

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 449**

21 Número de solicitud: 201730857

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.06.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.01.2019

71 Solicitantes:

**FUNDACION PARA LA INVESTIGACION
BIOMEDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA (50.0%)
C/ Joaquín Rodrigo, Nº 2
28222 Majadahonda (Madrid) ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PROVENCIO PULLA, Mariano y
CRUZ BERMÚDEZ, Alberto**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Método para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y ha sido tratado con cisplatino**

57 Resumen:

Método para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y ha sido tratado con cisplatino.

La presente invención se refiere a un método in vitro para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino que comprende determinar el nivel de expresión del gen PGC-1alfa antes y después del tratamiento con cisplatino, en donde si el nivel de expresión de dicho gen es mayor después que antes del tratamiento, entonces la terapia comprende la administración de un segundo tratamiento basado en la combinación de cisplatino con compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.

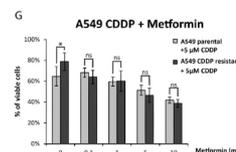


FIG. 5 (cont.)

DESCRIPCIÓN

Método para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y ha sido tratado con cisplatino

5

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino que comprende determinar el nivel de expresión del gen PGC-1alfa antes y después del tratamiento con cisplatino, en donde si el nivel de expresión de dicho gen es mayor después que antes del tratamiento, entonces la terapia comprende la administración de un segundo tratamiento basado en la combinación de cisplatino con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo del tratamiento del cáncer, más en concreto, en el tratamiento del cáncer de pulmón.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer de pulmón es el cáncer más extendido a lo largo del mundo en términos de incidencia y es la principal causa de muerte debida al cáncer. En la mayoría de los casos, la quimioterapia basada en cisplatino es el tratamiento estándar. Sin embargo, es frecuente que durante el tratamiento se desarrolle resistencia, limitando la utilidad clínica de este fármaco. Los mecanismos de resistencia del cisplatino son complejos, pues están implicadas diversas estrategias y rutas metabólicas. En los últimos años, un incremento en el metabolismo oxidativo ha sido sugerido como el mecanismo de acción común para muchos cánceres y la resistencia al tratamiento.

20

Aproximadamente, entre el 85% y el 90% de los diagnósticos de cáncer de pulmón son cáncer de pulmón de células no pequeñas o NSCLC (de sus iniciales en inglés *Non-Small Cell Lung Cancer*). La clasificación actual de NSCLC tiene en cuenta alteraciones moleculares que pueden influir en la decisión terapéutica. Sin embargo, hasta el momento, no se dispone de un fármaco adaptado a las mutaciones que muestran la mayoría de los pacientes que sufren NSCLC y por lo tanto, la quimioterapia basada en platino es todavía la terapia estándar de elección.

30

Adicionalmente, aunque los tratamientos del cáncer de pulmón han progresado de

forma significativa desde hace un tiempo, e incluso más recientemente con la aparición de la inmunoterapia, su relación coste-eficacia en comparación con los tratamientos basados en cisplatino todavía es un reto a superar. Por lo tanto, el cisplatino es uno de los principales fármacos empleados en el tratamiento de NSCLC.

5 Lamentablemente, es frecuente desarrollar quimio resistencia durante el tratamiento, o el tratamiento tiene que ser discontinuo debido a la toxicidad del platino lo que limita la utilidad clínica de este fármaco

Los mecanismos de resistencia al cisplatino son complejos. Aunque un metabolismo energético alterado es uno de los sellos distintivos del cáncer, poco se sabe de su papel en la quimio resistencia. Las mitocondrias son orgánulos conocidos por ser la central energética de la célula, responsables de la fosforilación oxidativa o OXPHOS (de sus iniciales en inglés *oxidative phosphorylation*). En este proceso, la acetil CoA a partir de la glicolisis o la oxidación de los ácidos grasos alimenta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) que genera cofactores reducidos. Estos cofactores transfieren electrones al sistema OXPHOS que a través de una cadena de reacciones redox reduce el oxígeno a agua. Algunas de estas reacciones producen especies reactivas del oxígeno (o ROS, de sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*). Simultáneamente durante este proceso, los protones son bombeados dentro del espacio intermembrana generando lo que se conoce como el potencial de membrana interno mitocondrial o MIMP (de sus siglas en inglés *Mitochondrial Inner Membrane Potential*) que es finalmente disipado a través del complejo V generando ATP. La visión clásica del metabolismo tumoral se conoce como el efecto Warburg. Según esta teoría, las células tumorales incrementan su glicolisis aeróbica reduciendo la función OXPHOS con el objetivo de aumentar la provisión de intermediarios metabólicos usados en los procesos anabólicos. Sin embargo, bajo algunas circunstancias, las células tumorales tienen la habilidad de adaptar su metabolismo a los diferentes ambientes y tratamientos, incrementando su adaptabilidad y resistencia del tumor a las terapias.

30

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que superen todos estos inconvenientes, y se mejore así la eficacia del tratamiento administrado al paciente.

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado que, en líneas celulares de pulmón, los niveles de expresión del gen PGC-1alfa se incrementan en respuesta al tratamiento con cisplatino, dando lugar a que la célula se haga resistente a este fármaco, pero que, sorprendentemente, dicha resistencia se revierte cuando se administra un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS, como por ejemplo, metformina.

Por lo tanto, este descubrimiento abre una nueva ventana terapéutica al tratamiento del cáncer de pulmón, en particular, al cáncer de pulmón que se muestra resistente al tratamiento con cisplatino, pues permite dirigir el tratamiento a las características especiales del individuo, evitando la administración de terapias no eficaces. Por lo tanto, en base a este descubrimiento, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos a continuación.

15

Método de la invención

En vista de lo anterior, en un aspecto la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino, de aquí en adelante “método de la invención”, que comprende

(a) determinar el nivel de expresión del gen PGC-1alfa antes y después del tratamiento con cisplatino en una muestra biológica aislada procedente de dicho individuo, y

(b) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa (a) antes del tratamiento con el nivel de expresión después del tratamiento,

en donde un nivel de expresión de PGC-1alfa después del tratamiento mayor que el nivel de expresión de PGC-1alfa antes del tratamiento es indicativo de la terapia comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.

En la presente invención se entiende por “terapia” o “tratamiento” a la administración a un individuo de un compuesto, o combinación de compuestos, con el objetivo de inhibir una enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo; aliviar una enfermedad o condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la

condición patológica; y/o estabilizar una enfermedad o condición patológica en un individuo. En la presente invención, la enfermedad o condición patológica es el cáncer de pulmón, en particular, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC de sus siglas en inglés *non-small cell lung cancer*). En otra realización particular, el cáncer de pulmón es metastásico, más en particular, NSCLC en estado metastásico.

En la presente invención se entiende por “cáncer de pulmón” a aquella enfermedad, o conjunto de enfermedades, resultante del crecimiento incontrolado de las células del tracto respiratorio, en particular, del tejido pulmonar. En el contexto de la presente invención, el término “cáncer” también incluye el concepto de “tumores”, entiendo éstos como un conjunto agregado de células resultante de la proliferación incontrolada de una única célula. La gran mayoría de los tipos de cáncer de pulmón son carcinomas, es decir, tumores malignos que nacen de células epiteliales. Hay dos formas de carcinoma pulmonar, categorizados por el tamaño y apariencia de las células malignas vistas histopatológicamente bajo un microscopio: los tumores de células no-pequeñas y los de células pequeñas. Así, ejemplos de cáncer de pulmón incluyen, sin limitar a, los adenocarcinomas, los carcinomas de células escamosas, los carcinomas de células grandes y los carcinomas de células pequeñas. Existen además los carcinomas bronquioalveolares y varias formas mixtas.

Asimismo, el cáncer de pulmón puede ser metastásico o no metastásico. En la presente invención se entiende por “cáncer de pulmón metastásico”, a aquella etapa del desarrollo del cáncer en la que las células del tracto respiratorio cancerígenas, en particular, células pulmonares cancerígenas, invaden el torrente sanguíneo del individuo, llegando a los nódulos linfáticos, y colonizando otros tejidos distintos del tejido de origen.

Se considera que la terapia es “personalizada” cuando el/los compuesto/s que se va/n a administrar al individuo para tratar una enfermedad está/n especialmente adaptado/s a las características tanto genotípicas como fenotípicas del individuo que va a ser tratado, evitando con ello la pérdida de tiempo en terapias no efectivas. En la presente invención, la característica que determina la terapia que va a ser administrada al individuo es el nivel de expresión del gen PGC-1alfa. Adicionalmente, tal como se explicará más adelante, también pueden medirse otros valores como el potencial de membrana interna mitocondrial y/o los niveles de las especies reactivas del oxígeno.

En la presente invención el término "individuo" es equivalente al término "sujeto", por lo que ambos términos pueden emplearse indistintamente a lo largo de la presente descripción. Se entiende por "individuo", cualquier animal perteneciente a cualquier especie. No obstante, en una realización particular, el sujeto es un mamífero, preferiblemente, un primate, más preferiblemente, un ser humano de cualquier raza, sexo o edad. El individuo objeto de la presente invención padece cáncer de pulmón y va a ser tratado con cisplatino como un primer tratamiento.

10 El método de la invención comprende en una primera etapa, etapa a), determinar el nivel de expresión del gen PGC-1alfa antes y después del tratamiento con cisplatino en una muestra biológica aislada procedente de dicho individuo.

El gen PGC-1alfa es un gen que, en humanos, está localizado en el cromosoma 4p15.2. Nombres alternativos que pueden usarse en la literatura científica para referirse al gen PGC-1alfa incluyen, pero no se limitan a, "*peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1*", "*peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1, alpha*", "*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*", "*PPARG coactivator 1 alpha*", PPARGC1A, LEM6, PGC-1v, PGC1, PGC1A y PPARGC1. En una realización particular, el gen PGC-1alfa comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 (número de acceso a GenBank AF106698 versión AF106698.1). En otra realización particular, el gen PGC-1alfa comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia del 100% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.

En la presente invención se entiende por "identidad de secuencia" al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos (o aminoácidos) obtenido mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos (o aminoácidos) puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al. Basic local alignment search tool.* J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10]. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX,

and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

5 El gen PGC-1alfa codifica la proteína *PPAR gamma coactivator-1*. En una realización particular, la proteína codificada por el gen PGC-1alfa comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de, al menos, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 2 (número de acceso a GenBank NP_037393 versión NP_037393.1). En otra realización particular, la proteína codificada por el gen PGC-1alfa comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia
10 del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 2. El término "identidad de secuencia" ha sido definido previamente.

