

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 174**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2013 PCT/EP2013/073284**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072416**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2013 E 13786515 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2917347**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la metástasis ósea**

30 Prioridad:

08.11.2012 EP 12306376
12.03.2013 US 201361777518 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2019

73 Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (50.0%)

72 Inventor/es:

CLEZARDIN, PHILIPPE;
ECKEL, BÉNÉDICTE;
DIAZ-LATOUD, CHANTAL y
CLEMENT-DEMANGE, LISE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 710 174 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la metástasis ósea

Campo:

La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la metástasis ósea.

5 Antecedentes:

La metástasis ósea, la diseminación del cáncer a los huesos, ocurre en más de 1,5 millones de pacientes con cáncer en todo el mundo y se asocia más comúnmente con cánceres de próstata, pulmón y mama (Weilbaecher et al., Nat Rev Cancer 2011; 11: 411-24). Las células cancerosas metastásicas que residen en la médula ósea alteran las funciones de reabsorción ósea (osteoclastos) y células formadoras de hueso (osteoblastos) y se apropian de señales de secuestro que provienen de la matriz ósea (Weilbaecher et al., Nat Rev Cancer 2011; 11:411-24). Alterando el equilibrio fisiológico entre la reabsorción ósea y la formación ósea, las células metastásicas promueven así la destrucción esquelética. El entendimiento de que las células metastásicas en la médula ósea alteran las funciones de los osteoclastos y los osteoblastos ha llevado al uso de terapias dirigidas a los osteoclastos (bifosfonatos, denosumab). Muchos agentes terapéuticos para el tratamiento y la prevención de la metástasis ósea se describieron en la técnica anterior (Rachel Theriault et al., "Biology of Bone Metastases", Cancer Control, vol. 19, n° 2, 1 abril de 2012 (2012-04-01)). Por ejemplo, los bifosfonatos inhiben la actividad de reabsorción ósea de los osteoclastos y son los estándares de atención para retrasar la destrucción ósea en pacientes con cáncer con metástasis ósea (Gnant & Clezardin, Cancer Treat Rev 2011; Brown & Coleman, Nat Rev Clin Oncol 2012; 9: 110-8). Denosumab, un anticuerpo monoclonal completamente humanizado que se une específicamente al activador del receptor del ligando NF- κ B (RANKL), inhibe la formación de osteoclastos, reduciendo así la destrucción ósea (Brown & Coleman, Nat Rev Clin Oncol 2012; 9: 110-8). Sin embargo, estos tratamientos son solo paliativos y se asocian a menudo con efectos secundarios adversos. Por lo tanto, es vital para comprender mejor los mecanismos moleculares que preceden al desarrollo evidente de las lesiones esqueléticas con el fin de desarrollar fármacos que se dirijan a las células cancerosas durante la formación temprana de la metástasis cuando colonizan la médula ósea.

Se informó que la sialoproteína ósea en el suero de pacientes con cáncer de mama primario es un marcador pronóstico de la metástasis ósea posterior (Diel I. et al. "Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastases", Clinical Cancer Research, The American Association For Cancer Research, EE.UU., vol. 5, n° 12, 1 diciembre 1999 (1999-12-01)).

Se informó que el siRNA ROBO4 anula la migración de las células endoteliales mediada por el suero (Kaur Sukhbir et al., "Silencing of directional migration in roundabout 4 knockdown endothelial cells", BMC Cell Biology, Biomed Central, London, GB, vol. 9, n° 1, 3 noviembre 2008 (2008-11-03)). Se demostró que el receptor de ROBO4 soluble, Robo4Fc, inhibe la angiogénesis *in vivo* y la migración de la célula endotelial (Suchting et al: "Soluble Robo4 receptor inhibits *in vivo* angiogenesis and endothelial cells migration", FASEB Journal, Fed. Of American Soc. for Experimental Biology, EE.UU., vol. 19, n° 1, 1 octubre 2005 (2005-10-01)). El documento WO2008/100805 describe que un anticuerpo anti-ROBO4 inhibe el alargamiento del tubo en HUVEC, pero también ilustra que el anticuerpo anti-ROBO4 desnudo no tiene efecto anticancerígeno *in vivo*.

Resumen:

La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la metástasis ósea. En particular, la presente invención se define por las reivindicaciones.

Más particularmente, el primer objeto de la presente invención se refiere a un agente seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-ROBO4, un polipéptido señuelo de ROBO4 y un inhibidor de la expresión de ROBO4 para usar en un método para prevenir o tratar la metástasis ósea en un sujeto que lo necesita en donde el inhibidor de la expresión de ROBO4 se selecciona del grupo que consiste en siRNA de ROBO4, shRNAs de ROBO4, ribozimas de ROBO4 y oligonucleótidos antisentido de ROBO4 y en donde el polipéptido señuelo de ROBO4 comprende el dominio extracelular de ROBO4.

Un segundo objeto de la presente invención se refiere a un método para probar si un paciente con cáncer tiene riesgo de tener metástasis ósea que comprende i) determinar el nivel de expresión de ROBO4 en una muestra obtenida de dicho paciente ii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con un nivel de referencia predeterminado y iii) concluir que el paciente tiene un alto riesgo de tener metástasis ósea cuando el nivel determinado en la etapa i) es mayor que el nivel de referencia predeterminado.

Descripción detallada:

Los inventores conjeturan que los receptores ROBO apoyan las funciones de las células tumorales diseminadas (DTC), permitiendo a estas células adaptarse y desarrollarse en la médula ósea. Usando células de cáncer de mama B02 humanas, una subpoblación de la línea celular MDA-MB-231 que metastatiza solo en hueso, un análisis de microarrays mostró que ROBO1 y ROBO4 estaban significativamente sobreexpresados en células B02 en

comparación con lo observado con células parentales. ROBO2 y ROBO3 no se expresaban en ambas líneas celulares. Por lo tanto, se evaluó el papel funcional de ROBO1/ROBO4 en la metástasis del cáncer de mama B02, usando shRNAs dirigidos a cada uno de estos receptores. Consistente con su papel como gen supresor de tumores, el silenciamiento de ROBO1 mejoró las propiedades migratorias e invasivas de los clones de shROBO1 in vitro y aumentó el crecimiento de xenoinjertos de tumores shROBO1 en animales. Además, el silenciamiento de ROBO1 promovió la formación de micrometástasis en la médula ósea ex vivo. En acusado contraste, el silenciamiento de ROBO4 inhibió la migración y la invasión de células de cáncer de mama shROBO4 in vitro, disminuyó el crecimiento del tumor ortotópico in vivo y redujo la formación de micrometástasis en la médula ósea ex-vivo. Por lo tanto, los datos descubrieron una función previamente desconocida de los receptores ROBO en la formación de micrometástasis en la médula ósea y revelaron que ROBO1 y ROBO4 tienen funciones opuestas.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un agente seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-ROBO4, un polipéptido señuelo de ROBO4, un inhibidor de la expresión de ROBO4 para usar en un método para prevenir o tratar la metástasis ósea en un sujeto que lo necesite en donde el inhibidor de la expresión de ROBO4 se selecciona del grupo que consiste en siRNAs de ROBO4, shRNAs de ROBO4, ribozimas de ROBO4 y oligonucleótidos antisentido de ROBO4 y en donde el polipéptido señuelo de ROBO4 comprende el dominio extracelular de ROBO4.

Los términos “sujeto” y “paciente”, usados indistintamente en esta memoria, se refieren a un mamífero, particularmente a un ser humano que padece un cáncer como cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de ovario y cáncer cerebral.

Como se usa en esta memoria, el término “ROBO4” tiene su significado general en la técnica y designa la proteína transmembrana de superficie celular Roundabout 4. ROBO4 se describió por primera vez como una proteína receptora de guía de axones y su secuencia de aminoácidos y la secuencia génica que codifica la misma se describen en GenBank ID [nº de acceso AF361473].

Como se usa en esta memoria, “anticuerpo” incluye tanto los que aparecen de forma natural como los que no son naturales. Específicamente, “anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos monovalentes y divalentes de estos. Además, “anticuerpo” incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente sintéticos, anticuerpos de cadena única y fragmentos de estos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano puede humanizarse mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre.

Los anticuerpos se pueden preparar de acuerdo con la metodología convencional. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar usando el método de Kohler y Milstein (Nature, 256: 495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la invención se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado a intervalos adecuados (p. ej., dos veces por semana, semanalmente, dos veces al mes o mensualmente) con formas antigénicas de ROBO4. Al animal se le puede administrar un “refuerzo” final de antígeno dentro de una semana del sacrificio. A menudo es deseable usar un adyuvante inmunológico durante la inmunización. Los adyuvantes inmunológicos adecuados incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alúmina, adyuvante Ribí, Titermax de Hunter, adyuvantes de saponina como QS21 o Quil A, u oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen CpG. Son bien conocidos en el campo otros adyuvantes adecuados. Los animales se pueden inmunizar por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal u otras. Un animal dado se puede inmunizar con múltiples formas del antígeno por múltiples rutas.

Brevemente, se pueden proporcionar las formas recombinantes de ROBO4 usando cualquier método descrito previamente. Después del régimen de inmunización, se aíslan los linfocitos del bazo, nódulo linfático u otro órgano del animal y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando un agente como polietilén glicol para formar un hibridoma. Después de la fusión, se colocan las células en medios permisivos para el crecimiento de hibridomas, pero no para los compañeros de fusión, usando métodos estándar, como se describe (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology; Biochemistry and Immunology, 3ª edición, Academic Press, New York, 1996). Después del cultivo de los hibridomas, se analizan los sobrenadantes celulares para la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada, es decir, que se unen selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación y transferencia de Western. Son bien conocidas en el campo otras técnicas de cribado. Las técnicas preferidas son aquellas que confirman la unión de los anticuerpos al antígeno nativamente plegado, conformacionalmente intacto, como ELISA no desnaturalizante, citometría de flujo e inmunoprecipitación.

Significativamente, como es bien conocido en la técnica, solo una pequeña parte de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo. Las regiones Fc' y Fc, por ejemplo, son efectoras de la cascada del complemento, pero no están implicadas en la unión del antígeno. Un anticuerpo a partir del cual se ha escindido enzimáticamente la región pFc' o que se ha producido sin la región pFc', denominada un fragmento F(ab')₂, retiene ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. De manera similar, un anticuerpo a partir del cual se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que se ha producido sin la región Fc, denominada un fragmento Fab, retiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Continuando, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera del anticuerpo unida covalentemente y una porción de la cadena pesada del anticuerpo denominado Fd. Los fragmentos Fd son los principales determinantes de la especificidad del anticuerpo (un solo

fragmento Fd se puede asociar con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd retienen la capacidad de unión al epítipo en el aislamiento.

Dentro de la parte de unión al antígeno de un anticuerpo, como es bien conocido en la técnica, hay regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), que interactúan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones de marco (FRs), que mantienen la estructura terciaria del paratopo. Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada como en la cadena ligera de las inmunoglobulinas IgG hay cuatro regiones marco (FR1 a FR4) separados respectivamente por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDRs, y en particular las regiones CDR3, y más en particular los CDR3 de cadena pesada, son en gran parte responsables de la especificidad del anticuerpo.

Ahora está bien establecido en la técnica que las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero se pueden reemplazar con regiones similares de anticuerpos conoespecíficos o heteroespecíficos mientras se mantenga la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en los que las CDR no humanas se unen covalentemente a las regiones humanas FR y/o Fc/pFc' para producir un anticuerpo funcional.

Esta descripción proporciona en ciertas realizaciones, composiciones y métodos que incluyen formas humanizadas de anticuerpos. Como se usa en esta memoria, "humanizado" describe anticuerpos en donde algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se reemplazan con aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes de EE.UU. N.ºs. 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205. Las patentes anteriores de EE.UU. N.ºs. 5.585.089 y 5.693.761 y el documento WO 90/07861 también proponen cuatro criterios posibles que se pueden usar en el diseño de anticuerpos humanizados. La primera propuesta era aquella para un aceptor, usar un marco de lectura de una inmunoglobulina humana particular que sea inusualmente homólogo a la inmunoglobulina donante a ser humanizada, o usar un marco consenso de muchos anticuerpos humanos. La segunda propuesta era que si un aminoácido es inusual en el marco de la inmunoglobulina humana y el aminoácido donante en esa posición es típico de las secuencias humanas, entonces se puede seleccionar el aminoácido donante en lugar del aceptor. La tercera propuesta era que en las posiciones inmediatamente adyacentes a las 3 CDRs en la cadena de inmunoglobulina humanizada se puede seleccionar el aminoácido donante en lugar del aminoácido aceptor. La cuarta propuesta era usar el aminoácido donante que está en las posiciones del marco en el que se predice que el aminoácido tendrá un átomo en la cadena lateral a 3A de los CDRs en un modelo tridimensional del anticuerpo y se predice que será capaz de interactuar con los CDRs. Los métodos anteriores son meramente ilustrativos de algunos de los métodos que un experto en la técnica podría emplear para hacer anticuerpos humanizados. Un experto en la técnica estará familiarizado con otros métodos para la humanización de anticuerpos.

En una realización de las formas humanizadas de los anticuerpos, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos que están fuera de las regiones CDR se han reemplazado con aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana pero donde no se cambian algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR. Se permiten pequeñas adiciones, supresiones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre y cuando no abolan la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno dado. Las moléculas de inmunoglobulina humana adecuadas incluirían moléculas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM. Un anticuerpo "humanizado" retiene una especificidad antigénica similar al anticuerpo original. Sin embargo, usando ciertos métodos de humanización, se puede aumentar la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo usando métodos de "evolución dirigida", como se describe en Wu et al./ *Mol. Biol.* 294: 151, 1999.

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos también se pueden preparar inmunizando ratones transgénicos para grandes partes del loci de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina humana. Véase, p. ej., las patentes de EE.UU. N.ºs. 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584 y referencias citadas en estas. Estos animales se han modificado genéticamente de tal manera que hay una eliminación funcional en la producción de anticuerpos endógenos (p. ej., murinos). Los animales se modifican adicionalmente para contener toda o una parte del locus del gen de inmunoglobulina de línea-germinal humana de modo que la inmunización de estos animales dé como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos contra el antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (p. ej., ratones Xenomouse (Abgenix), HuMAb (Medarex/GenPharm)), se pueden preparar anticuerpos monoclonales de acuerdo con la tecnología de hibridoma estándar. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por lo tanto, no provocarán respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (KAMA) cuando se administren a seres humanos.

También existen métodos in vitro para producir anticuerpos humanos. Estos incluyen la tecnología de "phage display", visualización de fagos, (Patentes de EE.UU. N.ºs. 5.565.332 y 5.573.905) y la estimulación in vitro de células B humanas (Patentes de EE.UU. N.ºs. 5.229.275 y 5.567.610).

