

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 490**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2015 PCT/CZ2015/000029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15144102**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2015 E 15717786 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 3122902**

54 Título: **Método de predicción de la respuesta tumoral a inhibidores de la metilación del ADN**

30 Prioridad:

**27.03.2014 EP 14161897**

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

**13.09.2018**

73 Titular/es:

**PALACKÝ UNIVERSITY IN OLOMOUC (100.0%)  
Křížkovského 8  
771 47 Olomouc, CZ**

72 Inventor/es:

**AGRAWAL, KHUSHBOO;  
DZUBAK, PETR;  
FRYDRYCH, IVO y  
HAJDUCH, MARIAN**

74 Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

**ES 2 681 490 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).

**MÉTODO DE PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL A INHIBIDORES DE LA METILACIÓN DEL ADN****DESCRIPCIÓN****5 Campo de la técnica**

La invención se refiere a un método para predecir la respuesta tumoral (es decir, sensible o resistente) hacia inhibidores de la metilación del ADN.

**10 Técnica anterior**

La resistencia al tratamiento quimioterápico es uno de los principales impedimentos que impiden la terapia contra el cáncer satisfactoria (Gottesman M.M. *et al.*, Nature Reviews Cancer 2002; 2, 48-58). Aunque la investigación ha desentrañado las firmas moleculares principales de resistencia a la quimioterapia, incluyendo la inactivación intracelular del fármaco (Garattini S. *et al.*, European Journal of Cancer 2007; 43, 271-82), defectos en la reparación de apareamientos erróneos en el ADN (Fink D. *et al.*, Clinical Cancer Research 1998; 4, 1-6), evasión de la apoptosis (Hanahan D. *et al.*, Cell 2000; 100, 57-70), transportadores de membrana (Huang Y. *et al.*, Cancer Research 2004; 64, 4294-301) y muchos más, el fracaso de la quimioterapia contra el cáncer sigue sin resolverse frecuentemente. Además, un mecanismo de resistencia farmacológica particular definido en sistemas de cultivo celular y modelos animales no se correlaciona necesariamente con la patología molecular individual en clínica (Cimoli G. *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1705, 103-20). Esto ha subrayado la importancia fundamental de investigar las dianas adicionales para sensibilizar a los pacientes con cáncer, resistentes a un fármaco particular, y adaptar los regímenes terapéuticos alternativos para pacientes individuales. Actualmente, la epigenética ha surgido como uno de los campos más prometedores que expanden los límites de la oncología y la metilación aberrante del ADN constituye la característica consecuente debido a su implicación frecuente en todos los tipos de cáncer (Rodríguez-Paredes M. *et al.*, Nature Medicine 2011; 17, 330-39). Análogos de citosina, 5-azacitidina (AZA) y 2'-desoxi-5-azacitidina (DAC) son actualmente uno de los fármacos epigenéticos más eficaces (Stresemann C. *et al.*, International Journal of Cancer 2008; 123, 8-13), que funcionan inhibiendo la expresión de ADN metiltransferasas *de novo*, y han mostrado una potencia sustancial en la reactivación de genes supresores de tumores silenciados por metilación aberrante del ADN (Karahoca M. *et al.*, Clinical Epigenetics 2013; 5, 3). Los inhibidores de ADN metiltransferasas prototípicos, AZA y DAC son uno de los pocos fármacos a los que responden los pacientes que padecen síndromes mielodisplásicos (MDS) y leucemia mieloide aguda (AML), y han sido aprobados por la Food And Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para el tratamiento de MDS (Saba H.I. *et al.*, Therapeutics and Clinical Risk Management 2007; 3, 807-17). Aparte de ser terapias establecidas para tumores malignos mieloides, parecían ser prometedoras en la erradicación de tumores sólidos durante ensayos clínicos tempranos (Cowan L.A. *et al.*, Epigenomics 2010; 2, 71-86). Sin embargo, como otros fármacos anticancerígenos, la resistencia a estos agentes hipometilantes es una barrera importante que revierte la terapia epigenética. La mayoría de los pacientes no responden a la terapia y experimentan resistencia primaria mientras que los que responden inicialmente adquieren resistencia secundaria y sucumben a la enfermedad, a pesar de la terapia continuada (Prébet T. *et al.*, Journal of Clinical Oncology 2011; 29, 3322-7). Los mecanismos moleculares que esclarecen la causa de la resistencia a estos fármacos *in vitro* son diversos, incluyendo un flujo de entrada insuficiente del fármaco por transportadores de membrana, deficiencia de la enzima desoxicitidina cinasa requerida para la activación del fármaco, o desaminación por citidina desaminada que conduce a un aumento del metabolismo del fármaco, pero no pueden explicar la resistencia adquirida en pacientes. Además, también se ha implementado que la resistencia secundaria a DAC es probable que sea independiente de la metilación del ADN y se desarrolla resistencia independientemente de una desmetilación persistente (Qin T. *et al.*, PLOS ONE 2011; 6, e23372). Además, es un hecho innegable que la reexpresión de genes supresores de tumores silenciados epigenéticamente tras el tratamiento con DAC es transitoria (Kagey J.D. *et al.*, Molecular Cancer Research 2010; 8, 1048-59). La retirada de DAC da como resultado finalmente resilenciamiento génico que conduce a resistencia mientras que la reexpresión génica sostenida concuerda con la respuesta clínica, apoyando el papel del resilenciamiento génico en el desarrollo de resistencia farmacológica (Hesson L.B. *et al.*, PLOS Genetics 2013; 9, e1003636). Si el foco se pone sobre el resilenciamiento génico como requisito previo para la resistencia, pone de relieve el dogma central de la epigenética que expresa que los mecanismos de silenciamiento génico (hipermetilación del ADN, mutaciones en complejos de remodelación de cromatina y modificaciones de histonas postraduccionales múltiples) no están aislados unos de otros sino interconectados (Grant S. *et al.*, Clinical Cancer Research 2009; 15, 7111-3). En este contexto, los bromodominios (BRD), módulos efectores de cromatina que reconocen y se unen a motivos de  $\epsilon$ -N-acetil-lisina han surgido rápidamente como nuevas dianas excitantes en la búsqueda de avance clínico en el cáncer (Muller S. *et al.*, Expert Reviews in Molecular Medicine). El papel de genes de bromodominios múltiples en la restricción de la propagación del silenciamiento heterocromático se ha explorado en el pasado (Jambunathan N. *et al.*, Genetics 2005; 171, 913-22). Además, las proteínas de bromodominios desempeñan un papel crítico en la activación génica mediante el reclutamiento de los factores necesarios para la transcripción (Josling G.A. *et al.*, Genes 2012; 3, 320-43).

La presente invención expone tales genes que contienen bromodominios y/o proteínas codificadas por el gen, cuya expresión se regulaba de manera diferencial durante el desarrollo de resistencia, y cuya selección como diana puede sensibilizar a los pacientes que padecen resistencia hacia inhibidores de la metilación del ADN. Por tanto, la

presente invención proporciona un método para determinar la respuesta de los pacientes (es decir, sensible o resistente) hacia inhibidores de la metilación del ADN.

**Divulgación de la invención**

5 La primera realización de la invención es un método para predecir la sensibilidad de un paciente que padece una enfermedad de cáncer a la terapia de inhibidores de la metilación del ADN, que comprende determinar *in vitro* en las células cancerosas tomadas del paciente y comparar con los valores para el tipo de células original

10 - el nivel de expresión del gen BRD4, en el que la disminución en la expresión determina resistencia, opcionalmente en combinación con uno o más o todos de los genes adicionales seleccionados del grupo que comprende:

Gen	Cambio en la expresión que determina resistencia
ASH1L	aumento
ATAD2	disminución
BAZ1B	disminución
BAZ2A	aumento
BAZ2B	disminución
BRD1	disminución
BRD2	aumento
BRD3	aumento
BRD7	disminución
BRD8	disminución
BRWD1	aumento
CECR2	aumento
CREBBP	aumento
EP300	aumento
KAT2A	aumento
KAT2B	aumento
KMT2A	aumento
SMARCA2	aumento
SP100	aumento
SP110	aumento
TRIM66	disminución
ZMYND8	disminución
ZMYND11	disminución

15 y posteriormente determinar la resistencia o sensibilidad del paciente hacia dicho tratamiento basándose en la información proporcionada anteriormente.

20 El cambio en el nivel de expresión (regulación por incremento o regulación por disminución) de los genes y/o las proteínas codificadas por los genes, enumerados en la tabla relevante se observó repetidamente en varias líneas celulares resistentes a fármacos en comparación con su homólogo sensible a fármacos genéticamente idéntico, y es por tanto el indicador de resistencia hacia el inhibidor de la metilación del ADN, 2'-desoxi-5-azacitidina (DAC). Preferiblemente, se determina el nivel de expresión de una combinación de BRD4 con al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez genes que contienen bromodominios. Lo más preferiblemente, se determina el nivel de expresión de todos los genes enumerados en el presente documento que contienen bromodominios y/o el nivel de expresión de todas las proteínas que contienen bromodominios enumeradas en el presente documento.

25 El método de determinación de la resistencia es particularmente útil en cánceres seleccionados de carcinomas, sarcomas, melanomas, linfomas y leucemia.

**Breve descripción de los dibujos**

30 Figura 1: Actividad antitumoral de DAC y (+)-JQ1. La disminución del efecto en veces y una razón T/C menos significativa para DAC indican claramente resistencia de HCT116-R<sub>DAC</sub> (efecto en veces 1,3, p < 0,05) en comparación con HCT116 original (efecto en veces 2,9, p < 0,001), contrariamente, el aumento en efecto en veces para (+)-JQ1 indica mayor sensibilidad de HCT116-R<sub>DAC</sub> (efecto en veces 1,7, p < 0,001) en comparación con HCT116 original (efecto en veces 1,6, p < 0,05).

**Ejemplos para llevar a cabo la invención**

*Cultivo celular*

40 Para estudiar el mecanismo de resistencia hacia el inhibidor de la metilación del ADN, 2'-desoxi-5-azacitidina, se usó

la línea celular de cáncer colorrectal humano (HCT116), células de leucemia promielocítica humana (HL-60) y la línea celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Se cultivaron las líneas celulares en medios de crecimiento completos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), complementados con suero bovino fetal (FBS, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Alemania), penicilina 100 U/ml (Biotika, Slovenská L'upca, República de Eslovaquia) y estreptomycin 50 µg/ml (Sigma-Aldrich), y se mantuvieron los cultivos a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>, en un incubador humidificado. La línea celular, HCT116, se hizo crecer en medio 5A de McCoy complementado con FBS al 10% y L-glutamina 3 mM (Sigma-Aldrich), se hizo crecer HL-60 en medio de Dulbecco modificado por Iscove con FBS al 20% y se hizo crecer MCF-7 en medio RPMI-1640 con FBS al 10%.

#### 10 *Desarrollo de líneas celulares resistentes*

Las líneas celulares HCT116 resistentes a DAC se desarrollaron usando dos métodos. Método de adaptación: se trataron inicialmente las células con una concentración 1x CI<sub>50</sub> del fármaco (0,28 µM; prueba de MTT de 5 días) que se aumentó gradualmente con la adaptación de resistencia hasta 10x CI<sub>50</sub> en pases posteriores. Método de selección rápida: se expusieron directamente las células a una concentración 5x CI<sub>50</sub> del fármaco que se dobló adicionalmente hasta 10x CI<sub>50</sub>. Tras la exposición a largo plazo de las células a una dosis citotóxica del fármaco, se determinó que la población general era resistente. La clonación de la población celular resistente dio como resultado seis líneas celulares resistentes, R1.1, R1.2, R1.3, R1.4 (aisladas mediante el método de adaptación) y R2.1, R2.2 (aisladas mediante el método de selección rápida).

Para la validación cruzada de datos obtenidos a partir de estudios comparativos de células originales y resistentes HCT116, se desarrollaron adicionalmente las líneas celulares MCF-7 y HL-60 resistentes a DAC. Se desarrollaron células MCF-7 resistentes usando el método de adaptación, en donde se trataron las células con DAC 0,5 µM que se aumentó gradualmente hasta 5 µM con adaptación de la resistencia. Sin embargo, se obtuvieron células HL-60 resistentes a DAC como un obsequio del autor (Qin T. *et al.*, Blood 2009; 113, 659-67) y se seleccionaron adicionalmente en el laboratorio mediante tratamiento con DAC 5 µM.

Se confirmó la resistencia a DAC mediante el ensayo de supervivencia celular basado en MTT y se calculó el índice de resistencia como el aumento en veces en la CI<sub>50</sub> de las líneas celulares resistentes en comparación con el control sin tratar. Todas las líneas celulares resistentes eran >100 mM resistentes a DAC.

#### *Transcriptómica basada en secuenciación del ARN (ARN-sec)*

La secuenciación del ARN (ARN-sec) que utiliza plataformas de secuenciación de alto rendimiento ha surgido como un método poderoso para descubrir, obtener el perfil y cuantificar el transcriptoma facilitando mediciones relativamente no sesgadas de expresiones génicas y de transcritos, la capacidad para medir expresiones específicas de alelo y exón, y para detectar la transcripción de exones no anotados que conduce a la identificación de transcritos poco comunes y novedosos (Pickrell J.K. *et al.*, Nature 2010; 464, 768-72).

#### 40 *Preparación de muestras/construcción de una biblioteca de ADNc:*

Se hicieron crecer la línea celular original HCT116 y cada una de las seis líneas celulares resistentes en placas de Petri con una cobertura mayor del 80%. Se homogeneizaron las células usando 1 ml de reactivo TRI (trizol) por 10 cm<sup>2</sup> del cultivo de monocapa y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min, para permitir la disociación completa de complejos de nucleoproteína. Se transfirieron los homogenizados a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y se extrajo el ARN total mediante un método de extracción orgánica según el protocolo del fabricante (kit Ambion RiboPure, Life Technologies, Carlsbad, CA). Se analizó la integridad de las muestras de ARN obtenidas (kit RNA 6000 Nano de Agilent, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) usando un bioanalizador Agilent 2100. Se usaron 0,1-4 µg del ARN total y se construyó la biblioteca de ADNc según el protocolo del fabricante (kit de preparación de muestras de ARNm TruSeq Stranded, Illumina, San Diego, CA). En resumen, se purificaron las moléculas de ARNm que contenían poli-A usando perlas magnéticas unidas a oligos poli-T en dos rondas de purificación que incluía fragmentación del ARN y cebado con hexámeros al azar. Los fragmentos de ARN escindidos se transcribieron de manera inversa (transcriptasa inversa RevertAid H Minus, Thermo Scientific, Waltham, MA) para dar ADNc de primera hebra seguido por síntesis de ADNc de segunda hebra. Se completó la síntesis de ADNc con un control de "reparación de extremos" a -20°C. Se añadió un único nucleótido "A" en los extremos 3' de los fragmentos romos seguido por la ligación de adaptadores de indexación múltiples. Los fragmentos de ADN con moléculas adaptadoras en ambos extremos se enriquecieron selectivamente y se amplificaron mediante PCR. Se validó y cuantificó la biblioteca de ADNc así preparada (kit de ADN de alta sensibilidad de Agilent, Agilent Technologies) usando el bioanalizador Agilent 2100. Finalmente, se agruparon juntas las muestras con diferentes índices para la secuenciación.

#### *Secuenciación del ARN, alineación e identificación de variantes:*

Se secuenció el transcriptoma mediante secuenciación masiva en paralelo de firmas (MPSS) usando el sistema de secuenciación de rendimiento ultraalto de Illumina, HiSeq 2500. Las lecturas generadas a partir del experimento de

sec. del ARN se alinearon con el genoma de referencia humano anotado (HG19) usando Tophat 2 (Trapnell C. *et al.*, Bioinformatics 2009; 25, 1105-11) y se contaron las que se alienaban con exones, genes y uniones de corte y empalme. Se fijó la tolerancia para permitir un máximo de dos apareamientos erróneos durante una alineación y se descontaron las lecturas que se alineaban con múltiples ubicaciones genómicas. Se identificaron variantes (cSNP, indels y uniones de corte y empalme) tras la alineación mediante SAMtools (Li H. *et al.*, Bioinformatics 2009; 25, 2078-79) y se anotaron mediante ANNOVAR (Wang K. *et al.*, Nucleic Acids Research 2010; 38, e164). Para la cuantificación de la expresión al nivel de transcritos y genes, se usó el paquete HTSeq (Python) y se notificaron expresiones diferenciales tras la normalización de los datos y la evaluación estadística usando el paquete DESeq (biblioteca R). Se determinó la significación estadística mediante la prueba binomial y se fijó el umbral de significación a 0,01.

#### *Proteómica basada en espectrometría de masas*

Aunque los estudios de transcriptómica proporcionan una perspectiva de los papeles del ARN y la expresión génica, es en última instancia el cambio en el nivel de expresiones de proteínas lo que afecta a las funciones biológicas. El marcaje con isótopos estables de aminoácidos en cultivo celular (SILAC) acoplado con espectrometría de masas había evolucionado como una herramienta inestimable en la identificación y el desarrollo de biomarcadores novedosos, al facilitar la cuantificación de niveles de proteínas diferenciales en estados normal y fisiopatológico (Mann M., Nature Reviews Molecular Cell Biology 2006; 7, 952-58).

#### *SILAC/Preparación de lisados:*

La línea celular original, HCT116 se cultivó en medio SILAC (Thermo Scientific) sustituido con Lys-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> y Arg-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> pesadas y FBS dializado (Sigma-Aldrich) durante aproximadamente 8 duplicaciones hasta alcanzar el marcaje completo. Entonces se mezcló la línea celular original marcada con cada una de las líneas celulares resistentes no marcadas en una razón 1:1. Se lavó dos veces la mezcla de células así preparada con 1x PBS enfriado con hielo con inhibidores [inhibidores de fosfatasa (pirofosfato de sodio 5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 5 mM), inhibidores de proteasa (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasa; Sigma-Aldrich)] seguido por un lavado con 1x PBS sin inhibidores, tras lo cual se lisaron las células usando 200 µl de tampón de lisis SILAC enfriado con hielo (Tris-HCl 20 mM, urea 7 M, DTT 10 mM, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,5%) por 2 x 10<sup>7</sup> células. Entonces se sonicaron los lisados usando un sonicador Branson Digital y se clarificaron mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min y se almacenaron los sobrenadantes clarificados a -80°C.

#### *Fraccionamiento/digestión en gel enzimática:*

Se fraccionaron lisados celulares (100 µl) mediante el peso molecular en gel de LDS-Tris-glicina al 12% a través de una matriz de gel cilíndrica mediante electroforesis en gel de elución continua (Mini Prep Cell, Bio-Rad, Hercules, CA) a potencia constante de 1 W durante 3-4 horas. Tras la electroforesis, se expulsó el gel del tubo y se fijó (ácido acético al 10%, etanol al 35%), seguido por enjuague con H<sub>2</sub>O Milli-Q. Usando un bisturí limpio, se cortó el trozo de gel de 90 mm en 20 rodajas (~4,5 mm cada una) que se cortaron adicionalmente en pequeños trozos (~1 mm<sup>3</sup>) y se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Se deshidrataron los trozos de gel con ACN (acetoniitrilo) mediante sonicación durante 5 min, seguido por reducción con tris-(2-carboxietil)fosfina 50 mM a 90°C durante 10 min. Se deshidrató el gel reducido de nuevo, seguido por alquilación con IAA (yodoacetamida) 50 mM recién preparada durante 60 min en la oscuridad. Tras la alquilación, se deshidrató el gel dos veces con cambios de ACN y H<sub>2</sub>O (para garantizar la eliminación completa de IAA), seguido por deshidratación con ACN al 50% por último. Finalmente, se sometió el gel a digestión enzimática mediante incubación durante la noche a 37°C con tampón tripsina (Trypsin Gold, Promega, Madison, WI) preparado según el protocolo del fabricante. Tras la digestión en gel de las proteínas, se extrajeron las mezclas de péptidos deshidratando el gel [TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1%, ACN al 80%] seguido por rehidratación (TFA al 0,1%) y deshidratación con ACN al 50% por último. Se concentró el tampón de extracción antes la evaporación completa y se resuspendieron las mezclas de péptidos (5 µl de ACN al 80%, TFA al 0,1%) y se diluyeron (145 µl de TFA al 0,1%). Se cargaron 150 µl de las muestras de péptidos sobre la columna (MacroTrap, MICHROM Bioresources Inc., Auburn, CA) y se desalaron (TFA al 0,1%), seguido por elución (TFA al 0,1%, ACN al 80%). Tras la purificación, se evaporó completamente el tampón de elución y se resuspendieron los péptidos purificados en la fase móvil A [ACN al 5%, FA (ácido fórmico) al 0,1%] para el análisis de CL-EM.

#### *CL-EM/EM:*

Se cargaron 20 µl de muestras de péptidos en la fase móvil A sobre la columna de atrapamiento (Acclaim PepMap100 C18, 3 µm, 100 Å, 75 µm d.i. x 2 cm, nanoViper, Thermo Scientific) en un sistema UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific) para la concentración previa y la desalación, a la velocidad de flujo de 5 µl/min. La columna de atrapamiento a su vez se conectó directamente con la columna de separación (PepMap C18, 3 µm, 100 Å, 75 µm d.i. x 15 cm, Thermo Scientific) en EASY-Spray (Thermo Scientific), y se eluyeron los péptidos separados mediante cromatografía de fase inversa con 100 min de gradiente lineal de desde el 5 hasta el 35% de fase móvil B (ACN al 80%, FA al 0,1%), a la velocidad de flujo de 300 nl/min y una temperatura de columna de 35°C.

Tras el gradiente, se lavó la columna con fase móvil B y se reequilibró con fase móvil A. Para la adquisición de espectros de masas, se acopló la cromatografía de líquidos de alto rendimiento a un espectrómetro de masas Orbitrap Elite Mass Spectrometer (Thermo Scientific) y se adquirieron los espectros de una manera dependiente de los datos con un conmutador automático entre barridos de EM y EM/EM usando un método de los 20 superiores. Se adquirieron espectros de EM usando un analizador Orbitrap con un intervalo de masa de 300-1700 Da y un valor objetivo de  $10^6$  iones mientras que se adquirieron los espectros de EM/EM usando un analizador trampa de iones a un valor objetivo de  $10^4$  iones. Se realizó la fragmentación de péptidos usando el método CID y se fijó el umbral de selección de iones a 1000 cuentas.

#### 10 *Análisis de datos:*

Se analizaron los archivos de EM sin procesar mediante MaxQuant versión 1.4.1.3 (Cox J. *et al.*, Nature Biotechnology 2008; 26, 1367-72) y se realizaron búsquedas de los espectros de EM/EM usando el motor de búsqueda Andromeda (Cox J. *et al.*, Journal of Proteome Research 2011; 10, 1794-1805) en las bases de datos UniprotKB / Swiss-Prot-human (generadas a partir de la versión 2013\_09) que contenían secuencias directas e inversas. Se incluyó la base de datos adicional de 248 contaminantes comunes durante la búsqueda (Geiger T. *et al.*, Molecular & Cellular Proteomics 2012; 11, M111.014050). Se realizó la calibración de masas usando los resultados de la búsqueda inicial con una tolerancia de masas de precursor de 20 ppm, sin embargo, en la búsqueda con Andromeda principal, la masa de precursor y la masa de fragmento se fijaron a la tolerancia de 7 ppm y 20 ppm respectivamente. Se incluyeron la modificación fijada de carbamidometilcisteína y las modificaciones variables de oxidación de metionina y acetilación N-terminal para la búsqueda en las bases de datos. Se usaron marcadores de SILAC, R6 y K6 para el análisis de datos de SILAC. La búsqueda se basó en la regla de escisión enzimática de tripsina/P y se permitió un máximo de dos escisiones erróneas. Se fijó la longitud de péptido mínima a seis aminoácidos y se requería al menos un péptido único para identificación de proteínas. La tasa de falso descubrimiento (FDR) para la identificación de péptido y proteína se fijó a 0,01.

Se realizó el análisis bioinformático con Perseus versión 1.4.1.3. Se realizaron filtraciones para erradicar las identificaciones a partir de las bases de datos de la secuencia inversa y los contaminantes comunes y para excluir proteínas con < 3 valores válidos (sólo se consideraron péptidos cuantificados en tres mediciones). Se suministró la anotación categórica en forma de proceso biológico de Gene Ontology (GO), función molecular y componente celular. Para la cuantificación de la expresión diferencial, se transformaron los datos a log 2 y se normalizaron restando la mediana de cada columna. Se calculó el cambio en veces como la media de tres valores y se determinó la significación calculando el valor de p con una corrección de pruebas de hipótesis múltiples de Benjamini-Hochberg basada en un umbral de FDR de 0,05.

#### 35 *Determinación de la resistencia cruzada / sensibilidad*

Se realizó un ensayo de supervivencia celular basado en MTT en cualquier caso, ya sea para determinar la resistencia cruzada de las líneas celulares resistentes a DAC hacia inhibidores de ADN metiltransferasas, histona acetiltransferasas, histona metiltransferasas, histona deacetilasas e histona desmetilasas, o para determinar su sensibilidad hacia inhibidores de bromodominios BET selectivos.

El método se basa principalmente en la reducción de sal de tetrazolio de color amarillo, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para dar cristales de formazán de color púrpura insolubles mediante enzimas oxidoreductasa dependientes de NAD(P)H en mitocondrias de la célula viable. La intensidad del color púrpura producido en la solubilización de los cristales de formazán es directamente proporcional al número de células viables (Meerloo J.V. *et al.*, Methods in Molecular Biology 2011; 731, 237-45).

Para determinar la  $CI_{50}$  de los fármacos epigenéticos (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido), se realizaron cuatro experimentos independientes usando pocillos por triplicado de placas de 96 pocillos. Se sembraron en placa las células en 80  $\mu$ l de medio en cada uno de los pocillos experimental y de control, seguido por adición de 20  $\mu$ l de medio con una concentración de fármaco de cinco veces a los pocillos experimentales. Se incluyeron los pocillos con medio solo además como blanco para las lecturas de absorbancia. Tras 72 h de tratamiento con fármaco, se añadieron 10  $\mu$ l de MTT (Sigma-Aldrich) preparado en 1x PBS (5 mg/ml) a todos los pocillos incluyendo el blanco y el control, y se incubaron hasta que eran visibles los cristales de formazán púrpuras, tras lo cual se añadieron 100  $\mu$ l de detergente (SDS al 10%, pH: 5,5) y se incubaron las placas durante la noche para solubilizar el formazán y el material celular. Se leyó la absorbancia de MTT a 540 nM usando el lector Labsystems iEMS MF, y se determinaron los valores de  $CI_{50}$  usando el software Chemorezist (IMTM, Palacky University, Olomouc, República Checa).

Se determinó la resistencia cruzada como el aumento en veces, mientras que se determinó la sensibilidad como la disminución en veces en la  $CI_{50}$  de los fármacos para las líneas celulares resistentes en comparación con su homólogo sensible a fármacos genéticamente idéntico.

#### 65 *Actividad antitumoral de DAC y (+)-JQ1*

Para la validación *in vivo* de la resistencia de HCT116 hacia DAC y la sensibilidad de tumores resistentes a DAC al

tratamiento con (+)-JQ1, se estudió la actividad antitumoral de DAC y (+)-JQ1 en HCT116 original frente al clon celular resistente R1.4 (HCT116<sub>RDAC</sub>). Se establecieron xenoinjertos en ratones SCID hembra de 11-12 semanas de edad, se inocularon con  $5 \times 10^6$  células, por vía s.c. en ambos lados del tórax. Tras 2 semanas, los tumores podían palpase (volumen tumoral promedio de 20 mm<sup>3</sup>) y se asignaron los ratones a cuatro grupos (8 ratones/grupo). Grupo I: control de vehículo para DAC (10:90, DMSO: PBS) y grupo II: DAC, 2,5 mg/kg mediante inyección i.p. una vez al día durante 14 días (5 días con inyección, 2 días de descanso), 10 dosis totales. Grupo III: control de vehículo para (+)-JQ1 (5:95, DMSO:2-hidroxipropil-β-ciclodextrina al 10%) y grupo IV: (+)-JQ1, 50 mg/kg mediante inyección i.p. una vez al día durante 28 días (5 días con inyección, 2 días de descanso), 20 dosis totales. Se midieron diariamente los pesos corporales de los animales y se recogieron datos de volumen tumoral dos veces a la semana. Se sacrificaron los ratones cuando el peso corporal disminuyó >20% del peso inicial. Todo el trabajo con animales se realizó según protocolos de IACUC aprobados.

Para determinar la actividad antitumoral de los fármacos, DAC y (+)-JQ1, se transformaron los datos de volumen tumoral para cada grupo en volúmenes tumorales relativos seguido por cálculo de la razón de tratamiento con respecto a control (razón T/C) para cada punto de tiempo. Se usaron adicionalmente las razones T/C durante el día 0 - 21 para calcular aAUC para cada fármaco. (Jianrong Wu. *Et al.*, Pharmaceutical statistics 2010; 9, 46-54). Se usaron los valores de aAUC así obtenidos para definir la resistencia (para DAC) y el índice de sensibilidad [para (+)-JQ1] de HCT116<sub>RDAC</sub> en comparación con HCT116 original. Se determinó la significación estadística de los datos calculando el valor de p de arranque, n=10000, prueba unilateral de H0: razón T/C = 1, H1: razón T/C <1 (Jianrong Wu., Journal of Biopharmaceutical Statistics 2010; 20, 954-64). Tras el día 21, la significación estadística no puede medirse con exactitud debido a la disminución de la supervivencia de los animales en el grupo de control.

**Resultados:**

Se realizaron estudios de expresión génica y de proteínas a los niveles de ARN y proteína respectivamente. Para los estudios de expresión génica, se usó la secuenciación masiva en paralelo de firmas (MPSS) y se mapearon las secuencias generadas a partir del experimento de ARN-sec en el genoma de referencia humano anotado (HG<sub>19</sub>) seguido por cuantificación de expresiones génicas y de transcritos, mientras que, para los estudios de expresión de proteínas, se usó marcaje con isótopos estables de aminoácidos en cultivo celular (SILAC) y se cuantificaron las expresiones de proteínas usando espectrometría de masas.

Para notificar las expresiones diferenciales, se comparó cada una de las líneas celulares resistentes a fármacos, HCT116-R<sub>DAC</sub> (R1.1, R1.2, R1.3, R1.4 y R2.1, R2.2) con su homólogo sensible a fármacos genéticamente idéntico o la línea celular original, HCT116. Los valores se representan como cambios en veces. Los valores positivos indican regulación por incremento y los valores negativos indican regulación por disminución. Los datos se generan a partir de tres experimentos independientes y son estadísticamente significativos (valor de p <0,05).

Gen	Cambio en la expresión que determina resistencia	Cambio en veces promedio en líneas celulares resistentes a DAC					
		R1.1	R1.2	R1.3	R1.4	R2.1	R2.2
ASH1L	aumento						0,52
ATAD2	disminución					-0,67	-0,64
BAZ1B	disminución					-0,40	
BAZ2A	aumento			0,33	0,33		0,38
BAZ2B	disminución				-0,92		
BRD1	disminución	-0,48	-0,52				
BRD2	aumento		0,31	0,02	0,03	0,04	0,19
BRD3	aumento	0,36	0,43	1,02	0,43	0,76	1,07
BRD4	disminución	-0,46	0,02	-0,33	-0,51	-0,23	0,04
BRD7	disminución						-0,55
BRD8	disminución	-0,44	-0,35		-0,47	-0,67	-0,50
BRWD1	aumento	0,66					
CECR2	aumento						0,73
CREBBP	aumento			0,35	0,40		
EP300	aumento						0,35
KAT2A	aumento	0,37		0,47	0,40	0,43	
KAT2B	aumento						0,62
KMT2A	aumento		0,45				
SMARCA2	aumento	0,71	0,73	0,69	0,98	0,76	1,17
SP100	aumento	0,77	0,59		0,99	0,51	1,22
SP110	aumento	0,85	0,58		1,29		1,19
TRIM66	disminución			-0,60	-0,55		
ZMYND8	disminución					-0,50	-0,50
ZMYND11	disminución		-0,55			-0,43	

Se determinó la resistencia cruzada hacia inhibidores epigenéticos sometidos a prueba usando un ensayo de supervivencia celular basado en MTT y se calculó el índice de resistencia como la razón de valores de  $CI_{50}$  de las líneas celulares resistentes con respecto a su homólogo sensible a fármacos genéticamente idéntico.

Los valores en la tabla representan la  $CI_{50}$  media en  $\mu M$  calculada a partir de cuatro experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (D.E.,  $\pm 0 - \pm 9,74$ ) y los valores entre paréntesis representan los cambios en veces. Se determinó la significación experimental usando Anova de un factor con prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$ ).

	Valores de $CI_{50}$ medios en $\mu M$ (cambios en veces)						
	HCT116	R1.1	R1.2	R1.3	R1.4	R2.1	R2.2
DAC	0,28	>100 (>357) ***	>100 (>357) ***	>100 (>357) ***	>100 (>357) ***	>100 (>357) ***	>100 (>357) ***
AZA	3,02	9,36 (3,10) ***	11,69 (3,87) ***	10,57 (3,50) ***	14,86 (4,92) ***	12,28 (4,07) ***	14,47 (4,19) ***
Zebularina	84,16	100 (1,19) ***					
Ácido anicárdico	120,18	128,27 (1,07)	126,92 (1,06)	124,80 (1,04)	122,50 (1,02)	124,23 (1,03)	124,71 (1,04)
C646	33,45	45,10 (1,35)	50,59 (1,51) **	47,52 (1,42) *	51,28(1,53) **	51,02 (1,52) **	55 (1,64) ***
BIX-01294	2,55	3 (1,17)	3,02 (1,19) *	2,97 (1,16)	3,05 (1,20) *	3,40 (1,33) ***	3,22 (1,26) **
DZNep	0,82	25 (30,34) ***					
Romidepsina	0,0028	0,0031 (1,14)	0,0049 (1,77)	0,0033 (1,18)	0,0031 (1,14)	0,0054 (1,95) *	0,0073 (2,64) ***
Vorinostat	0,68	0,84 (1,24) *	0,94 (1,39) ***	0,86 (1,28) *	0,92 (1,37) ***	0,75 (1,11)	0,80 (1,19)
GSK J4	2,28	3,45 (1,52)	2,95 (1,30)	3,18 (1,39)	3,05 (1,34)	4,81 (2,11) ***	4,25 (1,87) **
IOX1	29,56	41,56 (1,41) ***	63,56 (2,15) ***	53,18 (1,80) ***	58,05 (1,96) ***	50,16 (1,70) ***	57,02 (1,93) ***

Se determinó la sensibilidad hacia inhibidores de bromodominios usando el ensayo de supervivencia celular basado en MTT y se calculó el índice de sensibilidad como la razón de valores de  $CI_{50}$  de la línea celular original con respecto a su homólogo resistente a fármacos genéticamente idéntico o las líneas celulares resistentes.

Los valores en la tabla representan la  $CI_{50}$  media en  $\mu M$  calculada a partir de cuatro experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (D.E.,  $\pm 0,88 - \pm 1,09$ ) y los valores entre paréntesis representan los cambios en veces. Se determinó la significación experimental usando Anova de un factor con prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$ ).

	Valores de $CI_{50}$ medios en $\mu M$ (cambios en veces)						
	HCT116	R1.1	R1.2	R1.3	R1.4	R2.1	R2.2
(+)-JQ1	3,5	0,73 (4,81) ***	3,17 (1,10)	0,42 (8,43) ***	0,78 (4,48) ***	0,76 (4,60) ***	3,12 (1,12)
I-BET 151	5,23	2,68 (1,95) ***	5,18 (1,01)	1,60 (3,28) ***	3,58 (1,46) **	3,16 (1,65) ***	5,40 (0,97)

Se confirmó adicionalmente la sensibilización de células cancerosas resistentes a DAC mediante inhibición de bromodominios en las líneas celulares MCF-7 y HL-60, original frente a resistente a DAC ( $R_{DAC}$ ). Aunque la sensibilidad de MCF-7\_  $R_{DAC}$  frente a MCF-7 y HL-60\_  $R_{DAC}$  frente a HL-60, hacia (+)-JQ1 no es estadísticamente significativa, los resultados muestran aparentemente que el tratamiento con (+)-JQ1 puede superar una alta resistencia a DAC.

	Valores de $CI_{50}$ medios en $\mu M$ (cambios en veces)			
	MCF-7	MCF-7 $R_{DAC}$	HL-60	HL-60 $R_{DAC}$
DAC	0,238	>100 (>421) ***	0,078	>100 (>1289) ***
(+)-JQ1	0,129	0,120 (1,07)	0,134	0,132 (1,01)

Se estudió la actividad antitumoral de DAC y (+)-JQ1 en modelo de ratón con xenoinjerto de carcinoma colorrectal, HCT116 original frente a homólogo resistente a fármacos, HCT116- $R_{DAC}$ . La figura 1A muestra los gráficos de

medición del tiempo para la actividad antitumoral de DAC y (+)-JQ1 en comparación con control de vehículo para cada fármaco, en HCT116 y HCT116-R<sub>DAC</sub>. Los datos son volumen tumoral relativo  $\pm$  EEM. La figura 1B muestra los gráficos de aAUC (razón T/C) que comparan la HCT116 original frente a HCT116-R<sub>DAC</sub>.

5 **Aplicabilidad industrial**

10 Los genes que contienen bromodominios dados a conocer en la presente invención pueden usarse como biomarcadores para predecir la respuesta clínica hacia la terapia epigenética que selecciona como diana la metilación aberrante del ADN. El nivel variable de expresiones de los genes puede usarse como fundamento para diferenciar entre los pacientes que responden y los que no responden. Esto proporciona la accesibilidad del método de predicción y la personalización de la terapia.

15 Los pacientes que no responden a los inhibidores de la metilación del ADN y padecen resistencia primaria pueden eliminarse rápidamente del tratamiento ineficaz. Esto proporcionará el beneficio de que tales pacientes escapen de los efectos secundarios relativos que podrían asociarse con el fármaco, el coste redundante de la terapia y sugiere otro posible protocolo de tratamiento a tiempo.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para predecir la sensibilidad de un paciente que padece una enfermedad de cáncer a la terapia de inhibidores de la metilación del ADN, que comprende determinar *in vitro* en células cancerosas tomadas del paciente y comparar con los valores para el tipo de células original

- el nivel de expresión de BRD4, en el que la disminución en la expresión determina resistencia, opcionalmente en combinación con uno o más o todos de los genes adicionales seleccionados del grupo que comprende:

Gen	Cambio en la expresión que determina resistencia
ASH1L	aumento
ATAD2	disminución
BAZ1B	disminución
BAZ2A	aumento
BAZ2B	disminución
BRD1	disminución
BRD2	aumento
BRD3	aumento
BRD7	disminución
BRD8	disminución
BRWD1	aumento
CECR2	aumento
CREBBP	aumento
EP300	aumento
KAT2A	aumento
KAT2B	aumento
KMT2A	aumento
SMARCA2	aumento
SP100	aumento
SP110	aumento
TRIM66	disminución
ZMYND8	disminución
ZMYND11	disminución

2. Método según la reivindicación 1, en el que se determina el nivel de expresión de una combinación de BRD4 con al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez genes que contienen bromodominios enumerados en el presente documento.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células cancerosas se derivan de un cáncer seleccionado de carcinomas, sarcomas, melanomas, linfomas y leucemia.

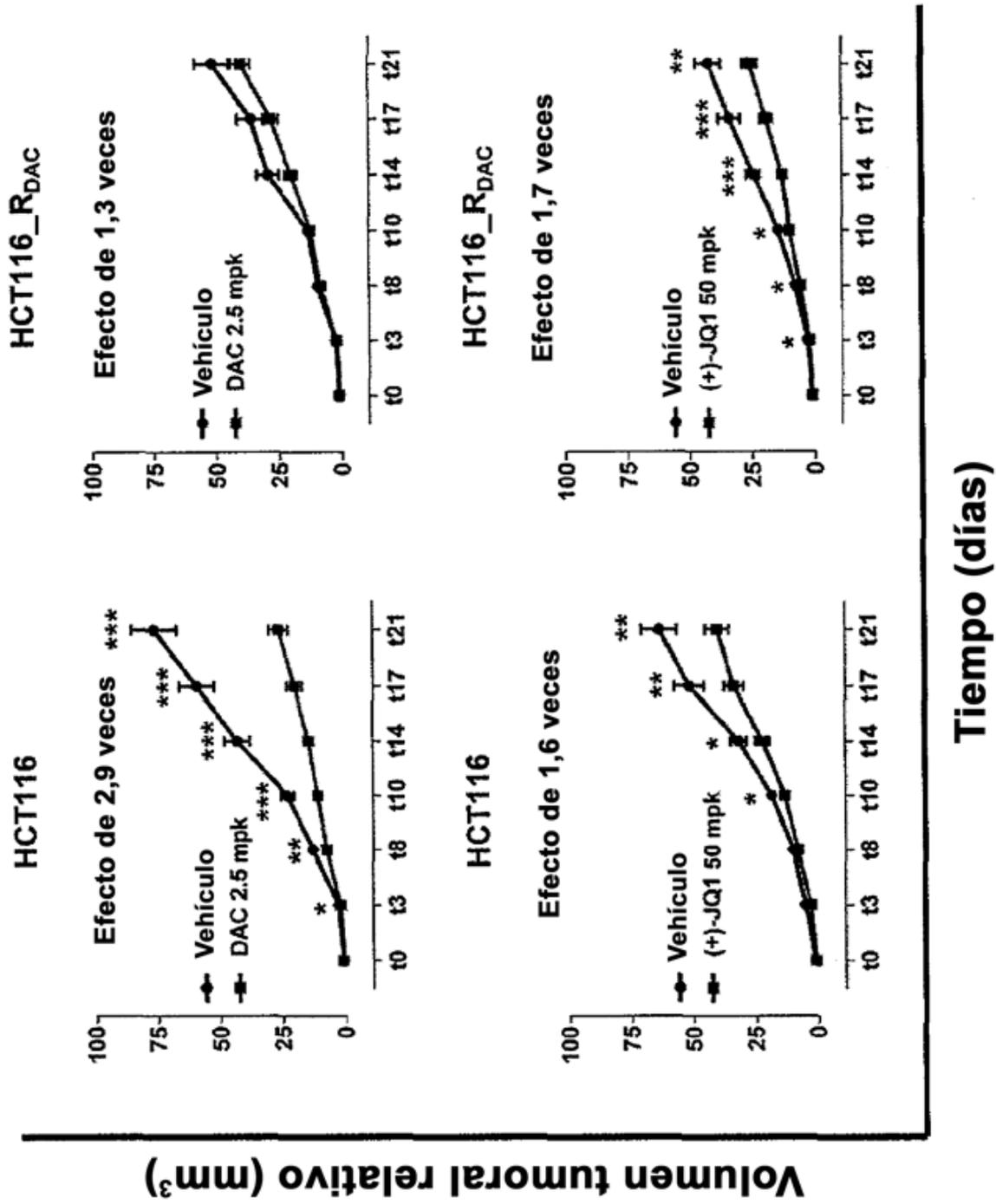
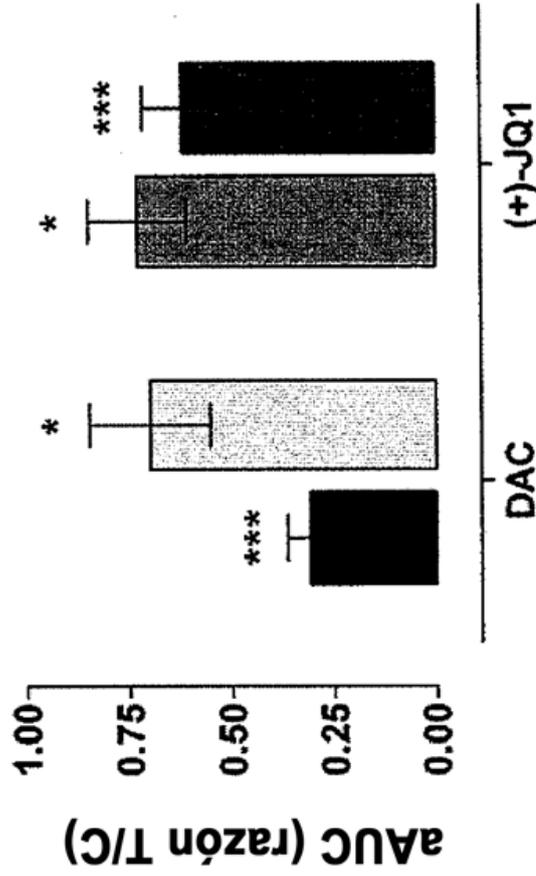


Figura 1A

■ HCT116 – DAC      ▨ HCT116-R<sub>DAC</sub> – DAC  
■ HCT116 – (+)-JQ1      ■ HCT116-R<sub>DAC</sub> – (+)-JQ1



\* valor de p <0.05  
\*\* valor de p <0.01  
\*\*\*valor de p <0.001

Figura 1B