El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en
15 posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad, dando lugar a variantes de la proteína. Dichas variantes caen dentro del ámbito de la presente invención, es decir, aquellas variantes de la proteína codificada por el gen PGC-1alfa que presentan inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más
20 aminoácidos con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2.

En la presente descripción, los términos "expresión" y "expresión génica" incluyen la transcripción y/o traducción del ácido nucleico. Por lo tanto, la cuantificación de la expresión del gen PGC-1alfa puede determinarse a partir del ácido nucleico del gen
25 PGC-1alfa o de la proteína codificada por dicho gen, es decir, de la proteína *PPAR gamma coactivator-1*.

Así, en una realización particular del método de la invención, la determinación de los niveles de expresión del gen PGC-1alfa comprende medir el nivel de ADNc, o un
30 fragmento del mismo, el nivel de ARNm, o un fragmento del mismo, y/o el nivel de la proteína codificada por dicho gen, o un fragmento de dicha proteína.

En la presente invención se entiende por "fragmento de ARNm" o "fragmento de ADNc" a la secuencia de nucleótidos del gen PGC-1alfa que comprende uno o más
35 nucleótidos ausentes de los extremos 3' y/o 5' con respecto a la secuencia de

nucleótidos completa del gen PGC-1alfa. En una realización particular, el fragmento del gen PGC-1alfa es un fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 1.

De forma análoga, en la presente invención se entiende por “fragmento de la proteína
5 *PPAR gamma coactivator-1*” a la secuencia de aminoácidos de la proteína *PPAR gamma coactivator-1* que comprende uno o más aminoácidos ausentes de su extremo amino terminal o carboxilo terminal con respecto a la secuencia de aminoácidos completa de la proteína *PPAR gamma coactivator-1*. En una realización particular, el fragmento de la proteína *PPAR gamma coactivator-1* es un fragmento de la secuencia
10 SEQ ID NO: 2.

Si la cuantificación de la expresión del gen PGC-1alfa va a realizarse a partir del ADNc o el ARNm, primero es necesaria la extracción del ácido nucleico de la muestra biológica aislada del sujeto. Para este fin, la muestra biológica se puede tratar para
15 disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o la célula, liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para aislar y preparar los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente (Sambroock, J.,
20 *et al.* 2012, "*Molecular cloning: a Laboratory Manual*", 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.).

Una vez extraído el ácido nucleico se procede a realizar la cuantificación de la expresión del gen PGC-1alfa. Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de
25 ARNm del gen PGC-1alfa o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm de dicho gen pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot
30 y empleo de sondas apropiadas, northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm del gen de interés (gen *PTGDR*) o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, *microarrays*, etc.

Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente a dicho ARNm del gen PGC-
35 1alfa también pueden ser cuantificados 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 convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook *et al.* citado *ad supra*. En una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, un *array* de ADN o ARN, o RNA-Seq o Secuenciación Masiva aplicada al estudio de ARN. En otra realización todavía más particular, el nivel de expresión del ARNm del gen PGC-1alfa se determina mediante qRT-PCR usando el ensayo de expresión génica Taqman® (Taqman® *gene expression assay*) con la sonda Hs01016719_m1.

Si la cuantificación de la expresión del gen PGC-1alfa va a realizarse a partir de la proteína codificada por el gen PGC-1alfa, es decir, la proteína *PPAR gamma coactivator-1*, entonces la muestra biológica aislada del sujeto tiene que ser tratada para extraer las proteínas. Métodos para extraer o aislar proteínas son conocidos para el experto en la materia y están disponibles comercialmente (Sambroock, J., *et al.* 2012, citado *ad supra*).

Los niveles de la proteína *PPAR gamma coactivator-1* pueden ser cuantificados mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra 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 la proteína *PPAR gamma coactivator-1* y la posterior cuantificación de los complejos formados.

Se entiende por “anticuerpo” a una glicoproteína del tipo gamma globulina que forma parte del sistema inmunitario humoral que se une de forma específica a un antígeno. El término anticuerpo, tal como aquí se utiliza, incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios de unión a ligando. Anticuerpos específicos de la proteína codificada por el gen PGC-1alfa están disponibles comercialmente. Ejemplos de dichos anticuerpos incluyen, sin limitar a, los anticuerpos 3G6 #2178 de la empresa Cell Signaling, ab54481 de la empresa Abcam y H-300 sc-13067 de la empresa Santa Cruz Biotechnology.

Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Los términos "marca" o "marcado" se refieren a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia de la molécula marcada. Ejemplos
5 ilustrativos de marcadores adecuados incluyen, sin limitar a, radioisótopos, cromóforos de nucleótidos, enzimas, sustratos, moléculas fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, restos bioluminescentes, y similares. Como tal, una marca es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, eléctricos, ópticos o
10 químicos. 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 (enzimoinmunoensayo RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (enzimoinmunoensayo competitivo), DAS-
15 ELISA (ELISA tipo sándwich 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 la proteína *PPAR gamma coactivator-1*, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad,
20 ensayos de unión a ligando, espectrometría de masas etc. No obstante, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante Western blot, ELISA, un array de proteínas o un estudio de *binding*. Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a la proteína *PPAR gamma coactivator-1* con alta afinidad para detectar la
25 cantidad de la misma. Ejemplos de anticuerpos o reactivos con capacidad de unirse a dicha la proteína *PPAR gamma coactivator-1* incluyen, sin limitarse a, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. En el mercado, existen anticuerpos comerciales contra la
30 proteína *PPAR gamma coactivator-1* que pueden emplearse en el contexto de la presente invención, tales como los citados anteriormente.

Tal como se ha puesto de manifiesto en párrafos anteriores, para llevar a cabo la primera etapa del método de la invención, es necesario disponer de una muestra
35 biológica aislada del individuo en estudio. En el contexto de la presente invención, el

término “muestra biológica” se refiere a cualquier material biológico que se puede obtener del individuo, tal como una biopsia, un tejido, una célula o un fluido (suero, saliva, semen, esputo, lágrimas, moco, sudor, leche, extractos de cerebro y similares), y que puede albergar información sobre la dotación genética característica de una
 5 persona. En una realización particular, la muestra biológica es sangre, suero o tejido procedente de una biopsia. El término “aislado/a” implica que la muestra biológica ha sido separada o extraída del resto de componentes que la acompañan de forma natural. Técnicas para obtener muestras biológicas de un individuo son ampliamente conocidas en el estado de la técnica, y cualquiera de ellas puede emplearse en la
 10 puesta en práctica de la presente invención.

Una vez que se ha llevado a cabo la etapa (a), es decir, se han cuantificado los niveles de expresión del gen PGC-1alfa antes y después del tratamiento con cisplatino, el método de la invención comprende una etapa (b) que comprende comparar entre sí
 15 los niveles de expresión obtenidos. Si el nivel de expresión de PGC-1alfa después de tratar al individuo con cisplatino es mayor que el nivel de expresión de PGC-1alfa antes del tratamiento con cisplatino, entonces la terapia a administrar al individuo comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS. En caso contrario, no es necesaria
 20 la administración de un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS para continuar con el tratamiento basado en cisplatino.

En la presente invención se entiende que un nivel de expresión es “mayor” que otro cuando un valor del nivel de expresión es superior a otro. En particular, se entiende
 25 que un nivel de expresión es “mayor”, cuando los niveles de expresión del gen PGC-1alfa después del tratamiento con cisplatino son de, al menos, 1,1 veces, 1,5 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 con respecto a los niveles de expresión del gen PGC-1alfa antes del tratamiento con cisplatino. Dependiendo del resultado de
 30 dicha comparación, se puede concluir si la terapia a administrar al individuo comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.

En la presente invención se entiende por “compuesto dirigido a disminuir la función
 35 OXPHOS” al compuesto que disminuye la capacidad de generar energía en forma de

ATP por parte del sistema OXPHOS, ya sea a través de disminuir el aporte de cofactores reducidos, el transporte de electrones, la actividad o cantidad de algunos de sus complejos o disipar el gradiente de protones generado. En una realización particular, el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS es una biguanida. En la presente invención se entiende por “biguanida” a aquel compuesto clasificado dentro de la categoría A10B del código ATC (Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química). En otra realización todavía más particular, la biguanida se selecciona del grupo que consiste en fenformina, metformina y buformina. En otra realización aún más particular, el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS es metformina.

La administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS puede llevarse a cabo por cualquiera de las formas de administración que existen en el estado de la técnica. Ejemplos de rutas de administración incluyen, sin limitar a, oral, cutánea, parenteral, nasal e intraperitoneal. Asimismo, la administración de ambos compuestos puede realizarse al mismo tiempo o de forma separada. Así, en una realización particular, la administración de cisplatino en combinación con el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS se lleva a cabo de forma secuencial, simultánea o separada.

En la presente invención se entiende que la administración es “secuencial” cuando el cisplatino y el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS son administrados al individuo en diferentes momentos en el tiempo, de forma que primero se administra uno y posteriormente se administra otro. El orden en el que el cisplatino y el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS son administrados es indiferente.

En la presente invención se entiende que la administración es “simultánea” cuando el cisplatino y el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS forman parte de la misma composición y son administrados conjuntamente, es decir, al mismo tiempo al individuo.

En la presente invención se entiende que la administración es “separada” cuando el cisplatino y el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS forman parte de diferentes composiciones, siendo cada una de ellas administrada de forma individual.

Como entiende el experto en la materia, la administración “separada” puede ser al mismo “simultánea” si ambas composiciones se administran al mismo tiempo.

5 Adicionalmente, el método de la invención puede comprender etapas adicionales dirigidas a determinar otros parámetros útiles para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino. Entre dichos parámetros están el potencial interno de membrana mitocondrial (MIMP) y los niveles de ROS.

10 Así, en una realización particular, el método de la invención comprende, además, medir el MIMP antes y después del tratamiento con cisplatino en una muestra biológica aislada procedente de dicho individuo, en donde un MIMP después del tratamiento mayor que el MIMP antes del tratamiento es indicativo de que la terapia comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un
15 compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.

En otra realización particular, el método de la invención comprende, además, medir los niveles de ROS antes y después del tratamiento con cisplatino en una muestra biológica aislada procedente de dicho individuo, en donde unos niveles de ROS
20 después del tratamiento mayores que el nivel de ROS antes del tratamiento es indicativo de que la terapia comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.

Los reactivos, condiciones y métodos para medir el MIMP y los niveles de ROS son
25 ampliamente conocidos en el estado de técnica.

A la vista de lo explicado anteriormente, dentro de la presente invención también se contempla el empleo de los niveles de expresión del gen PGC-1alfa para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece un cáncer de pulmón y que va a ser
30 tratado con cisplatino.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso *in vitro* del nivel de expresión del gen PGC-1alfa para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece un cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino. De
35 aquí en adelante, a este aspecto inventivo se le denominará “uso de la invención”.