Por lo tanto, como será evidente para un experto en la técnica, la presente descripción también proporciona los fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que se han reemplazado las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o de la cadena ligera de CDR3 por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos de fragmentos F(ab')₂ en los que se han reemplazado las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o de la cadena ligera de CDR3 por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos de fragmentos Fab en los

que se han reemplazado las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o de la cadena ligera de CDR3 por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos quiméricos de fragmentos Fd en los que se han reemplazado las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 por secuencias homólogas humanas o no humanas. La presente descripción también incluye los denominados anticuerpos de cadena única.

- 5 Las diversas moléculas y fragmentos de anticuerpos pueden derivar de cualquiera de las clases de inmunoglobulinas comúnmente conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, IgA, IgA secretoria, IgE, IgG e IgM. También son bien conocidas por los expertos en la técnica las subclases de IgG e incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

- 10 En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de dominio único. El término “anticuerpo de dominio único” (sdAb) o “VHH” se refiere al dominio variable de la cadena pesada único de anticuerpos del tipo que se pueden encontrar en mamíferos camélidos que están naturalmente desprovistos de cadenas ligeras. Dichos VHH también se llaman “nanobody®”. De acuerdo con la descripción, puede ser de modo particular sdAb de llama.

- 15 Como se usa en esta memoria, el término “aptámero” se refiere a una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son oligonucleótidos o secuencias de oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Por consiguiente, el término “aptámero anti-ROBO4” se refiere a un aptámero dirigido contra ROBO4. Los aptámeros se pueden aislar mediante Evolución Sistemática de Ligandos por enriquecimiento EXponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN.

- 20 En una realización, el agente es un polipéptido señuelo de ROBO4 que es capaz de atrapar los ligandos de ROBO4 y así evitar su activación. Típicamente, el polipéptido señuelo de ROBO4 comprende el dominio extracelular de ROBO4 y, por lo tanto, incluye formas solubles de ROBO4. Una forma soluble adecuada de ROBO4 podría comprender, por ejemplo, una forma truncada de la proteína de la que se ha eliminado el dominio transmembrana por métodos químicos, proteolíticos o recombinantes.

- 25 En una realización particular, el polipéptido señuelo de ROBO4 comprende el dominio extracelular de ROBO4 fusionado con el dominio Fc de una inmunoglobulina. El dominio Fc de dicha proteína de fusión sirve para al menos a uno de los siguientes propósitos: la secreción de la proteína de fusión a partir de células que producen dicha proteína de fusión, lo que proporciona el dominio extracelular de ROBO4 en una forma (p. ej., estado de plegamiento o agregación) funcional para atrapar los ligandos de ROBO4, la purificación por afinidad de dicha proteína de fusión, el reconocimiento de la proteína de fusión por un anticuerpo, lo que proporciona propiedades favorables a la proteína de fusión cuando se usa como un medicamento. Las inmunoglobulinas adecuadas son IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. La IgG y la IgA son preferidas, las más preferidas son las IgGs, p.ej., una IgG1. Dicho dominio Fc puede ser un dominio Fc completo o una variante conservadora de función de este. Una variante de Fc es conservadora de función si conserva al menos una de las funciones enumeradas anteriormente. Los dominios de la proteína de fusión se pueden unir mediante un enlazador. El enlazador puede consistir en aproximadamente de 1 a 100, preferiblemente de 1 a 10 aminoácidos.

- 30 Los polipéptidos se pueden producir por cualquier medio adecuado, como será evidente para los expertos en la técnica. Con el fin de producir cantidades suficientes del polipéptido para su uso de acuerdo con la presente descripción, se puede lograr convenientemente la expresión cultivando en condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el polipéptido de la descripción. Preferiblemente, el polipéptido se produce por medios recombinantes, mediante expresión a partir de una molécula de ácido nucleico codificante. Son bien conocidos los sistemas para clonar y expresar un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes. Cuando se expresa en forma recombinante, el polipéptido se genera preferiblemente por expresión a partir de un ácido nucleico codificante en una célula huésped. Se puede usar cualquier célula huésped, dependiendo de los requisitos individuales de un determinado sistema. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células renales de hámster recién nacido y muchas otras. Las bacterias también son huésped preferidos para la producción de proteína recombinante, debido a la facilidad con que las bacterias se pueden manipular y crecer. Un huésped bacteriano común preferido es E. coli.

- 35 En realizaciones específicas, se contempla que se pueden modificar los polipéptidos usados en los métodos terapéuticos de la presente descripción para mejorar su eficacia terapéutica. Dicha modificación de los compuestos terapéuticos se puede usar para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo de circulación o modificar la biodistribución. Por ejemplo, se puede disminuir significativamente la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes mediante la combinación con una variedad de vehículos transportadores de fármacos que modifican la biodistribución. Como ejemplo, añadir dipéptidos puede mejorar la penetración de un agente circulante en el ojo a través de la barrera retiniana sanguínea mediante el uso de transportadores endógenos.

Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Se ha demostrado que varios polímeros solubles en agua modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la

permeabilidad a través de las barreras fisiológicas; y modifican la velocidad de aclaramiento del cuerpo. Para lograr un efecto de direccionamiento o efecto de liberación sostenida se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármacos como grupos terminales, como parte del esqueleto o como grupos que penden de la cadena polimérica.

5 Se ha usado ampliamente el polietilenglicol (PEG) como transportador de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. Se ha demostrado que la unión a varios fármacos, proteínas y liposomas mejora el tiempo de residencia y disminuye la toxicidad. El PEG se puede acoplar a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y a través de otros métodos químicos; sin embargo, el PEG en si mismo está limitado a como máximo dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, se exploraron los copolímeros de PEG y aminoácidos como nuevos biomateriales que retendrían las propiedades de biocompatibilidad del PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de anclaje por molécula (proporcionando una mayor carga de fármaco) y que se podrían diseñar sintéticamente para adaptarse a una variedad de aplicaciones.

10 Los expertos en la técnica conocen las técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de fármacos. Por ejemplo, VectraMed (Plainsboro, N. J.) ha usado polímeros de administración de fármacos que consisten en polímeros alternantes de PEG y monómeros trifuncionales como lisina. Las cadenas de PEG (típicamente de 2000 daltons o menos) están unidas a los a- y e- grupos amino de la lisina a través de enlaces de uretano estables. Dichos copolímeros retienen las propiedades deseables del PEG, mientras proporcionan grupos colgantes reactivos (los grupos de ácido carboxílico de la lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena del polímero. Los grupos colgantes reactivos se pueden usar para la derivación, entrecruzamiento o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles para producir profármacos estables de larga circulación variando el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG y el enlace escindible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta al espaciado del complejo fármaco/grupo enlazador y la cantidad de fármaco por peso molecular de conjugado (segmentos más pequeños de PEG proporcionan una mayor carga de fármaco). En general, aumentar el peso molecular total del conjugado de copolímero en bloque aumentará la vida media circulatoria del conjugado. Aún así, el conjugado debe ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo del umbral limitante de filtración glomerular (p. ej., menos de 45 kDa).

15 Además, dado que el esqueleto polimérico es importante para mantener la vida media circulatoria y la biodistribución, se pueden usar enlazadores para mantener el agente terapéutico en forma de profármaco hasta que se libere del esqueleto polimérico por un desencadenante específico, típicamente actividad enzimática en el tejido diana. Por ejemplo, este tipo de distribución de fármaco activado por tejido es particularmente útil cuando se requiere la distribución a un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libere en o cerca del sitio de la patología. Se conocen por los expertos en la técnica bibliotecas de grupos enlazadores para usar en la distribución de fármacos activados y se pueden basar en la cinética enzimática, prevalencia de la enzima activa y especificidad de escisión de las enzimas específicas de enfermedad seleccionadas. Se pueden usar dichos enlazadores para modificar la proteína o fragmento de la proteína descrita en esta memoria para distribución terapéutica.

20 Un "inhibidor de la expresión de ROBO4" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir o reducir significativamente la expresión del gen de ROBO4.

25 Los inhibidores de expresión para usar en la presente descripción se pueden basar en constructos de oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, que incluyen moléculas de ARN antisentido y moléculas de ADN antisentido, actuarían para bloquear directamente la traducción del ARNm de ROBO4 uniéndose al mismo y evitando así la traducción de proteínas o aumentando la degradación del ARNm, disminuyendo así el nivel de ROBO4 y, por tanto, la actividad, en una célula. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia del ARNm transcrito que codifica ROBO4, p. ej., mediante técnicas de fosfodiéster convencionales y administrarse mediante, p. ej., inyección intravenosa o infusión. Son bien conocidos en la técnica los métodos para usar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuyas secuencias se conocen (p. ej., véanse las patentes de EE.UU. N°s. 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321 y 5.981.732).

30 Los ARNs inhibidores pequeños (siRNAs) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión para usar en la presente descripción. La expresión génica de ROBO4 se puede reducir poniendo en contacto un sujeto o célula con un ARN de doble cadena pequeño (dsRNA) o un vector o constructo que origina la producción de un ARN de doble cadena pequeño, de modo que la expresión génica de ROBO4 se inhiba específicamente (es decir, ARN de interferencia o ARNi). Los métodos para seleccionar un dsRNA o un vector codificante de dsRNA son bien conocidos en la técnica para genes cuya secuencia se conoce (p. ej., véase Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); MacManus, MT. et al (2002); Brummelkamp, TR. et al.(2002); Patentes de EE.UU. Nos. 6.573.099 y 6.506.559; y las publicaciones de Patente internacional Nos. WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836). Todos o parte de los enlaces fosfodiéster de los siRNAs de la descripción están ventajosamente protegidos. Esta protección se implementa generalmente a través de la ruta química que usa métodos que se conocen en la técnica. Los enlaces fosfodiéster se pueden proteger, por ejemplo, por un grupo funcional tiol o amina o por un grupo fenilo. Los extremos 5' y/o 3' de los si RNAs de la descripción están ventajosamente protegidos, por ejemplo, usando la técnica descrita

anteriormente para proteger los enlaces fosfodiéster. Las secuencias de los siRNAs comprenden ventajosamente al menos doce dinucleótidos contiguos o sus derivados.

Como se usa en esta memoria, el término “derivados de siRNAs” con respecto a las secuencias de ácido nucleico presentes se refiere a un ácido nucleico que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 90% con la eritropoyetina o fragmento de esta, preferiblemente al menos el 95%, como un ejemplo de al menos el 98% y más preferiblemente de al menos el 98%.

Como se usa en esta memoria, “porcentaje de identidad” entre dos secuencias de ácido nucleico quiere decir el porcentaje de ácido nucleico idéntico entre las dos secuencias a comparar obtenido con el mejor alineamiento de dichas secuencias, siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferencias entre estas dos secuencias distribuyéndose aleatoriamente sobre las secuencias de ácidos nucleicos. Como se usa en esta memoria, “mejor alineamiento” o “alineamiento óptimo” significa el alineamiento para el que el porcentaje de identidad determinado (véase más abajo) es el más alto. La comparación de secuencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos se realiza generalmente comparando estas secuencias que previamente se han alineado de acuerdo con el mejor alineamiento; esta comparación se realiza en segmentos de comparación con el fin de identificar y comparar las regiones locales de similitud. Se puede saber el mejor alineamiento de secuencias para realizar la comparación, además de la forma manual, usando el algoritmo de homología global desarrollado por SMITH y WATERMAN (Ad. App. Math., vol. 2, p: 482, 1981), usando el algoritmo de homología local desarrollado por NEDDLEMAN y WUNSCH (J. Mol. Biol., vol. 48, p. 443, 1970), usando el método de similitudes desarrollado por PEARSON y LIPMAN (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, p. 2444, 1988), usando programas informáticos que usan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI EE.UU.), usando los algoritmos de alineamiento múltiple MUSCLE (Edgar, Robert, C., Nucleic Acids Research, vol. 32, p: 1792, 2004). Para obtener el mejor alineamiento local, se puede usar preferiblemente el programa informático BLAST. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos se determina comparando estas dos secuencias óptimamente alineadas, siendo las secuencias de ácidos nucleicos capaces de comprender adiciones o supresiones con respecto a la secuencia de referencia con el fin de obtener el alineamiento óptimo entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre estas dos secuencias y dividiendo este número por el número total de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Los shRNAs (ARN de horquilla corta) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión para usar en la presente descripción.

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión para usar en la presente descripción. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. El mecanismo de acción de la ribozima implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima con ARN diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima diseñadas con motivo de horquilla o de cabeza de martillo que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de secuencias de ARNm de ROBO4 son, por lo tanto, útiles dentro del alcance de la presente descripción. Inicialmente se identificaron los sitios específicos de escisión de la ribozima dentro de cualquier ARN diana mediante el escáner de la molécula diana en busca de sitios de escisión de la ribozima que típicamente incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, se pueden evaluar las secuencias de ARN cortas de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos que corresponden a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión para las características estructurales predichas, como la estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia de nucleótidos sea inadecuada.

Tanto los oligonucleótidos antisentido como las ribozimas útiles como inhibidores de la expresión se pueden preparar por métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química como, p. ej., por síntesis química de fosforamada en fase sólida. Alternativamente, se pueden generar las moléculas de ARN antisentido mediante transcripción in vitro o in vivo de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Se pueden incorporar dichas secuencias de ADN en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados, como los promotores de la polimerasa T7 o SP6. Se pueden introducir varias modificaciones a los oligonucleótidos de la descripción como un medio para aumentar la estabilidad intracelular y la vida media. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces de fosfodiesterasa dentro del esqueleto del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos antisentido, siRNAs, shRNAs y ribozimas de la descripción se pueden administrar in vivo solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un “vector” es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido antisentido, siRNA, shRNA o ácido nucleico de la ribozima a las células y preferiblemente a las células que expresan ROBO4. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con una reducida degradación en relación con el grado de degradación que daría como resultado la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la descripción incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de oligonucleótidos antisentido, siRNA, shRNA o secuencias de ácido nucleico de ribozima. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico de los siguientes

virus: retrovirus, virus de la leucemia murina moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino y virus del sarcoma de rous; adenovirus, virus adeno-asociado; virus tipo SV40; virus de polioma; virus de Epstein-Barr; virus de papiloma; virus del herpes; virus vaccinia; virus de la polio y virus de ARN como retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

5 Los vectores víricos preferidos se basan en virus eucarióticos no citopáticos en los que los genes no esenciales se han reemplazado con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (p. ej., lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del ARN viral genómico en ADN con la integración proviral posterior en el ADN celular del huésped. Se han aprobado los retrovirus para ensayos de terapia génica en seres humanos. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes en la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retroviral alterados genéticamente tienen una utilidad general para la transducción de alta eficiencia de genes in vivo. Se proporcionan protocolos estándar para producir retrovirus deficientes en la replicación (que incluyen las etapas de incorporación de material genético exógeno dentro de un plásmido, transfección de una línea celular de empaquetamiento con el plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, recogida de partículas virales del medio de cultivo tisular e infección de las células diana con partículas virales) en Kriegler, 1990 y en Murry, 1991).

