación y la muerte celular. El cáncer que va a tratarse en el contexto de la presente invención puede ser cualquier tipo de cáncer o tumor. Estos tumores o cáncer incluyen, y no se limitan a, cánceres hematológicos (por ejemplo leucemias o linfomas) , tumores neurológicos (por ejemplo astrocitomas o glioblastomas) , melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tumores gastrointestinales (por ejemplo cáncer de estómago, páncreas o colon), cáncer de hígado (por ejemplo carcinoma hepatocelular) , cáncer de células renales, tumores genitourinarios (por ejemplo cáncer de ovario, cáncer vaginal, cáncer de cuello de útero, cáncer de vejiga, cáncer de testículo, cáncer de próstata), tumores óseos y tumores vasculares.

35

En una realización preferida, el cáncer es un tumor primario. En otra realización preferida, el cáncer es una metástasis. En otra realización preferida, el cáncer es un cáncer colorrectal.

El término "cáncer colorrectal" (CCR), tal como se usa aquí, incluye cualquier tipo de neoplasias del colon, recto y apéndice y hace referencia tanto a los adenomas tempranos y tardíos como a los carcinoma así como al cáncer hereditario, familiar o esporádico. En los sistemas de estadificación para la clasificación del cáncer colorrectal, el colon y el recto son tratadas como un solo órgano. la invención contempla el tratamiento del cáncer colorrectal en sus distintos estadios tales como los estadios A, B, C1, C2 y D según la clasificación de Dukes, los estadios A, B 1, B2, B3, C1, C2, C3 y D según la clasificación de Astler-Coller, los estadios T1, T2, T3, N0, N1, N2, M0 y M1 según el sistema TNM así como los estadios 0, I, II, III y IV según la clasificación de la AJCC (American Joint Committee on Cáncer). De acuerdo con sistema de estadificación de tumor/nodo/metástasis (TNM) de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (Greene et al. (eds.), *cáncer del AJCC Staging Manual*. 6^a ed. Nueva York, NY: Springer, 2002), las distintas etapas del cáncer colorrectal se definen como sigue:

- Tumor: T1: el tumor invade la submucosa, T2: el tumor invade la muscularis propia, T3: el tumor invade a la muscularis propia en la subserosa, o los tejidos pericólicos o perirrectal; T4: El tumor invade directamente otros órganos o estructuras, y / o perfora.
- Nodo: N0: No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales; N1: metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales, N2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.
- Metástasis: M0: Metástasis distante no presente; M1: metástasis distante presente.

Así, los estadios 0, I, II, III y IV presentarían las siguientes características:

- S-0: Tis/ N0/ M0 (Tis=carcinoma in situ);
- S-I: T1/ N0/ M0 o T2/ N0/ M0;
- S-II: T3/ N0/ M0 o T4/ N0/ M0;
- S-III: Cualquier T/ N1/ M0 o cualquier T/ N2/ M0
- S-IV: Cualquier T/ cualquier N/ M1

En el contexto de la invención, "tratamiento del cáncer" se entiende como la administración de apolipoproteína A de acuerdo a la invención para prevenir o retrasar la aparición de síntomas, complicaciones o indicaciones bioquímicas del cáncer o tumor, para aliviar sus síntomas o para detener o inhibir su desarrollo y progresión tal como, por ejemplo, la aparición de metástasis. El tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico para retrasar la

aparición de la enfermedad o para prevenir la manifestación de sus síntomas clínicos o subclínicos o un tratamiento terapéutico para eliminar o aliviar los síntomas después de la manifestación de la enfermedad o en relación con su tratamiento quirúrgico o con radioterapia. La administración de apolipoproteína A de acuerdo a la invención se puede
5 realizar simultánea o consecutivamente a cualquier otro tratamiento ya conocido en el tratamiento del cáncer.

En una realización preferida, el cáncer se caracteriza por encontrarse en un paciente que presenta un nivel elevado de expresión del gen ABCA1 con respecto a un valor de
10 referencia, por presentar un nivel elevado de un metabolito resultante de la actividad de ABCA1 con respecto a un valor de referencia y/o por presentar un nivel elevado de un parámetro asociado con la actividad de ABCA1.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “ABCA1”, también conocido como
15 CERP, HDLDT1, ABC1, ABC-1, TGD, un gen que codifica el transportador de colesterol “ATP binding cassette subfamily A member 1”. El gen humano se muestra en la base de datos de Ensembl con el número de registro ENSG00000165029.

La cuantificación de los niveles de expresión del gen ABCA1 puede realizarse a partir del
20 ARN resultante de la transcripción de dicho gen (ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho gen. Por tanto, en una realización particular de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión del gen ABCA1 comprende la cuantificación del ARN mensajero del gen ABCA1, un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario del gen TFF 3, un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.
25 Adicionalmente, el método de la invención puede incluir la realización de una etapa de extracción con el fin de obtener el ARN total, lo que puede realizarse mediante técnicas convencionales (Chomczynski y cois., Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532).

30 Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por el gen ABCA1 o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dicho gen puede ser cuantificado mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la
35 cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y

tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, Northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm del gen de interés (ABCA1) o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa SI, RT-LCR, hibridación, microarrays, etc., preferentemente, mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando un marcador apropiado.

5 Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente a dicho ARNm codificado por el gen ABCA1 también puede ser cuantificado mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Métodos
10 convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook, 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., Vol. 1-3. En una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión del gen ABCA1 se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa.

15

Por otro lado, para la puesta en práctica de la invención, aparte de cuantificar los niveles de expresión del gen ABCA1, también se pueden cuantificar los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen, es decir, la proteína ABCA1, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína ABCA1. Así, en una realización particular, la
20 cuantificación de los niveles de la proteína codificada por el gen ABCA1 comprende la cuantificación de la proteína ABCA1.

El nivel de expresión de la proteína ABCA1 puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un
25 sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a ABCA1 (o a fragmentos de la misma que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden
30 utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o
35 transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA

(ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína ABCA1, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. En el mercado, existen anticuerpos comerciales contra ABCA1 que pueden emplearse en el contexto de la presente invención. En una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína codificada por el gen ABCA1 se realiza mediante western blot, inmunohistoquímica o ELISA.

10

En una realización preferida, el nivel de expresión de ABCA1 en el tumor primario es de al menos dos veces el valor de referencia.

El término "valor de referencia", tal como se utiliza aquí en el contexto de la invención, se refiere a un valor de laboratorio usado como referencia para valores/datos obtenidos mediante exámenes de laboratorio de sujetos o muestras recogidas de sujetos. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, una gama de valores, un valor medio, un valor mediano, un valor medio o un valor en comparación con un valor de control o valor basal particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de muestra individual, tal como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se está evaluando, pero en un momento anterior al desarrollo de la enfermedad o procedente de un tejido no canceroso. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, por ejemplo, de la población de sujetos del grupo de edad cronológica coincidente, o basada en un grupo de muestras que incluye o excluye la muestra a ensayar. Varias consideraciones se tienen en cuenta al determinar el valor de referencia. Entre tales consideraciones están la edad, el peso, el sexo, la condición física general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 y preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados de acuerdo con las consideraciones anteriores, por ejemplo según diversas categorías de edad.

El valor de referencia para el nivel de expresión de ABCA1 es preferiblemente el nivel medio de expresión de ABCA1 en un grupo de muestras de tejido no tumoral. En una realización preferida, el tejido no tumoral es de un sujeto sano que no sufre de cáncer. En una realización preferida adicional, el tejido no tumoral es de un sujeto que sufre de cáncer

35

distinto del paciente. En otra realización preferida, el tejido no tumoral es del propio paciente.

5 En otra realización, la cantidad del marcador en una muestra de un sujeto puede determinarse directamente con relación al valor de referencia (por ejemplo, en términos de aumento o disminución, o aumento en número de veces o disminución en número de veces). De manera ventajosa, esto puede permitir comparar la cantidad del marcador en la muestra del sujeto con el valor de referencia (en otras palabras, medir la cantidad relativa del marcador en la muestra del sujeto frente al sujeto con el valor de referencia) sin
10 necesidad de determinar primero las cantidades absolutas respectivas del marcador. Una vez que se establece este valor de referencia, el nivel de este marcador expresado en tejidos tumorales de sujetos puede compararse con este valor de referencia, y por lo tanto se le asigna un nivel de "aumentado" o "disminuido". Por ejemplo, un aumento de los niveles de expresión por encima del valor de referencia de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 2 veces,
15 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más en comparación con el valor de referencia se considera como un nivel de expresión "aumentado". Por otra parte, una disminución en los niveles de expresión por debajo del valor de referencia de al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 -flexión o incluso menos
20 en comparación con el valor de referencia se considera como un nivel de expresión "disminuido".

El término "paciente" o "sujeto", como se usa aquí, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de
25 granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

El metabolito resultante de la actividad de ABCA1 se puede seleccionar de entre
30 fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingomielina, colesterol, ésteres de colesterol y HDL. En una realización preferida de la invención, el metabolito resultante de la actividad de ABCA1 es colesterol.

La determinación del metabolito resultante de la actividad de ABCA1, preferentemente
35 colesterol, se puede realizar por cualquier medio conocido por el experto en la materia en una muestra de biofluido.

En la presente invención, el término "muestra" o "muestra biológica", se refieren el material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar el marcador que se desee y puede comprender células y /
5 o material no-celular del sujeto. La muestra puede ser aislada de cualquier tejido o fluido biológico adecuado, como por ejemplo, sangre, plasma sanguíneo, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) o de las heces. En el contexto del segundo aspecto de la invención, las muestras son muestras de biofluidos. Los términos "fluido biológico" y "biofluido" se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a fluidos acuosos de origen
10 biológico. El biofluido se puede obtener desde cualquier localización (tales como sangre, plasma, suero, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo o acuoso, o cualquier secreción corporal), un exudado (como el líquido obtenido a partir de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), o el líquido obtenido a partir de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad como la
15 artritis reumatoide).

En una realización preferida, el biofluido es una muestra de sangre del paciente.

El valor de referencia para un metabolito resultante de la actividad de ABCA1 es
20 preferiblemente el nivel medio de concentración de dicho metabolito resultante de la actividad de ABCA1 en un grupo de muestras de biofluido en sujetos que no sufren de enfermedad.

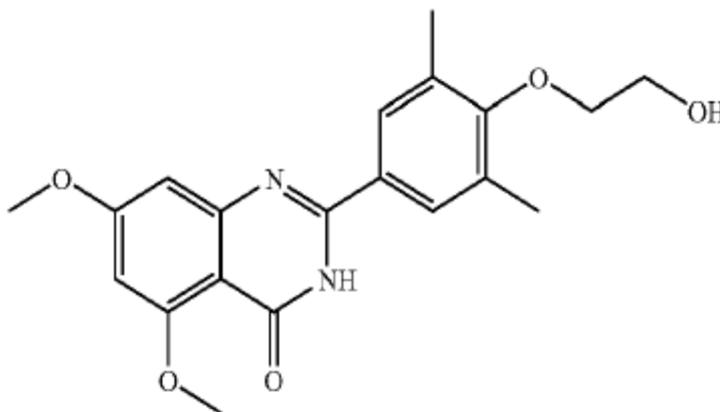
El parámetro asociado con la actividad de ABCA1 se puede seleccionar de entre la vida
25 media de la caveolina-1 (CAV1), el nivel plasmático de HDL, y el nivel intracelular de ésteres de colesterol. En una realización preferida de la invención, el parámetro asociado con la actividad de ABCA1 es la vida media de la caveolina-1 (CAV1). En el contexto de la presente invención, se entiende por "CAV1", también conocido como BSCL3, CAV, PPH3, LCCNS, CGL3, VIP21, MSTP085, un gen que codifica la caveolina 1. El gen humano se
30 muestra en la base de datos de Ensembl con el número de registro ENSG00000105974. En el contexto de la invención, el término "vida media de la caveolina-1" se refiere al tiempo requerido para que se degrade el 50% de una cantidad específica de caveolina-1. Her et al. (Nam-Hu Her, et al., Cell Cycle (2013), 12:10, 1521-1535) demuestran en una línea celular de cáncer de próstata que la depleción de ABCA1 resulta en una drástica reducción de la
35 proteína CAV1 por una menor estabilidad de la misma, mientras que la sobreexpresión de

ABCA1 tiene como resultado una mayor estabilidad de CAV1 por un aumento en los niveles de colesterol en la membrana.

En realizaciones preferidas de la invención, el valor de referencia es el nivel de expresión de ABCA1 en un tejido no tumoral, el nivel del metabolito resultante de la actividad de ABCA1 en un sujeto sano que no sufre de cáncer o el valor de la vida media de caveolina-1 en un sujeto que no sufre cáncer.

En el contexto del primer aspecto de la presente invención, se entiende por “activador de la apolipoproteína A” toda molécula capaz de aumentar la expresión del RNA mensajero de apolipoproteína A, así como de aumentar la concentración de la apolipoproteína A, dando lugar a un incremento de la proteína lipídica de alta densidad (HDL).

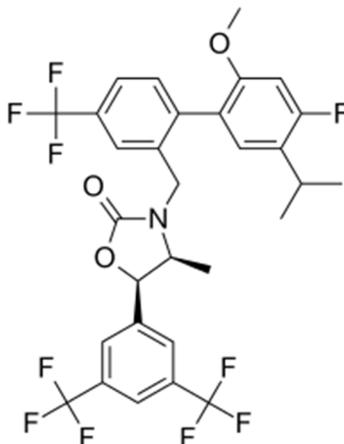
En una realización preferida, el activador de la apolipoproteína A es apabetalone (RVX-208). RVX-208 (2-(4-(2-hidroxietoxi)-3,5-dimetilfenil)-5,7-dimetoxiquinazolin-4(3H)-ona) se describe en detalle en la figura 20 de la patente US 8,053,440. Así, en una realización preferida, el activador de la apolipoproteína A tiene la siguiente estructura:



En otra realización preferida, el activador de la apolipoproteína A es lecitín colesterol acil transferasa (LCAT). En el contexto de la invención, “LCAT” se refiere al gen que codifica la lecitín colesterol acil transferasa. El gen humano se muestra en la base de datos de Ensembl con el número de registro ENSG00000213398.

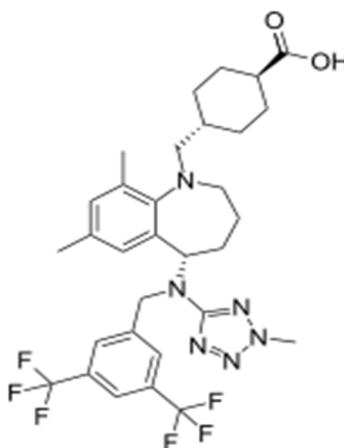
En otra realización preferida, el activador de la apolipoproteína A es la (4S, 5R)-5-[3,5-bis(trifluorometil) fenil]-3-([2-[4-fluoro-2-metoxi-5-(propan-2-il) fenil]-5-(trifluorometil) fenil] metil)-

4-metil-1,3-oxazolidin-2-ona. Así, en esta realización preferida, el activador de la apolipoproteína A tiene la siguiente estructura:



5

En otra realización preferida, el activador de la apolipoproteína A es el ácido trans-4-(((5S)-5-[[[3,5-bis (trifluorometil) fenil] metil] (2-metil-2H-tetrazol-5-il) amino]-7,9-dimetil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzazepin-1-il) metil) ciclohexanocarboxílico. Así, en esta realización preferida, el activador de la apolipoproteína A tiene la siguiente estructura:



10

En el contexto del primer aspecto de la presente invención, el término “péptido mimético” se refiere a una pequeña cadena similar a la proteína diseñada para imitar un péptido. Típicamente surgen de la modificación de un péptido existente, o mediante el diseño de sistemas similares que imitan péptidos, tales como peptoides y péptidos β . Independientemente del enfoque, la estructura química alterada está diseñada para ajustar ventajosamente las propiedades moleculares tales como estabilidad o actividad biológica. Esto puede tener un papel en el desarrollo de compuestos similares a fármacos a partir de péptidos existentes. Estas modificaciones implican cambios en el péptido que no se

producirán de forma natural (tal como una estructura lineal alterada y la incorporación de aminoácidos no naturales).

5 En una realización preferida de la invención, el péptido mimético de ApoA1 es un complejo de lipoproteína que comprende una fracción de la apolipoproteína ApoA-1 y una fracción lipídica.

10 En el contexto de la presente invención, las lipoproteínas son complejos macromoleculares que están compuestos por proteínas y lípidos. Las lipoproteínas transportan las grasas por todo el organismo. Son esféricas, hidrosolubles, formadas por (a) un núcleo de lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) y (b) una capa externa polar formada por apoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre. Las lipoproteínas se clasifican en diferentes grupos según su densidad, a mayor densidad mayor contenido en proteínas (a mayor diámetro, mayor contenido de lípidos): quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Cada tipo de lipoproteína tiene una composición y una proporción características de apolipoproteínas (ApoA, ApoB, ApoC, ApoE).

20 La fracción lipídica del complejo de lipoproteína comprende fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina (cefalina), fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, esfingomielina, gangliósido, cerebrósido, o combinaciones de los mismos.

25 La relación molar de la fracción lipídica respecto de la fracción de la apolipoproteína ApoA-1 puede estar comprendida en el intervalo de aproximadamente 200: 1 a 2: 1; de aproximadamente 180: 1 a 2: 1; de aproximadamente 160: 1 a 2: 1; de aproximadamente 140: 1 a 2: 1; de aproximadamente 120: 1 a 2: 1; de aproximadamente 100: 1 a 2: 1; de aproximadamente 90: 1 a 2: 1; de aproximadamente 80: 1 a 2: 1; de aproximadamente 70: 1 a 2: 1; de aproximadamente 60: 1 a 2: 1; de aproximadamente 50: 1 a 2: 1; de aproximadamente 40: 1 a 2: 1; de aproximadamente 30: 1 a 2: 1; de aproximadamente 20: 1 a 2: 1; de aproximadamente 10: 1 a 2: 1; de aproximadamente 5: 1 a 2: 1.

35 En una realización preferida, la fracción lipídica del complejo de lipoproteína consiste esencialmente en esfingomielina y aproximadamente 3 % en peso de un fosfolípido cargado negativamente, y la relación molar de la fracción lipídica respecto de la fracción de la apolipoproteína ApoA-1 está en el intervalo de aproximadamente 200: 1 a 2: 1.

En una realización aún más preferida, el péptido mimético de ApoA1 es CER-001:
(www.cerenis.com/en/our-therapies/cer-001).

5 CER-001 comprende ApoA1, esfingomielina y DPPG en una relación de peso de fosfolípidos frente a peso de lipoproteína de 1: 2,7; y con una relación en peso de esfingomielina frente a peso de DPPG de 97: 3. CER-001 se prepara de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4 de WO 2012/109162.

Método para determinar el estadio de un tumor colorrectal en un paciente

10

Los inventores han descubierto que pacientes diagnosticados con tumores en estadios avanzados de la enfermedad presentan niveles reducidos de expresión de ApoA1 en una muestra del tumor con respecto a pacientes diagnosticados con tumores en estadios más tempranos. Asimismo, los inventores han descubierto que pacientes que sufren metástasis
15 presentan niveles de ApoA1 en plasma reducidos con respecto a pacientes diagnosticados con un tumor primario.

20

Por lo tanto, en un segundo aspecto la invención se refiere a un método para determinar el estadio de un tumor colorrectal en un paciente que comprende determinar en un biofluido de dicho paciente los niveles de ApoA1, en donde niveles reducidos de ApoA1 con respecto a un valor de referencia indican un estadio más avanzado del tumor.

25

Los términos "cáncer", "cáncer colorrectal" y "paciente", se han descrito en detalle anteriormente, y se aplican por igual a los métodos de acuerdo con el método de este segundo aspecto de la invención.

30

En la presente invención, el término "muestra" o "muestra biológica", se refieren el material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar el marcador que se desee y puede comprender células y /
o material no-celular del sujeto. La muestra puede ser aislada de cualquier tejido o fluido biológico adecuado, como por ejemplo, sangre, plasma sanguíneo, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) o de las heces. En el contexto del segundo aspecto de la invención, las muestras son muestras de biofluidos. Los términos "fluido biológico" y "biofluido" se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a fluidos acuosos de origen
35 biológico. El biofluido se puede obtener desde cualquier localización (tales como sangre, plasma, suero, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo o acuoso, o cualquier

secreción corporal), un exudado (como el líquido obtenido a partir de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), o el líquido obtenido a partir de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad como la artritis reumatoide).

5

En una realización preferida, el biofluido es una muestra de plasma del paciente.

El nivel de expresión de la proteína ApoA1 puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de biofluido de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a ApoA1 (o a fragmentos de la misma que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína ApoA1, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. En el mercado, existen anticuerpos comerciales contra ApoA1 que pueden emplearse en el contexto de la presente invención. En una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína codificada por el gen ApoA1 se realiza mediante western blot, inmunohistoquímica o ELISA.

30

El término "valor de referencia", tal como se utiliza aquí en el contexto de la invención, se refiere a un valor de laboratorio usado como referencia para valores/datos obtenidos mediante exámenes de laboratorio de sujetos o muestras recogidas de sujetos. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, una gama de valores, un valor medio, un valor mediano,

35

un valor medio o un valor en comparación con un valor de control o valor basal particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de muestra individual, tal como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se está evaluando, pero en un momento anterior al desarrollo de la enfermedad o procedente de un tejido no canceroso. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, por ejemplo, de la población de sujetos del grupo de edad cronológica coincidente, o basada en un grupo de muestras que incluye o excluye la muestra a ensayar. Varias consideraciones se tienen en cuenta al determinar el valor de referencia. Entre tales consideraciones están la edad, el peso, el sexo, la condición física general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 y preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados de acuerdo con las consideraciones anteriores, por ejemplo según diversas categorías de edad.

El valor de referencia para el nivel de ApoA1 es preferiblemente el nivel medio de ApoA1 en plasma de un grupo de sujetos que no sufren cáncer. En otra realización preferida, el valor de referencia es el nivel medio de ApoA1 en plasma de un grupo de sujetos diagnosticados con un tumor primario. En otra realización preferida, el valor de referencia es el nivel medio de ApoA1 en plasma de un grupo de sujetos diagnosticados con metástasis.

En otra realización, la cantidad del marcador en una muestra de un sujeto puede determinarse directamente con relación al valor de referencia (por ejemplo, en términos de aumento o disminución, o aumento en número de veces o disminución en número de veces). De manera ventajosa, esto puede permitir comparar la cantidad del marcador en la muestra del sujeto con el valor de referencia (en otras palabras, medir la cantidad relativa del marcador en la muestra del sujeto frente al sujeto con el valor de referencia) sin necesidad de determinar primero las cantidades absolutas respectivas del marcador. Una vez que se establece este valor de referencia, el nivel de este marcador expresado en tejidos tumorales de sujetos puede compararse con este valor de referencia, y por lo tanto se le asigna un nivel de "aumentado" o "disminuido". Por ejemplo, un aumento de los niveles de expresión por encima del valor de referencia de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más en comparación con el valor de referencia se considera como un nivel de expresión "aumentado". Por otra parte, una disminución en los niveles de expresión por debajo del valor de referencia de al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 -flexión o incluso menos

en comparación con el valor de referencia se considera como un nivel de expresión "disminuido".

Método para seleccionar el tratamiento de un paciente con cáncer

5

Los inventores han descubierto que pacientes que sufren metástasis presentan niveles de ApoA1 en plasma reducidos con respecto a pacientes diagnosticados con un tumor primario.

10

Por lo tanto, en un tercer aspecto la invención también se refiere a un método para seleccionar el tratamiento de un paciente con cáncer que comprende determinar en un biofluido de dicho pacientes los niveles de ApoA1, en donde niveles reducidos de ApoA1 con respecto a un valor de referencia indican que la terapia de elección es una terapia basada en la apolipoproteína A, en un péptido mimético de la misma o en un activador de la misma.

15

En un modo de realización preferido, el cáncer es un tumor primario. En otro modo de realización preferido, el cáncer es una metástasis. En otro modo de realización preferido, el cáncer es un cáncer colorrectal.

20

Los términos "cáncer", "cáncer colorrectal" y "paciente" se han descrito en detalle anteriormente, y se aplican por igual a los métodos de acuerdo con el método de este tercer aspecto de la invención.

25

En el contexto del tercer aspecto de la invención, "tratamiento del cáncer" se entiende como la administración de apolipoproteína A de acuerdo a la invención para prevenir o retrasar la aparición de síntomas, complicaciones o indicaciones bioquímicas del cáncer o tumor, para aliviar sus síntomas o para detener o inhibir su desarrollo y progresión tal como, por ejemplo, la aparición de metástasis. El tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico para retrasar la aparición de la enfermedad o para prevenir la manifestación de sus síntomas clínicos o subclínicos o un tratamiento terapéutico para eliminar o aliviar los síntomas después de la manifestación de la enfermedad o en relación con su tratamiento quirúrgico o con radioterapia. La administración de apolipoproteína A de acuerdo a la invención se puede realizar simultánea o consecutivamente a cualquier otro tratamiento ya conocido en el tratamiento del cáncer.

35

En la presente invención, el término "muestra" o "muestra biológica", se refieren el material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar el marcador que se desee y puede comprender células y / o material no-celular del sujeto. La muestra puede ser aislada de cualquier tejido o fluido biológico adecuado, como por ejemplo, sangre, plasma sanguíneo, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) o de las heces. En el contexto del segundo aspecto de la invención, las muestras son muestras de biofluidos. Los términos "fluido biológico" y "biofluido" se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a fluidos acuosos de origen biológico. El biofluido se puede obtener desde cualquier localización (tales como sangre, plasma, suero, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo o acuoso, o cualquier secreción corporal), un exudado (como el líquido obtenido a partir de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), o el líquido obtenido a partir de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad como la artritis reumatoide).

15

En una realización preferida, el biofluido es una muestra de plasma del paciente.

El nivel de expresión de la proteína ApoA1 puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de biofluido de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a ApoA1 (o a fragmentos de la misma que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína ApoA1, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. En

35

el mercado, existen anticuerpos comerciales contra ApoA1 que pueden emplearse en el contexto de la presente invención. En una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína codificada por el gen ApoA1 se realiza mediante western blot, inmunohistoquímica o ELISA.

5

El término "valor de referencia", tal como se utiliza aquí en el contexto de la invención, se refiere a un valor de laboratorio usado como referencia para valores/datos obtenidos mediante exámenes de laboratorio de sujetos o muestras recogidas de sujetos. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que
10 tiene un límite superior y/o inferior, una gama de valores, un valor medio, un valor mediano, un valor medio o un valor en comparación con un valor de control o valor basal particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de muestra individual, tal como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se está evaluando, pero en un momento anterior al desarrollo de la enfermedad o procedente de un tejido no canceroso. El valor de
15 referencia puede basarse en un gran número de muestras, por ejemplo, de la población de sujetos del grupo de edad cronológica coincidente, o basada en un grupo de muestras que incluye o excluye la muestra a ensayar. Varias consideraciones se tienen en cuenta al determinar el valor de referencia. Entre tales consideraciones están la edad, el peso, el sexo, la condición física general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como grupo
20 de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 y preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados de acuerdo con las consideraciones anteriores, por ejemplo según diversas categorías de edad.

El valor de referencia para el nivel de ApoA1 es preferiblemente el nivel medio de ApoA1 en
25 plasma de un grupo de sujetos que no sufren cáncer. En otra realización preferida, el valor de referencia es el nivel medio de ApoA1 en plasma de un grupo de sujetos diagnosticados con un tumor primario. En otra realización preferida, el valor de referencia es el nivel medio de ApoA1 en plasma de un grupo de sujetos diagnosticados con metástasis.