Cómo usar el nivel de expresión del gen PGC-1alfa para diseñar dicha terapia personalizada, ha sido explicado en párrafos anteriores. Así, en una realización particular, cuando el nivel de expresión de PGC-1alfa después del tratamiento con cisplatino es mayor que el nivel de expresión de PGC-1alfa antes de dicho tratamiento,
5 entonces la terapia comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.

Los términos empleados en el presente aspecto inventivo, tales como nivel de expresión, gen PGC-1alfa, terapia personalizada, etc. han sido explicados en párrafos
10 anteriores y son aplicables al presente aspecto inventivo.

Asimismo, las realizaciones particulares que han sido descritas para el método de la invención, también son aplicables al uso de la invención.

15 En una realización particular, el uso de la invención comprende, además, el uso del MIMP y/o de los niveles de ROS para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece un cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino. Así, en otra realización particular, un MIMP y/o unos niveles de ROS después del tratamiento con cisplatino mayores que el MIMP y/o los niveles de ROS antes de dicho tratamiento,
20 son indicativos de que la terapia comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.

En una realización particular, el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS es una biguanida. En otra realización más particular, la biguanida se selecciona del grupo
25 que consiste en fenformina, metformina y buformina.

En otra realización particular, la administración de cisplatino en combinación con el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS se lleva a cabo de forma secuencial, simultánea o separada. Los términos “secuencial”, “simultánea” o
30 “separada” han sido definidos previamente.

En el contexto de la presente invención, los niveles de expresión del gen PGC-1alfa pueden usarse para diseñar una terapia a un individuo que padece cualquier tipo de cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino. No obstante, en una
35 realización particular, el cáncer de pulmón es metastásico. En otra realización

particular, el cáncer de pulmón es NSCLC. En otra realización todavía más particular el uso de la invención, el cáncer de pulmón es NSCLC metastásico.

5 En la presente invención, pueden usarse cualquiera de las moléculas representativas de los niveles de expresión del gen PGC-1alfa, tales como el ADNc, el ARNm y/o la proteína codificada por dicho gen. Todas estas moléculas, así como explicaciones sobre el uso de ellas para determinar el nivel de expresión del gen PGC-1alfa, han sido descritas en párrafos anteriores de la presente descripción. Así, en una
10 realización particular el uso de la invención, el nivel de expresión del gen PGC-1alfa comprende determinar el nivel de ADNc, ARNm y/o la proteína codificada por dicho gen.

Adicionalmente, dentro de los aspectos inventivos incluidos dentro de la presente invención, se contempla el uso de cisplatino combinado con un compuesto dirigido a
15 disminuir la función OXPHOS en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer de pulmón en un individuo que va a ser tratado con cisplatino.

Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de cisplatino combinado de forma secuencial, simultánea o separada con compuesto dirigido a
20 disminuir la función OXPHOS en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer de pulmón en un individuo que va a ser tratado con cisplatino, en donde dicho individuo comprende un nivel de expresión de PGC-1alfa después del tratamiento con cisplatino mayor que el nivel de expresión de PGC-1alfa antes del tratamiento.

25

Realizaciones particulares del presente aspecto inventivo comprenden:

- el individuo comprende, además, un MIMP después del tratamiento mayor que el MIMP antes del tratamiento y/o unos niveles de ROS después del tratamiento mayores
30 que los niveles de ROS antes del tratamiento;
- El cáncer de pulmón es NSCLC y/o metastásico;
- El nivel de expresión del gen PGC-1alfa corresponde al nivel de ADNc, ARNm y/o la proteína codificada por dicho gen;

- El compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS es una biguanida. En otra realización más particular, la biguanida se selecciona del grupo que consiste en fenformina, metformina y buformina.

5 Todas estas realizaciones particulares así como las expresiones y términos empleados han sido descritos en párrafos anteriores, y son aplicables al presente aspecto inventivo.

Técnicas y materiales para elaborar medicamentos (excipientes, vehículos, formas galénicas, formulaciones, etc.) son ampliamente conocidas en estado de la técnica y su aplicación es práctica de rutina para el experto en la materia. Los términos “medicamento” y “composición farmacéutica” son equivalentes y pueden usarse indistintamente en el contexto de la presente invención.

15 Para poner en práctica la presente invención es necesario disponer de un kit que comprende los reactivos necesarios para determinar los niveles de expresión del gen PGC-1alfa. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un kit para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino, de aquí en adelante “kit de la invención”, que
20 comprende los reactivos necesarios para determinar los niveles de expresión del gen PGC-1alfa.

En el contexto de la presente invención, se entiende por kit al producto que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención adaptado para
25 permitir su transporte y almacenamiento. Los materiales adecuados para el embalaje de los componentes del kit incluyen, sin limitar a, polietileno, polipropileno, policarbonato y similares, de cristal, de plástico, etc. El kit también puede comprender botellas, frascos, papel, sobres, etc.

30 La expresión “reactivo que permite determinar el nivel de expresión de un gen” significa un compuesto o un grupo de compuestos que permite determinar el nivel de expresión de un gen, tanto por medio de la determinación del nivel de ADNc o ARNm como por medio del nivel de proteína. Por lo tanto, los reactivos del primer tipo incluyen ácidos nucleicos, e.g. cebadores y sondas, capaces de hibridar
35 específicamente con el ARNm codificado por el gen involucrado. Los reactivos del

segundo tipo son compuestos que se unen específicamente a la proteína codificada por el gen y, preferentemente, se incluyen los anticuerpos aunque pueden ser aptámeros específicos.

- 5 Así, en una realización particular, los reactivos necesarios para determinar los niveles de expresión del gen PGC-1alfa comprenden
- un ácido nucleico que hibrida de forma específica con el gen PGC-1alfa, o con un fragmento del mismo, y/o
 - anticuerpos que reconocen de forma específica la proteína codificada por el gen
- 10 PGC-1alfa, o un fragmento de la misma.

Ejemplo de un ácido nucleico que hibrida de forma específica con el gen PGC-1alfa es, por ejemplo, una sonda. En la presente invención se entiende por “sonda” a la molécula de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos hibrida de forma específica

15 con la secuencia de nucleótidos de un gen diana. En la presente invención, el gen diana es el gen PGC-1alfa. La expresión “hibrida de forma específica”, tal como se usa aquí, se refiere a las condiciones que permiten la hibridación de dos polinucleótidos en condiciones altamente o moderadamente rigurosas. Condiciones de alta rigurosidad implican, en general: (1) fuerza iónica baja y alta temperatura para el lavado, por

20 ejemplo de cloruro de sodio 0,015M/citrato de sodio 0,0015M/0,1% dodecil sulfato de sodio a 50°C, (2) empleo durante la hibridación de un agente de desnaturalización, tales como formamida, por ejemplo, el 50% (v/v) formamida con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1% Ficoll/0,1% polivinilpirrolidone/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH

25 6,5 con cloruro de sodio a 750 mM, 75 mM de citrato de sodio a 42°C, o (3) empleo de 50% de formamida, 5xSSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato de sodio), fosfato sódico 50mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 veces solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 mg/mL), 0,1 % SDS, y el 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2xSSC (cloruro sódico/citrato de sodio) y el 50% de formamida, seguido de un lavado de alto rigor que consiste en 0,1xSSC que contiene

30 EDTA a 55°C. “Condiciones moderadamente rigurosas” incluyen el uso de solución de lavado y las condiciones de hibridación menos estrictas que las descritas anteriormente. Como llevar a cabo la hibridación de dos secuencias de nucleótidos puede encontrarse en Sambroock, J., *et al.* 2012, citado *ad supra*.

En el caso de que los niveles de expresión del gen PGC-1alfa se determinen mediante la medición de los niveles de proteína codificada por dicho gen, el kit de la invención comprende reactivos que son capaces de unirse específicamente a dicha proteína, tales como los anticuerpos. Ejemplos de anticuerpos que pueden reconocer de forma específica la proteína codificada por el gen PGC-1alfa y unirse a ella han sido descritos en párrafos anteriores.

En otra realización particular, el gen PGC-1alfa comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 1. En otra realización particular, el gen PGC-1alfa comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 1.

Adicionalmente, el kit de la invención puede comprender reactivos dirigidos a determinar otros parámetros útiles para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino. Como se ha indicado anteriormente, entre dichos parámetros están el MIMP y los niveles de ROS. Así, en una realización particular, el kit comprende además reactivos para medir el MIMP y/o los niveles de ROS.

Finalmente, en otro aspecto, la invención se dirige a el uso *in vitro* del kit de la invención para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Generación de las líneas resistentes a CDDP (cisplatino). Tras el tratamiento continuado de las líneas celulares A549 (A), H1299 (B) y H460 (C) con 5 μ M CDDP, se

obtuvieron versiones resistentes. Los gráficos representan el porcentaje de células viables (Eje-Y) tras 48 horas de diferentes tratamientos con CDDP (Eje-X). Los datos son la media de al menos tres experimentos diferentes y están representados como porcentaje relativo a las células sin tratar. Las barras de error indican la desviación estándar. El valor p de la prueba t de Student se consideró estadísticamente significativo cuando fue menor de 0,05 (*= $P \leq 0,05$, **= $P \leq 0,01$, ***= $P \leq 0,001$).

Figura 2: Reprogramación metabólica en líneas resistentes a CDDP. El potencial de membrana interna mitocondrial (A) y los niveles de ROS totales (B) fueron medidos por citometría de flujo con las sondas fluorescentes TMRE y DCFHDA respectivamente. Los datos son medias de, al menos, tres diferentes experimentos y están representados como porcentajes relativos a su línea parental. Las barras de error indican desviación estándar. (C). El grafico de barras representa los niveles relativos de ARNm para el gen PGC-1alfa comparado con las líneas parentales. Las barras de error indican la desviación estándar. El valor p de la prueba t de Student se consideró estadísticamente significativo cuando fue menor de 0,05 (*= $P \leq 0,05$, **= $P \leq 0,01$, ***= $P \leq 0,001$).

Figura 3: Cambios en el MIMP y ROS en respuesta temprana al tratamiento con CDDP. Las líneas parentales y resistentes a CDDP fueron tratadas con 5 μ M CDDP durante 24 horas y su MIMP (A) y niveles ROS (B) fueron evaluados por citometría de flujo con las sondas fluorescentes TMRE y DCFHDA respectivamente. Los resultados representan las medias de, al menos, tres experimentos independientes y están representados como porcentaje relativo sobre las células parentales sin tratar. Las barras de error indican la desviación estándar. El valor p de la prueba t de Student se consideró estadísticamente significativo cuando fue menor de 0,05 (*= $P \leq 0,05$, **= $P \leq 0,01$, ***= $P \leq 0,001$).