Los virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adeno-asociados (AAV) que son virus de ADN de doble cadena que ya se han aprobado para uso humano en terapia génica. Realmente se conocen 12 serotipos de AAV diferentes (AAV1 a 12), cada uno con diferentes tropismos celulares (Wu, *Z Mol Ther* 2006; 14: 316-27). Los AAV recombinantes se derivan de los parvovirus dependientes AAV2 (Choi, *VV J Virol* 2005; 79: 6801-07). Los virus adeno-asociados de tipo 1 a 12 se pueden diseñar para ser deficientes en la replicación y ser capaces de infectar una amplia gama de tipos y especies celulares (Wu, *Z Mol Ther* 2006; 14: 316-27). Además tiene ventajas como estabilidad en disolvente lipídico y en calor; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes que incluyen células hematopoyéticas; y ausencia de inhibición de la superinfección permitiendo así múltiples series de transducciones. Según se informa, el virus adeno-asociado puede integrarse en el ADN celular humano de una manera específica de sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis de inserción y la variabilidad de la expresión del gen insertado característica de la infección retroviral. Además, se han seguido las infecciones por virus adeno-asociados de tipo salvaje en cultivo tisular durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un evento relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede funcionar de forma extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase p. ej. Sambrook et al., 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han usado como vacunas de ADN para administrar genes que codifican antígenos a células in vivo. Son particularmente ventajosos para esto porque no tienen los mismos problemas de seguridad que muchos de los vectores virales. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido a partir de un gen operativamente codificado dentro del plásmido. Algunos plásmidos de uso común incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Son bien conocidos por los expertos en la técnica otros plásmidos. Adicionalmente, se pueden diseñar plásmidos a medida usando enzimas de restricción y reacciones de ligación para eliminar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos se pueden distribuir por una variedad de rutas. Por ejemplo, el plásmido de ADN se puede inyectar por ruta intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras rutas. Los plásmidos se pueden administrar en una solución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de distribución de ADN que incluye, pero no se limita a, liposomas, dendrímeros, cocleato y microencapsulación.

En una realización preferida, el oligonucleótido antisentido, siRNA, shRNA o secuencia de ácido nucleico de ribozima está bajo el control de una región reguladora heteróloga, p. ej., un promotor heterólogo.

El agente de la descripción se puede administrar en forma de una composición farmacéutica, como se define a continuación. Preferiblemente, dicho agente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del agente para tratar la enfermedad con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario del agente o la composición farmacéutica que lo comprende se decidirá por el médico que lo atiende dentro del alcance de un buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; el tiempo de administración, ruta de administración y velocidad de excreción del agente específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el agente específico empleado y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la habilidad de la técnica empezar con dosis del agente a niveles inferiores que los requeridos para alcanzar el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logra el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria del agente puede variar en un amplio rango de 0,01 a 1000 mg por adulto y por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del agente para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto a tratar. Un medicamento típicamente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg

del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Normalmente se suministra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosis de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

5 En una realización particular, el agente de la presente descripción se puede usar en combinación con bifosfonatos y/o con un anticuerpo anti-RANKL (p. ej., denosumab).

10 El agente de la descripción puede formularse así en composiciones farmacéuticas que comprenden además un transportador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptables. En una realización, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente de la descripción descrito anteriormente y un transportador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de un agente de la presente descripción o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un transportador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, diluyentes, excipientes o transportadores farmacéuticos seleccionados adecuadamente con respecto a la forma de administración prevista y consistentes con las prácticas farmacéuticas convencionales.

15 Un transportador farmacéuticamente aceptable puede contener ingredientes inertes que no inhiban indebidamente la actividad biológica del agente. Los transportadores farmacéuticamente aceptables deben ser biocompatibles, p. ej., no tóxicos, no inflamatorios, no inmunogénicos o desprovistos de otras reacciones no deseadas o efectos secundarios en cuanto a la administración a un sujeto. Se pueden emplear técnicas estándar de formulación farmacéuticas.

20 El transportador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, como se usa en esta memoria, incluye cualquiera y todos los disolventes, diluyentes u otros vehículos, asistentes de dispersión o suspensión líquidos, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, Decimosexta edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) describe diversos transportadores usados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de estos. Excepto en la medida en que cualquier medio transportador convencional sea incompatible con los compuestos descritos en esta memoria, como producir cualquier efecto biológico indeseable o interactuar si no de manera perjudicial con cualquier otro componente(s) de la composición farmacéuticamente aceptable, se contempla su uso dentro del alcance de esta descripción.

30 Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas (como albúmina sérica humana), sustancias tamponantes (como twin 80, fosfatos, glicina, ácido sórbico o sorbato potásico), mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos (como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato potásico, cloruro sódico o sales de zinc), sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, poliácridatos, ceras, polímeros bloque de polietileno-polioxiopropileno, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, grasa de lana, azúcares como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados como carboxi metilcelulosa sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles como un propilén glicol o polietilén glicol; ésteres como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes como hidróxido magnésico e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones tamponantes de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición de acuerdo con el criterio del formulador.

45 Las composiciones descritas en esta memoria se pueden administrar por vía oral, parenteral, por inhalación de spray, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o por vía de un depósito implantado dependiendo de la gravedad de la enfermedad a tratar. El término "parenteral" como se usa en esta memoria incluye, pero no se limita a, inyección o técnicas de infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal.

50 Las formas inyectables estériles de las composiciones descritas en esta memoria pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica que usan agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear son agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónico. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave que incluye mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, igual que los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, como aceite de oliva o aceite de castor, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas suspensiones

o soluciones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos comúnmente usados, como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables sólidas, líquidas u otras también se pueden usar para los fines de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación oral aceptable que incluye, pero no se limita a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los transportadores comúnmente usados incluyen, pero no se limitan a, lactosa y almidón de maíz. Se pueden también añadir típicamente agentes lubricantes como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el agente se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, se pueden añadir también ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

Alternativamente, las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estos se pueden preparar mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el medicamento. Tales materiales incluyen, pero no se limitan a, manteca de cacao, cera de abeja y polietilén glicoles.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para probar si un paciente con cáncer tiene riesgo de tener metástasis ósea que comprende i) determinar el nivel de expresión de ROBO4 en una muestra obtenida de dicho paciente ii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con un nivel de referencia predeterminado e iii) concluir que el paciente tiene un alto riesgo de tener metástasis ósea cuando el nivel determinado en la etapa i) es más alto que el nivel de referencia predeterminado.

Como se usa en esta memoria, el término "muestra" se refiere a una muestra aislada del tumor primario del paciente o puede consistir en una colección de células tumorales aisladas de la muestra de sangre obtenida del paciente.

La determinación del nivel de expresión de ROBO4 se puede evaluar mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos.

Por ejemplo, la expresión del gen que codifica ROBO4 se evalúa analizando la expresión del transcrito de ARNm o precursores de ARNm, como el ARN naciente, de dicho gen. Dicho análisis se puede evaluar preparando ARNm/ADNc a partir de células en la muestra obtenida del paciente e hibridar el ARNm/ADNc con una sonda. El ARNm/ADNc preparado se puede usar en ensayos de hibridación o de amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis de Southern o de Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa, como PCR cuantitativa (TaqMan) y arrays de sondas como GeneChip (TM) DNA Arrays (AFF YMETRIX). De manera ventajosa, el análisis del nivel de expresión de ARNm transcrito a partir del gen que codifica ROBO4 implica el proceso de amplificación del ácido nucleico. p. ej., por RT-PCR (la realización experimental expuesta en la Patente de EE.UU. N° 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (BARANY, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p: 189-193, 1991), replicación de secuencia autosostenida (GUATELLI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 57, p: 1874-1878, 1990), sistema de amplificación transcripcional (KWOH et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86, p: 1173-1177, 1989), Replicasa Q-Beta (LIZARDI et al., Biol. Technology, vol. 6, p: 1197, 1988), replicación de círculo rodante (patente de EE.UU. N° 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy bajos. Como se usa en esta memoria, los cebadores de amplificación se definen como una par de moléculas de ácido nucleico que se pueden aparear con las regiones 5' o 3' de un gen (cadenas más y menos, respectivamente, o viceversa) y contener una región corta en el medio. En general, los cebadores de amplificación son de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. Bajo condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

En otra realización preferida, el nivel de expresión de ROBO4 en la muestra se puede evaluar determinando el número de células cancerosas que expresan ROBO4 y/o el nivel de ROBO4 en la superficie de las células cancerosas. Son bien conocidos en la técnica los métodos estándar para detectar la expresión de un marcador específico de superficie en la superficie celular. Típicamente, la etapa que consiste en medir el nivel de ROBO4 en la superficie de la célula cancerosa puede consistir en recoger la población de células cancerosas y usar al menos una pareja de unión diferencial dirigido contra el ROBO4, en donde las células cancerosas se unen a través de las parejas de unión a ROBO4. Como se usa en esta memoria, el término "pareja de unión dirigido contra ROBO4" se refiere a cualquier molécula (natural o no) que es capaz de unirse a ROBO4 con alta afinidad. Dichas parejas de unión incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, aptámeros y péptidos. Las parejas de unión pueden ser anticuerpos que pueden ser policlonales o monoclonales, preferiblemente monoclonales, dirigidos específicamente contra ROBO4.

Los anticuerpos policlonales de la descripción o un fragmento de estos se pueden generar de acuerdo con métodos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, p. ej., de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Se pueden usar diversos adyuvantes conocidos en la técnica para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la descripción pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales o un fragmento de estos se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo a partir de líneas celulares en cultivo. Las técnicas para la producción y aislamiento incluyen, pero no se limitan a, originalmente la técnica de hibridoma; la técnica de hibridoma de células B humanas y la técnica de hibridoma EBV.

Las parejas de unión de la descripción como anticuerpos o aptámeros se pueden marcar con una molécula o sustancia detectable, como preferentemente una molécula fluorescente o una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Se conocen marcadores en la técnica que proporcionan generalmente (ya sea directa o indirectamente) una señal. Como se usa en esta memoria, el término "marcado" con respecto al anticuerpo o aptámero pretende abarcar el marcaje directo del anticuerpo o aptámero por acoplamiento (es decir, unión física) de una sustancia detectable, como un fluoróforo [p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o Indocianina (Cy5)] o un agente radiactivo al anticuerpo o aptámero, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero de la descripción se puede marcar con una molécula radiactiva por cualquier método conocido en la técnica. Las moléculas radiactivas incluyen por ejemplo, pero no se limitan a, átomo radiactivo para estudios de centellografía como I123, I124, In111, Re186, Re188. Preferiblemente, los anticuerpos ya están conjugados con un fluoróforo (p. ej., conjugado con FITC y/o conjugado con PE).

Los ensayos mencionados anteriormente pueden implicar la unión de las parejas de unión (es decir, anticuerpos o aptámeros) a un soporte sólido. La superficie sólida podría ser una placa de microtitulación recubierta con la pareja de unión. Después de la incubación de la muestra, las células cancerosas que expresan ROBO4 se unen específicamente a la pareja de unión. Alternativamente, las superficies sólidas pueden ser perlas, como perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles. Las perlas pueden estar hechas de diferentes materiales que incluyen, pero no se limitan a, vidrio, plástico, poliestireno y acrílico. Además, las perlas están preferiblemente marcadas con fluorescencia. En una realización preferida, las perlas fluorescentes son aquellas contenidas en tubos TruCount(TM), disponibles en Becton Dickinson Biosciences, (San José, California). De acuerdo con la descripción, los métodos de citometría de flujo son los métodos preferidos para medir el nivel de ROBO4 en la superficie de la célula. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede por lo tanto usar la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

En una realización, los valores de referencia predeterminados pueden ser valores índice o se pueden derivar de uno o más algoritmos de predicción de riesgo o índices computados para el desarrollo de metástasis ósea. Un valor de referencia predeterminado puede ser relativo a un número o valor derivado de estudios poblacionales. Dichos valores de referencia predeterminados se pueden derivar de análisis estadísticos y/o datos de predicción de riesgo de poblaciones obtenidos de algoritmos matemáticos e índices computados de desarrollo de metástasis. En una realización de la presente descripción, el valor de referencia predeterminado se deriva del nivel de expresión de ROBO4 en una muestra control derivada de uno o más sujetos que no desarrollaron metástasis ósea. En otra realización, dichos sujetos se monitorizan y/o se reevalúan periódicamente durante un periodo de tiempo diagnósticamente relevante ("estudios longitudinales") para verificar después de dicha prueba la ausencia continua de metástasis ósea. Dicho periodo de tiempo puede ser un año, dos años, de dos a cinco años, cinco años, de cinco a diez años, diez años, o de diez a más años desde la fecha de prueba inicial para la determinación del valor de referencia. Además, la medición retrospectiva del nivel de expresión de ROBO4 en bancos históricos de muestras de sujetos correctamente almacenadas se pueden usar para establecer estos valores de referencia predeterminados, lo que acorta el tiempo de estudio requerido. Típicamente, los niveles de ROBO4 en un paciente con riesgo de tener metástasis ósea se consideran más altos que el valor de referencia obtenido de pacientes que nunca desarrollan metástasis ósea.

La invención se ilustrará adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

Figura 1: La expresión de ROBO4 en tumores de mama primarios se asocia con un peor pronóstico en la supervivencia sin recaída. (A) Estimaciones de Kaplan-Meier para tasas de supervivencia libre de recaídas en 254 pacientes con cáncer de mama, de acuerdo con el estado de ROBO1. (B) lo mismo que en (A), pero los casos se categorizan de acuerdo con el estado de ROBO4. (C) Tasas de supervivencia libre de recaída en 137 pacientes con cáncer de mama con ganglios positivos (pN+) de acuerdo con el estado de ROBO4. (D) lo mismo que en (C) pero para la supervivencia libre de metástasis ósea.

Figura 2: Se inocularon transfectantes Sh- o Sc-Robo4 en la arteria de la cola de los animales. El día 28 después de la inoculación de células tumorales, se analizaron las lesiones óseas mediante radiografía, histología y tinción TRAP.

Las imágenes representativas de las lesiones óseas en cada grupo se muestran en el lado izquierdo. Los datos cuantitativos se muestran en el lado derecho.

Figura 3: Formación de osteoclastos *in vitro* de células de médula ósea murinas tratadas con MCSF+RANKL y el medio condicionado de células de cáncer de mama silenciadas para ROBO1 o ROBO4. Los osteoclastos maduros se cuantificaron como células TRAP-positivas multinucleadas. Se muestran imágenes representativas de osteoclastos maduros para cada grupo.