30 En otra realización, la cantidad del marcador en una muestra de un sujeto puede determinarse directamente con relación al valor de referencia (por ejemplo, en términos de aumento o disminución, o aumento en número de veces o disminución en número de veces). De manera ventajosa, esto puede permitir comparar la cantidad del marcador en la muestra del sujeto con el valor de referencia (en otras palabras, medir la cantidad relativa
35 del marcador en la muestra del sujeto frente al sujeto con el valor de referencia) sin necesidad de determinar primero las cantidades absolutas respectivas del marcador. Una

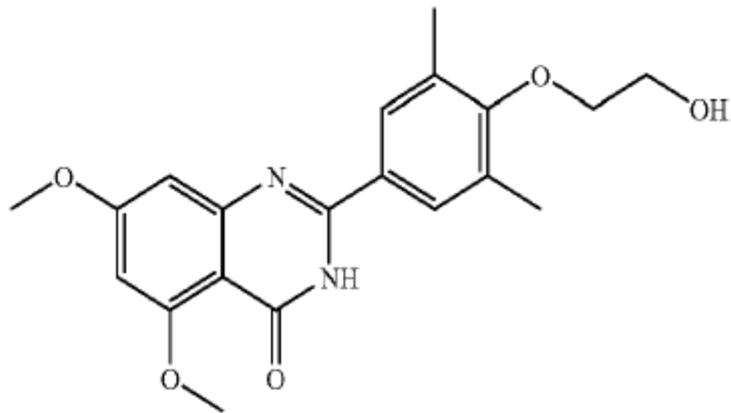
vez que se establece este valor de referencia, el nivel de este marcador expresado en tejidos tumorales de sujetos puede compararse con este valor de referencia, y por lo tanto se le asigna un nivel de "aumentado" o "disminuido". Por ejemplo, un aumento de los niveles de expresión por encima del valor de referencia de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más en comparación con el valor de referencia se considera como un nivel de expresión "aumentado". Por otra parte, una disminución en los niveles de expresión por debajo del valor de referencia de al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos en comparación con el valor de referencia se considera como un nivel de expresión "disminuido".

En el contexto de la presente invención, la apolipoproteína A se selecciona de entre ApoA1, ApoA2, ApoA4 y ApoA5. En una realización particular, la apolipoproteína A es ApoA1.

Los términos "apolipoproteína A", "ApoA1", "ApoA2", "ApoA4" y "ApoA5" se han descrito en detalle anteriormente, y se aplican por igual a los métodos de acuerdo con el método de este tercer aspecto de la invención.

En el contexto del tercer aspecto de la presente invención, se entiende por "activador de la apolipoproteína A" toda molécula capaz de aumentar la expresión del RNA mensajero de apolipoproteína A, así como de aumentar la concentración de la apolipoproteína A, dando lugar a un incremento de la proteína lipídica de alta densidad (HDL).

En una realización preferida, el activador de la apolipoproteína A es apabetalone (RVX-208). RVX-208 (2-(4-(2-hidroxietoxi)-3,5-dimetilfenil)-5,7-dimetoxiquinazolin-4(3H)-ona) se describe en detalle en la figura 20 de la patente US 8,053,440. Así, en una realización preferida, el activador de la apolipoproteína A tiene la siguiente estructura:

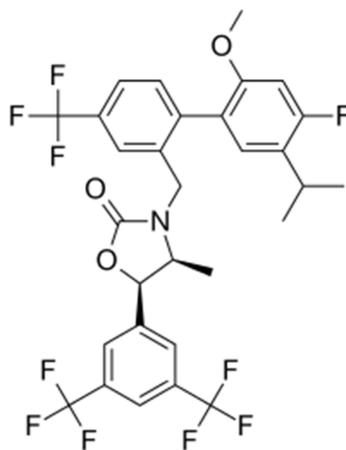


En otra realización preferida, el activador de la apolipoproteína A es lecitín colesterol acil transferasa.

5

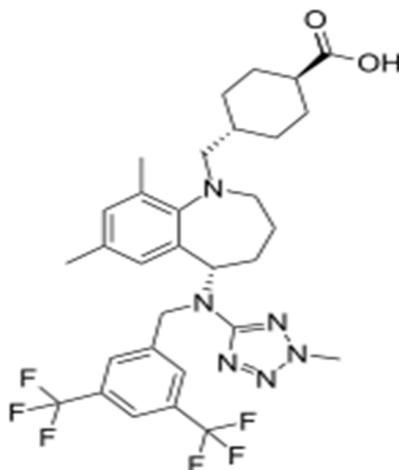
En otra realización preferida, el activador de la apolipoproteína A es la (4S, 5R)-5-[3,5-bis (trifluorometil) fenil]-3-({2-[4-fluoro-2-metoxi-5-(propan-2-il) fenil]-5-(trifluorometil) fenil} metil)-4-metil-1,3-oxazolidin-2-ona. Así, en esta realización preferida, el activador de la apolipoproteína A tiene la siguiente estructura:

10



En otra realización preferida, el activador de la apolipoproteína A es el ácido trans-4-(((5S)-5-[[[3,5-bis (trifluorometil) fenil] metil] (2-metil-2H-tetrazol-5-il) amino]-7,9-dimetil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzazepin-1-il) metil) ciclohexanocarboxílico. Así, en esta realización preferida, el activador de la apolipoproteína A tiene la siguiente estructura:

15



En el contexto del tercer aspecto de la presente invención, el término “péptido mimético” se refiere a una pequeña cadena similar a la proteína diseñada para imitar un péptido. Típicamente surgen de la modificación de un péptido existente, o mediante el diseño de sistemas similares que imitan péptidos, tales como peptoides y péptidos β . Independientemente del enfoque, la estructura química alterada está diseñada para ajustar ventajosamente las propiedades moleculares tales como estabilidad o actividad biológica. Esto puede tener un papel en el desarrollo de compuestos similares a fármacos a partir de péptidos existentes. Estas modificaciones implican cambios en el péptido que no se producirán de forma natural (tal como una estructura lineal alterada y la incorporación de aminoácidos no naturales).

En una realización preferida de la invención, el péptido mimético de ApoA1 es un complejo de lipoproteína que comprende una fracción de la apolipoproteína ApoA-1 y una fracción lipídica.

En el contexto de la presente invención, las lipoproteínas son complejos macromoleculares que están compuestos por proteínas y lípidos. Las lipoproteínas transportan las grasas por todo el organismo. Son esféricas, hidrosolubles, formadas por (a) un núcleo de lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) y (b) una capa externa polar formada por apoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre. Las lipoproteínas se clasifican en diferentes grupos según su densidad, a mayor densidad mayor contenido en proteínas (a mayor diámetro, mayor contenido de lípidos): quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Cada tipo de lipoproteína tiene una composición y una proporción características de apolipoproteínas (ApoA, ApoB, ApoC, ApoE).

La fracción lipídica del complejo de lipoproteína comprende fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina (cefalina), fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, esfingomielina, gangliósido, cerebrósido, o combinaciones de los mismos.

5

La relación molar de la fracción lipídica respecto de la fracción de la apolipoproteína ApoA-1 puede estar comprendida en el intervalo de aproximadamente 200: 1 a 2: 1; de aproximadamente 180: 1 a 2: 1; de aproximadamente 160: 1 a 2: 1; de aproximadamente 140: 1 a 2: 1; de aproximadamente 120: 1 a 2: 1; de aproximadamente 100: 1 a 2: 1; de aproximadamente 90: 1 a 2: 1; de aproximadamente 80: 1 a 2: 1; de aproximadamente 70: 1 a 2: 1; de aproximadamente 60: 1 a 2: 1; de aproximadamente 50: 1 a 2: 1; de aproximadamente 40: 1 a 2: 1; de aproximadamente 30: 1 a 2: 1; de aproximadamente 20: 1 a 2: 1; de aproximadamente 10: 1 a 2: 1; de aproximadamente 5: 1 a 2: 1.

10

15 En una realización preferida, la fracción lipídica del complejo de lipoproteína consiste esencialmente en esfingomielina y aproximadamente 3 % en peso de un fosfolípido cargado negativamente, y la relación molar de la fracción lipídica respecto de la fracción de la apolipoproteína ApoA-1 está en el intervalo de aproximadamente 200: 1 a 2: 1.

20 En una realización aún más preferida, el péptido mimético de ApoA1 es CER-001: (www.cerenis.com/en/our-therapies/cer-001).

CER-001 comprende ApoA1, esfingomielina y DPPG en una relación de peso de fosfolípidos frente a peso de lipoproteína de 1: 2,7; y con una relación en peso de esfingomielina frente a peso de DPPG de 97: 3. CER-001 se prepara de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4 de WO 2012/109162.

25

La invención se detalla a continuación por medio de los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención.

30

EJEMPLOS

Materiales y métodos

35

Los ensayos de viabilidad y proliferación celular se han llevado a cabo mediante la tecnología XCELLigence (ACEA Biosciences, Inc.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los ensayos de migración e invasión se han llevado a cabo en placas Corning® BioCoat™ Control (#354578) y Corning® BioCoat™ Matrigel (#354480) respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para los ensayos de rescate, las células fueron tratadas durante 72h con apabetalone (RVX-208; Biovision) 30µM. Anticuerpos: ABCA1 (Ab18180, Abcam. 1:500); Caveolina-1 (Ab2910, Abcam. 1:1000); α-tubulina (T9026, Sigma 1:1000). Las células DLD1 corresponden a una línea celular epitelial adherente derivada de cáncer colorrectal humano (ATCC® CCL-221™). Las líneas celulares estables capaces de sobreexpresar ABCA1 se han obtenido mediante la transducción de lentivirus modificados genéticamente.

Ejemplo 1: la proteína ApoA1 ofrece protección frente a la malignidad celular

En relación con el primer aspecto de esta invención, la generación de líneas celulares estables DLD1 para la sobreexpresión de ApoA1 (Figura 1A) permitió a los inventores observar que, si bien no existen diferencias significativas en la capacidad proliferativa (Figura 1B), aquellas células con niveles elevados de ApoA1 tienen disminuida la capacidad invasiva (Figura 1C). Por otra parte, al analizar los niveles de expresión de ApoA1 en dos cohortes de pacientes de cáncer colorrectal del Hospital Universitario de La Paz, los inventores observaron cómo aquellos pacientes en estadio II (CRC-TNM Stage II o SII) expresan, en el tejido tumoral, niveles de ApoA1 que son significativamente mayores que el tejido sano correspondiente. Sin embargo, aquellos pacientes en estadios más avanzados y por tanto más invasivos, presentan una disminución significativa de los niveles de RNA mensajero de ApoA1 (Figura 2A). Se llevó a cabo también un análisis ELISA de plasma derivado de pacientes del mismo hospital que habían sido diagnosticados de un tumor primario de colon y de pacientes que presentaban metástasis (Figura 2B). Por tanto, los resultados descritos sugieren que la proteína ApoA1 ofrece protección frente a la malignidad celular.

30

Ejemplo 2: la proteína ApoA1 inhibe la proliferación, migración e invasión de células DLD1

Con el objetivo de corroborar los resultados anteriores *in vitro*, los inventores llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular que les permitieron demostrar como la administración de ApoA1 en una concentración de 40µg/ml en una primera dosis de 72h y en una concentración de 20µg/ml durante la adquisición de resultados da lugar a una disminución

35

significativa de la proliferación celular (Figura 3A). Siguiendo el mismo esquema en cuanto al tratamiento, los inventores llevaron a cabo ensayos de migración e invasión. En este caso, aquellas células tratadas con ApoA1 mostraron disminuidas sus capacidades de migrar hacia la región rica en suero o invadir la matriz extracelular (Figura 3B).

5

Ejemplo 3: RVX-208 inhibe la proliferación de células DLD1

Los mismos ensayos fueron repetidos sustituyendo la ApoA1 por un tratamiento con RVX-208. En este caso, las células DLD1 fueron pre-tratadas durante las 72h previas al inicio del experimento con una concentración de RVX-208 de 30µM y fueron sometidas a un tratamiento con RVX-208 de 15µM durante el desarrollo de los experimentos. Primero, como se muestra en la Figura 4A, dicho tratamiento provocó un descenso significativo en la capacidad proliferativa. Por otra parte, las células tratadas presentan alteraciones en los niveles de expresión de genes que se utilizan como marcadores de la transición epitelio-mesénquima característica de las células tumorales; esto es: aumento en los niveles de expresión de E-cadherina y descenso en los niveles de vimentina (Figura 4B).

10
15

Ejemplo 4: la proteína ApoA1 inhibe la proliferación, migración e invasión de células DLD1 que expresan ABCA1

20

Al ser comparadas con la situación control, las células DLD1_ABCA1 que expresan niveles elevados del transportador ABCA1 (Figura 5A) mostraron mayor capacidad proliferativa (Figura 5B), así como un aumento significativo de las capacidades de migración e invasión (Figura 5C). Al ser tratadas con 40µg/ml de apolipoproteína A1, las células DLD1_ABCA1 redujeron su capacidad proliferativa a niveles comparables a la situación control (Figura 6A). Además, el incremento de las capacidades migratorias e invasivas fueron también controladas gracias al tratamiento (Figura 6B).

25

Ejemplo 5: RVX-208 inhibe la proliferación de células DLD1 que expresan ABCA1

30

Los inventores pudieron confirmar dichos resultados gracias al tratamiento con RVX-208 de células DLD1 que expresan ABCA1 en las condiciones ya detalladas en el Ejemplo 3. En este caso, las células DLD1 que sobre-expresan ABCA1 fueron pre-tratadas durante las 72h previas al inicio del experimento con una concentración de RVX-208 de 30µM y fueron sometidas a un tratamiento con RVX-208 de 15µM durante el desarrollo de los experimentos. Primero, como se muestra en la Figura 7A, dicho tratamiento provocó un

35

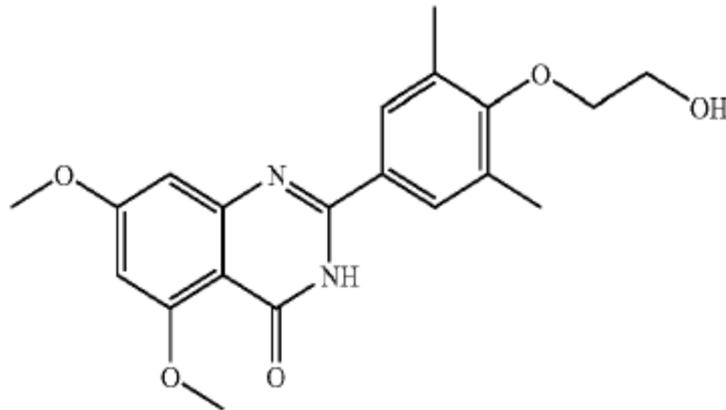
descenso significativo en la capacidad proliferativa. Además, el incremento de las capacidades migratorias e invasivas fueron también controladas gracias al tratamiento (Figura 7B). Por otra parte, las células tratadas presentan alteraciones en los niveles de expresión de genes que se utilizan como marcadores de la transición epitelio-mesénquima característica de las células tumorales; esto es: aumento en los niveles de expresión de E-cadherina y descenso en los niveles de vimentina (Figura 7C, gráfica de la izquierda). En este experimento fueron analizados también los niveles de Caveolina-1, proteína cuyos niveles elevados han sido asociados con incrementos en la migración y la invasión celular. Mediante un ensayo de Western blot, los inventores pudieron constatar que el tratamiento con RVX-208 es capaz de disminuir los niveles de dicha proteína (Figura 7C, paneles de la derecha).

Ejemplo 6: RVX-208 actúa a través del aumento de los niveles de ApoA1

Con el objetivo de confirmar que los efectos de RVX-208 en la recuperación del fenotipo celular eran debidos al aumento de expresión en ApoA-1, los inventores inhibieron la expresión de dicha proteína mediante la transfección de un RNA pequeño complementario, ShApoA1 (Figura 8). 24 horas después de la transfección con el vector para expresión de ShApoA1, los inventores comenzaron el tratamiento con 30µM de RVX-208. Viabilidad y proliferación celular en células DLD1 (D_NoORF) y en líneas celulares de DID1 que expresan niveles elevados de ApoA1 (D_ApoA1) fueron analizadas con el sistema xCELLigence. En ambos casos, aquellas células tratadas con RVX-208 y en las que no se había inhibido la expresión de ApoA1 (Scr + Rvx-208), los índices de proliferación eran significativamente menores. Además, la interferencia de la proteína con shApoA1 provoca un aumento significativo en los niveles de proliferación de las células control. Ambos resultados demuestran que los efectos antiproliferativos de RVX-208 se deben a un aumento en los niveles de expresión de la Apolipoproteína A1.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un activador de la la apolipoproteína A para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer, en donde el
5 cáncer es un cáncer colorrectal, y en donde el activador de la apolipoproteína A tiene la siguiente estructura:



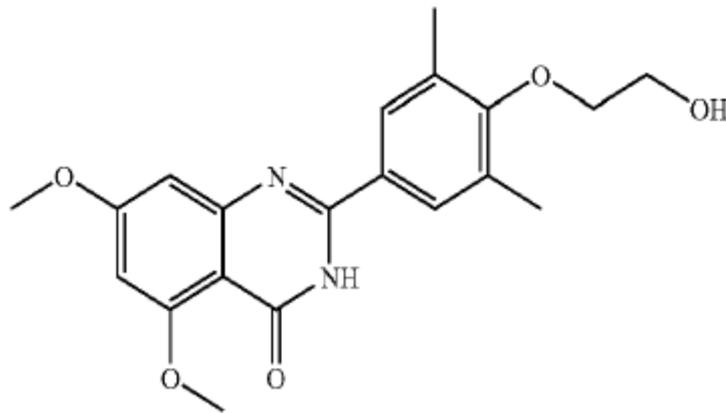
2. Uso según la reivindicación 1 en donde el cáncer es un tumor primario.
10
3. Uso según la reivindicación 1 en donde el cáncer es una metástasis.
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el cáncer se
15 caracteriza por encontrarse en un paciente que presenta un nivel elevado de expresión del gen ABCA1 con respecto a un valor de referencia, por presentar un nivel elevado de un metabolito resultante de la actividad de ABCA1 con respecto a un valor de referencia y/o por presentar un nivel elevado de un parámetro asociado con la actividad de ABCA1.
- 20 5. Uso según la reivindicación 4 en donde el nivel de expresión de ABCA1 en el tumor primario es de al menos dos veces el valor de referencia.
6. Uso según la reivindicación 4 en donde el metabolito resultante de la actividad de ABCA1 es colesterol.
- 25 7. Uso según la reivindicación 4 el parámetro asociado con la actividad de ABCA1 es la vida media de la caveolina-1.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 en donde el valor de referencia es el nivel de expresión de ABCA1 en un tejido no tumoral, el nivel del metabolito resultante de la actividad de ABCA1 en un sujeto sano que no sufre de cáncer o el valor de la vida media de caveolina-1 en un sujeto que no sufre cáncer.

5

9. Método para seleccionar el tratamiento de un paciente con cáncer que comprende determinar en un biofluido de dicho pacientes los niveles de ApoA1, en donde niveles reducidos de ApoA1 con respecto a un valor de referencia indican que la terapia de elección es una terapia basada en un activador de la apolipoproteína A, en donde el cáncer es un cáncer colorrectal, y en donde el activador de la apolipoproteína A tiene la siguiente estructura:

10



15

10. Método según la reivindicación 9 en donde el cáncer es un tumor primario.

11. Método según la reivindicación 9 en donde el cáncer es una metástasis.

FIGURA 1:

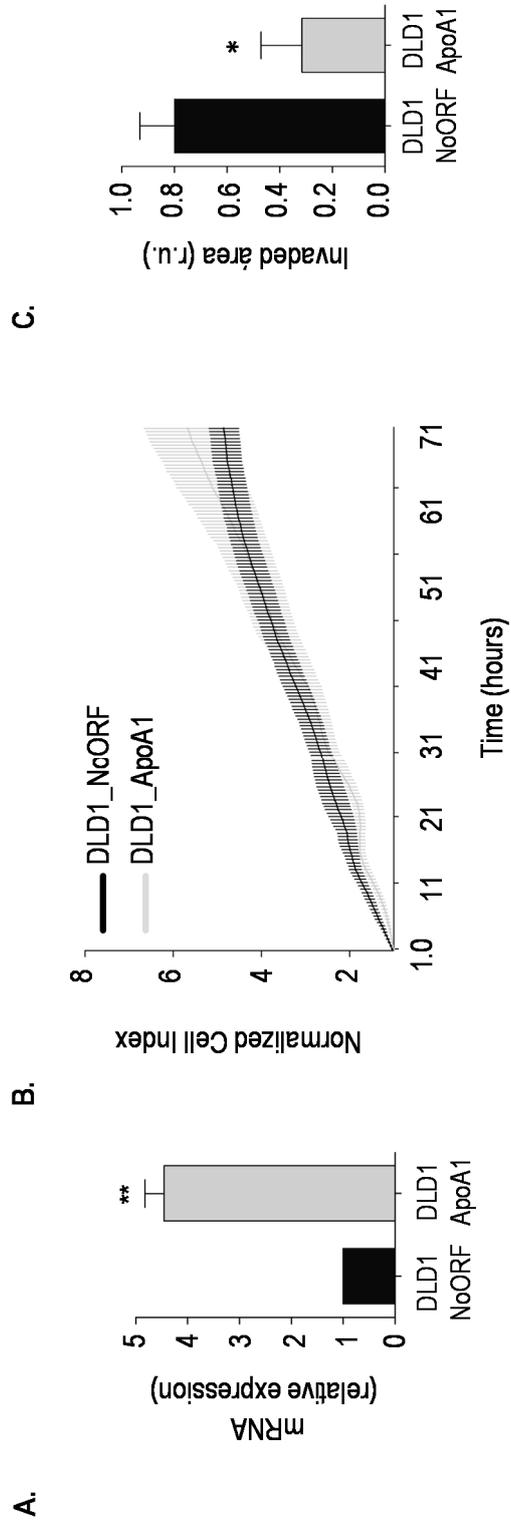


FIGURA 2:

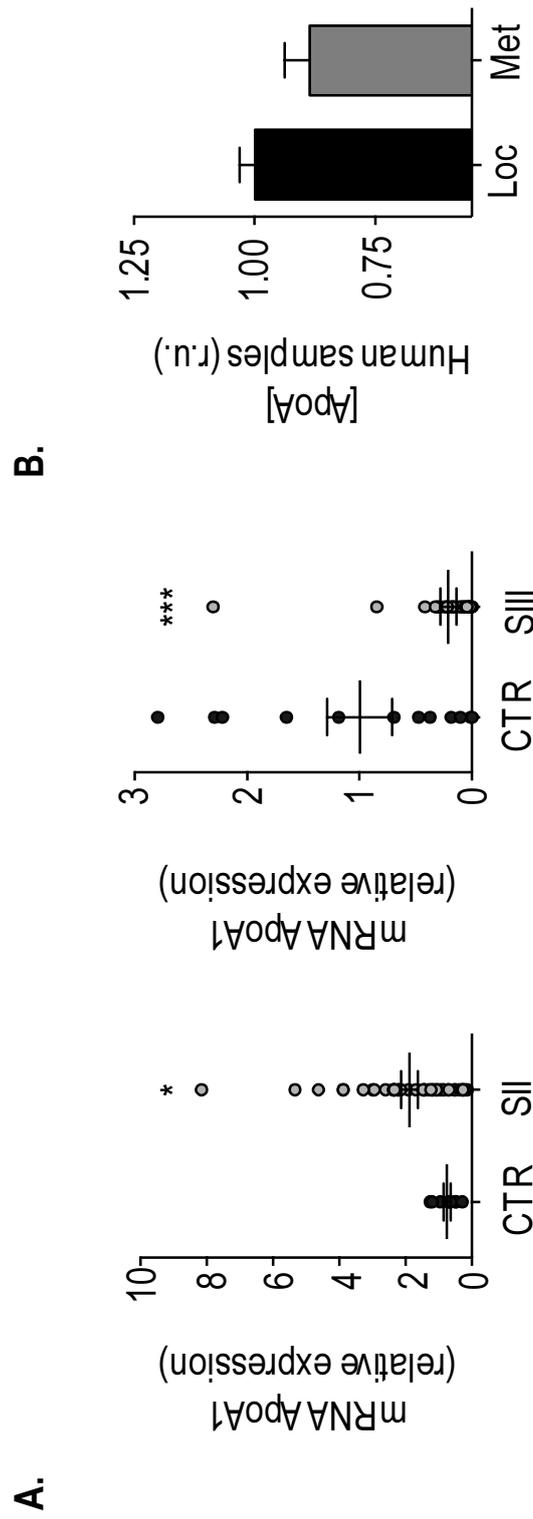


FIGURA 3:

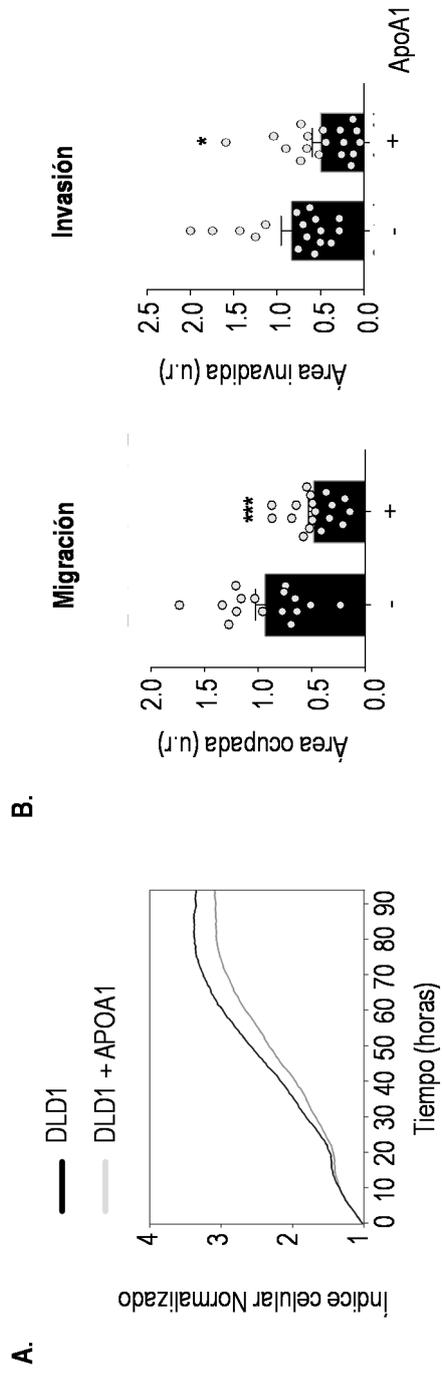


FIGURA 4:

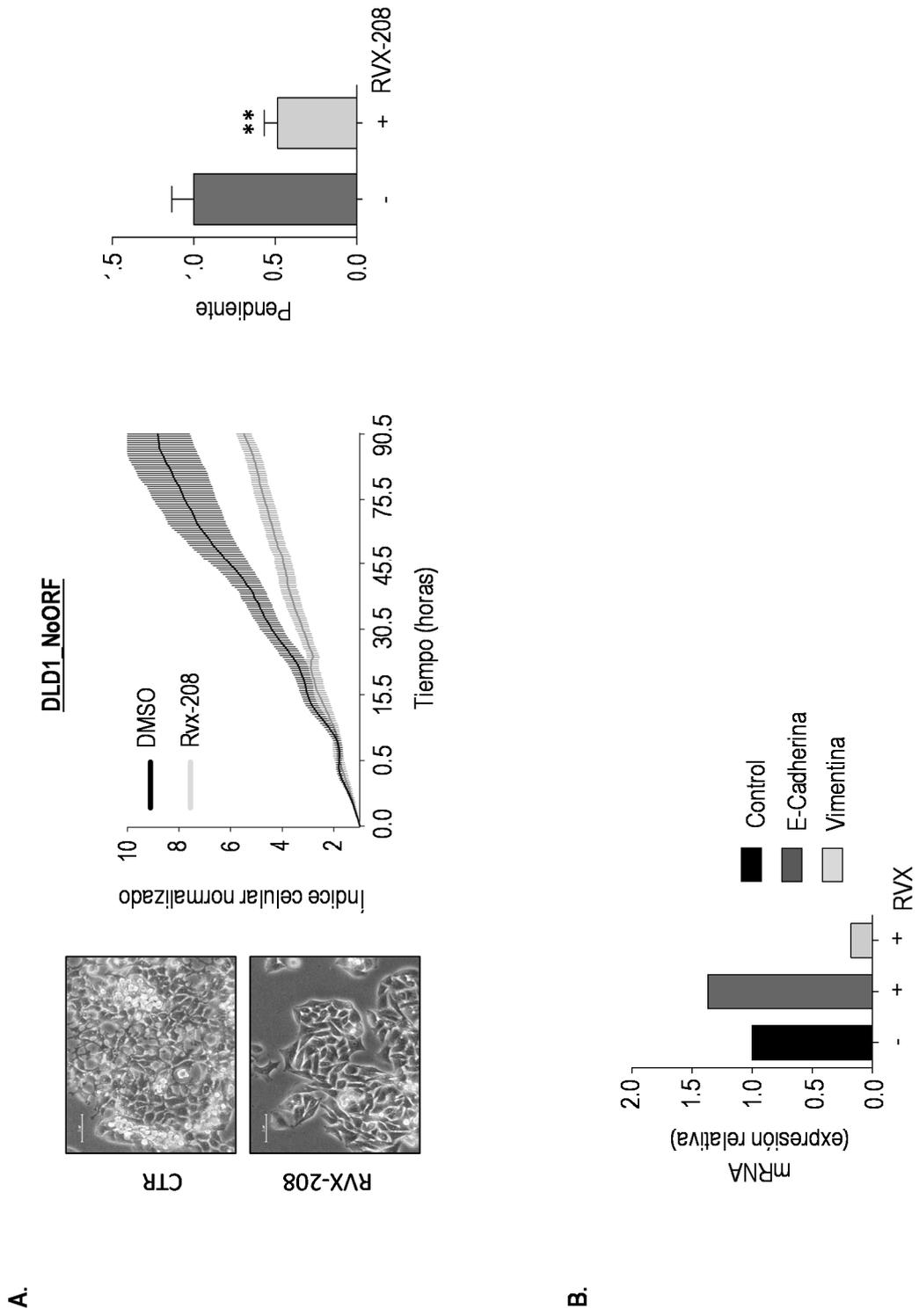


FIGURA 5:

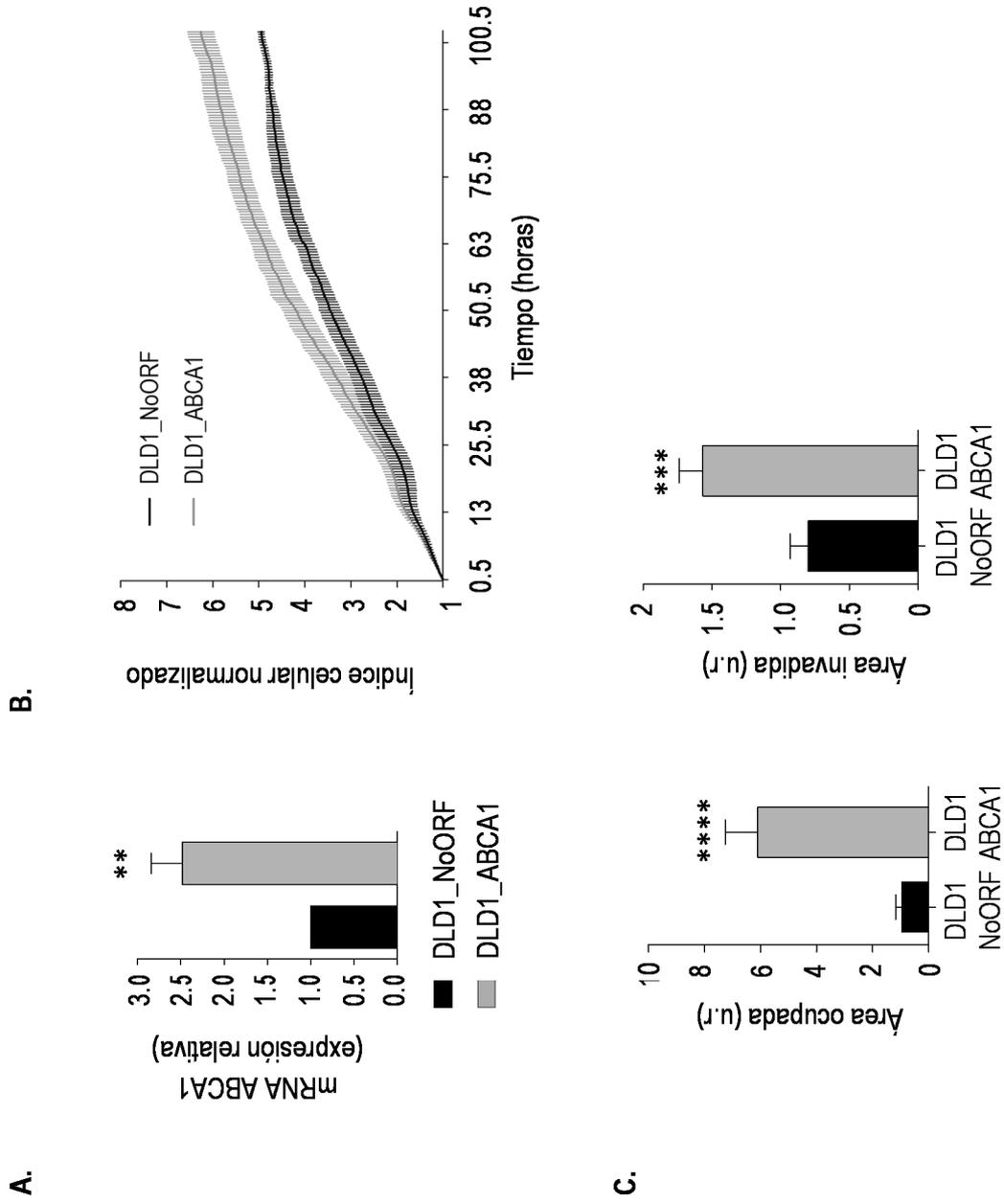


FIGURA 6:

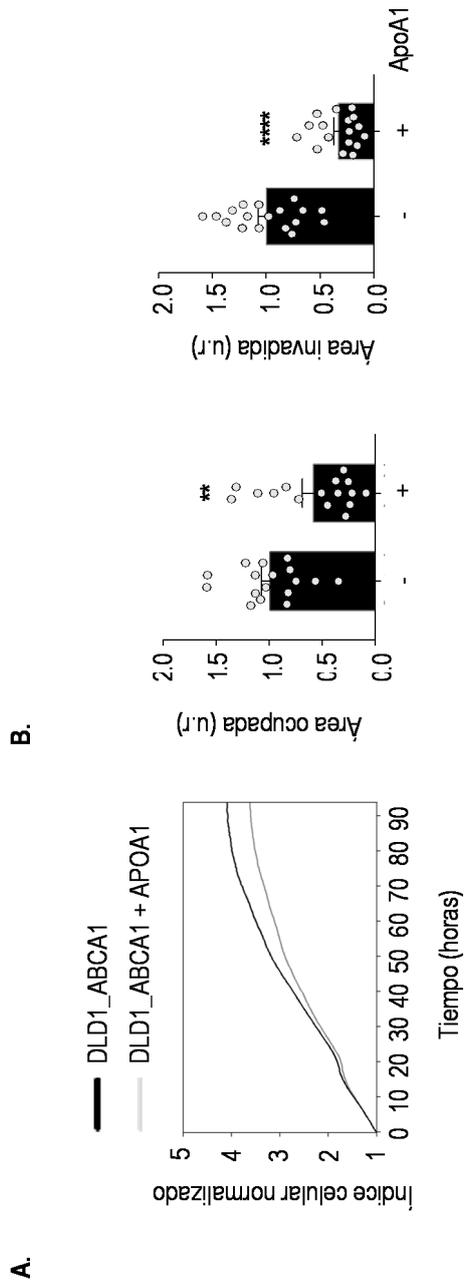
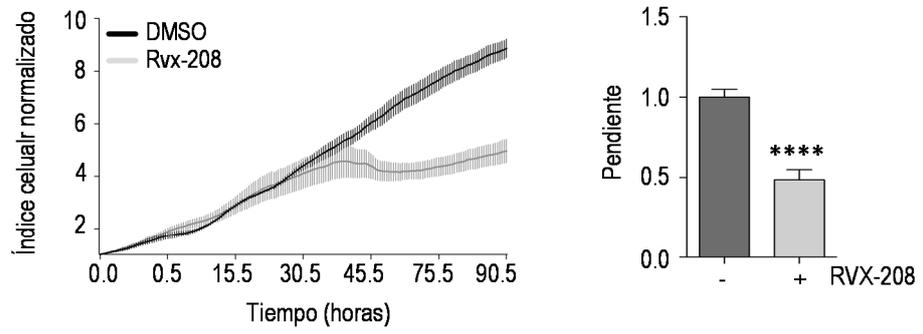
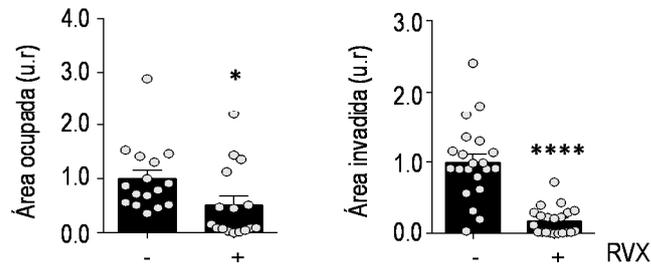


FIGURA 7:

A.



B.



C.

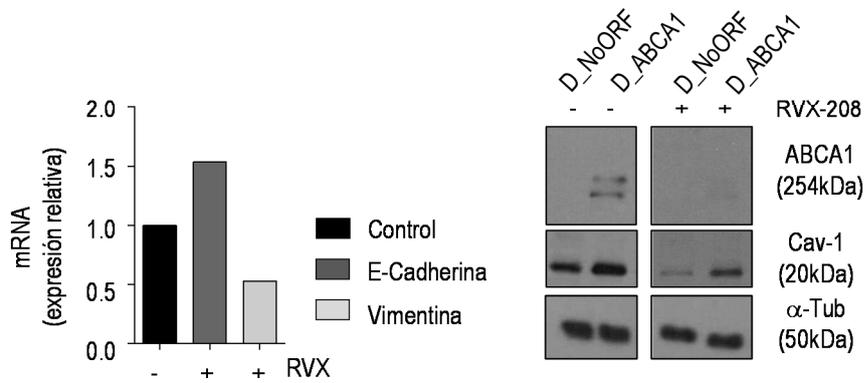
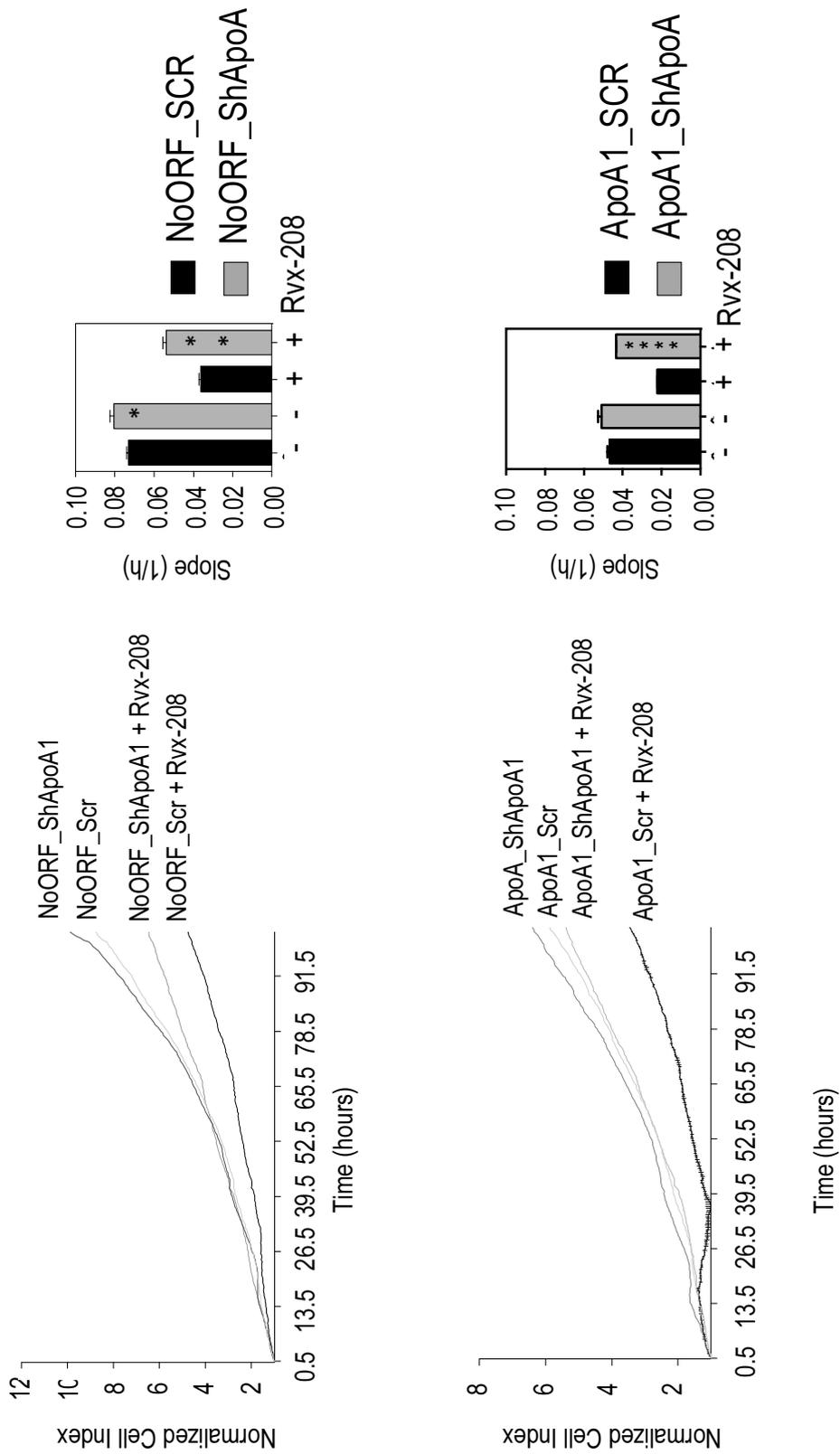


FIGURA 8:





- ②① N.º solicitud: 201730304
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.03.2017
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ES 2454966 T3 (RESVERLOGIX CORP. (100.0%)) 14/04/2014, página 2, líneas 4-44; página 11, líneas 33-34; Página 37, línea 44 - página 38, línea 4.	1-11
Y	ZAMANIAN-DARYOUSH M. & DIDONATO JA. APOLIPOPROTEIN A-I AND CANCER. <i>Frontiers in Pharmacology</i> , November 2015, Vol. 6 (Article 265), páginas 1-10, todo el documento.	1-8
Y	ES 2569485 T3 (BIOMERIEUX (100.0%)) 11/05/2016, Página 2, líneas 5-9; página 3, líneas 22-63.	9-11
A	ZHANG X <i>et al.</i> LIPID LEVELS IN SERUM AND CANCEROUS TISSUES OF COLORECTAL CANCER PATIENTS. <i>World Journal of Gastroenterology</i> . 2014, Vol. 20(26), páginas 8646-8652, Todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 11.06.2018</p>	<p>Examinador M. D. García Grávalos</p>	<p>Página 1/5</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/517 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.06.2018

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2454966 T3	14.04.2014
D02	ZAMANIAN-DARYOUSH M. & DiDONATO JA. <i>Frontiers in Pharmacology</i> . 2015. Vol. 6 (Article 265), pp:1-10	November 2015
D03	ES 2569485 T3	11.05.2016
D04	ZHANG X <i>et al.</i> <i>World Journal of Gastroenterology</i> , Vol. 20(26), pp: 8646-8652.	2014

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere al uso del activador de la apolipoproteína A denominado apabetalone (RVX-208) para preparación de un medicamento para tratamiento o prevención del cáncer colorrectal de origen primario o de una metástasis; así como un método para seleccionar el tratamiento de un paciente con cáncer colorrectal, determinando en un biofluido los niveles de ApoA1, indicando niveles reducidos de esta proteína que el paciente es apto para una terapia basada en un tratamiento con apabetalone (reivindicaciones 1-11).

El documento D01 se refiere a compuestos que son útiles para regular la expresión de la ApoA-1, y a su uso para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares y estados patológicos relacionados, que incluyen trastornos relacionados con colesterol o lípidos, como aterosclerosis (ver página 2, líneas 4-44; página 11, líneas 33-34; página 37, línea 44 - página 38, línea 4).

El documento D02 se refiere a un estudio que relaciona el incremento de los niveles de apolipoproteína A1 con la protección frente a desarrollo de tumores; así como el uso de ApoA1 humana en la preparación de un producto para tratamiento de tumores en ratones (ver todo el documento).

El documento D03 se refiere a un método *in vitro* de diagnóstico de cáncer colorrectal, mediante la determinación de los niveles de apolipoproteína A1 en una muestra biológica aislada de un paciente, respecto de los valores de referencia para sujetos sanos (ver página 2, líneas 5-9; página 3, línea 22 - página 3, línea 19).

El documento D04 se refiere a un estudio que muestra la diferencia entre los niveles de lípidos en suero y tejido canceroso procedentes de pacientes con cáncer colorrectal con los procedentes de individuos sanos (ver todo el documento).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1-11**

La presente solicitud de invención reivindica el uso del activador de la ApoA1, denominado apabetalone (RVX-208), para preparación de un medicamento para tratamiento o prevención del cáncer colorrectal de origen primario o metástasis; así como un método para seleccionar pacientes para una terapia basada en este producto.

El uso de apabetalone (RVX-208) para tratamiento o prevención del cáncer colorrectal no ha sido encontrado en el estado de la técnica. Del mismo modo tampoco se ha encontrado un método para seleccionar pacientes para aplicar esta terapia.

Por consiguiente, las reivindicaciones 1-11 cumplen el requisito de novedad (**Art. 6.1 LP 11/1986**)

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)**2.1. REIVINDICACIONES 1-8**

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica ya que anticipa compuestos activadores de la expresión de la ApoA1, entre los que se encuentra apabetalone (RVX-208), y su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares u otros estados patológicos relacionados con lípidos y colesterol. La diferencia entre el documento D01 y el objeto técnico de las reivindicaciones de la solicitud radica en que en este documento no se hace referencia al tratamiento o prevención del cáncer.

El documento D02 se refiere a un estudio que relaciona el incremento de los niveles de ApoA1 con la protección frente a desarrollo de diferentes tipos de tumores y el uso de esta proteína en la preparación de un producto para tratamiento de tumores en ratones. En este documento también se hace referencia al papel de la ApoA1 y del gen ABCA1 en el transporte reverso del colesterol.

Por lo tanto según lo divulgado en D01 en combinación con D02, resultaría obvio para un experto en la materia el uso de un activador de la ApoA1, como apabetalone (RVX-208), para preparar un medicamento para tratamiento o prevención del cáncer, incluido cáncer colorrectal.

El hecho de que el tratamiento fuera para un tumor que expresara el gen ABCA1 y donde el nivel de expresión de dicho gen fuera al menos dos veces el valor de referencia respecto a un individuo sano, no está soportado por los ejemplos que acompañan a la invención. En ellos se muestra la actividad de un tratamiento con ApoA1 o apabetalone en ensayos de viabilidad celular *in vitro* frente a la línea celular de adenocarcinoma de colon humano DLD.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-8 no cumplen el requisito de actividad inventiva (**Art. 8.1 LP 11/1986**)

2.2. REIVINDICACIONES 9-11

El documento D03 se refiere a un método *in vitro* de diagnóstico, pronóstico y seguimiento terapéutico de cáncer colorrectal, determinando la disminución de ApoA1 en una muestra biológica aislada de un paciente respecto de un valor control procedente de un individuo sano.

A la vista de este documento, resultaría obvio para un experto en la materia valorar este marcador en un paciente con cáncer colorrectal. Si el diagnóstico fuera positivo para la enfermedad, mostrando niveles más bajos que el control, indicaría que es apto para un tratamiento con apabetalone.

En consecuencia, las reivindicaciones 9-11 no cumplen el requisito de actividad inventiva (**Art. 8.1 LP 11/1986**)

Aunque el documento D04 también relaciona el cáncer colorrectal con niveles más bajos de expresión de ApoA1, se considera que se refiere al estado de la técnica y no es relevante a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud de invención.