Figura 4: La Resistencia a CDDP aumenta la sensibilidad a metformina. El tratamiento con metformina reduce el MIMP en las líneas celulares A549 (A) y H1299 (B), independientemente de su resistencia a CDDP. Las barras muestran las medias de al menos tres experimentos independientes y representan la fluorescencia de TMRE. Las barras de error indican desviación estándar. (C y D) La sensibilidad a metformina fue evaluada para las líneas parentales A549 y H1299 así como para sus versiones resistentes a CDDP. Los gráficos representan el porcentaje de células viables (Eje-Y)

tras 48 horas de diferentes tratamientos con CDDP (Eje-X). Los datos son la media de al menos tres experimentos diferentes y están representados como porcentaje relativo a las células sin tratar. Las barras de error indican la desviación estándar. El valor p de la prueba t de Student se consideró estadísticamente significativo cuando fue menor de 0,05 (*= $P \leq 0,05$, **= $P \leq 0,01$, ***= $P \leq 0,001$).

Figura 5: Tratamiento concomitante de metformina y CDDP en las líneas celulares parentales y resistentes a CDDP. El tratamiento con metformina reduce el aumento de MIMP producido por el tratamiento con CDDP en las líneas celulares A549 (A) y H1299 (B). La sensibilidad a diferentes concentraciones de metformina en presencia o ausencia de 5 μM CDDP fue evaluada para las líneas parentales A549 y H1299 (C y D) así como para sus respectivas versiones resistentes a CDDP (E y F). La metformina elimina las diferencias al tratamiento con CDDP entre las líneas parentales y resistentes a CDDP en ambos casos A549 y H1299 (G y H). Los gráficos representan el porcentaje de células viables (Eje-Y) tras 48 horas de diferentes tratamientos con CDDP (Eje-X). Los datos son la media de, al menos, tres experimentos diferentes y están representados como porcentaje relativo a las células sin tratar. Las barras de error indican la desviación estándar. El valor p de la prueba t de Student se consideró estadísticamente significativo cuando fue menor de 0,05 (*= $P \leq 0,05$, **= $P \leq 0,01$, ***= $P \leq 0,001$).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

I. MATERIAL y MÉTODOS

1.1 Líneas celulares y reactivos.

Las líneas celulares A549 (ATCC® CCL-185™), H1299 (ATCC® CRL-5803™), and H460 (ATCC® HTB-177™) fueron obtenidas a partir de la ATCC.

La línea A549 proviene de un tumor primario de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP o en inglés NSCLC), mientras que las líneas H1299 y H460 provienen de metástasis de CPCNP, más concretamente, las células H1299 están

derivadas de ganglio linfático y las H460 de una efusión pleural.

Todas las células se cultivaron de forma rutinaria en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina y streptomycin. El cisplatino se obtuvo de excedentes terapéuticos del servicio de Oncología Médica del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda. La metformina se obtuvo de sigma.

1.2 Ensayos de viabilidad celular.

3x10³ células se sembraron en una placa multipocillo de 96 y fueron cultivados en DMEM hasta el día siguiente. A la mañana siguiente el medio fue sustituido por DMEM que contenía los diferentes tratamientos de acuerdo a las leyendas de las figuras. La viabilidad celular se determinó mediante el kit comercial Cell counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo EU GmbH, Munich, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.3 Citometría de Flujo.

Los ROS citoplasmáticos fueron determinados utilizando 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (H2DCFHDA, Invitrogen). El potencial interno mitocondrial MIMP fue determinado utilizando Tetrametilrodamina etil ester (TMRE, Invitrogen)

Para estos ensayos, se cultivaron 1x10⁵ células. Tras la adición de los fluoróforos, (30 µM DCFHDA y 100 nM TMRE) y su incubación durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad, las células fueron recuperadas en DMEM y analizadas inmediatamente en un citómetro Cytomic FC500 MPL (BeckmanCoulter). El tamaño y complejidad fueron utilizados para determinar la población viable de las células, y la intensidad media de la fluorescencia se determinó con el software MXP (BeckmanCoulter). Los experimentos se realizaron por duplicado en al menos tres pases independientes.

1.4 Análisis de expresión.

El ARN de las células se extrajo utilizando el kit "RNeasy mini Kit with DNase" (Qiagen) y el ADNc se sintetizó utilizando el kit "NZY First-StrandcDNASynthesis Kit" (NZYtech).

Los niveles de expresión de PGC-1alfa se evaluaron mediante qRT-PCR utilizando el ensayo de expresión Taqman® (Hs01016719_m1). Los niveles de TBP

(Hs00427621_m1) se utilizaron como control endógeno (Søes, S., *et al.* (2013). LungCancer 81, 180–186).

1.5 Estadística.

5 Los resultados se presentaron como medias \pm la desviación estándar. Se utilizó la prueba t de Student para el análisis estadístico entre los grupos y se consideró esta diferencia significativa cuando el valor p fue menor de 0,05 (*= $P \leq 0,05$, **= $P \leq 0,01$, ***= $P \leq 0,001$).

10 II. RESULTS

2.1 Generación de las líneas resistentes a cisplatino.

Como primer paso en el estudio de los cambios metabólicos asociados a la resistencia a cisplatino en CPCNP, se obtuvieron líneas celulares resistentes.

15

Para hacer esto, partiendo de tres de las líneas celulares más comunes de CPCNP (A549 tumor primario, H1299 Nódulo linfático y H460 efusión pleural) se generaron líneas resistentes mediante tratamiento continuado con 5 μ M CDDP durante tres meses.

20

Después de este proceso de selección, las células fueron evaluadas para su sensibilidad al tratamiento con cisplatino (Figura 1). Como cabría esperar de forma similar a lo que ocurre en pacientes, los resultados mostraron que el tratamiento continuado con CDDP sobre las líneas celulares condujo a la generación de un aumento en la resistencia a este tratamiento para las tres líneas celulares.

25

A pesar de que las curvas parecen similares, se observaron diferencias significativas para las 3 líneas celulares en el rango de concentración que va desde 3 a 12 μ M CDDP. Además, estos resultados se obtuvieron en un corto periodo de tiempo, 48 horas, por lo que a mayores exposiciones, se esperaría un aumento de las diferencias entre las líneas parentales y las resistentes. Los siguientes experimentos se realizaron con 5 μ M cisplatino, ya que es una concentración baja, pero que permitió mostrar diferencias significativas para las 3 líneas del estudio.

35 2.2 Líneas celulares resistentes a cisplatino muestran un aumento del MIMP y de los

niveles de ROS.

Una vez se obtuvieron los tres modelos celulares de resistencia a CDDP, se procedió a caracterizar los cambios metabólicos asociados con este aumento estable de la resistencia (Figura 2). Se midió el potencial interno mitocondrial (MIMP) ya que es un
5 buen reflejo de la función mitocondrial y puede ser evaluado fácilmente por citometría de flujo con la sonda fluorescente TMRE. Los resultados mostraron un aumento significativo del MIMP para las líneas resistentes H1299 y H460 comparado con sus respectivas líneas parentales, pero no para la línea A549 (Figura 2A).

10 Por otro lado, la cadena de transporte de electrones (ETC) es una de las fuentes principales de especies reactivas del oxígeno (ROS), por lo tanto se evaluaron los niveles de ROS totales en nuestras líneas celulares. Para ello, se utilizó la sonda fluorescente DCFHDA. Los resultados muestran un aumento significativo cercano al 20-30% para las tres líneas celulares resistentes a CDDP (Figura 2B).

15 Estos resultados se completaron con el análisis de los niveles de expresión de PGC-1alfa, conocido por ser el regulador principal de la biogénesis mitocondrial (Figura 2C). Los niveles de expresión de PGC-1alfa estaban aumentados significativamente en las líneas resistentes a CDDP H1299 y H460. Sin embargo, no se observaron cambios en
20 la línea A549 resistente a CDDP, de forma similar a lo observado para el MIMP.

2.3 El tratamiento con cisplatino induce una reprogramación metabólica en líneas celulares de CPCNP

Los resultados obtenidos con las líneas resistentes condujeron a preguntarse si estos
25 cambios podían producirse como respuesta temprana a la droga. Con este propósito se analizaron los niveles de MIMP y ROS tras 24 horas de tratamiento con CDDP en las diferentes líneas celulares (Figura 3).

Los resultados muestran un aumento del MIMP y ROS cuando las líneas parentales
30 son tratadas durante 24 horas con 5 μ M CDDP. De forma interesante para el MIMP, este aumento ocurre en las tres líneas celulares, a pesar de que la línea A549 no presenta un aumento estable del MIMP.

De forma similar, este cambio temprano del MIMP y los ROS en respuesta al
35 tratamiento ocurrió también en las líneas resistentes, que aumentaron aún más sus

parámetros.

Por lo tanto, esta adaptación temprana al tratamiento parece ser común a las líneas parentales y resistentes. Sin embargo, el aumento relativo en comparación con las células no tratadas es similar para ambas líneas celulares parentales y resistentes a CDDP (a pesar de que los niveles de MIMP y ROS son significativamente más altos para las líneas celulares resistentes).

2.4 Tratamiento con metformina en líneas de CPCNP parentales y resistentes a CDDP.

A la vista de los resultados, parece claro que un mecanismo de resistencia al cisplatino sería un aumento del MIMP y de la biogénesis mitocondrial. Profundizando en esta hipótesis, se investigó si este grupo de células resistentes con un MIMP aumentado podría ser atacado con una droga que inhiba la función mitocondrial.

Para estos estudios se trabajó con la línea celular H1299 ya que su versión resistente a CDDP es la que mostró un aumento mayor del MIMP. Además se utilizó la línea A549 como control negativo ya que en esta línea no se observó este fenómeno.

Primero se comprobó si la droga metformina era capaz de reducir el MIMP de las líneas celulares. El tratamiento con metformina a las líneas A549 y H1299 disminuyó su MIMP independientemente de su resistencia a CDDP (Figura 4 A-B).

En segundo lugar, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de metformina en la viabilidad celular de las líneas parentales y resistentes a CDDP (Figura 4 C-D).

Los resultados muestran una disminución de la viabilidad celular con un aumento de la concentración de metformina. De forma destacable, este efecto es mucho mayor en el caso de la línea H1299 resistente a CDDP comparado con su línea parental. Por el otro lado, no se observaron diferencias entre la línea A549 resistente a CDDP y su línea parental.