Figura 4: (A) Ensayo de migración celular. Las células de cáncer de mama silenciadas para ROBO1 (lado izquierdo) o ROBO4 (lado derecho) se cargaron en insertos con una membrana porosa (cámara superior) y el quimioattractante (suero) se colocó en pocillos de una placa de acompañamiento (cámara inferior). Después de 6 h de incubación a 37°C, se eliminaron las células que no migraron y las células que migraron sobre la superficie inferior de los insertos se fijaron, tiñeron y se contaron al microscopio. (B) Ensayo de invasión celular. Para la invasión celular, los insertos se recubrieron con membrana basal Matrigel. Después de 24 h de incubación a 37°C, se eliminaron las células no invasoras y se realizó el resto de los experimentos como se describe en (A). (C) Efectos de concentraciones crecientes de anticuerpos anti-Robo1 (izquierda) o anti-Robo4 (derecha) sobre la invasión de células de cáncer de mama osteotrópicas B02. *Recuadros*: efectos de las concentraciones más altas de anticuerpos anti-Robo1 y anti-Robo4 en comparación con los anticuerpos control negativo de isotipo emparejado.

Figura 5: (A) Siete días después de la inoculación intraarterial de células de cáncer de mama transfectantes Sh-Robo1/4 o B02 parentales se sacrificaron los animales, se recogieron las extremidades posteriores y se enjuagó la médula ósea, como se muestra en el dibujo. Las células de médula ósea cultivadas se colocaron bajo selección de antibiótico, lo que permite el crecimiento selectivo de células tumorales resistentes a antibiótico. Las colonias de células tumorales se fijaron, tiñeron y se contaron. Se muestran imágenes representativas de cada grupo. (B) Lo mismo que en (A) pero para la inoculación intratibial de células tumorales transfectadas Sc- y Sh-Robo4. (C) Ensayo de formación de colonias en agar blando. El silenciamiento de ROBO4 disminuye el número y tamaño de las colonias.

Figura 6: Estimaciones de Kaplan-Meier para tasas de supervivencia sin recaída en 254 pacientes con cáncer de mama, de acuerdo con el estado de ROBO1 y ROBO4. $P = 0,058$ por prueba de log-rank. El número total de eventos de metástasis (número de eventos) en cada subgrupo se muestra en la tabla inserta.

Figura 7: Asociación entre la angiogénesis tumoral y el silenciamiento de ROBO1 o ROBO4 en células tumorales. (A) Análisis inmunohistoquímico de xenoinjertos tumorales Sc-ROBO1 y Sh-ROBO1 en el día 50 después de la inoculación de células tumorales, usando un anticuerpo anti-CD31 que reconoce específicamente células endoteliales murinas. Se cuantificó el número de vasos sanguíneos positivos para CD31 dentro de los tumores. Las flechas muestran los vasos sanguíneos. ** $P < 0,01$. (B) Lo mismo que en (A), pero para los xenoinjertos tumorales Sc-ROBO4 y Sh-ROBO4. * $P < 0,05$.

Figura 8: Detección *in situ* de osteoclastos después de la tinción con fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de la metafisis tibial de patas metastásicas de animales inoculados intratibialmente con células tumorales transfectadas con Sh- o Sc-Robo4. Las imágenes representativas se muestran a la izquierda. Los osteoclastos se tiñen de rojo (flecha). La relación superficie relativa de osteoclasto (OC) con respecto a la superficie del hueso se expresó en porcentaje. **, $P < 0,01$ en comparación con el grupo Sc-Robo4.

Figura 9: El tratamiento de células de cáncer de mama B02 humanas con un anticuerpo policlonal dirigido contra Robo4 inhibe la formación de micrometástasis de médula ósea en animales.

Ejemplo 1:

Materiales & Métodos

Pacientes

Las características clínicas y biológicas de las cohortes de pacientes con cáncer de mama se han descrito en otras partes (Berthier et al., 2010). La mediana de seguimiento de las cohortes de pacientes del Hospices Civils de Lyon (n = 254) y del hospital René Huguenin (n = 456) fue de 54 y 120,5 meses, respectivamente.

RT-PCR a tiempo real

Se extrajo ARN total de tumores de mama humanos y de médula ósea murina usando el reactivo Trizol (Sigma). Para eliminar cualquier contaminación de ADN genómico, el ARN total se trató con DNase I libre de RNase y se purificó usando microcolumnas RNeasy (Qiagen). Se verificó la calidad del ARN usando un Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies). Se sintetizó el ADNc usando el kit iScript cDNA Synthesis (Biorad). Las reacciones de PCR se realizaron con el kit SYBR® Green qPCR (Life technologies) en placas de 96 pocillos en un sistema Mastercycler EP (Realplex2, Eppendorf, hamburg-Eppendorf, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La RT-PCR a tiempo real se llevó a cabo con una etapa inicial de 2 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a la T_m (mL32: 58°C, mSlit2: 64°C, TBP: 67°C, Robo1: 63°C, Robo4: 67°C) y 20 segundos a 72°C. La expresión de ROBO1 y ROBO4 se normalizó con TBP. Slit2 murino se normalizó con mL32.

Líneas celulares, cultivo celular y transfección.

La línea celular de cáncer de mama B02 humana es una subpoblación de la línea cancerosa MDA-MB-231 que se seleccionó por la alta eficacia con la que metastatiza en hueso en animales (Peyruchaud et al., 2003). Aquí se usó un subclon que expresaba Flp (MDA-MB-231/B02-Frt11), que se había generado previamente (Brujns et al., 2007), para los experimentos de transfección celular.

Los ARNs de horquilla pequeña (ShRNA) dirigidos contra el ARNm de ROBO1 humano y las secuencias codificadas correspondientes (ScRNA) se diseñaron con el Si Designer Tool (Promega). Los oligonucleótidos usados fueron los siguientes: ShRNA directo, 5'-ACCGCAGTACTAAgggAA-CAATAAgTTCTCTATTgTTCCCTTAgTACTgCTTTTTC-3'; ShRNA inverso, 5'-TgCAGAAAAgCAG-TACTAAgggACAATAgAgAACTTATTgTTCCCTT-AgTACTg-3'. Los shRNAs y los correspondientes dúplex codificados se sintetizaron con el kit de puromicina psiSTRIKE (Promega) bajo el promotor U6. Los plásmidos se transfectaron en células B02-Frt usando el reactivo Transfast (Promega). Las células se cultivaron durante 2 semanas en presencia de puromicina (2 µg/ml, PAA) y los clones se aislaron usando cilindros de clonaje.

Los shRNAs dirigidos al ARNm de ROBO4 y su correspondiente control ScRNA se diseñaron con las herramientas de diseño de siRNA (Genscript) y se clonaron en el vector pRNA-U6.1/zeocin (Genscript). Los oligonucleótidos usados fueron los siguientes: ShRNA directo, 5'-GAGCAGAGAAGAGTGACGA-3'; ShRNA inverso, 5'-TCTTACACGGCCTTGTTCA-3'. Después de la transfección, las células se cultivaron durante 3 semanas en presencia de zeocina (800 µg/ml, Life technologies) y se aislaron los clones usando cilindros de clonación. Los clones silenciados para ROBO1 y ROBO4 y sus controles respectivos se seleccionaron entonces mediante transferencia de Western.

Transferencia de Western

Los extractos celulares se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida en gradiente del 4%-12% (Life technologies) y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Billerica, MA). Se usaron anticuerpos contra Robo1 (Ab7279; AbCam; dilución 1:300), Robo4 (Ab10547, AbCam; dilución 1:500), α -tubulina (Sigma; dilución 1:2.000), Akt (#9272, Cell signaling; dilución 1:2.000), fosfo-Akt (#9271S, Cell signaling; dilución 1:2.000), Src (clon GD11, Millipore; dilución 1:500), fosfo-Src (clon 9A6, Millipore; dilución 1:500) y ciclina D1 (clon EPR2241, Millipore; dilución 1:10.000) para la inmunotransferencia de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Después de la incubación con anticuerpos primarios, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón de burro conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (Amersham; dilución 1:2.000) y luego se realizó la inmunotinción con el sistema de detección de quimioluminiscencia aumentada (ECL) (Perkin Elmer).

Ensayos de migración e invasión celular

Los experimentos se llevaron a cabo en placas de cultivo celular de 24 pocillos con insertos de tamaño de poro de 8 µm de diámetro, como se describió previamente (Zhang et al., 2007; Fradet et al., 2011). Para los ensayos de invasión celular, los insertos se recubrieron con 100 µl de membrana basal Matrigel (0,3 mg/ml). Se resuspendieron las células tumorales parentales o las transfectantes (1,6 X 10⁵ células/ml) en medio de cultivo que contenía albúmina sérica bovina al 0,1% (p/v) y se cargaron 300 µl de esta suspensión celular en cada inserto (cámara superior). Para los experimentos con anticuerpos anti-Robo1 (clon 1F8, Sigma) y anti-Robo4 (ab10547, Abcam), cada uno de estos anticuerpos se preincubó 90 minutos a 37°C con células tumorales antes de agregarlas a las cámaras superiores. El quimioattractante [suero de ternera fetal (v/v) al 10%] se colocó en la cámara inferior (750 µl/pocillo). Para los experimentos de migración e invasión celular se incubaron las placas durante 6 h a 24 h a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%, respectivamente. Después de la incubación, los insertos se recogieron, se eliminaron las células que no migraron y las células que migraron en la superficie inferior de los insertos se fijaron y tiñeron con cristal violeta. Se contaron entonces las células bajo el microscopio.

Animales

Los ratones inmunocomprometidos NMRI y Balb/c de cuatro semanas hembras y los ratones OF1 macho se compraron en Charles River Laboratories (St. Germain sur l'Arbresle, Francia). Todos los procedimientos que implican animales, que incluyen su alojamiento y su cuidado, el método mediante el cual se sacrificaron, y los protocolos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con un código de práctica establecido por el comité de ética local de la Universidad de Lyon.

Estudios de animales

Se llevaron a cabo experimentos de xenoinjerto de tumor ortotópico en ratones inmunodeficientes NMRI, como se describió anteriormente (Fradet et al., 2011). Se inyectaron ratones desnudos hembra de cuatro semanas de edad en la almohadilla de grasa de la cuarta glándula mamaria con un conjunto de transfectantes (10⁶ células en 50 µl de PBS). Al final de los protocolos, los ratones se sacrificaron y se recogieron los tumores, se pesaron y se prepararon para la inmunohistoquímica.

Se realizaron experimentos de xenoinjerto de tumores intraóseos en ratones hembra Balb/c desnudos, como se describió anteriormente (Zhang et al., 2007). Brevemente, se perforó un pequeño orificio con una aguja estéril de calibre 30 a través de la meseta tibial con la rodilla flexionada. Usando una nueva aguja estéril ajustada a una jeringa Hamilton estéril de 50 ml, se inyectó una única suspensión celular (10^5 células en 30 μ l de PBS) en la cavidad de la médula ósea. Se monitorizó la progresión de las lesiones osteolíticas mediante radiografía de animales anestesiados usando un sistema de rayos X en gabinete.

Se llevaron a cabo experimentos de metástasis ósea en ratones hembra Balb/c desnudos, como se describió anteriormente (Fradet et al., 2011; Peyruchaud et al., 2003; Zhang et al., 2007). Los transfectantes (5×10^5 células en 100 μ l de PBS) se inyectaron en la arteria de la cola de ratones desnudos anestesiados. Se tomaron radiografías como se describió anteriormente. Se identificaron las lesiones osteolíticas en las radiografías como lesiones radiolúcidas en el hueso. El área de las lesiones osteolíticas se midió usando un sistema de análisis de imagen computerizado y el grado de destrucción ósea por pata se expresó en milímetros cuadrados.

Histología ósea, histomorfometría e inmunohistoquímica

La histología ósea y el análisis histomorfométrico de las secciones de tejido óseo se realizaron como se describió anteriormente (Fradet et al., 2011; Peyruchaud et al., 2003; Zhang et al., 2007). Las mediciones histomorfométricas [las relaciones de volumen óseo (BV)/volumen tisular (TV) y volumen tumoral (TuV)/volumen de tejido blando (STV)] se realizaron en una zona estándar de la metafisis tibial, situada a 0,5 mm de la placa de crecimiento, que incluye hueso cortical y trabecular. La relación BV/TV representa el porcentaje de tejido óseo. La relación TuV/STV representa el porcentaje de tejido tumoral. La detección in situ de osteoclastos se realizó en secciones intermedias longitudinales embebidas en parafina teñidas con fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de metafisis tibiales con el uso de un kit comercial (Sigma). La superficie de reabsorción del osteoclasto se calculó como la relación entre la superficie ósea trabecular TRAP-positiva y la superficie ósea trabecular total en la interfase tumor-hueso. Para la inmunodetección de vasos sanguíneos, se incubaron secciones de tumor con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CD31 (AnaSpec) seguido de un anticuerpo secundario anti-conejo unido a HRP. Se cuantificó la densidad de microvasos tumorales como se describió anteriormente (Fradet et al., 2011; Peyruchaud et al., 2003).

Ensayo de osteoclastogénesis

Los experimentos se realizaron como se describió anteriormente (Fradet et al., 2011). Brevemente, se cultivaron células de médula ósea de extremidades posteriores de ratones machos OF1 de seis semanas de edad en medio α -MEM que contenía suero de ternera fetal al 10% (v/v) suplementado con M-CSF (20 ng/ml) y RANK-L (200 ng/ml) en presencia de medio condicionado de transfectantes (20 μ g/ml). Después de 7 días, se enumeraron los osteoclastos maduros bajo un microscopio en base al número de núcleos (más de tres núcleos) y la actividad TRAP. Los resultados se expresaron como el número de osteoclastos por pocillo.

Ensayo de micrometástasis de médula ósea ex-vivo

Se inyectaron transfectantes Sh/Sc-Robo y células de cáncer de mama B02 parentales en la arteria de la cola de los animales y los animales se sacrificaron el día 7 después de la inoculación de las células tumorales. Se recolectaron las extremidades posteriores y se cortaron ambos extremos de tibias y fémures y se enjuagó la médula ósea con medio de cultivo usando una aguja de calibre 23. Luego se sembraron las células de médula ósea en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio completo. Después de 1 día de cultivo, las células de médula ósea se colocaron bajo selección de antibiótico durante 2 semanas, lo que permite el crecimiento selectivo de células tumorales resistentes al antibiótico. Se fijaron las colonias de células tumorales, se tiñeron con cristal violeta y se contaron.

Matriz de citoquinas

Se usó una micromatriz comercial de proteínas basada en anticuerpos diseñada para detectar 79 factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas (RayBio Human Cytokine Array V, RayBiotech). Las membranas de la matriz se incubaron durante 2 h con el medio condicionado de células transfectadas cultivadas (150 μ g/ml). Después del lavado, las membranas se incubaron con un cóctel de 79 anticuerpos biotinilados, y el resto del procedimiento experimental se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron usando el programa informático StatView (versión 5.0; SAS Institute Inc, Cary, NC). Los resultados se informan como media \pm desviación estándar (SD), como se indica en las leyendas de las figuras y tablas. Con respecto a los estudios preclínicos, se llevaron a cabo comparaciones por pares mediante la realización de una prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney. Con respecto a los datos clínicos, la distribución de Robo1 y la expresión de Robo4 en relación con los parámetros de pronóstico habituales se llevó a cabo usando la prueba de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis. La comparación entre las curvas de Kaplan-Meier se realizó mediante la prueba de log-rank. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de *P* menores de 0,05.