3.5 Tratamiento concomitante de metformina y CDDP en líneas celulares parentales y resistentes a CDDP.

Ya que se observó un aumento en el MIMP como respuesta temprana al tratamiento

con CDDP, se comprobó si el tratamiento conjunto con metformina podría aumentar el efecto del cisplatino. Se procedió de una forma similar a la anterior sección, primero se analizó si la metformina era capaz de bloquear el aumento temprano de MIMP producido por el CDDP (Figura 5 A-B).

5

Los resultados muestran que la metformina es capaz de revertir el aumento de MIMP inducido por el cisplatino en las dos líneas celulares A549 y H1299, para las versiones parentales y resistentes a cisplatino.

10 En segundo lugar, se midió la viabilidad celular para todas las líneas celulares con diferentes concentraciones (0, 0,1, 1, 5, and 10 mM) en la presencia o ausencia de 5 μ M CDDP (Figura 5 C-F).

15 Los resultados mostraron una disminución del porcentaje de células viables para todas las líneas celulares tratadas con metformina. Notablemente, este efecto es mantenido cuando las células son tratadas con la combinación metformina más CDDP, aunque en algún caso un ligero efecto protector que no llega a ser significativo se observa para concentraciones de metformina inferiores a 1 mM.

20 Finalmente, el tratamiento con metformina elimina las diferencias entre las líneas parentales y resistentes al tratamiento con CDDP para ambas líneas celulares (Figura 5 G-H). Las diferencias entre la línea parental y las líneas resistentes dejan de ser significativas desde una concentración de metformina de 0,1 mM para la línea A549 y desde 1mM para la línea H1299.

25

III. DISCUSIÓN

30 Se generaron versiones resistentes de tres líneas celulares diferentes después de un tratamiento continuado con cisplatino durante tres meses. Dos de tres líneas celulares mostraron cambios estables hacia un aumento de MIMP, aunque curiosamente, los tres respondieron de manera similar el aumento de este parámetro como una respuesta temprana al tratamiento de CDDP.

35 Los resultados aquí mostrados muestran un aumento de PGC-1alfa (activador de la función OXPHOS), precisamente en las dos líneas celulares (H1299 y H460) que

mostraron un aumento del MIMP.

Apoyando la importancia de PGC-1alfa en el cambio metabólico, la línea celular A549 resistente al CDDP, sin cambios observados en el MIMP, no mostró un aumento en la
5 expresión de PGC-1alfa. Estos resultados refuerzan un cambio específico estable en la función OXPHOS para las líneas celulares resistentes a CDDP de H1299 y H460.

Un aumento de la función OXPHOS puede conducir a un aumento de los niveles de superóxido y peróxido de hidrógeno. Los niveles de ROS medidos con DCFHDA
10 estuvieron aumentados significativamente. Sorprendentemente, este aumento se produce tanto como una modificación estable en las líneas celulares CDDP resistentes y también como una respuesta temprana a la exposición a cisplatino en todas las líneas celulares estudiadas.

15 Todos estos resultados indican un proceso de reprogramación metabólica hacia una mayor función OXPHOS en contra del Efecto Warburg. La mayoría de las células tumorales utilizan preferentemente la estrategia de glicólisis aeróbica a pesar de su menor rendimiento energético (en comparación con el uso del sistema OXPHOS más eficiente) ya que este "metabolismo de Warburg" está adaptado para sostener un
20 crecimiento exponencial. Sin embargo, como indican los resultados, hay un aumento en la función de OXPHOS tanto en células tratadas con CDDP como en células resistentes a CDDP de forma estable. Así, en este estudio se demuestra una reprogramación metabólica asociada con la resistencia a CDDP en este tipo de tumores.

25

Se investigó la posibilidad de atacar este grupo de células resistentes con una función OXPHOS aumentada inhibiendo la función mitocondrial.

En el presente estudio se demostró que la adición de metformina a las líneas celulares
30 A549 y H1299 disminuye su MIMP, muy probablemente inhibiendo la función del complejo I independientemente de su resistencia a CDDP (Figura 4A-B) o la presencia de cisplatino concomitante (Figura 5A-B). Además, la metformina disminuyó, de una manera dosis-dependiente, la viabilidad de las células proporcionalmente a sus requerimientos OXPHOS. Como era de esperar, no se observaron diferencias en la
35 viabilidad entre las células A549 parentales y CDDP-resistentes, ya que no

hubocambios en la función OXPHOS para su versión resistente al CDDP.

Sin embargo, hubo diferencias notables para la línea H1299, cuya versión resistente a CDDP fue mucho más sensible a la metformina. Estos resultados apoyan de nuevo una reprogramación metabólica específica hacia un metabolismo más oxidativo en las
5 células resistentes H1299, ya que esta línea es mucho mas sensible que su parental a un inhibidor mitocondrial como la metformina.

La metformina provocó una reducción del porcentaje de células viables para todas las
10 líneas celulares, incluso en presencia de cisplatino concomitante. Sin embargo, el tratamiento con metformina eliminó las diferencias entre las líneas celulares parentales y resistentes al tratamiento con cisplatino para las células A549 y H1299. Las células A549 CDDP-resistentes, que sobrevivieron más al tratamiento con cisplatino que la línea celular parental, pierden estas diferencias cuando se tratan con una
15 concentración tan baja como metformina 0,1 mM. A partir de este momento, el comportamiento de ambas líneas celulares con el tratamiento con metformina fue similar.

En la línea celular H1299, su versión parental fue sensible al cisplatino y resistente a la
20 metformina. Por otro lado, la versión resistente fue más sensible a la metformina y menos sensible al cisplatino. Por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de metformina, los gráficos se unen porque las células resistentes a CDDP mueren por el efecto de la metformina pero no por el cisplatino (Figura 5F). Por el contrario, la metformina prácticamente no tuvo efecto sobre la línea celular parental (como se ve en
25 Figura 5D), siendo la reducción de la viabilidad celular producida principalmente por el cisplatino.

Para concluir, se puede decir que un aumento en la función de OXPHOS es un mecanismo de resistencia al tratamiento con cisplatino en NSCLC, y que esta
30 característica de células resistentes a cisplatino puede ser aprovechada terapéuticamente mediante tratamiento con metformina.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino que comprende
- 5 (a) determinar el nivel de expresión del gen PGC-1alfa antes y después del tratamiento con cisplatino en una muestra biológica aislada procedente de dicho individuo, y
- (b) comparar el nivel de expresión obtenido en la etapa (a) antes del tratamiento con el nivel de expresión después del tratamiento,
- 10 en donde un nivel de expresión de PGC-1alfa después del tratamiento mayor que el nivel de expresión de PGC-1alfa antes del tratamiento es indicativo de que la terapia comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, que además comprende medir el potencial interno de membrana mitocondrial (MIMP) antes y después del tratamiento con cisplatino en una muestra biológica aislada procedente de dicho individuo, en donde un MIMP después del tratamiento mayor que el MIMP antes del tratamiento es indicativo de que la terapia comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un
- 20 compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, que además comprende medir los niveles de radicales libres de oxígeno (ROS) antes y después del tratamiento con cisplatino en una muestra biológica aislada procedente de dicho individuo, en donde unos niveles
- 25 de ROS después del tratamiento mayores que el nivel de ROS antes del tratamiento es indicativo de que la terapia comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cáncer de
- 30 pulmón es metastásico.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde determinar el nivel de expresión del gen PGC-1alfa comprende medir el nivel de ADNc, ARNm y/o la proteína codificada por dicho gen.
- 5 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra biológica es sangre, suero o tejido procedente de una biopsia.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la administración de cisplatino en combinación con el compuesto dirigido a disminuir la
10 función OXPHOS se lleva a cabo de forma secuencial, simultánea o separada.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS es una biguanida.
- 15 10. Método según la reivindicación 9, en donde la biguanida se selecciona del grupo que consiste en fenformina, metformina y buformina.
11. Uso *in vitro* del nivel de expresión del gen PGC-1alfa para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece un cáncer de pulmón y que va a ser tratado
20 con cisplatino.
12. Uso según la reivindicación 11, que además comprende el uso del MIMP y/o de los niveles de ROS.
- 25 13. Uso según la reivindicación 11 o 12, en donde un nivel de expresión de PGC-1alfa después del tratamiento con cisplatino mayores que el nivel de expresión de PGC-1alfa antes de dicho tratamiento, es indicativo de que la terapia comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS.
30
14. Uso según la reivindicación 12 o 13, en donde un MIMP y/o unos niveles de ROS después del tratamiento con cisplatino mayores que el MIMP y/o los niveles de ROS antes de dicho tratamiento, es indicativo de que la terapia comprende una segunda administración de cisplatino en combinación con un compuesto dirigido a disminuir la
35 función OXPHOS.

15. Uso según la una cualquiera de la reivindicación 13 o 14, en donde el compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS es una biguanida.

5 16. Uso según la reivindicación 15, en donde la biguanida se selecciona del grupo que consiste en fenformina, metformina y buformina.

17. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde la administración de cisplatino en combinación con el compuesto dirigido a disminuir la
10 función OXPHOS se lleva a cabo de forma secuencial, simultánea o separada.

18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en donde el cáncer de pulmón es metastásico.

15 19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, en donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

20. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en donde el nivel de expresión del gen PGC-1alfa comprende determinar el nivel de ADNc, ARNm y/o la
20 proteína codificada por dicho gen.

21. Uso de cisplatino combinado de forma secuencial, simultánea o separada con compuesto dirigido a disminuir la función OXPHOS en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer de pulmón en un individuo va a ser tratado
25 con cisplatino, en donde dicho individuo comprende un nivel de expresión de PGC-1alfa después del tratamiento mayor que el nivel de expresión de PGC-1alfa antes del tratamiento.

22. Uso según la reivindicación 21, en donde el individuo comprende, además, un
30 MIMP después del tratamiento mayor que el MIMP antes del tratamiento y/o unos niveles de ROS después del tratamiento, mayores que los niveles de ROS antes del tratamiento.

23. Uso según la reivindicación 21 o 22, en donde el cáncer de pulmón es
35 metastásico.

24. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 5 25. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en donde el nivel de expresión del gen PGC-1alfa corresponde al nivel de ADNc, ARNm y/o la proteína codificada por dicho gen.
26. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en donde el compuesto
10 dirigido a disminuir la función OXPHOS es una biguanida.
27. Uso según la reivindicación 26, en donde la biguanida se selecciona del grupo que consiste en fenformina, metformina y buformina.
- 15 28. Un kit para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino que comprende los reactivos necesarios para determinar los niveles de expresión del gen PGC-1alfa.
29. Kit según la reivindicación 28, en donde los reactivos comprenden
20 - un ácido nucleico que hibrida de forma específica el gen PGC-1alfa, y/o
- anticuerpos que reconocen de forma específica la proteína codificada por el gen PGC-1alfa.
30. Kit según la reivindicación 28 o 29, en donde el gen PGC-1alfa comprende una
25 secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 1.
31. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, que comprende además reactivos para medir el MIMP y/o los niveles de ROS.
30
32. Uso *in vitro* de un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31 para diseñar una terapia personalizada a un individuo que padece cáncer de pulmón y que va a ser tratado con cisplatino.

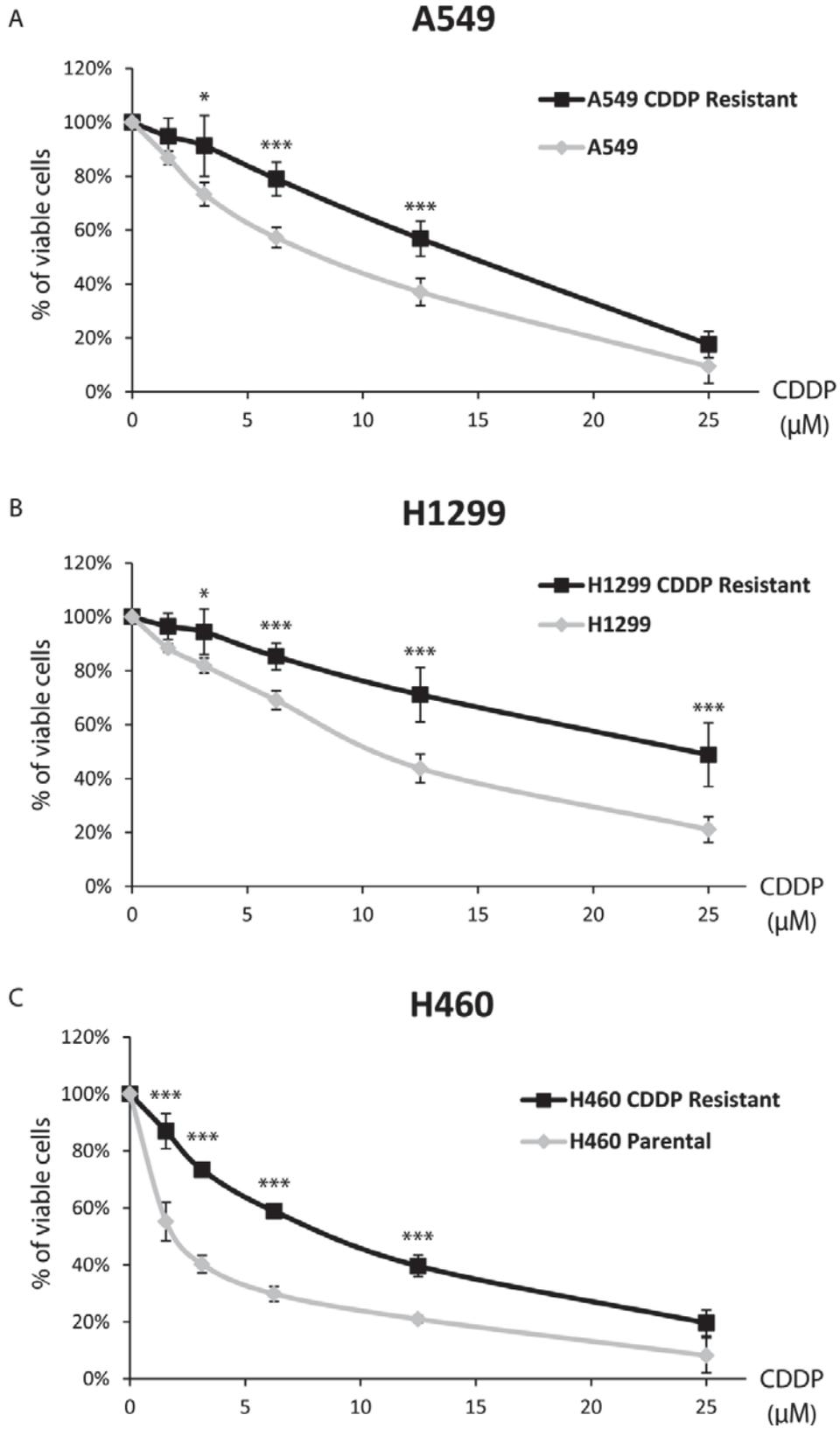


FIG. 1

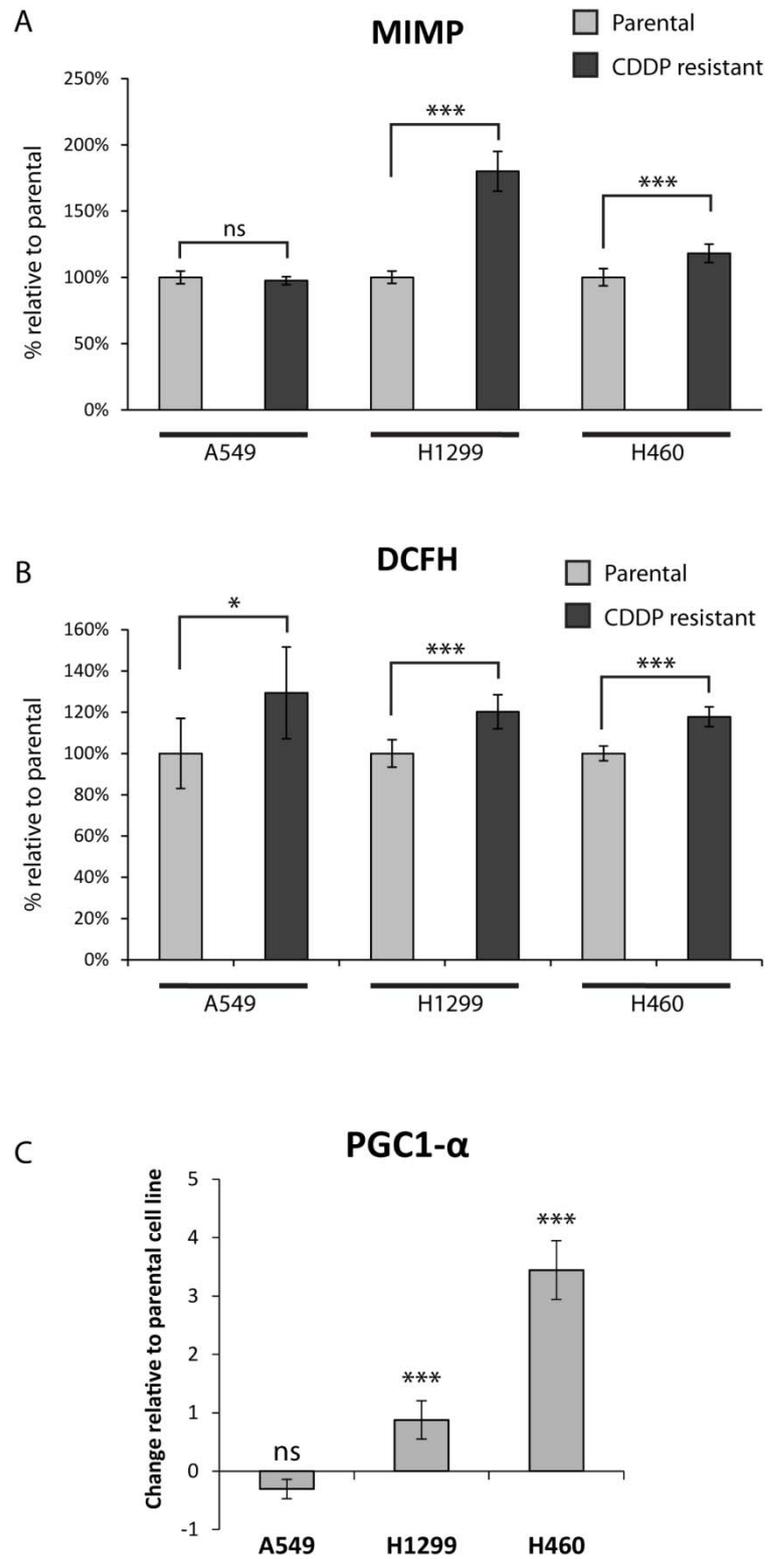


FIG. 2

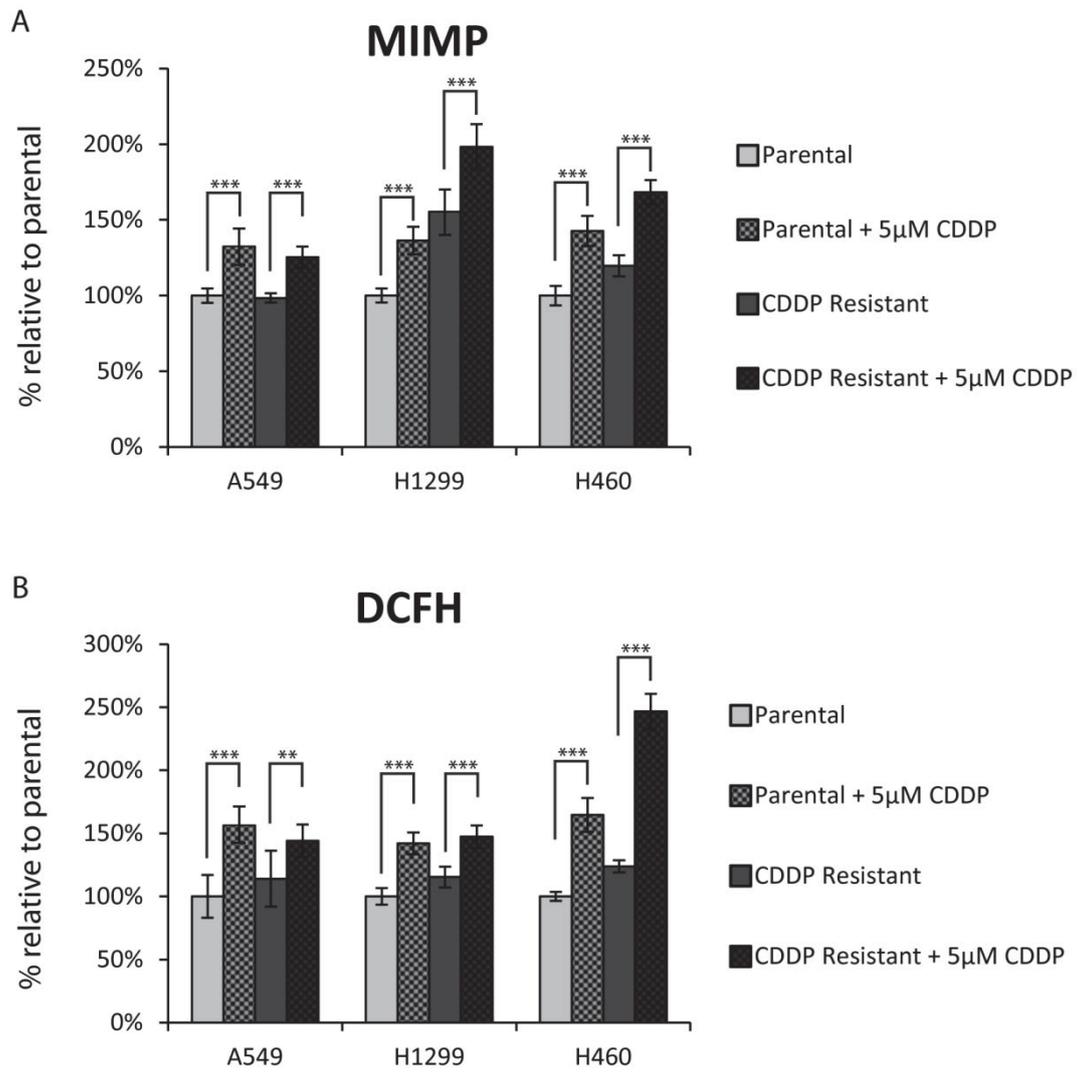


FIG. 3