Resultados

Asociación de la expresión de ROBO1/ROBO4 con recaída clínica de cáncer de mama.

Anteriormente se seleccionó una subpoblación de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (denominada MDA-MB-231/B02) que sólo metastatiza en hueso (Peyruchaud et al., 2003). Usando los U133 Affymetrix GeneChips A y B, se han comparado los perfiles de expresión génica de células MDA-MB-231 y MDA-MB-231/B02 y se encontró que las células MDA-MB-231/B02 expresan un distintivo génico de metástasis ósea (Bellahcène et al., Breast Cancer Res Treat., 101: 135-148, 2007; Garcia et al., Clin Exp Metastasis, 25: 33-42, 2008), que incluye genes de la familia de ROBO/SLIT. Para ser más precisos, las células osteotrópicas MDA-MB-231/B02 sobreexpresan ROBO1 y ROBO4 en comparación con la línea celular parental. ROBO2 y ROBO3 no se expresaron por células MDA-MB-231 y MDA-MB-231/B02. Los ligandos de Robo SLIT2 y, en menor medida, SLIT1 (pero no SLIT3) también se expresaron por células MDA-MB-231 y MDA-MB-231/B02.

Para investigar la asociación de la expresión de ROBO1 y ROBO4 con el pronóstico del cáncer de mama, se examinó una cohorte de 254 pacientes en los que no había evidencia de metástasis distante en el momento del diagnóstico y sin tratamiento previo (Berthier et al., 2010). No se observó ninguna correlación entre el estado de ROBO1 y las características clínicas y biológicas en pacientes con cáncer de mama (Tabla 1). En sorprendente contraste, hubo una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de ROBO4 y el estado ganglionar ($P = 0,001$); se observan con mayor frecuencia altos niveles de ROBO4 en tumores primarios en pacientes que tienen más de tres ganglios linfáticos positivos (Tabla 1). Para definir los valores pronósticos de la expresión de ROBO1 y ROBO4 en pacientes con cáncer de mama, se calcularon las curvas de supervivencia usando el método de Kaplan-Meier. Las tasas de supervivencia sin recaída no difirieron significativamente entre los grupos que expresaron altos o bajos niveles de ROBO1. Por el contrario, el número de recaídas en una mediana de seguimiento de 54 meses en el grupo con altos niveles de expresión de ROBO4 fueron dos veces más altos que en el grupo con niveles bajos de ROBO4 (32 frente a 15 recaídas, respectivamente; $P = 0,009$ mediante la prueba de log-rank).

Adicionalmente, el análisis de subgrupos de la cohorte de pacientes de acuerdo con el estatus de ROBO1 y ROBO4 mostró que las recaídas se produjeron con mayor frecuencia en pacientes que tenían tumores primarios con altos niveles de ROBO4, independientemente de si los niveles de expresión de ROBO1 eran altos o bajos ($P = 0,058$). Dado que el estado de los ganglios linfáticos se ha correlacionado previamente con un alto riesgo de metástasis en la cohorte que se analizó (Berthier et al., 2010) y se observó aquí una correlación significativa entre la expresión de ROBO4 y el estado ganglionar (Tabla 1), se verificó si el estado ganglionar podría ser un factor de confusión. En pacientes con ganglios linfáticos negativos (pN0), la expresión de ROBO4 no se relacionó con el riesgo de metástasis (no se muestra). Por el contrario, cuando se restringió el análisis a pacientes con ganglios linfáticos positivos (pN+), los altos niveles de ROBO4 se correlacionan con recaídas distantes ($P = 0,07$ mediante prueba de log-rank) y recaídas óseas ($P = 0,018$ mediante prueba de log-rank). Por lo tanto, se correlacionó una alta expresión de ROBO4 con un peor pronóstico.

El silenciamiento de ROBO1 aumenta, mientras que el silenciamiento de ROBO4 reduce el crecimiento experimental del tumor primario

Para determinar si existe un vínculo entre la expresión de ROBO1/ROBO4 y el crecimiento del tumor dentro de la glándula mamaria del ratón se redujeron de forma estable los niveles endógenos de ROBO1 o ROBO4 en células de cáncer de mama MDA-MB-231/B02 humanas usando la estrategia del ARN de interferencia. El silenciamiento mediado por shRNA redujo los niveles de proteína Robo1 en >90% cuando se comparó con lo observado en células ScRobo1 transfectadas-codificadas y MDA-MB-231/B02 parentales. Los niveles de Robo4 se mantuvieron sin cambios en las células de cáncer de mama ShRobo1 y ScRobo1. Luego se implantaron de manera ortotópica un conjunto de transfectantes MDA-MB-231/B02 silenciados para ROBO1 (clones Sh1.32 y Sh1.33) y después se implantaron de manera ortotópica un conjunto de transfectantes simulados (clones Sc2.1 y Sc2.4) dentro de la glándula mamaria de los ratones inunodeficientes. El análisis de la mediana del tamaño del tumor primario demostró que los tumores ShRobo1 eran más grandes que los tumores ScRobo1. El análisis inmunohistoquímico de los xenoinjertos tumorales con un anticuerpo anti-CD31 que reconoce específicamente las células endoteliales murinas mostró que el silenciamiento de ROBO1 dio lugar a un aumento sustancial de la densidad de microvasos en los tumores ShRobo1 en comparación con los tumores ScRobo1. Los niveles de VEGF producidos por las células de cáncer de mama ShRobo1 también aumentaron estadísticamente de manera significativa en comparación con células ScRobo1 y parentales B02 (datos no mostrados). En marcado contraste, la implantación ortotópica dentro de la glándula mamaria de ratón de células de cáncer de mama B02 silenciadas para ROBO4 dio lugar a una disminución de 3 veces en el tamaño medio de los tumores primarios ShRobo4 en comparación con los tumores ScRobo4. El tamaño más pequeño de los tumores ShRobo4 se asoció con una disminución de la angiogénesis tumoral, según lo juzgado mediante la inmunotinción con CD31. Sin embargo, los niveles de VEGF producidos por las células de cáncer de mama ShRobo4 y ScRobo4 fueron similares. En conjunto, estos datos sugirieron que Robo1 y Robo4 expresados en células tumorales tenían funciones antagónicas; Robo1 y Robo4, siendo respectivamente, reguladores negativos y positivos del crecimiento del tumor primario.

Robo1 y Robo4 regulan de manera diferente la extensión ósea del cáncer de mama y la formación de lesiones osteolíticas

Para probar el papel de Robo1 y Robo4 en la metástasis ósea se inyectaron un conjunto de transfectantes MDA-MB-231/B02 silenciados para ROBO1 (clones Sh1.32 y Sh1.33) o un conjunto de transfectantes silenciados para ROBO4 (clones Sh2.6 y Sh4.5) o conjuntos de los transfectantes simulados para ROBO1 (clones Sc2.1 y Sc2.4) y ROBO4 (clones Sc1.2 y Sc2.2) respectivos en la arteria de la cola de ratones inmunodeficientes. Usando este modelo animal, el análisis radiográfico en el día 28 después de la inyección reveló que aumentó la extensión de las lesiones osteolíticas en las extremidades posteriores de los animales con tumores ShRobo1, siendo un 40% más grande que la de los animales con tumores ScRobo1 transfectados simulados. Esta diferencia fue acompañada de una marcada reducción de la relación BV/TV (que indica una mayor destrucción ósea) y un aumento de 3 veces en la relación TB/STV (una medida de la carga de tumor óseo) en comparación con los ratones que tienen tumores ScRobo1 transfectados simulados, según lo determinado mediante examen histomorfométrico. El silenciamiento de ROBO4 dio lugar a un modesto aumento en la extensión de las lesiones osteolíticas en animales portadores de tumores ShRobo4 en comparación con ratones portadores de tumores ScRobo4 transfectados simulados.

Sin embargo, el análisis histomorfométrico de las extremidades posteriores con metástasis mostró que las relaciones BV/TV y TB/STV no difirieron estadísticamente de forma significativa entre los dos grupos de animales. Curiosamente, la tinción de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) de secciones de tejido óseo de patas metastásicas de ratones con tumores ShRobo4 mostraron que las superficies de reabsorción de osteoclastos activos en la interfase tumor-hueso aumentaron sustancialmente en comparación con los tumores ScRobo4. Por el contrario, las superficies de reabsorción de osteoclastos activos en patas metastásicas de ratones portadores de tumores ShRobo1 o ScRobo1 fueron similares. Estas observaciones apuntaron a un papel específico de Robo4 derivado del tumor en la regulación de la destrucción ósea mediada por osteoclastos, mientras que Robo1 expresado en células tumorales se asoció con crecimiento metastásico en el esqueleto.

Para probar directamente si el silenciamiento de ROBO4 (o ROBO1) en células tumorales podría influir en la formación de osteoclastos, se trataron cultivos primarios de células de médula ósea de ratón con RANKL y factor estimulante de colonias de macrófagos, que son dos factores hematopoyéticos tanto necesarios como suficientes para inducir osteoclastogénesis, junto con el medio condicionado de los diferentes transfectantes. De acuerdo con los datos *in vivo*, los medios condicionados de las células de cáncer de mama B02 Sh-Robo1 y Sc-Robo1 estimularon la formación de osteoclastos multinucleados TRAP-positivos en un grado similar. A la inversa, el medio condicionado de células Sh-Robo4 B02 indujo un aumento de 2 veces en la formación de osteoclastos en comparación con el de las células Sc-Robo4. Se usó después una matriz de anticuerpos de citoquinas humanas para medir las citoquinas en el medio condicionado de los transfectantes. Estos transfectantes produjeron varias citoquinas e interleucinas que se sabe que estimulan la actividad de los osteoclastos (MCP-1, GM-CSF, P1GF, VEGF, IL-6, IL-8). Los perfiles de citoquinas fueron similares para las células Sc- y Sh-Robo1. Por el contrario, hubo una mayor producción de P1GF, MCP-1 e IL-8 por las células Sh-Robo4 que por las células Sc-Robo4, según lo determinado mediante matriz de citoquinas y ELISA. Estas citoquinas también se detectaron *in vivo*. Además, las concentraciones de P1GF e IL-8 (pero no de MCP-1) fueron más altas en el suero de animales portadores de tumores Sh-Robo4 que en el grupo control. Por lo tanto, las superficies de reabsorción aumentadas de osteoclastos activos en patas metastásicas de animales portadores de tumores ShRobo4 probablemente fueron el resultado de una mayor producción de citoquinas pro-osteoclasticas por células tumorales *in vivo*. Por el contrario, las lesiones osteolíticas en animales portadores de tumores deficientes en Robo1 no se relacionaron directamente con el silenciamiento de ROBO1, sino con un resultado indirecto del mayor número de células tumorales ShRobo1 que residen en la médula ósea que, en su mayoría, estimularon la destrucción ósea mediada por osteoclastos.

Efectos del silenciamiento o focalización por anticuerpos de ROBO1 y ROBO4 en la migración e invasión de células de cáncer de mama

A la luz de estos resultados, se postula que el silenciamiento de ROBO1 podría dar lugar a una colonización ósea más rápida por las células tumorales ShRobo1. De hecho, existe cierta evidencia en la bibliografía de que Slit-Robo1 regula la migración de células cancerosas (Mehlen et al., 2011). Por lo tanto, se investigó si Robo1 y/o Robo4 podrían regular la migración/invasión de células de cáncer de mama, usando un ensayo de cámara de Boyden modificado. Primero se probaron los efectos del silenciamiento de ROBO1 o ROBO4 en la respuesta quimiotáctica de las células de cáncer de mama al suero. Hubo un aumento de 1,5 a 2 veces en la migración de las células transfectadas Sh-Robo1 (conjunto de clones Sh1.32 y Sh 1.33) en comparación con la de las células ScRobo1 transfectadas codificadas (conjunto de clones Sc2.1 y Sc2.4). De manera similar, hubo una ganancia sustancial en la invasión de células ShRobo1 cuando se comparó con las células ScRobo1. Por el contrario, el silenciamiento de ROBO4 dio lugar a una disminución estadísticamente significativa de la migración de células ShRobo4 (conjunto de clones Sh2.6 y Sh4.5) en comparación con la de las células de control (conjunto de clones Sc1.2 y Sc2.2). Además, hubo una disminución de 4 veces en la invasión de células ShRobo4 en comparación con la de las células ScRobo4. A continuación, se evaluó el beneficio de focalizar Robo1 y Robo4 con anticuerpos en la invasión de células de cáncer de mama B02 parentales. En comparación con anticuerpos control con isotipo emparejado, el tratamiento de células de cáncer de mama B02 con un anticuerpo monoclonal anti-Robo1 promovió la invasividad, mientras que la invasión de células B02 se inhibió de forma dependiente de la dosis en presencia de concentraciones crecientes de un anticuerpo policlonal anti-Robo4. Tomado en conjunto, se llega a la conclusión de que Robo1 y Robo4 en las células tumorales tienen propiedades anti-invasivas y pro-invasivas, respectivamente.

Por lo tanto, estos resultados sugirieron que el silenciamiento de Robo1 podría atraer a las células de cáncer de mama a colonizar el hueso más rápido que cuando se inyecta por vía intravenosa, lo que explica la mayor carga tumoral ósea en patas de animales portadores de tumores deficientes en Robo1. Esta suposición se apoyó de hecho por la observación de que, cuando las células transfectadas Sc-Robo1 y Sh-Robo1 se inocularon directamente en la cavidad de la médula ósea tibial, los ratones que portaban el control o tumores mermados en Robo1 tenían un grado similar de destrucción ósea y de carga tumoral ósea, según se determinó mediante radiografía y examen histomorfométrico. Así, el silenciamiento de ROBO1 dotó a las células tumorales de una mayor invasividad *in vivo*. Con respecto a la función de Robo4 en la metástasis ósea, las lesiones osteolíticas formadas por células tumorales Sh-Robo4 fueron comparables a las observadas en patas metastásicas de animales portadores de tumores Sc-Robo4. Esto fue inesperado dado que el silenciamiento de ROBO4 disminuyó la carga tumoral ósea en animales metastásicos en comparación con los tumores ScRobo4. Sin embargo, también hubo un fuerte aumento de osteoclastos TRAP-positivos en la interfase tumor-hueso y niveles más altos de la citoquina pro-osteoclástica IL-8 en el suero de animales portadores de tumores ShRobo4 en comparación con los tumores ScRobo4. Así, una alta actividad estimuladora de osteoclastos endógena de células tumorales ShRobo4 es probable que explique por qué los animales portadores del tumor ShRobo4 tenían lesiones osteolíticas a pesar de una reducción de la carga tumoral ósea.

El silenciamiento de ROBO4 reduce la supervivencia y la extensión de células de cáncer de mama en la médula ósea

La invasión de células tumorales se produce en una etapa muy temprana durante la formación de la metástasis ósea, lo que permite que las células tumorales se siembren y prosperen en la médula ósea (Weilbaecher et al., 2011). Debido a que Robo1 y Robo4 regulan la invasión de células cancerosas *in vitro* y la formación de metástasis ósea *in vivo*, se hipotetiza que estos receptores podrían facilitar el injerto de células tumorales en el microambiente de la médula ósea. Para abordar esta pregunta, se inyectaron transfectantes Sh-Robo y células de cáncer de mama B02 parentales en la arteria de la cola de los animales y estos animales se sacrificaron el día 7 después de la inoculación de células tumorales, momento en el cual no hay evidencia de metástasis, según lo juzgado por radiografía, imagen por bioluminiscencia e histología (García et al., 2008). Después, la médula ósea de las extremidades posteriores de estos animales se enjuagó y se colocó en cultivo bajo selección antibiótica, lo que permite el crecimiento selectivo de células tumorales resistentes al antibiótico. En comparación con los ratones inoculados con células B02 parentales o células ShRobo1, el número de colonias de células tumorales en la médula ósea de los ratones inoculados con células ShRobo4 se redujo en un 75 a un 80%. Además, cuando se inocula directamente en la cavidad de la médula ósea de las tibias y se rastrea la extensión tumoral, el número de colonias ShRobo4 en la médula ósea se redujo en un 78% en comparación con el observado para las células ScRobo4. Se observó un efecto similar cuando las células tumorales crecieron independientemente ancladas en agar blando. En comparación con las células ScRobo4 y las células B02 parentales, el número y tamaño de las colonias formadas por las células ShRobo4 disminuyeron de manera estadísticamente significativa. Por lo tanto, se requirió Robo4 para la supervivencia de células de cáncer de mama en la médula ósea.

Ejemplo 2

Se inyectaron células B02 pre-tratadas con anticuerpo anti-Robo4 en la arteria de la cola de ratones inmunodeficientes. Una semana después de la inoculación de las células tumorales se enjuagó la médula ósea de las extremidades posteriores de estos animales y se colocaron en cultivo bajo selección de antibiótico, lo que permite el crecimiento selectivo de células tumorales resistentes al antibiótico. Después de 2 semanas en cultivo, se fijaron, se tiñeron y se contaron las colonias de células tumorales. Cada serie de 3 pocillos muestra la extensión de colonias de células tumorales de la médula ósea de un solo animal. Había 4 ratones por grupo. La Figura 9 muestra que el tratamiento de células de cáncer de mama B02 humano con un anticuerpo policlonal dirigido contra Robo4 inhibe la formación de micrometástasis de médula ósea en animales. Un análisis de PCR muestra que, si bien la mayoría de las líneas celulares de cáncer de mama expresaron Robo1, sólo las que tenían un tropismo óseo (B02 y BC-M1) expresaron Robo4. De manera adicional, se encontró que las células Hs578T y T47D expresaban fuertemente Robo2.

Características			Expresión de Robo1			Expresión de Robo4		
			n	bajo ^(a)	alto ^(a)	P	bajo ^(a)	alto ^(a)
Estado menopáusico	Pre	147	77	70	,45	82	65	,08
	Post	107	50	57		47	60	
Tamaño del tumor	< 20 mm	103	60	43	,05	52	51	,99
	> 20 mm	143	64	79		73	70	
Grado histológico	1	27	15	12	,74	15	12	,12
	2	110	52	58		52	58	
	3	58	28	30		37	21	

ES 2 710 174 T3

Estado ganglionar	Negativo	117	66	51	,13	74	43	,001
	1-3	83	35	48		39	44	
	> 3	54	26	28		16	38	
Estado ER	negativo	42	15	27	,06	22	20	,95
	positivo	212	112	110		107	105	
Estado PR	negativo	55	26	29	,76	30	25	,63
	positivo	199	101	98		99	100	

(a) bajo: < 50% del cuartil; alto: > 50% del cuartil.

Los valores de P son para las comparaciones entre los grupos alto y bajo que usan la prueba de Chi-2.

Tabla 1

Referencias

- Alajez, N. M., Lenarduzzi M, Ito E, Hui AB, Shi W, Bruce J, Yue S, Huang SH, Xu W, Waldron J, et al., (2011). MiR-218 supresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer Res* 71, 2381-2391.
- 5 Bellahcène, A., Bachelier, R., Detry, C., Lidereau, R., Clèzardin, P., and Castronovo, V. (2007) Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 101, 135-148.
- Berthier, A., Seguin, S., Sasco, A. J., Bobin, J. Y., De Laroche, G., Datchary, J., Saez, S., Rodriguez-Lafresse, C., Tolle, F., Fraichard, A., et al. (2010) High expression of gabarap11 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 102, 1024-1031.
- 10 Bruijs, J. T., Henriquez, N. V., van Overveld, P. G., van der Horst, G., Que, I., Schwaninger, R., Rentsch, C., Ten Dijke, P., Cleton-Jansen, A. M., Driouch, K., Lidereau, R., et al. (2007) Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. *Cancer Res* 67, 8742-8751.
- Chang, P-H., Hwang-Verslues, W. W., Chang, Y-C., Chen, C-C., Hsiao, M., Jeng, Y-M., Chang, K-J., Lee, E. Y., Shew, J-Y., and Lee, W-H. (2012) Activation of Robo1 signaling of breast cancer cells by Slit2 from stromal fibroblast restrains tumorigenesis via blocking PI3K/Akt/b-catenin pathway. *Cancer Res* (en prensa).
- 15 Coleman, R., Gnant, M., Morgan, G., and Clèzardin, P. (2012) Effects of bone-targeted agents on cancer progression and mortality. *J Natl Cancer Inst* 104, 1059-1067.
- Dickinson, R. E., and Duncan, W. C. (2010) The SLIT-ROBO pathway: a regulator of cell function with implications for the reproductive system. *Reproduction* 139, 697-704.
- 20 Fradet, A., Sorel, H., Bouazza, L., Goehrig, D., Dèpalle, B., Bellahcène, A., Castronovo, V., Follet, H., Descotes, F., Aubin, J. E., et al. (2011) Dual function of $ERR\alpha$ in breast cancer and bone metastasis formation: implication of VEGF and osteoprotegerin. *Cancer Res* 71, 5728-5738.
- Garcia, T., Jackson, A., Bachelier, R., Clément-Lacroix, P., Baron, R., Clèzardin, P., and Pujuguet, P. (2008) A convenient clinically relevant model of human breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 25, 33-42.
- 25 Jones CA, Nishiya N, London NR, Zhu W, Sorensen LK, Chan AC, Lim CJ, Chen H, Zhang Q, Schultz PG, et al. (2009) Slit2-Robo4 signalling promotes vascular stability by blocking Arf6 activity. *Nat Cell Biol* 11, 1325-1331.
- Marlow, R., Strickland P, Lee JS, Wu X, Pebenito M, Binnewies M, Le EK, Moran A, Macias H, Cardiff RD, et al. (2008) SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. *Cancer Res* 68, 7819-7827.
- 30 Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., and Chèdot, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* 11, 188-197.
- Nguyen, D. X., Bos, P. D., and Massaguè, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9, 274-284.
- 35 Peyruchaud, O., Serre, C. M., NicAmhlaobh, R., Fournier, P., and Clèzardin, P. (2003). Angiostatin inhibits bone metastasis formation in nude mice through a direct anti-osteoclastic activity. *J Biol Chem* 278, 45826-45832.
- Prasad, A., Parachuri, V., Preet, A., Latif, F., Ganju, R. K. (2008) Slit-2 induces a tumor-suppressive effect by regulating beta-catenin in breast cancer cells. *J Biol Chem* 283, 26624-26633.
- Sin, S., Bonin, F., Petit, V., Meseure, D., Lallemand, F., Bièche, I., Bellahcène, A., Castronovo, V., de Wever, O., Gespach, C., et al. (2011) Role of the focal adhesion protein kindlin-1 in breast cancer growth and lung metastasis. *J Natl Cancer Inst* 103, 1323-1337.
- 40 Sun, H., Dai, K., Tang, T. and Zhang, X. (2009) Regulation of osteoblast differentiation by Slit2 in osteoblastic cells. *Cells Tissues Organs* 190, 69-80.
- Weilbaecher, K. N., Guise, T. A., and McCauley, L. K., (2011) Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* 11, 411-424.
- 45 Ypsilanti, A. R., Zagar, Y., Chèdot, A. (2010) Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* 137, 1939-1952.
- Yu, J., Cao, Q., Yu, J., Wu, L., Dallol, A., Li, J., Chen, G., Grasso, C., Cao, X., Lonigro, R. J., et al. (2010) The neuronal repellent SLIT2 is a target for repression by EZH2 in prostate cancer. *Oncogene* 29, 5370-5380.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSERM

5 <120> Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la metástasis ósea
 <130> BIO12095 CLEZARDIN / MC

10 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> ROBO1 ARNSh precoz
 <400> 1
 accgcagtac taaggaaca ataagtctc tattgtccc ttagtactgc ttttcc 56

25 <210> 2
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> ROBO1 ARNSh reverso
 <400> 2
 tgcagaaaaa gcagtactaa ggaacaata gagaacttat tgttcctta gtactg 56

35 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> ROBO4 ARNSh precoz
 <400> 3
 gagcagagaa gagtgacga 19

45 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> ROBO4 ARNSh reverso
 <400> 4
 tcttacacgg cctgttca 19

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-ROBO4, un polipéptido señuelo de ROBO4 y un inhibidor de la expresión de ROBO4 para usar en un método para prevenir o tratar la metástasis ósea en un sujeto que lo necesite en donde el inhibidor de la expresión de ROBO4 se selecciona del grupo que consiste en siRNAs de ROBO4, shRNAs de ROBO4, ribozimas de ROBO4 y oligonucleótidos antisentido de ROBO4 y en donde el polipéptido señuelo de ROBO4 comprende el dominio extracelular de ROBO4.
2. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el sujeto padece un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer colorectal, cáncer de ovario y cáncer cerebral.
- 10 3. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos monoclonales totalmente humanos.
4. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el polipéptido señuelo de ROBO4 comprende el dominio extracelular de ROBO4 fusionado al dominio Fc de una inmunoglobulina.
- 15 5. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el agente se administra al sujeto en combinación con bifosfonatos.
6. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el agente se administra al sujeto en combinación con un anticuerpo anti-RANKL.
7. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el anticuerpo anti-RANKL es denosumab.
- 20 8. Un método para evaluar si un paciente con un cáncer tiene riesgo de tener metástasis ósea que comprende i) determinar el nivel de expresión de ROBO4 en una muestra obtenida de dicho paciente ii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con un nivel de referencia predeterminado e iii) concluir que el paciente tiene un alto riesgo de tener metástasis ósea cuando el nivel determinado en la etapa i) es mayor que el nivel de referencia predeterminado.
- 25 9. El método de la reivindicación 8 en donde la muestra se aísla del tumor primario del paciente o consiste en una recogida de células tumorales circulantes aisladas de la muestra de sangre obtenida del sujeto.
10. El método de la reivindicación 8 en donde el sujeto padece un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer colorectal, cáncer de ovario y cáncer cerebral.
- 30 11. El método de la reivindicación 8 en donde el nivel de expresión de ROBO4 en la muestra se evalúa determinando el número de células cancerosas que expresan ROBO4 o el nivel de ROBO4 en la superficie de las células cancerosas.

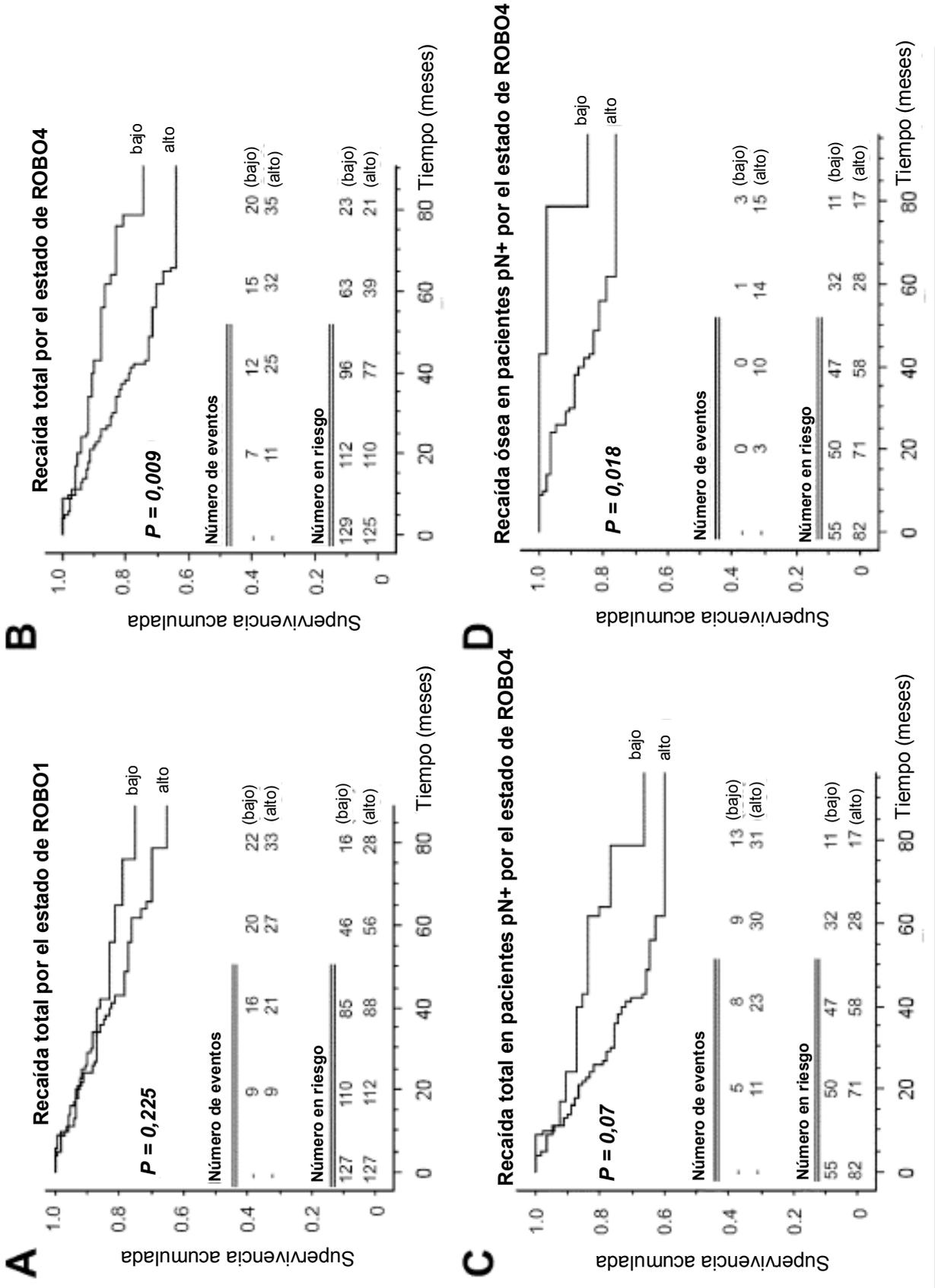


Figura 1

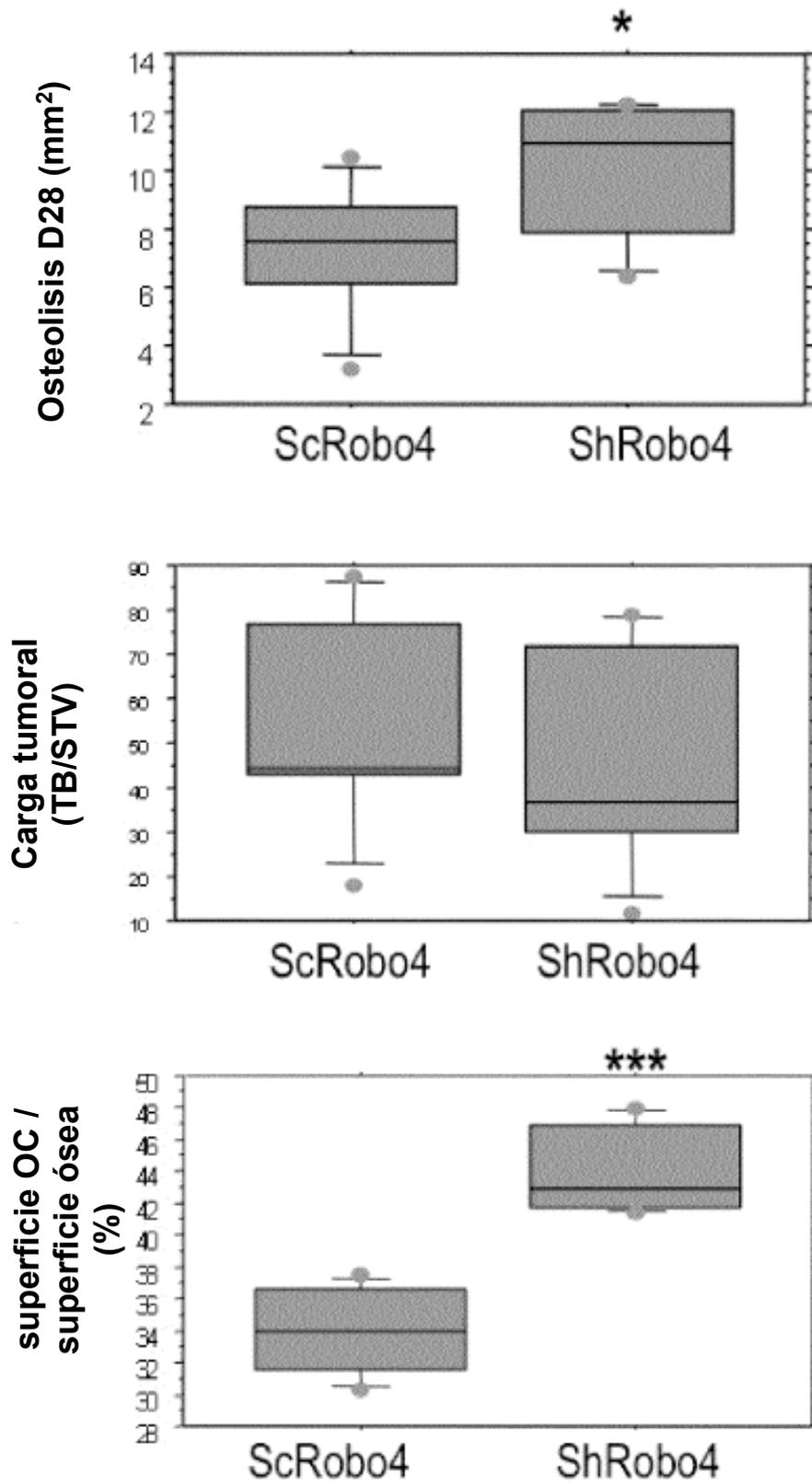
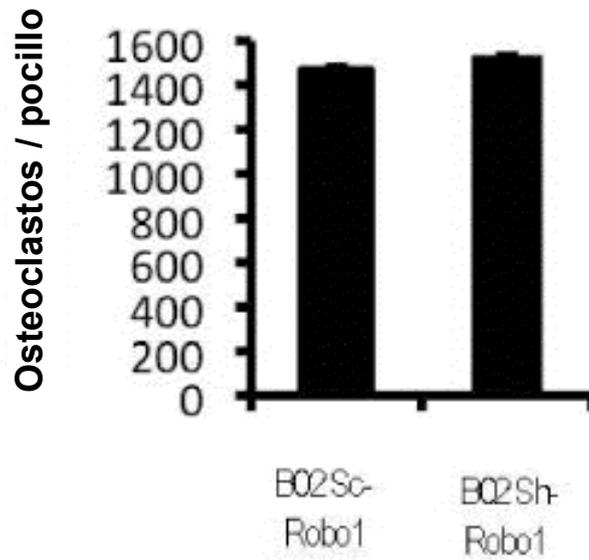


Figura 2

Robo1



Robo4

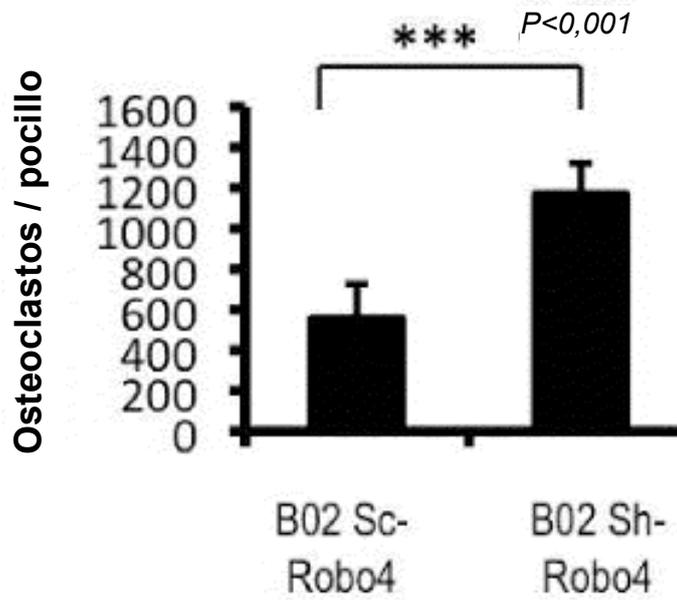


Figura 3

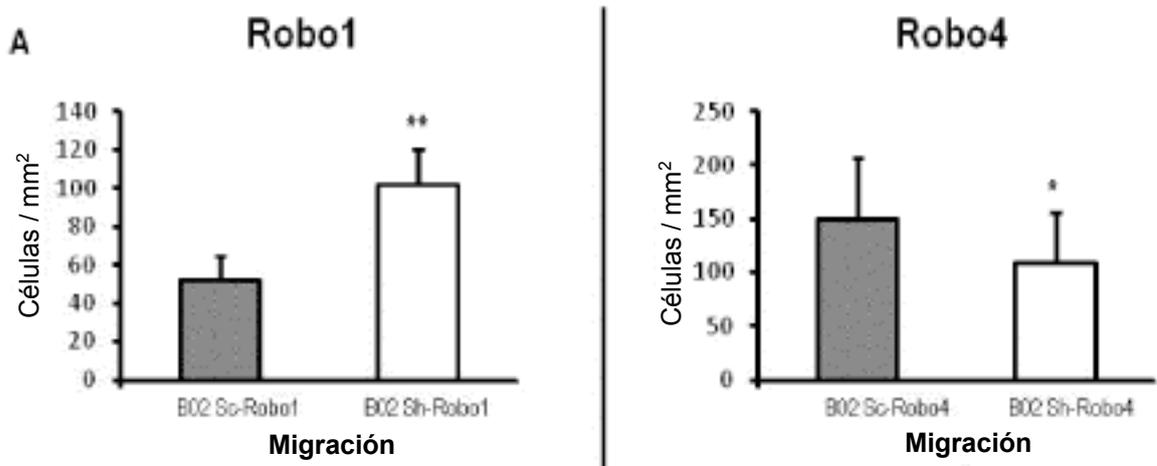


Figura 4A

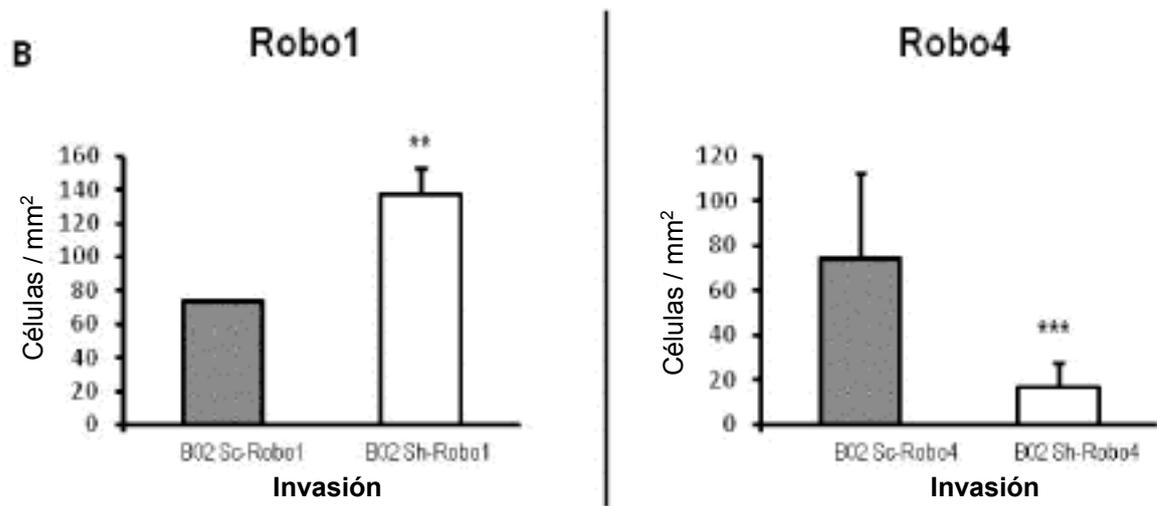


Figura 4B

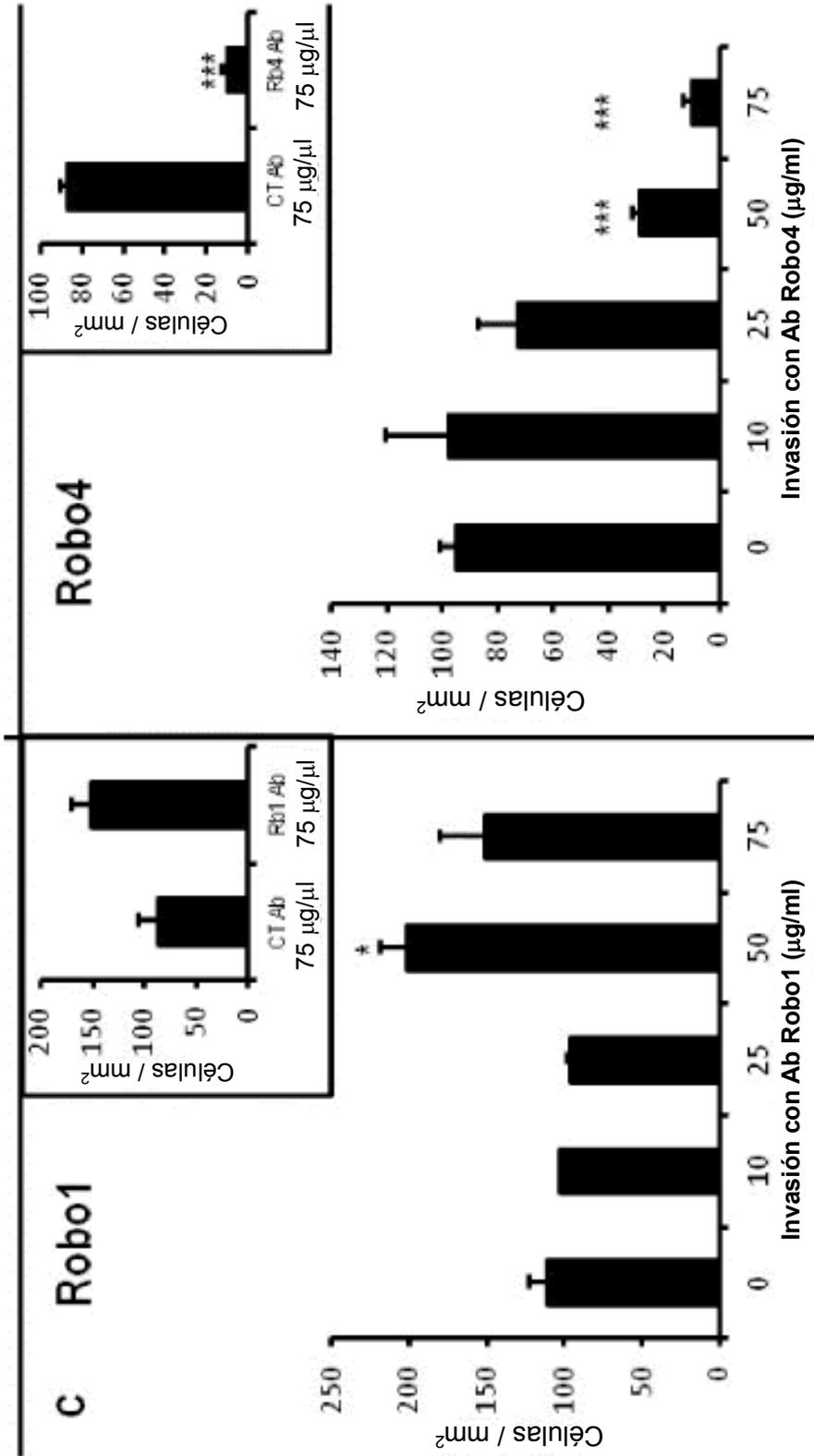


Figura 4C

Colonias de células tumorales

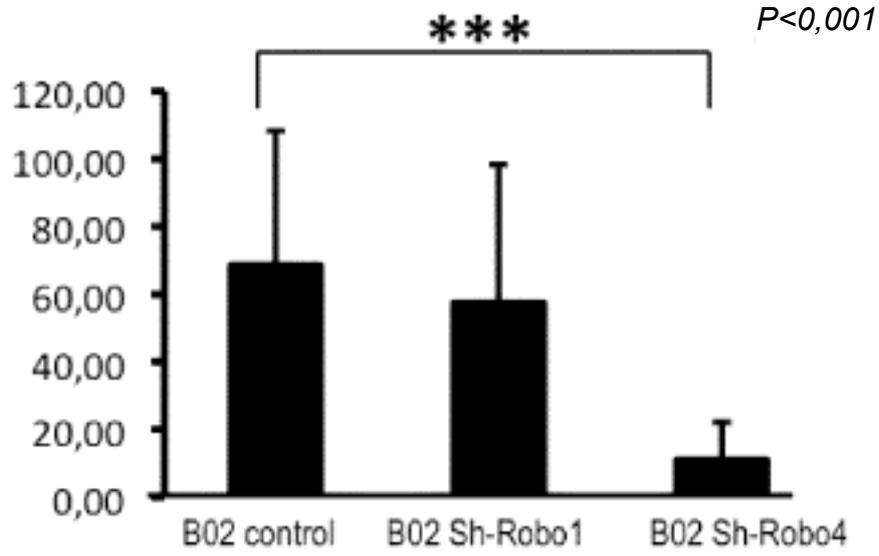


Figura 5A

Colonias de células tumorales

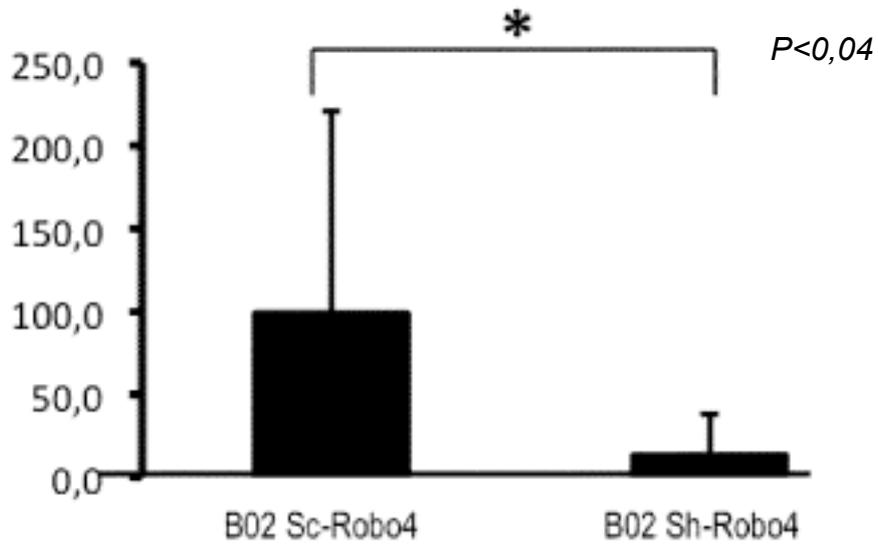


Figura 5B

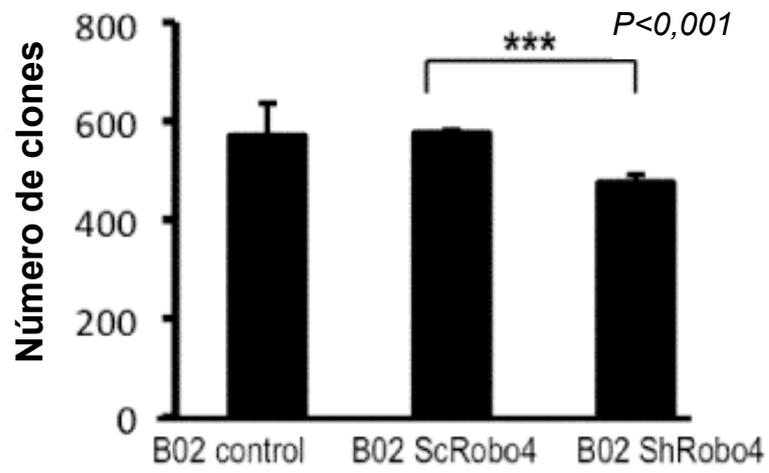


Figura 5C

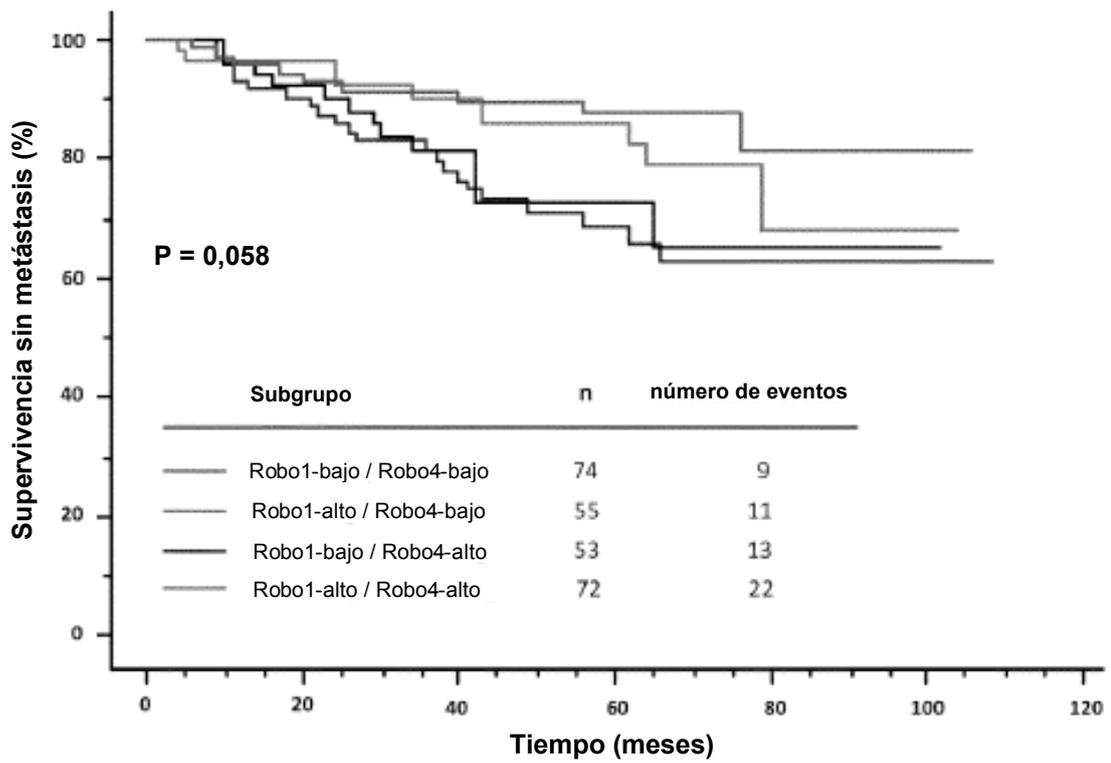


Figura 6

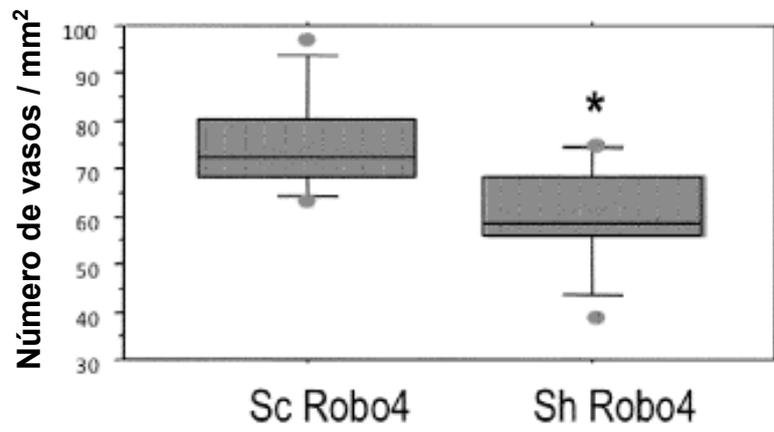
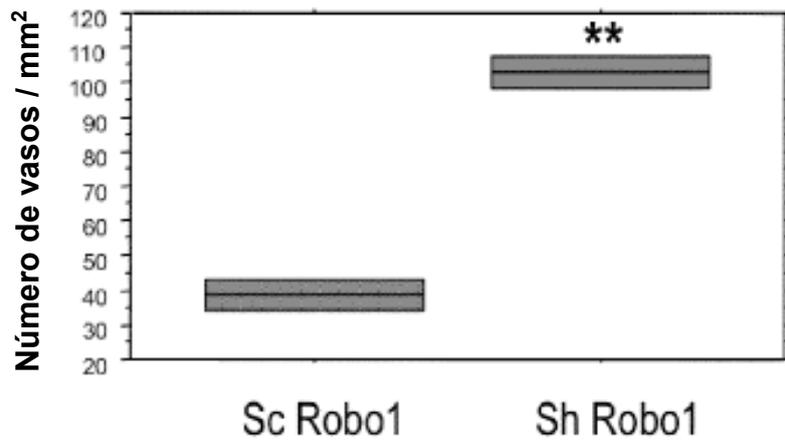


Figura 7

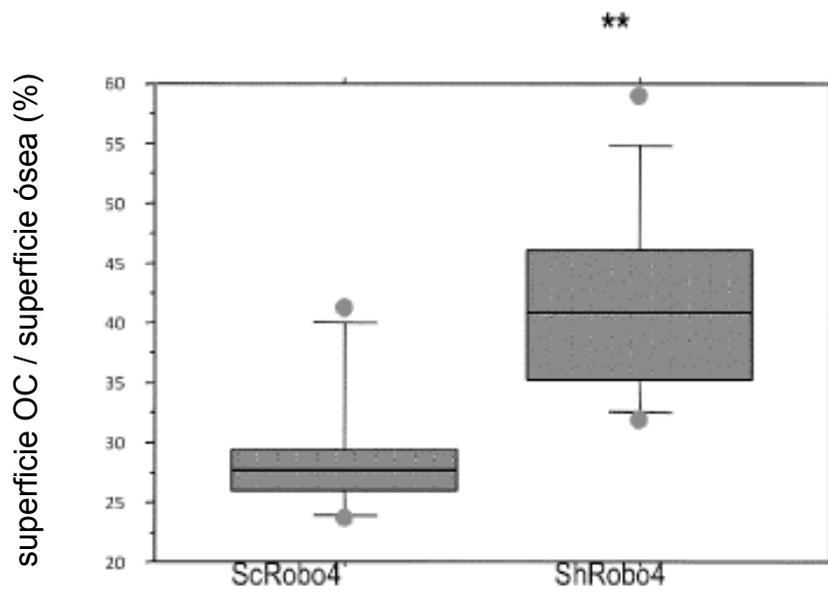
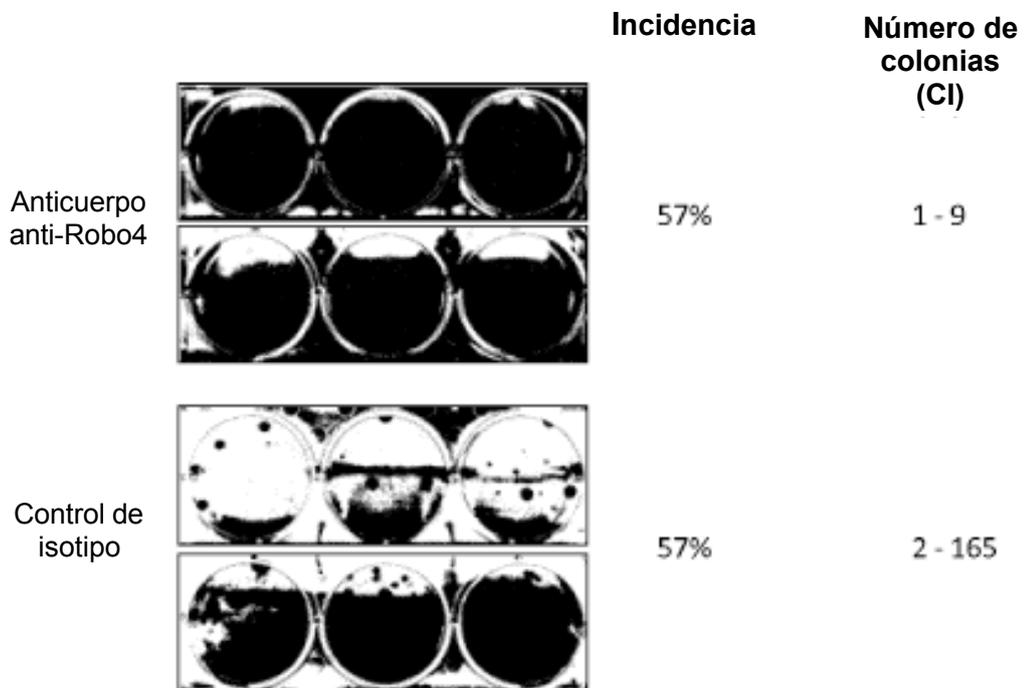
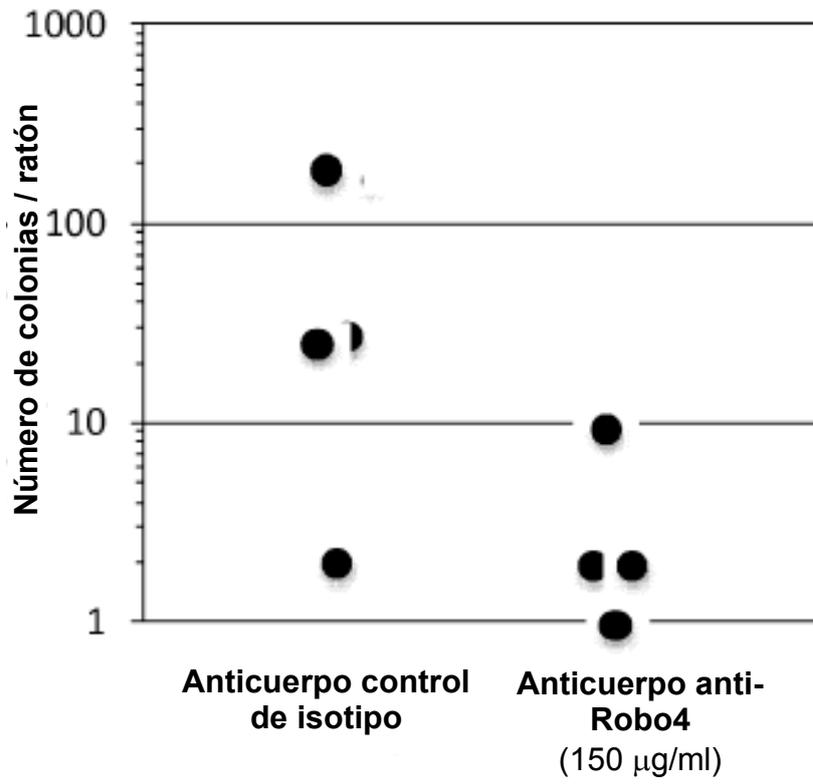


Figura 8



CI: intervalo de confianza

Figura 9