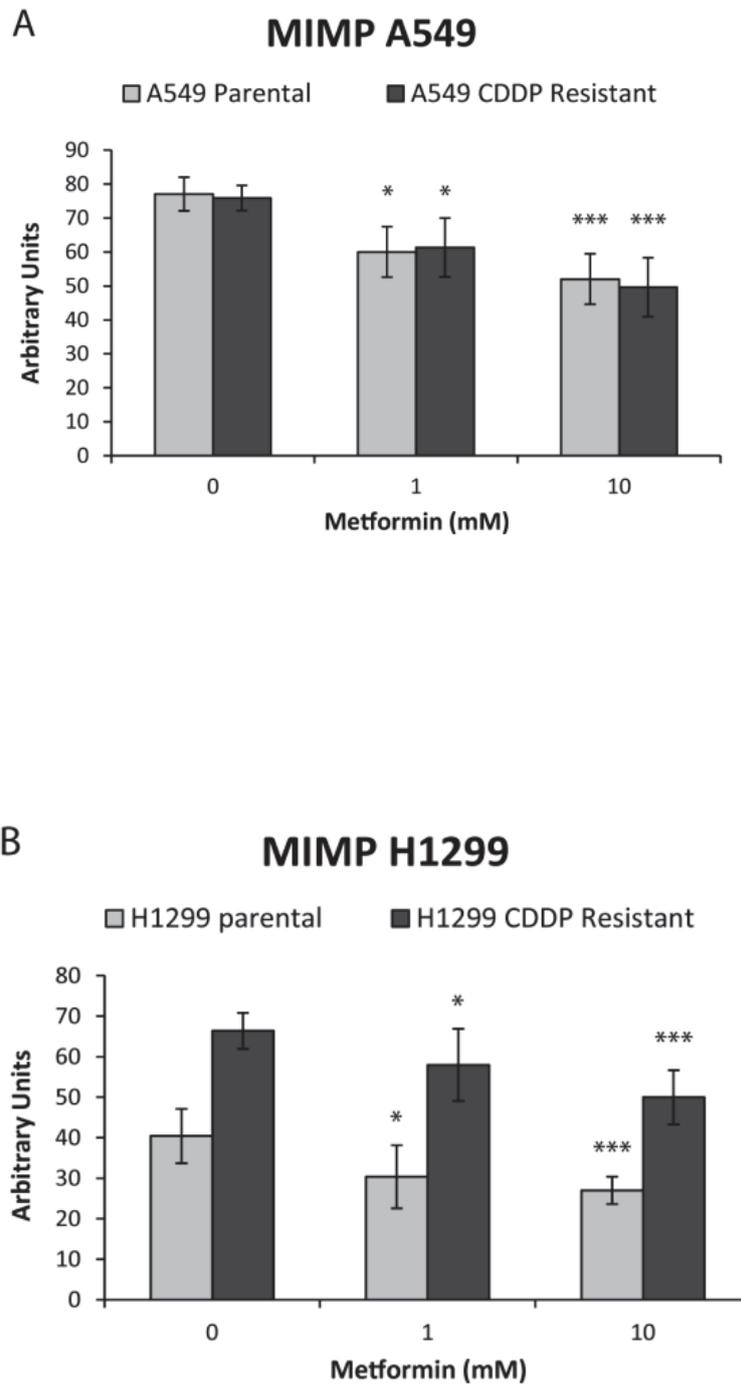


FIG. 4

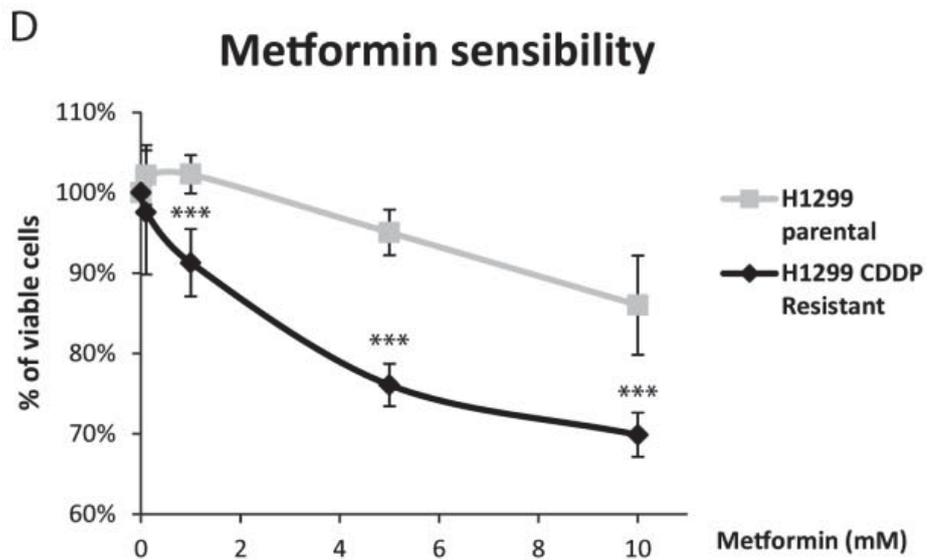
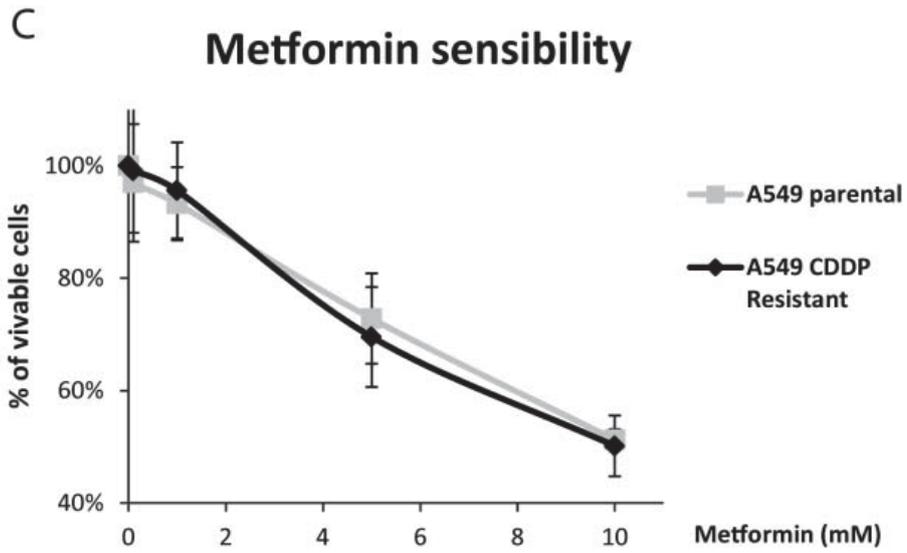


FIG. 4 (cont.)

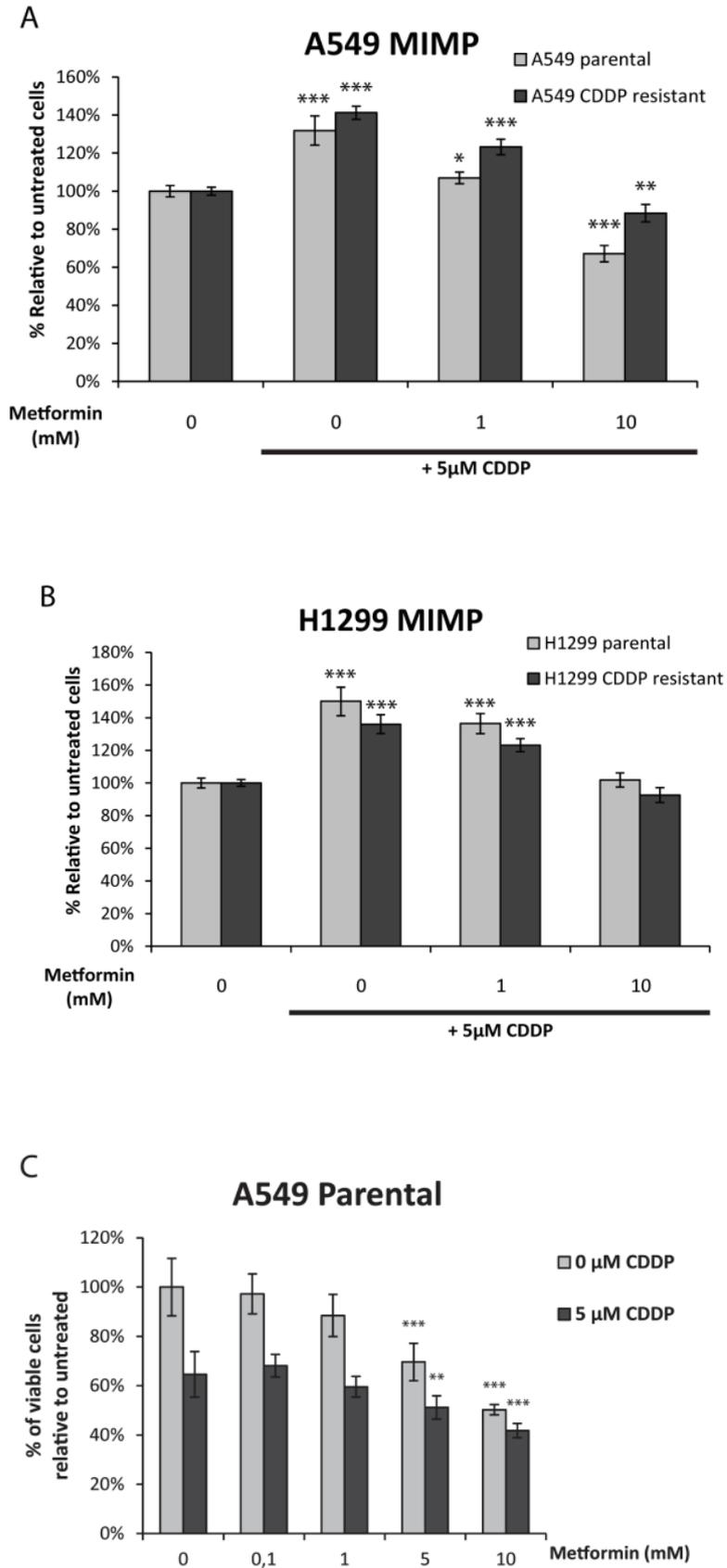


FIG. 5

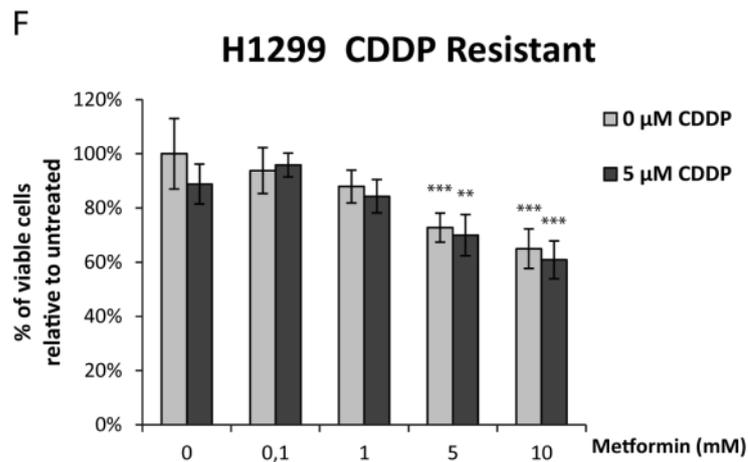
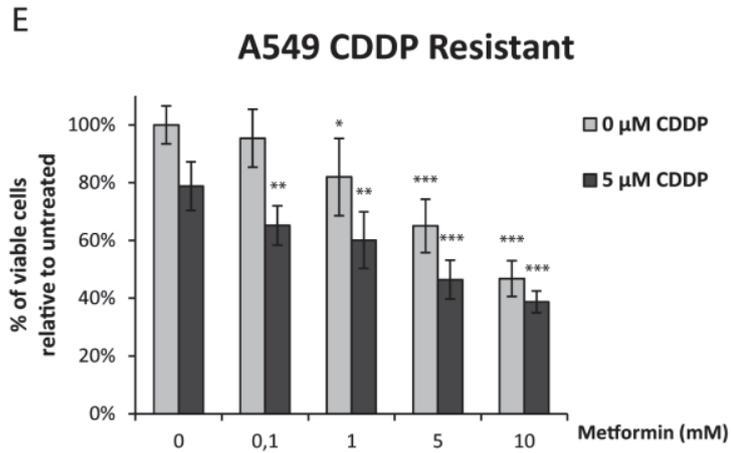
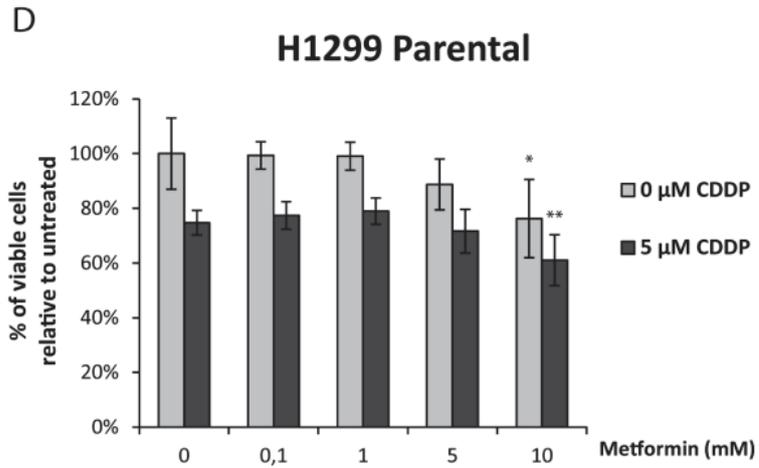


FIG. 5 (cont.)

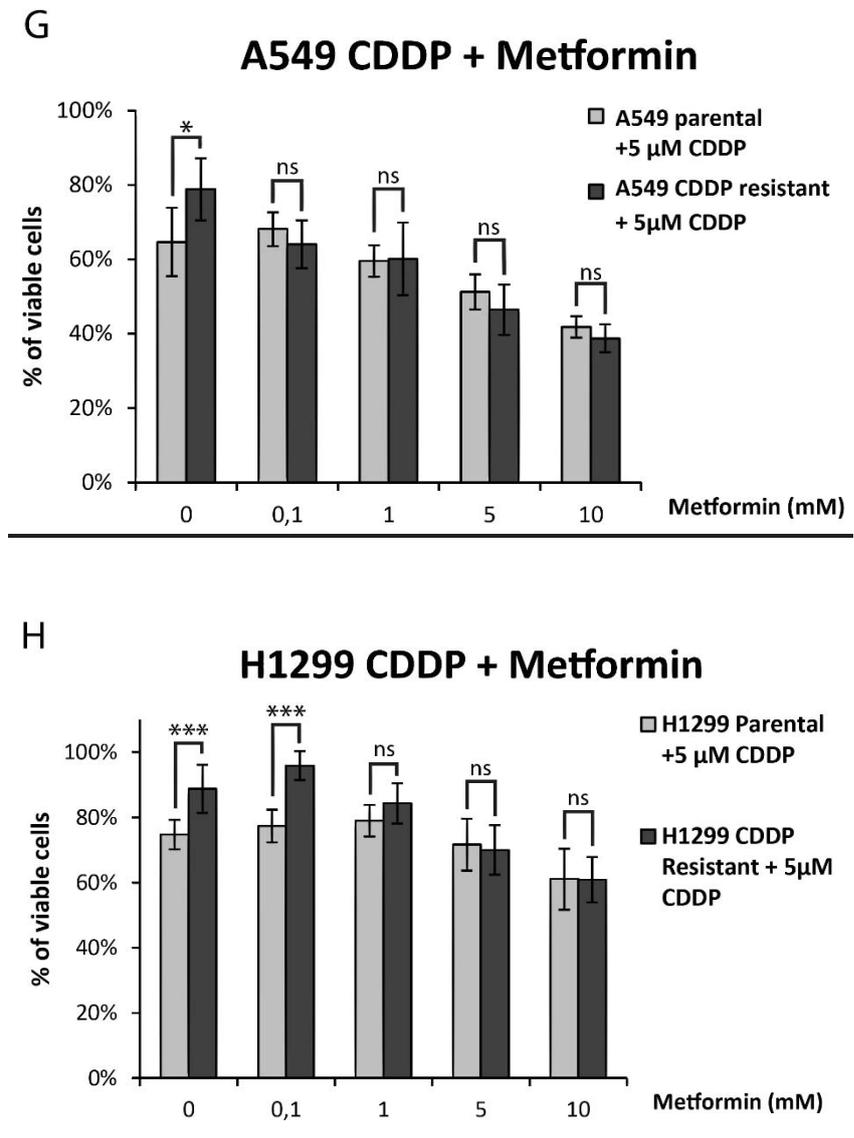


FIG. 5 (cont.)



- ②¹ N.º solicitud: 201730857
②² Fecha de presentación de la solicitud: 28.06.2017
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12Q1/6886** (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LIN, C.-C. et al. Metformin enhances cisplatin cytotoxicity by suppressing signal transducer and activator of transcription-3 activity independently of the liver kinase B1-AMP-activated protein kinase pathway. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. Agosto 2013, Vol. 49, Nº 2, páginas 241-250. ISSN 1044-1549 (impreso), ISSN 1535-4989 (electrónico). <DOI:10.1165/rcmb.2012-0244OC>. Especialmente: apartado "Results", paginas 243 - 244, 246, 247; figura 5B.	1-27
X	YOUSEF, M. et al. Metformin in lung cancer: review of in vitro and in vivo animal studies. Cancers. Mayo 2017, Vol. 9, Nº 5, Artículo Nº: 45. ISSN 2072-6694. <DOI: 10.3390/cancers9050045>. Especialmente páginas 3, 5, 8, 11, 12.	1-27
X	WANG, Y. et al. Metformin inhibits the proliferation of A549/CDDP cells by activating p38 mitogen-activated protein kinase. Oncology Letters. Septiembre 2014, Vol. 8, Nº 3, páginas 1269 - 1274. ISSN 1792-1074 (impreso), ISSN 1792-1082 (electrónico). <DOI:10.3892/ol.2014.2270> Especialmente páginas 1272, 1273, página 1275, último párrafo.	1, 2, 4-27
X	WANG, J. et al. Metformin inhibits growth of lung adenocarcinoma cells by inducing apoptosis via the mitochondria-mediated pathway. Oncology Letters. Septiembre 2015, Vol. 10, Nº 3, páginas 1343 - 1349. ISSN 1792-1074 (impreso), ISSN 1792-1082 (electrónico). <DOI:10.3892/ol.2015.3450>. Especialmente epígrafes "Results"; "Discussion" segundo y último párrafo.	1, 2, 4-27
X	CHEN, Y.-Q. et al. Combined therapeutic effect and molecular mechanisms of metformin and cisplatin in human lung cancer xenografts in nude mice. Journal of Cancer Research and Therapeutics. Abril - junio 2015, Vol. 11, Nº 2, páginas 324 - 330. <DOI: 10.4103/0973-1482.151444>. Especialmente apartado "Discussion".	1, 2, 4-27

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: 1-27

Fecha de realización del informe
20.02.2018

Examinador
E. Relañó Reyes

Página
1/3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201730857

22 Fecha de presentación de la solicitud: 28.06.2017

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C12Q1/6886** (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FERNANDES TEIXEIRA, S. et al. Metformin synergistically enhances antiproliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells. <i>Jornal Brasileiro de Pneumologia</i> . 2013, Vol. 39, Nº 6, páginas 644 - 649. ISSN 1806-3756 (electrónico). <DOI: 10.1590/S1806-37132013000600002> Especialmente "Results".	1, 2, 4-27

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: 1-27

Fecha de realización del informe
20.02.2018

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
2/3

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC