

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 832**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2015 PCT/KR2015/007964**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16018087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2015 E 15828012 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3176268**

54 Título: **Nuevo biomarcador para predecir la sensibilidad al agente dirigido contra egrf y uso del mismo**

30 Prioridad:

**29.07.2014 KR 20140096716**

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

**27.03.2020**

73 Titular/es:

**WELLMARKER BIO CO., LTD. (100.0%)  
11th Fl., 88, Olympic-ro 43-gil  
Songpa-gu, Seoul 05505 , KR**

72 Inventor/es:

**KIM, TAE WON;  
JIN, DONG HOON;  
HONG, SEUNG WOO;  
MOON, JAI HEE;  
SHIN, JAE SIK;  
KIM, SEUNG MI;  
LEE, DAE HEE;  
LEE, EUN YOUNG;  
LEE, SEUL y  
HONG, YONG SANG**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 750 832 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

Nuevo biomarcador para predecir la sensibilidad al agente dirigido contra egfr y uso del mismo

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se consigue mediante el Proyecto N.º 1420030 con el apoyo del Ministerio de Salud de Corea y una organización especializada en gestión de investigación del proyecto es el Programa de Apoyo a la Investigación para el Centro Regional del Cáncer, un nombre del programa de investigación es "Programa Nacional de I+D para el Control del Cáncer", un nombre del proyecto de investigación es "Desarrollo de una nueva terapia para superar la resistencia al cetuximab en pacientes con cáncer de colon y desarrollo de biomarcadores", una organización de control es el Centro Médico Asan y un período de investigación es del 1 de mayo de 2014 al 30 de abril de 2017.

La presente divulgación se consigue mediante el Proyecto N.º HI06C0868 con el apoyo del Ministerio de Salud de Corea y la organización especializada en gestión de investigación del informe es el Instituto de Desarrollo del a Industria de la Salud de Corea, el nombre del programa de investigación es "Programa Puntero de Investigación de Caracterización", el nombre del proyecto de investigación es "Desarrollo de fármaco antineoplásico creativo dirigido contra tirosina cinasa receptora (RTK)", la organización de control es el Grupo Empresarial de Invención Puntera contra el Cáncer del Centro Médico Asan y el período de investigación es del 1 de diciembre de 2011 al 30 de noviembre de 2016.

La presente divulgación se relaciona con un nuevo biomarcador para predecir la susceptibilidad a un agente dirigido contra EGFR y un uso del mismo.

25 **Antecedentes**

Generalmente, en una terapia antineoplásica, una respuesta biológica cuando se administra un agente antineoplásico depende significativamente de la susceptibilidad de las células cancerosas diana al agente antineoplásico. La susceptibilidad de la célula cancerosa al agente antineoplásico varía significativamente para cada célula cancerosa. La diferencia en la susceptibilidad se debe a una diferencia cuantitativa o cualitativa de una molécula diana del agente cancerígeno o un factor asociado a la misma o la adquisición de resistencia a fármacos. Basándose en los antecedentes, cuando una célula cancerosa diana presenta susceptibilidad al fármaco, si puede verificarse un cambio genético de la célula cancerosa presentada específicamente, la determinación de un efecto del fármaco, el establecimiento de la terapia, la selección de una nueva terapia y similares son válidos y, como resultado, es muy beneficioso. Adicionalmente, en un tejido canceroso obtenido mediante un trozo de tejido biológico y similares antes de la terapia, la célula cancerosa se separa y el procesamiento del fármaco se realiza de acuerdo con un método general y, como resultado, si cuando la célula cancerosa es sensible al fármaco se mide mediante el cambio, puede predecirse si la terapia con el fármaco es válida, lo que es muy útil clínicamente.

En general, se sabía que la mutación de un gen KRAS, NRAS o BRAF hace que la proteína que tiene una característica de señalización se deforme de la célula cancerosa y la mutación se asocia a un resultado no satisfactorio en una terapia contra el cáncer usando un anticuerpo terapéutico dirigido contra un receptor de factor de crecimiento epidérmico, por ejemplo, cetuximab o panitumumab (Amado, Wolf et al, 2008; Karapetis, Khambata-Ford et al, 2008; Di Nicolantonio, Martini et al, 2008; Loupakis, Ruzzo et al, 2009; Lievre, 1Bachet et al, 2006).

Sin embargo, incluso en el caso de un paciente con cáncer que no tenga mutación sino un genotipo de tipo silvestre de KRAS, NRAS o BRAF, hay muchos casos en los que el efecto antineoplásico de un agente antineoplásico objetivo tal como el cetuximab o similar es menor.

Se sabía que el cetuximab como anticuerpo monoclonal (MoAb) quimérico humano/de ratón anti-EGFR de recombinación sensibiliza la célula cancerosa a la toxicidad celular dependiente de anticuerpos y a la quimioterapia y radioterapia (Graham J, et al., *Nat Rev Drug Discov.* Julio de 2004; 3 (7): 549-50; Kimura H. et al., *Cancer Sci.* Agosto de 2007; 98 (8): 1275-80; Kurai J, et al., *Clin Cancer Res.* 1 de marzo de 2007; 13 (5): 1552-61; Dittmann K. et al., *RadiotherOncol*, agosto de 2005; 76 (2): 157-61.). Debido a la ventaja, se ha demostrado una ventaja clínica usando cetuximab como terapia única o terapia simultánea de quimioterapia y/o radioterapia en el cáncer de cabeza y cáncer de cuello de útero y cáncer de colon metastásico (Marshall J, et al., *Cancer*, 15 de septiembre de 2006; 107 (6): 1207-18).

Mientras tanto, el Receptor de Origen Nantais (RON) como receptor de proteína que pertenece a la serie c-MET es un receptor de proteína estimuladora de macrófagos (MSP) secretada por el hígado y controla la operación de los macrófagos (Zhou YQ, He C, Chen YQ, Wang D, Wang MH: *Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal adenocarcinomas, generation of different splicing RON variants and their oncogenic potential*, *Oncogene* 2003, 22 (2): 186-197). La expresión de RON se controla de manera anormal en el cáncer de mama y el cáncer colorrectal y, en particular, se cierra en relación con la metástasis del cáncer colorrectal. De hecho, KELLER et al. (*British J. of Cancer* 2013, 109 (2): 482-492) sugieren que la expresión de RON confiere un fenotipo agresivo a los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en inglés). Además,

ZHAO et al. (*Oncogenesis* 2013, 2 (10): e76) desvelan que RON y MET se co-expresan en estirpes celulares de cáncer de páncreas. Sin embargo, el presente documento menciona que la inhibición específica de RON retrasa pero no evita la progresión del cáncer de páncreas. También se publica que un solo anticuerpo de clon IMC-41A10 unido a RON inhibe la metástasis celular y la formación de cáncer, un inhibidor de RON será capaz de presentar un excelente efecto  
 5 contra el cáncer y sobre la metástasis del cáncer. Por ejemplo, WANG et al. (*Cancer Letters* 2013, 340 (1): 43-50) describen que tanto los inhibidores de RON de molécula pequeña como el ARN de interferencia pequeño dirigido contra RON restablecieron eficazmente la sensibilidad a lapatinib en clones de células de cáncer de mama positivo para HER2 que inicialmente eran resistentes a lapatinib. Además, O'Toole et al. (*Cancer Research* 2006, 66 (18): 9162-9170) desvelan la inhibición de la migración de células cancerosas y la carcinogénesis mediante el uso de un anticuerpo que se une a RON.  
 10

Es decir, un fármaco antineoplásico presenta una gran diferencia entre los individuos en términos de resistencia y toxicidad y puesto que el fármaco antineoplásico presenta resistencia por encima de la mitad incluso en el mismo paciente y, como resultado, la selección usando un marcador de capacidad de respuesta terapéutica adecuada puede producir un avance notable en la terapia farmacológica antineoplásica. Por tanto, una investigación sobre la capacidad de respuesta terapéutica de fármacos antineoplásicos individuales que depende de un gen específico ha progresado continuamente de manera activa en los últimos años.  
 15

Sin embargo, no hay logros notables debido a la operación compleja de un elemento relacionado con la respuesta biológica a un fármaco específico, la diversidad de medicamentos y esquemas de administración y la dificultad para obtener muestras enormes.  
 20

### Sumario

Los presentes inventores han realizado esfuerzos exhaustivos para desarrollar el método para predecir la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR como agente antineoplásico en el cáncer de colon mediante el análisis de un nivel de actividad del gen de RON y/o la proteína como biomarcador para predecir la susceptibilidad en el cáncer de colon al cetuximab, que es uno de los agentes dirigidos contra EGFR. Como resultado, los presentes inventores han verificado que el grado de muerte celular es diferente por la susceptibilidad farmacológica al cetuximab como agente dirigido contra EGFR al tener un efecto sobre los genes Adam11, Adam32, FZD4, GPER y GPR101, que son genes relacionados con la transactivación del EGFR de acuerdo con el nivel de actividad del gen de RON y/o la proteína en el cáncer de colon, completando de este modo la presente divulgación.  
 25  
 30

En consecuencia, es un objeto de la presente divulgación proporcionar un biomarcador para predecir la susceptibilidad a un agente dirigido contra EGFR.  
 35

Es otro objeto de la presente divulgación proporcionar una composición para predecir la susceptibilidad a un agente dirigido contra EGFR.

Es otro objeto más de la presente divulgación proporcionar una composición para predecir la susceptibilidad a un agente dirigido contra EGFR.  
 40

Es otro objeto más de la presente divulgación proporcionar un kit para predecir la susceptibilidad a un agente dirigido contra EGFR.  
 45

Incluso es otro objeto más de la presente invención proporcionar un potenciador de la susceptibilidad a un agente dirigido contra EGFR, en particular cetuximab.

Incluso es otro objeto más de la presente invención proporcionar un método para predecir la susceptibilidad a un agente dirigido contra EGFR, en particular cetuximab.  
 50

Incluso es otro objeto más de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer, que comprende el potenciador de la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR y al agente dirigido contra EGFR como principios activos.  
 55

Incluso es otro objeto más de la presente divulgación proporcionar un método para potenciar la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR, que comprende administrar el potenciador de susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR y el agente dirigido contra EGFR a un sujeto.

De acuerdo con la realización de la presente divulgación, cuando se usa el biomarcador para predecir la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR, en particular cetuximab, la susceptibilidad de un paciente individual puede determinarse con precisión antes del inicio del tratamiento y, por tanto, es posible seleccionar un agente antineoplásico que tenga un alto efecto de tratamiento. Adicionalmente, puesto que se evita el uso del agente antineoplásico sin obtener el efecto, es posible evitar efectos secundarios innecesarios.  
 60  
 65

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A ilustra la presencia o ausencia de activación de proteínas RON en una estirpe celular de cáncer de colon humano.

La FIG. 1B ilustra el resultado de un análisis de genes modificados solo por genes RON.

5 La FIG. 1C ilustra el resultado de un análisis por PCR en tiempo real de genes relacionados con la transactivación del EGFR por activación de RON. La FIG. 1D ilustra el resultado de un análisis de expresión por RT-PCR de genes relacionados con la transactivación del EGFR por activación de RON.

La FIG. 1E ilustra el resultado de un análisis por PCR en tiempo real de genes relacionados con la transactivación del EGFR por inhibición de RON.

10 La FIG. 1F ilustra el resultado de un análisis de la activación de proteínas EGFR por activación de RON.

La FIG. 2A ilustra un resultado de fosforilación inducida de EGFR por activación de RON.

La FIG. 2B ilustra el resultado de un análisis de un cambio en la activación de proteínas EGFR por inhibición de RON.

15 La FIG. 2C ilustra el resultado de un análisis de un cambio en la activación de EGFR independiente del ligando de EGFR por inhibición de RON.

La FIG. 3A ilustra el resultado de un análisis de la unión intracelular endógena entre la proteína RON y la proteína EGFR.

La FIG. 3B ilustra el resultado de un análisis de la unión intracelular exógena entre la proteína RON y la proteína EGFR.

20 La FIG. 3C ilustra el resultado de un análisis de un dominio de proteína EGFR unido a la proteína RON a través de un ensayo *in vivo* completo.

La FIG. 3D ilustra el resultado de un análisis de un dominio de proteína EGFR unido a la proteína RON a través de un ensayo *in vitro* sin células.

25 La FIG. 3E ilustra el resultado de un análisis de predicción de un sitio de unión a la proteína RON unido a la proteína EGFR usando modelado por ordenador.

La FIG. 3F ilustra el resultado de un análisis de un sitio de unión a la proteína RON unido a la proteína EGFR.

La FIG. 3G ilustra el resultado de un análisis de activación de EGFR de acuerdo con un sitio de unión de la proteína RON unido con la proteína EGFR.

30 La FIG. 4A ilustra el resultado de un análisis de presencia o ausencia de activación de EGFR independiente de ligando de acuerdo con la presencia o ausencia de una proteína de forma activa RON.

La FIG. 4B ilustra el resultado de un análisis de la presencia o ausencia de activación de EGFR independiente de ligando de acuerdo con la presencia o ausencia de activación de RON independiente de ligando.

La FIG. 5A ilustra el resultado de un análisis de inhibición de la activación de EGFR a través de la inhibición de la activación de RON y la inhibición de la activación de EGFR a cetuximab.

35 La FIG. 5B ilustra el resultado de un análisis de muerte celular por cetuximab de acuerdo con la presencia o ausencia de activación de RON.

La FIG. 5C ilustra el resultado de un análisis de muerte celular por cetuximab después de inhibir la expresión de RON.

40 La FIG. 5D ilustra el resultado de un análisis de un mecanismo de sub-señalización por cetuximab después de inhibir la expresión de RON.

La FIG. 5E ilustra el resultado de un análisis de muerte celular por cetuximab después de inhibir la activación de RON.

45 La FIG. 5F ilustra el resultado de un análisis de muerte celular por cetuximab de acuerdo con la presencia o ausencia de activación de RON.

La FIG. 5G ilustra el resultado de un análisis de inhibición del crecimiento celular por cetuximab de acuerdo con la presencia o ausencia de activación de RON.

La FIG. 5H ilustra el resultado de un análisis de muerte celular por cetuximab en una estirpe celular isogénica inactivada de RON.

50 La FIG. 5I ilustra el resultado de un análisis de inhibición del crecimiento celular por cetuximab en una estirpe celular isogénica inactivada de RON.

La FIG. 6 ilustra el resultado de un análisis de un efecto de inhibición tumoral de cetuximab de acuerdo con la presencia o ausencia de RON en un modelo de xenoinjerto *in vivo* usando una estirpe celular isogénica inactivada de RON.

55 La FIG. 7 ilustra el resultado de tratar tanto con un agente antineoplásico de anticuerpo ROM como con cetuximab en una estirpe celular que tiene activación de RON.

La FIG. 8 ilustra el resultado de analizar la activación de RON en tejido de un paciente con cáncer de colon (tratado con cetuximab).

### Descripción detallada

60 En lo sucesivo en el presente documento, la presente divulgación se describirá con más detalle.

65 En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición de biomarcadores para predecir la susceptibilidad al cetuximab en el cáncer de colon, incluyendo dicha composición un agente que mide un nivel de expresión del gen de RON (receptor de origen nantais, NM\_002447.1); o un nivel de expresión o actividad de una proteína del mismo, y un agente que mide un nivel de expresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo

que consiste en los genes KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, N.º de acceso de Gene Bank NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), N.º de acceso de Gene Bank NP\_002515.1), BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, N.º de acceso de Gene Bank NP\_004324.2), EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico, N.º de acceso de Gene Bank U48722.1), Adam11 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 11, N.º de acceso de Gene Bank NM\_002390.4), Adam32 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 32, N.º de acceso de Gene Bank NM\_145004.5), FZD4 (receptor 4 de la familia Frizzled, N.º de acceso de Gene Bank NM\_012193.2), GPER (receptor de estrógenos 1 acoplado a proteína G, NM\_001505.2) y GPR101 (receptor 101 acoplado a la proteína G, N.º de acceso de Gene Bank NM\_054021.1); o un nivel de expresión o actividad de una proteína de los genes.

La característica más importante de la presente divulgación es predecir la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR usando la activación del gen de RON y una proteína activada que es un producto del mismo como biomarcador.

El biomarcador de la presente divulgación puede ser un indicador de susceptibilidad a un agente antineoplásico que es el agente dirigido contra EGFR y puede usarse en el tratamiento de la generación, el desarrollo y/o la metástasis del cáncer debido a la excelente precisión y fiabilidad como marcador sensible al agente antineoplásico.

El término "susceptibilidad" utilizado en la presente memoria descriptiva significa si tiene un efecto sobre un fármaco específico para el cáncer de un paciente objetivo.

El término "susceptibilidad" utilizado al mencionar la susceptibilidad en la presente memoria descriptiva significa que el efecto sobre el fármaco se efectúa reaccionando de manera susceptible con el fármaco correspondiente y se mezcla con la susceptibilidad en la presente memoria descriptiva.

El término "resistencia" utilizado al mencionar la susceptibilidad en la presente memoria descriptiva significa que el efecto sobre el fármaco no se efectúa sin reaccionar de manera susceptible con el fármaco correspondiente.

Por ejemplo, los fármacos específicos son principalmente agentes antineoplásicos y los agentes antineoplásicos tienen el efecto sobre el cáncer o no dependiendo del tipo de cáncer. Adicionalmente, a pesar de que se reconozca como válido un tipo de cáncer, se sabe que hay un caso con el efecto y un caso sin el efecto de acuerdo con un paciente objetivo. Si el agente antineoplásico tiene un efecto sobre el cáncer del paciente objetivo se denomina susceptibilidad al agente antineoplásico. En consecuencia, de acuerdo con la presente divulgación, si pueden predecirse los pacientes (respondedores) que puede esperar el efecto antes del inicio del tratamiento y los pacientes (no respondedores) que pueden no esperar el efecto, puede implementarse la quimioterapia con alta efectividad y seguridad.

El término "predicción" utilizado en la presente memoria descriptiva se usa para indicar la posibilidad de responder ventajosa o desventajosamente a un fármaco o un conjunto de fármacos del paciente objetivo. En una realización, la predicción se relaciona con el grado de respuesta. Por ejemplo, la predicción se relaciona con la presencia o ausencia de supervivencia sin reaparición del cáncer y/o probabilidad del mismo después del tratamiento del paciente, por ejemplo, tratamiento de un agente terapéutico específico y/o extirpación quirúrgica de un tumor primario y/o quimioterapia durante un período predeterminado. La predicción de la presente divulgación puede usarse clínicamente para determinar el tratamiento seleccionando el método de tratamiento más apropiado para el paciente con cáncer de colon. La predicción de la presente divulgación es una herramienta útil para predecir si el paciente responde ventajosamente a un tratamiento terapéutico, por ejemplo, un tratamiento terapéutico dado, tal como administración, intervención quirúrgica, quimioterapia de un agente terapéutico dado o una combinación de los mismos o si la supervivencia a largo plazo del paciente después del tratamiento terapéutico es posible.

De acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, el biomarcador de la presente divulgación incluye adicionalmente uno o más genes seleccionados entre el grupo que consiste en genes KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, N.º de acceso de Gene Bank NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), N.º de acceso de Gene Bank NP\_002515.1), BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, N.º de acceso de Gene Bank NP\_004324.2), EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico, N.º de acceso de Gene Bank U48722.1), Adam11 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 11, N.º de acceso de Gene Bank NM\_002390.4), Adam32 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 32, N.º de acceso de Gene Bank NM\_145004.5), FZD4 (receptor 4 de la familia Frizzled, N.º de acceso de Gene Bank NM\_012193.2), GPER (receptor de estrógenos 1 acoplado a proteína G, NM\_001505.2) y GPR101 (receptor 101 acoplado a proteína G, N.º de acceso de Gene Bank NM\_054021.1).

Adicionalmente, de acuerdo con una realización preferida de la presente invención, cuando el gen KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), NP\_002515.1) o BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, NP\_004324.2) es de tipo silvestre, los biomarcadores de la presente divulgación predicen la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR, cetuximab, y pueden aplicarse a un caso donde las células cancerosas con mutación KRAS, NRAS o BRAF no consiguen el efecto deseado.

Es decir, en la presente divulgación, el biomarcador verifica si los genes en las células están presentes como el tipo

silvestre usando el gen de RON, KRAS, NRAS o BRAF y se dirige a una diana que tiene células cancerosas o cáncer con los genes KRAS, NRAS o BRAF de tipo silvestre. Cuando el nivel de expresión del gen de RON o la expresión de proteína del mismo o el nivel de actividad es bajo en comparación con un nivel normal (como alternativa, el nivel de expresión del gen/proteína de tipo silvestre), el biomarcador determina que existe la susceptibilidad al agente dirigido  
 5 contra EGFR que es cetuximab. Cuando el nivel de expresión del gen de RON o la expresión de la proteína del mismo o el nivel de actividad es alto en comparación con un nivel normal, el biomarcador determina que existe resistencia al agente dirigido contra EGFR.

Adicionalmente, los genes Adam11 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 11, NM\_002390.4), Adam32 (dominio de metalopeptidasa ADAM 32, NM\_145004.5), FZD4 (receptor 4 de la familia Frizzled, NM\_012193.2), GPER (receptor de estrógenos 1 acoplado a proteína G, NM\_001505.2), GPR101 (receptor 101 acoplado a proteína G, NM\_054021.1) son genes relacionados con la actividad transcripcional del EGFR y pueden incluirse como el biomarcador que predice la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR por el gen de RON debido a que la expresión del mismo se induce de acuerdo con la actividad del gen de RON como el biomarcador de la presente divulgación y la proteína activa como  
 10 el producto del mismo.

Adicionalmente, el gen de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico, número de acceso de Gene Bank U48722.1) puede incluirse como el biomarcador que predice la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR por el gen de RON porque la activación se induce o aumenta de acuerdo con la actividad del gen de RON como el biomarcador de la presente divulgación y la proteína activa como producto del mismo.  
 20

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para su uso para predecir la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR, cetuximab, que incluye un agente que mide un nivel de expresión de RON (Receptor de Origen Nantais, número de acceso de Gene Bank NM\_002447.1) o un nivel de expresión o actividad de la proteína del mismo.  
 25

De acuerdo con otra realización de la presente divulgación, la composición de la presente divulgación incluye adicionalmente un agente que mide un nivel de expresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo que consiste en genes KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, N.º de acceso de Gene Bank NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), N.º de acceso de Gene Bank NP\_002515.1), BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, N.º de acceso de Gene Bank NP\_004324.2), EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico, N.º de acceso de Gene Bank U48722.1), Adam11 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 11, N.º de acceso de Gene Bank NM\_002390.4), Adam32 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 32, N.º de acceso de Gene Bank NM\_145004.5), FZD4 (receptor 4 de la familia Frizzled, N.º de acceso de Gene Bank NM\_012193.2), GPER (receptor de estrógenos 1 acoplado a proteína G, NM\_001505.2) y GPR101 (receptor 101 acoplado a proteína G, N.º de acceso de Gene Bank NM\_054021.1); o un nivel de expresión o actividad de la proteína de los genes.  
 30  
 35

Adicionalmente, de acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, cuando el gen KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), NP\_002515.1) o BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, NP\_004324.2) es de tipo silvestre, la composición de la presente divulgación se usa para predecir la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR, cetuximab, y pueden aplicarse a un caso donde las células cancerosas con mutación KRAS, NRAS o BRAF no consiguen el efecto deseado.  
 40  
 45

Adicionalmente, de acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, el agente dirigido contra EGFR es un agente terapéutico para uno o más seleccionados entre el grupo que consiste en tumores producidos por hormona adrenocorticotropa (ACTH), leucemia linfocítica o linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda o crónica, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de vejiga, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, leucemia mielógena crónica, linfomas, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, sarcoma de Ewing, cáncer de lengua, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, osteosarcoma, cáncer de ovario, carcinoma lobular, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de pene, retinoblastoma, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de testículo, tumor de Wilms y trofoblastoma, y mucho más preferentemente cáncer de colon. Adicionalmente, de acuerdo con una realización más preferida de la presente divulgación, el agente dirigido contra EGFR es un agente terapéutico para uno o más seleccionados entre el grupo que consiste en tumores producidos por hormona adrenocorticotropa (ACTH), leucemia linfocítica o linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda o crónica, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de vejiga, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, leucemia mielógena crónica, linfomas, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, sarcoma de Ewing, cáncer de lengua, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, osteosarcoma, cáncer de ovario, carcinoma lobular, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de pene, retinoblastoma, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de testículo, tumor de Wilms y trofoblastoma, y mucho más preferentemente cáncer de colon. De acuerdo con una realización  
 50  
 55  
 60  
 65 incluso más preferida de la presente divulgación, el agente dirigido contra EGFR es un agente terapéutico para el cáncer de colon.

La expresión "cáncer de colon" utilizado en la presente memoria descriptiva significa un nombre común de cáncer rectal, cáncer colorrectal y cáncer anal.

5 Adicionalmente, el agente dirigido contra EGFR de la presente divulgación significa un agente antineoplásico y puede aplicarse cualquier agente dirigido contra EGFR que tenga un efecto antineoplásico. Preferentemente, el agente dirigido contra EGFR es uno o más seleccionados entre el grupo que consiste en cetuximab, gefitinib, erlotinib, panitumumab, PKI-166, EKB-569, HKI-272 (WAY-177820), icotinib, brigatinib, afatinib, lapatinib, canertinib, AEE788, XL647 y Zactima. El agente dirigido contra EGFR es más preferentemente cetuximab, gefitinib, erlotinib o panitumumab, y mucho más preferentemente cetuximab.

15 A menos que se indique lo contrario en la presente memoria descriptiva, la expresión "medir el nivel de expresión del gen; o el nivel de expresión o actividad de la proteína del gen" utilizada en la presente memoria descriptiva significa detectar un objetivo que se ha de detectar en la muestra correspondiente.

En la presente divulgación, el objetivo que se ha de detectar es ARNm y/o proteína del gen correspondiente en la muestra. Es decir, si el gen se expresa o no puede verificarse detectando ARN como producto de transcripción del gen o proteína (preferentemente, la forma activa) como producto génico.

20 La detección del ARN o la proteína puede implementarse generalmente extrayendo el ARN o la proteína de la muestra para detectar el ARN o la proteína del extractor. La detección del ARN o la proteína puede medirse mediante un método analítico inmunológico, una reacción de hibridación y una reacción de amplificación, pero no se limita a los mismos y puede implementarse fácilmente usando diversas técnicas conocidas en la técnica.

25 Adicionalmente, de acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, el agente que mide el nivel de expresión génica incluye oligonucleótido antisentido, un par de cebadores o una sonda que se une específicamente al ARNm del gen.

30 El agente que mide la expresión del ARNm se selecciona entre el grupo que consiste en oligonucleótido antisentido, un par de cebadores, una sonda y una combinación de los mismos que son específicos del gen. Es decir, la detección de ácido nucleico puede realizarse mediante una reacción de amplificación usando uno o más cebadores oligonucleotídicos que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que codifica el gen o un material complementario de la molécula de ácido nucleico.

35 Por ejemplo, la detección del ARNm usando el cebador puede realizarse verificando si el gen se amplifica mediante un método conocido en la técnica después de amplificar una secuencia génica usando el método de amplificación tal como PCR.

40 Adicionalmente, de acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, el agente que mide el nivel de expresión o actividad de la proteína incluye un anticuerpo, un péptido o un nucleótido que se une específicamente a la proteína.

45 El agente que mide el nivel de expresión o actividad de la proteína significa un anticuerpo que se une específicamente a la proteína e incluye un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante y una combinación de los mismos.

50 El anticuerpo incluye no solo el anticuerpo policlonal, el anticuerpo monoclonal, el anticuerpo recombinante y una forma completa que tiene dos cadenas ligeras con la longitud completa y dos cadenas pesadas con la longitud completa, sino también fragmentos funcionales de las moléculas de anticuerpo, por ejemplo, Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> y Fv. Los anticuerpos pueden prepararse fácilmente usando una técnica bien conocida en la materia y pueden usarse anticuerpos que se preparan y se comercializan en el mercado.

55 La composición de la presente divulgación puede incluir adicionalmente marcadores que pueden medir cuantitativa o cualitativamente la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, herramientas generales utilizadas en el análisis inmunológico, reactivos y similares, así como el agente para medir si el gen descrito anteriormente se expresa o no.

60 Los marcadores que pueden medir cuantitativa o cualitativamente la formación del complejo antígeno-anticuerpo incluyen enzimas, sustancias fluorescentes, ligandos, sustancias luminiscentes, micropartículas, moléculas redox, isótopos radiactivos y similares, y no se limitan necesariamente a los mismos. Las enzimas que pueden usarse como marcador de detección incluyen β-glucuronidasa, β-D-glucosidasa, β-D-galactosidasa, ureasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa, glucosa oxidasa, hexocinasa y GDPasa, RNasa, glucosa oxidasa y luciferasa, fosfofructocinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa, fosfoenolpiruvato descarboxilasa, β-lactamasa y similares, y no se limitan a los mismos. Las sustancias fluorescentes incluyen fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, fluorescamina y similares, y no se limitan a los mismos.

65 Los ligandos incluyen derivados de biotina y similares, y no se limitan a los mismos. Las sustancias luminiscentes incluyen éster de acridinio, luciferina, luciferasa y similares, y no se limitan a los mismos. Las micropartículas incluyen

oro coloidal, látex coloreado y similares, y no se limitan a los mismos. Las moléculas redox incluyen ferroceno, compuestos de complejo de rutenio, viológeno, quinona, iones de Ti, iones de Cs, diimida, 1,4-benzoquinona, hidroquinona,  $K_4W(CN)_8$ ,  $[Os(bpy)_3]^{2+}$ ,  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ,  $[MO(CN)_6]^{4-}$  y similares, y no se limitan a los mismos. Los isótopos radiactivos incluyen  $^3H$ ,  $^{14}C$ ,  $^{32}P$ ,  $^{35}S$ ,  $^{36}Cl$ ,  $^{51}Cr$ ,  $^{57}Co$ ,  $^{58}Co$ ,  $^{59}Fe$ ,  $^{90}Y$ ,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{186}Re$  y similares, y no se limitan a los mismos.

5

Un ejemplo de la herramienta o el reactivo incluye vehículos adecuados, agentes solubilizantes, detergentes, agentes tamponantes, estabilizadores y similares, pero no se limita a los mismos. Cuando el marcador es la enzima, puede incluirse una sustancia y un inactivador que pueden medir la actividad enzimática. Los vehículos incluyen un vehículo soluble y un vehículo insoluble. Un ejemplo del vehículo soluble incluye una solución tampón que es fisiológicamente aceptable y conocida en la técnica, por ejemplo, PBS y un ejemplo del vehículo insoluble puede incluir poliestireno, polietileno, polipropileno, poliéster, poliacrilonitrilo, fluororresina, dextrano reticulado, polisacárido y otros papeles, vidrio, metal, agarosa y una combinación de los mismos.

10

Puesto que la composición de la presente divulgación usa el biomarcador mencionado anteriormente, la divulgación del contenido duplicado se omite para evitar la excesiva complejidad de la presente memoria descriptiva.

15

En otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un kit para predecir la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR que incluye la composición.

20

El kit puede incluir una herramienta, un reactivo y similares, que generalmente se usan en la técnica para el análisis inmunológico, así como el agente que mide la expresión del gen; o el nivel de expresión o actividad de la proteína del mismo.

25

Un ejemplo de la herramienta o el reactivo incluye vehículos adecuados, marcadores capaces de generar una señal detectable, cromóforos, agentes solubilizantes, detergentes, agentes tamponantes, estabilizadores y similares, pero no se limita a los mismos. Cuando el marcador es la enzima, puede incluirse una sustancia y un inactivador que pueden medir la actividad enzimática. Los vehículos incluyen un vehículo soluble y un vehículo insoluble. Un ejemplo del vehículo soluble incluye una solución tampón que es fisiológicamente aceptable y conocida en la técnica, por ejemplo, PBS y un ejemplo del vehículo insoluble puede incluir poliestireno, polietileno, polipropileno, poliéster, poliacrilonitrilo, fluororresina, dextrano reticulado, polisacárido, polímeros tales como partículas magnéticas que aplican un metal como baño sobre el látex y otros papeles, vidrio, metal, agarosa y una combinación de los mismos.

30

Puesto que el kit de la presente divulgación usa el biomarcador y la composición mencionados anteriormente como la configuración, la divulgación del contenido duplicado se omite para evitar la excesiva complejidad de la presente memoria descriptiva.

35

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un potenciador de la susceptibilidad al cetuximab, que incluye cetuximab y un inhibidor de la expresión de un gen de RON (Receptor de Origen Nantais, NM\_002447.1); o la expresión o actividad de la proteína del gen, para su uso en el tratamiento del cáncer de colon en un sujeto, en el que el gen KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, N.º de acceso de Gene Bank NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), N.º de acceso de Gene Bank NP\_002515.1) o BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, N.º de acceso de Gene Bank NP\_004324.2) del sujeto es un gen de tipo silvestre, en el que el inhibidor es ARN de interferencia pequeño (ARNip) o Merestinib (LY2801653).

45

De acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, cuando el gen KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), NP\_002515.1) o BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, NP\_004324.2) es de tipo silvestre, el objetivo predice la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR y puede aplicarse a un caso en el que las células cancerosas con mutación KRAS, NRAS o BRAF no consiguen el efecto deseado.

50

De acuerdo con la presente divulgación, en células cancerosas con un gen KRAS, NRAS o BRAF de tipo silvestre en las que se expresa la actividad del gen de RON y una proteína activa como un producto del mismo, un resultado muestra que una tasa de mortalidad de las células cancerosas por el cetuximab disminuye significativamente en comparación con las células antineoplásicas en las que no se expresa la actividad del gen de RON y la proteína activa.

55

Adicionalmente, en la presente divulgación, en las células cancerosas con un gen KRAS, NRAS o BRAF de tipo silvestre en las que se expresa la actividad del gen de RON y la proteína activa como producto de la misma, cuando la expresión del gen de RON; o la expresión o actividad de la proteína se inhibe, un resultado muestra que la tasa de mortalidad de las células cancerosas por cetuximab aumenta significativamente.

60

En consecuencia, esto indica que la susceptibilidad de las células cancerosas al cetuximab se potencia por la presencia del gen KRAS, NRAS o BRAF de tipo silvestre (normal) (expresión y función normales del gen normal); y la inhibición de la expresión del gen de RON, y la presente divulgación proporciona un efecto excelente de potenciación de la susceptibilidad del objetivo al agente dirigido contra EGFR basada en el mismo.

65

- El potenciador de la susceptibilidad o la composición para potenciar la presente divulgación puede incluir adicionalmente un vehículo que sea farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable que puede usarse en la presente divulgación puede usarse mediante la selección de excipientes generales, disgregantes, aglutinantes, lubricantes y otros aditivos, por ejemplo, estabilizantes, relajantes, emulsionantes y similares. Por ejemplo, como excipientes, pueden usarse celulosa microcristalina, lactosa, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución y similares, y como disgregantes, pueden usarse glicolato sódico de almidón, fosfato de calcio dibásico anhidro y similares. Como aglutinantes, pueden usarse polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución y similares, y los lubricantes pueden usarse y seleccionarse entre estearato de magnesio, dióxido de silicio, talco y similares.
- En la presente divulgación, la presencia del gen KRAS, NRAS o BRAF de tipo silvestre y la inhibición de la expresión del gen de RON reducen el crecimiento de las células cancerosas en el tratamiento del agente dirigido contra EGFR, cetuximab.
- La expresión del gen de RON es inhibida por uno o más seleccionados entre el grupo que consiste en ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), microARN (miARN), ribozima, ADNzima, ácidos peptidonucleicos (PNA), oligonucleótidos antisentido, anticuerpos, aptámeros, extractos naturales y sustancias químicas que se unen específicamente al ARNm del gen de RON.
- La expresión del gen de RON es inhibida por, más preferentemente, oligonucleótido antisentido, aptámeros, ARNip, ARNhc o miARN y, más preferentemente, ARNip u oligonucleótido antisentido y, mucho más preferentemente, ARNip o Merestinib (LY2801653).
- El término "ARNip" utilizado en la presente memoria descriptiva significa un pequeño fragmento de ARN con un tamaño de 21 a 25 nucleótidos generado cuando un ARN bicatenario es escindido por un dicer e inhibe la expresión al unirse específicamente al ARNm que tiene una secuencia complementaria. A los efectos de la presente divulgación, el término "ARNip" significa inhibir la expresión del gen uniéndose específicamente al ARNm de RON. El ARNip puede sintetizarse química o enzimáticamente. Un método de preparación del ARNip no se limita en particular y puede usar un método conocido en la técnica.
- De acuerdo con la realización preferida de la presente divulgación, el ARNip incluye una secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 13.
- La expresión "oligonucleótido antisentido" utilizada en la presente memoria descriptiva es una secuencia nucleotídica que inhibe la expresión unida complementariamente al miARN y no se limita a la misma, pero incluye ARN antisentido, ADN antisentido y ARNm antagonista.
- Puesto que la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR, cetuximab, se potencia mediante el uso del nivel de expresión del biomarcador mencionado anteriormente en el método de la presente divulgación, la divulgación del contenido duplicado se omite para evitar la excesiva complejidad de la presente memoria descriptiva.
- En incluso otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con la desregulación de una vía de señalización de EGFR, que incluye un potenciador de la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR mencionado anteriormente y al agente dirigido contra EGFR como ingredientes activos.
- En la presente divulgación, las enfermedades relacionadas con la desregulación de la vía de señalización de EGFR son cáncer, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, fibrosis y regeneración renal, enfermedad hepática, enfermedad alérgica, enfermedad inflamatoria, trastorno autoinmunitario, enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardiovascular o síntomas asociados al trasplante de órganos y, preferentemente, cáncer.
- Es decir, el inhibidor de la expresión del gen de RON (Receptor de Origen Nantais, NM\_002447.1) como potenciador de la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR de la presente divulgación; o la expresión o actividad de la proteína del gen aumenta la susceptibilidad al antineoplásico y aumenta los efectos antineoplásicos de los agentes antineoplásicos cuando se administran junto con los agentes antineoplásicos para facilitar más el tratamiento del cáncer.
- El "cáncer", que es la enfermedad que debe mejorarse, prevenirse o tratarse mediante la composición de la presente divulgación, significa un nombre común de enfermedades provocadas por células que tienen una característica agresiva en la que las células se dividen y crecen independientemente de un límite de crecimiento normal, una característica invasiva en la que las células invaden el tejido ambiental y una característica metastásica en la que las células se propagan a otras partes del cuerpo. En la presente memoria descriptiva, el cáncer se usa con el mismo significado que tumor maligno.
- El cáncer al que se aplica la composición de la presente divulgación incluye cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer hemático, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer

de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, sarcoma uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de ano, cáncer de colon, carcinoma de trompa de Falopio, carcinoma de endometrio, cáncer de cuello de útero, cáncer del intestino delgado, cáncer endocrino, cáncer de tiroides, cáncer paratiroideo, cáncer suprarrenal, tumor de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de próstata, cáncer broncogénico, tumor de médula ósea y similares, pero no se limita a los mismos.

Preferentemente, la composición de la presente divulgación puede aplicarse para prevenir o tratar el cáncer de colon.

El término "prevención" en la presente memoria descriptiva significa que no se ha diagnosticado que las enfermedades o los trastornos se conserven, sino que se suprime la generación de las enfermedades o los trastornos en animales que son susceptibles a las enfermedades o los trastornos. El término "tratamiento" en la presente memoria descriptiva significa (i) supresión del desarrollo de las enfermedades o los trastornos; (ii) reducción de las enfermedades o los trastornos; y (iii) retirada de las enfermedades o los trastornos.

Adicionalmente, la composición de la presente divulgación puede incluir adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El vehículo farmacéuticamente aceptable incluido en la composición farmacéutica de la presente divulgación se usa generalmente en la preparación, e incluye lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio, aceites minerales y similares, pero no se limita a los mismos. La composición farmacéutica de la presente divulgación puede incluir adicionalmente un lubricante, un agente humectante, un edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, una suspensión, un conservante y similares distintos de los componentes. El vehículo y agente farmacéuticamente aceptable adecuado se desvela en detalle en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19ª ed., 1995).

Puede prescribirse una dosificación adecuada de la composición farmacéutica de la presente divulgación por diversos métodos de acuerdo con factores, tales como métodos de formulación, métodos de administración, edad del paciente, peso corporal, sexo, morbilidad, alimentos, tiempo de administración, una vía de administración, una tasa de excreción y susceptibilidad de respuesta.

Mientras tanto, la dosificación de la composición farmacéutica de la presente divulgación es preferentemente de 0.001 a 1000 mg/kg (peso) por día.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse por vía oral o por vía parenteral, y en el caso de la administración parental, la composición farmacéutica puede administrarse por inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, administración dérmica y similares. Se prefiere que la vía de administración se determine de acuerdo con un tipo de enfermedad a la que se aplica la composición farmacéutica de la presente divulgación.

La concentración del gen correspondiente o el inhibidor de la expresión de la proteína del mismo en el potenciador como principio activo incluido en la composición de la presente divulgación se determina considerando un propósito terapéutico, la afección de un paciente, un período requerido, la gravedad de la enfermedad y similares, y no se limita a una concentración en un intervalo predeterminado.

La composición farmacéutica de la presente divulgación se formula usando el vehículo y/o el excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con un método que los expertos en la materia pueden implementar fácilmente para prepararlos en una forma de capacidad unitaria o insertar en un recipiente de gran capacidad que se ha de preparar. En este caso, la formulación puede ser una solución en aceite o un medio acuoso, una suspensión o una emulsión, o un agente X, un polvo, un gránulo, un comprimido o una cápsula, y puede incluir adicionalmente un agente dispersante o un agente estabilizante.

Puesto que la composición de la presente divulgación mejora la muerte celular de las células cancerosas mediante el uso del agente dirigido contra EGFR como el potenciador de susceptibilidad mencionado anteriormente y el agente antineoplásico, la divulgación del contenido duplicado se omite para evitar la excesiva complejidad de la presente memoria descriptiva.

En incluso otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un método de predicción de la susceptibilidad al cetuximab de un sujeto con cáncer de colon, que incluye:

(a) aplicar la composición como se ha definido anteriormente a una muestra biológica de un sujeto y medir un nivel de expresión de un gen de RON (Receptor de Origen Nantais, NM\_002447.1); o un nivel de expresión o actividad de una proteína del gen en la muestra biológica; y un nivel de expresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo que consiste en genes KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, N.º de acceso de Gene Bank NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), N.º de acceso de Gene Bank NP\_002515.1), BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, N.º de

acceso de Gene Bank NP\_004324.2), EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico, N.º de acceso de Gene Bank U48722.1), Adam11 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 11, N.º de acceso de Gene Bank NM\_002390.4), Adam32 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 32, N.º de acceso de Gene Bank NM\_145004.5), FZD4 (receptor 4 de la familia Frizzled, N.º de acceso de Gene Bank NM\_012193.2), GPER (receptor de estrógenos 1 acoplado a proteína G, NM\_001505.2) y GPR101 (receptor 101 acoplado a proteína G, N.º de acceso de Gene Bank NM\_054021.1); o un nivel de expresión o actividad de una proteína de los genes, en la muestra biológica; y

(b) determinar la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR, cetuximab, del sujeto basándose en el resultado verificado del nivel medido en la etapa (a).

De acuerdo con la realización preferida de la presente invención, el objetivo tiene un gen de tipo silvestre tal como KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), NP\_002515.1) o BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, NP\_004324.2).

El método de predicción de la presente divulgación está constituido por la inclusión de procesos para determinar que la muestra correspondiente tiene susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR cuando la expresión o la actividad del gen o la proteína divulgados se inhibe o reduce en comparación con una muestra normal después de obtener una muestra biológica de un paciente objetivo, y medir si se expresa un gen o una pluralidad de genes seleccionados entre el grupo que consiste en los genes mencionados anteriormente en la muestra; y determinar que la muestra correspondiente tiene resistencia al agente dirigido contra EGFR cuando la expresión o la actividad del gen o la proteína divulgados aumentan o se potencian.

El método de predicción de la presente divulgación caracteriza que si un gen o una proteína específicos (preferentemente, una forma activa) se expresan en la muestra es un índice de susceptibilidad al agente antineoplásico de las células cancerosas.

De acuerdo con la realización preferida de la presente divulgación, en la etapa (a), un nivel de expresión de cualquier gen seleccionado entre el grupo que consiste en genes EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, N.º de acceso de Gene Bank U48722.1), Adam11 (dominio de metalopeptidasa ADAM 11, NM\_002390.4), Adam32 (dominio de metalopeptidasa ADAM 32, NM\_145004.5), FZD4 (receptor 4 de la familia Frizzled, NM\_012193.2), GPER (receptor de estrógenos 1 acoplado a proteína G, NM\_001505.2) y GPR101 (receptor 101 acoplado a proteína G, NM\_054021.1) y una combinación de los mismos; se mide adicionalmente un nivel de expresión o actividad de la proteína del gen.

De acuerdo con la realización preferida de la presente divulgación, en la etapa (b), cuando el nivel de expresión del gen de RON; o el nivel de expresión o actividad de la proteína del mismo es bajo en comparación con el nivel normal, se determina que existe la susceptibilidad (susceptibilidad) al agente dirigido contra EGFR del objetivo.

De acuerdo con la realización preferida de la presente divulgación, en la etapa (b), cuando el nivel de expresión del gen de RON; o el nivel de expresión o actividad de la proteína del mismo es alto en comparación con el nivel normal, se determina que existe la resistencia al agente dirigido contra EGFR del objetivo.

De acuerdo con la realización preferida de la presente divulgación, cuando el nivel de expresión de un gen cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en los genes Adam11, Adam32, FZD4, GPER, GPR101 y una combinación de los mismos; un nivel de expresión o actividad de la proteína del gen es bajo en comparación con un nivel normal, se determina que existe la susceptibilidad (susceptibilidad) al agente dirigido contra EGFR, cetuximab, del objetivo.

Más en particular, en la etapa (b) de la presente divulgación, basándose en el resultado del nivel de expresión medido en la etapa (a), cuando se verifica que se incluye el gen KRAS, NRAS o BRAF de tipo silvestre y el nivel de la actividad del gen de RON y la proteína activa que es el producto del mismo se inhibe y/o reduce en comparación con un valor normal (tipo silvestre), se determina que las células tumorales correspondientes obtenidas del paciente objetivo tienen la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR como agente antineoplásico. En este caso, adicionalmente, cuando el nivel de expresión de un gen cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en los genes Adam11, Adam32, FZD4, GPER y GPR101 y una combinación de los mismos; se mide el nivel de expresión o actividad de la proteína del gen y se determina que el nivel se inhibe y/o reduce en comparación con un valor normal (tipo silvestre), se determina que las células tumorales correspondientes se obtuvieron del paciente objetivo tienen la susceptibilidad (susceptibilidad) al agente dirigido contra EGFR, cetuximab, como agente antineoplásico.

En la presente memoria descriptiva, la expresión "baja expresión" o "baja actividad" utilizada al mencionar el nivel de expresión de los genes se conoce como un valor del biomarcador detectado en la muestra biológica obtenida de un objetivo sano o normal o un objetivo como objetivo de comparación o un valor o nivel del biomarcador en la muestra biológica que es inferior a un intervalo de nivel, cuando el biomarcador representa un proceso anormal, una enfermedad u otras afecciones en el objetivo o un síntoma de los mismos. Adicionalmente, la expresión "baja expresión" o "baja actividad" puede denominarse "nivel diferencial", "valor diferencial" o "expresado de manera diferente" en comparación con el nivel o valor de expresión "normal" del biomarcador e incluye tanto una diferencia

cuantitativa como una diferencia cualitativa en la expresión.

De acuerdo con la realización preferida de la presente invención, la medición del nivel de expresión del gen de RON; o el nivel de expresión o actividad de la proteína del gen incluye adicionalmente medir si hay presente una variante de corte y empalme o un mutante del gen.

De acuerdo con la presente divulgación, la presencia de la variante del gen o uno o más mutantes en el gen hace que un cambio en el aspecto de expresión del gen tenga un efecto sobre la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR (véase el Ejemplo 3).

El término "variante" utilizado en la presente memoria descriptiva significa isoforma RON generada cuando un sitio de exón del gen correspondiente se retira mediante un corte y empalme alternativo, y un grado de actividad del RON se ajusta mediante un corte y empalme alternativo, que es uno de los procesos importantes de la regulación de la expresión génica en eucariotas.

RON $\Delta$ 155 (como alternativa, RON Delta 155), RON $\Delta$ 160 (como alternativa, RON Delta 160) y RON $\Delta$ 165 (como alternativa, RON Delta 165) utilizados en la presente divulgación se generan saltando los exones a través del corte y empalme y siempre se activan estructuralmente sin ligandos.

De acuerdo con la presente divulgación, las variantes de corte y empalme en las que los exones se suprimen mediante un mecanismo de corte y empalme alternativo del RON tienen diferentes sensibilidades al fármaco de acuerdo con la expresión del mismo.

El término "mutante" o "variante" utilizado en la presente memoria descriptiva incluye sustitución, supresión, inserción, amplificación y reordenamiento de bases del nucleótido y la secuencia de aminoácidos del gen correspondiente. La variante de nucleótidos se denomina cambio (por ejemplo, inserción, supresión, inversión o sustitución de uno o más nucleótidos, por ejemplo, un único polimorfismo de nucleótidos (SNP)), en la secuencia nucleotídica para una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de tipo silvestre). El término incluye un cambio correspondiente de un complemento de la secuencia nucleotídica a menos que se muestre lo contrario. La variante de nucleótidos puede ser una mutación somática o un patrón de polimorfismo.

Adicionalmente, la variante de aminoácidos se denomina cambio (por ejemplo, inserción, sustitución o delección de uno o más aminoácidos, por ejemplo, delección interna o truncamiento del extremo N o C) de la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia (por ejemplo, la secuencia de tipo silvestre).

En la realización de la presente divulgación, el mutante es mutantes puntuales E387A y H424L en los que un aminoácido está sustituido.

Adicionalmente, se verificó que el sitio E387 y el sitio H424 del aminoácido de la proteína RON son sitios capaces de unirse a la proteína EGFR.

La detección de la variante puede realizarse mediante clonación de moléculas objetivo y análisis de secuencia usando una técnica bien conocida en la materia. Por ejemplo, análisis de secuencia de ADN; ensayo de extensión de cebador que incluye ensayo de mezcla de nucleótidos específicos de alelo y ensayo de extensión de cebador específico de alelo (por ejemplo, PCR específica de alelo, reacción en cadena de ligadura específica de alelo (LCR) y hueco-LCR); ensayo de hibridación de oligonucleótidos específico de alelo (por ejemplo, ensayo de ligadura de oligonucleótidos); un ensayo de protección contra escisión que detecta nucleótidos no apareados en una doble cadena de ácido nucleico mediante el uso de protección contra un escindidor; Análisis de unión a proteína MutS; análisis por electroforesis que compara la movilidad de una variante y una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre; electroforesis en gel con gradiente de deformación (DGGE, por ejemplo, igual que la bibliografía [Myers et al, (1985) *Nature* 313: 495]); se incluye un análisis de escisión por ARNasa en pares de nucleótidos no apareados; un análisis de escisión química o enzimática de un ADN hetero bicatenario; espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI TOF); un análisis de bits genéticos (GBA); un ensayo de nucleasas 5' (por ejemplo, TaqMan); y un ensayo usando baliza molecular, pero los métodos no se limitan a los mismos.

La expresión "muestra biológica" utilizada en la presente memoria descriptiva significa todas las muestras obtenidas del objetivo en las que puede detectarse la expresión del biomarcador de la presente divulgación.

De acuerdo con la realización preferida de la presente divulgación, la muestra biológica es una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en saliva, biopsia, sangre, tejido cutáneo, cultivo líquido, heces y orina, y no se limita en particular a los mismos, y puede tratarse y prepararse mediante un método que se usa generalmente en la técnica.

Puesto que el método de la presente divulgación determina que existe la susceptibilidad mediante el uso del biomarcador mencionado anteriormente, la divulgación del contenido duplicado se omite para evitar la excesiva complejidad de la presente memoria descriptiva.

En otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un método de potenciación de la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR que incluye: administrar tanto un potenciador de susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR mencionado anteriormente como el agente dirigido contra EGFR al objetivo.

- 5 Puesto que el método de la presente divulgación potencia la susceptibilidad usando el potenciador de susceptibilidad mencionado anteriormente y el agente dirigido contra EGFR como agente antineoplásico, la divulgación del contenido duplicado se omite para evitar la excesiva complejidad de la presente memoria descriptiva.

- 10 En lo sucesivo en el presente documento, estos Ejemplos son solo para describir la presente divulgación con más detalle y será evidente para los expertos en la materia que el alcance de la presente divulgación no se limita a estos Ejemplos de acuerdo con la esencia de la presente divulgación.

### Método y condiciones experimentales

- 15 Método de inmunoprecipitación

Con el fin de analizar una forma activa de RON en una estirpe celular de cáncer de colon, después de mezclar 500 µg de un lisado de la estirpe celular de cáncer de colon con 1 µg de un anticuerpo anti-RON, cultivado durante 12 horas a 4 °C, se añadieron 20 µl de una perla de proteína-sepharose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) y después la mezcla reaccionó adicionalmente durante 2 horas. El inmunoprecipitado se lavó con una solución de tampón (tampón de lisis Nondiet P-40) cinco veces, se añadió y se calentó con 20 µl de una solución de muestra 2XSDS y después se realizó la transferencia Western usando anticuerpos anti-RON (Santa Cruz Biotechnology) y anti-fosfo-Tirosina (Cell Signaling, Beverly, CA, EE.UU.).

- 25 Con el fin de analizar la interacción de RON y EGFR endógenos, se mezclaron 300 µg de un lisado de una estirpe celular HCT-8 con 1 µg de un anticuerpo anti-RON o 1 µg de un anticuerpo IgG anti-conejo, cultivado durante 12 horas a 4 °C, se añadieron 20 µl de la perla de proteína-sepharose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) y después la mezcla reaccionó adicionalmente durante 2 horas. El inmunoprecipitado se lavó con una solución de tampón (tampón de lisis Nondiet P-40) cinco veces, se añadió y se calentó con 20 µl de una solución de muestra 2XSDS y después se realizó la transferencia Western usando anticuerpos anti-RON (Santa Cruz Biotechnology) y anti-EGFR (Cell Signaling, Beverly, CA, EE.UU.). Con el fin de analizar la interacción de RON y EGFR exógenos, se transfeció una variante Δ160 como una forma activa de RON en una estirpe celular de cáncer de colon LoVo sin expresar la proteína RON en sí, se recogió un lisado celular después de 48 horas, se mezclaron 300 µg del lisado celular con 1 µg de un anticuerpo anti-RON o 1 µg de un anticuerpo IgG anti-conejo, cultivado durante 12 horas a 4 °C, se añadieron 20 µl de la perla de proteína-sepharose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) y después la mezcla reaccionó adicionalmente durante 2 horas. El inmunoprecipitado se lavó con una solución de tampón (tampón de lisis Nondiet P-40) cinco veces, se añadió y se calentó con 20 µl de una solución de muestra 2XSDS y después se realizó la transferencia Western usando anticuerpos anti-RON (Santa Cruz Biotechnology) y anti-EGFR (Cell Signaling, Beverly, CA, EE.UU.).

40

### Análisis de micromatrices

Una estirpe celular de cáncer de colon Colo320HSR sin expresar la proteína RON se transfeció durante 48 horas con una construcción (plásmido) que expresa la forma activa de RON Δ160 y/o c-MET. Posteriormente, el lisado de las células fue analizado mediante una micromatriz.

45

### \* Métodos de sobreexpresión y supresión de genes

Con el fin de analizar la interacción de RON y EGFR exógenos, una construcción que expresa Δ160 como una forma activa de RON se transfeció durante 48 horas en una estirpe celular de cáncer de colon LoVo en la que la proteína RON no se expresaba.

50

Con el fin de analizar la interacción endógena de RON y EGFR, se transfeció ARNip de RON (ARN de interferencia pequeño) durante 48 horas en la estirpe celular de cáncer de colon HCT-8 en la que se activó RON.

55

La secuencia de ARNip de RON (SEQ ID NO:13) es como se indica a continuación: 5'-ACUUUGUAGAGGAGUUUGAUU-3'.

### Transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés)-PCR y PCR en tiempo real

60

Con el fin de realizar la RT-PCR, la estirpe celular de cáncer de colon Colo320HSR en la que el RON no se expresó se transfeció con una construcción que expresaba el RONΔ160 como la forma de tipo activo RON durante 48 horas y la estirpe celular de cáncer de colon KM12C en la que se activó el RON se transfeció con el ARNip de RON durante 48 horas. El ARN se extrajo usando trizol (n.º de cat. 15596-026, Life technologies™), respectivamente. El ARN extraído se sintetizó a ADNc usando un kit de RT-PCR (AccuPower RT PreMix, Bioneer). La diferencia en la expresión del gen correspondiente se verificó por PCR (AccuPower PCRPreMix, Bioneer) usando el ADNc sintetizado y un

65

## ES 2 750 832 T3

cebador específico del gen y cuantificado usando una PCR en tiempo real (LightCycler 480 SYBR Green, Roche).

[Tabla 1]

Secuencias de cebadores		
Genes	Directo	Inverso
Adam11	5'- TGGCTTCCTCCTCTGTG TCAA-3' (SEQ ID NO: 1)	5'- GCACTTCCCTTCATTG CTGC-3' (SEQ ID NO: 2)
Adam32	5'- AATGGCAGATTGGAGG GAAATG-3' (SEQ ID NO: 3)	5'- TTCATAGCAGGCAAAT GGAGCA-3' (SEQ ID NO: 4)
FZD4	5'- TGACTGGCTTGTGCTA TGTTGG-3' (SEQ ID NO: 5)	5'- ATGCCTGAAGTGATGC CCAC-3' (SEQ ID NO: 6)
GPR101	5'- GGCAGAATGGAAGCC AAGGA-3' (SEQ ID NO: 7)	5'- TTGCTGTTACGACGAC TGGGTG-3' (SEQ ID NO: 8)
GPER	5'- ATCGTGCCCTTCGCCA TCAT-3' (SEQ ID NO: 9)	5'- CCAGTCGTGAGGTTTC CTAAGCAG-3' (SEQ ID NO: 10)
GAPDH	5'- AGAAGGCTGGGGCTCA TTTG-3' (SEQ ID NO: 11)	5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3' (SEQ ID NO: 12)

[Tabla 2]

Condiciones de Transcripción inversa - PCR (reacción en cadena de la polimerasa)	
42 °C	90 °C
60 min	5 min

[Tabla 3]

Condiciones de PCR				
1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C

(continuación)

Condiciones de PCR				
1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
5 min	30 s	1 min	1 min	10 min

[Tabla 4]

Condiciones de PCR en tiempo real cuantitativa

1 ciclo	50 ciclo			1 ciclo
95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C
5 min	30 s	30 s	1 min	10 min

### Transferencia Western

- 5 Para realizar la transferencia Western, una proteína separada de cada célula se separó a través de SDS-PAGE y se transfirió a membranas Polyscreen (New England Nuclear, Boston, MA, EE.UU.), reaccionó durante 12 horas a 4 °C mediante el uso de diversos anticuerpos (anti-fosfo RON (MyBioSource, San Diego, California, EE.UU.), anti-fosfo-tirosina, anti-EGFR, anti-fosfo EGFR (Cell signaling Technology, Beverly, MA, EE.UU.), anti-RON y anti-r-tubulina (Santa Cruz Biotechnology) y después se lavó con una solución de tampón 1XTBS-T durante 10 minutos tres veces. Un anticuerpo secundario anti-HRP de conejo o HRP anti-ratón adecuado reaccionó durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavó con la solución de tampón 1XTBS-T durante 10 minutos tres veces para verificar la expresión de la proteína usando una solución de ECL (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido).

### Matriz de fosfo-RTK

- 15 Después de que la construcción  $\Delta 160$  como la forma activa de RON se transfectase durante 48 horas en la estirpe celular Colo320HSR sin expresar la proteína RON, se recogió el lisado celular. Se hicieron reaccionar 50  $\mu\text{g}$  del lisado celular recogido con una membrana incluida en un kit de matriz fosfo-RTK humano (R&D Systems, Inc, Mineápolis, MN, EE.UU.) durante 12 horas a 4 °C, se lavaron con una solución de tampón TBS-T tres veces, se hicieron reaccionar con un anticuerpo anti-fosfo-tirosina HRP durante 2 horas a temperatura ambiente y después se lavaron con la solución de tampón TBS-T tres veces. Posteriormente, en la membrana, se verificó un cambio en la expresión de las proteínas tirosina cinasa receptoras (RTK) mediante el uso de la solución ECL (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido).

### Tratamiento de agente antineoplásico

- 25 Después de que se aplicasen como tratamiento 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cetuximab (Merck & Co., Inc, NJ, EE.UU.) durante 48 horas en estirpes celulares de cáncer de colon CaCo2 y LIM1215 en las que el RON no se activó y una estirpe celular KM12C en la que se activó el RON, se recogió una solución celular para realizar el recuento de azul de tripano (FIG. 3A).
- 30 La estirpe celular de cáncer de colon KM12C en la que se activó el RON se trató con ARNip de RON durante 48 horas, se trató con 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cetuximab durante 48 horas y después se recogió la solución celular para realizar el recuento de azul de tripano.

### Tratamiento de inhibidor

- 35 Se aplicaron como tratamiento 3  $\mu\text{m}$  de un inhibidor de RON (LY2801653) y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de un agente dirigido contra EGFR (cetuximab) durante 48 horas en la estirpe celular de cáncer de colon KM12C en la que se activó el RON. Después del tratamiento, el lisado celular se recogió para realizar el recuento de azul de tripano.
- 40 Adicionalmente, se aplicaron como tratamiento narnatumab (N.º de Creative Diagnostic TAB-184 Anticuerpo terapéutico Anti-RON Humano) como agente antineoplásico de anticuerpo dirigido contra RON y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de un agente dirigido contra EGFR (cetuximab) durante 48 horas. Después del tratamiento, el grado de inducción de muerte celular se verificó mediante el mismo método que anteriormente.

### 45 Mutagénesis de mutante puntual

La mutagénesis se realizó de acuerdo con una directriz proporcionada por el kit usando un kit de mutagénesis muta-directa (Intron, N.º de Cat 15071). Las secuencias de cebadores utilizadas en la mutagénesis son las siguientes.

- 50 RON (E387A); Directo: 5'-GGA GCG CTG TTG TGC ATC CCC AGT CCA TCC-3', Inverso: 5'-GGA TGG ACT GGG GAT GCA CAA CAG CGC TCC-3', RON(H424L); Directo: 5'-ACA CCA GCT GCC GCC TCT TCC CTC TGC TGG-3', Inverso: 5'-CCA GCA GAG GGA AGA GGC GGC AGC TGG TGT-3', RON(K1114M); Directo: 5'-AAT GTG CCA TCA TGT CAC TAA GTC G-3', Inverso: 5'-CGA CTT AGT GAC ATG ATG GCA CAT T-3', EGFR (D813N); Directo: 5'-TTG GTG CAC CGC AAC CTG GCA GCC AGG-3', Inverso: 5'-CCT GGC TGCCAG GTT GCG GTG CAC CAA-3'.

- 55 La mutación progresó usando el cebador y una enzima muta-directa y después la transformación progresó en E-Coli. Después de que se extrajese el ADN de las colonias, se verificó la mutación mediante un método de análisis de secuenciación.

### 60 Análisis de la actividad de RON en la estirpe celular de cáncer de colon o en el tejido del paciente con cáncer de colon

Con el fin de analizar la actividad de RON, después de que se extrajese una proteína de una estirpe celular o del tejido

de un paciente de cáncer de colon (mediante el uso de un tampón de RIPA), se verificó la actividad usando un anticuerpo fosfo-RON (Mybiosource, MBS462024, factor de dilución 1:1000) en 20 µg de las células y 50 µg del tejido del paciente con cáncer de colon.

5 Adicionalmente, después de realizar la inmunoprecipitación con el anticuerpo RON (santa cruz; sc-322, n.º de Lote G1514, 2 µg, incubación de 2 días) (usando 300 µg de la estirpe celular y el tejido del paciente con cáncer de colon), se verificó la fosforilación mediante un anticuerpo fosfo-tirosina (Cell signaling; 9411, factor de dilución 1:1000). Con el fin de verificar RONΔ155 y RONΔ160 (forma de corte y empalme alternativa) que eran las formas activas de RON, se extrajo ARN de la estirpe celular de cáncer de colon o del tejido del paciente con cáncer de colon con un reactivo de trizol.

Después de analizar el ADNc, el análisis se realizó usando dos cebadores.

15 En primer lugar, se usó un cebador diseñado para distinguir RONΔ155 y RONΔ160 y el cebador fue el siguiente: Directo: 5'-CTCTGGGGACCAGGTTTTCC-3', Retroceso: 5'-ACCATCAATGGCAGGGAGTG-3'. En las condiciones de RT-PCR, se realizaron 37 ciclos durante 5 minutos a 94 °C, durante 30 segundos a 94 °C, durante 30 segundos a 63 °C y durante 1 minuto 30 segundos a 72 °C y se extendieron durante 10 minutos a 72 °C. El RON de tipo silvestre se verificó a 1552 pb, el RONΔ155 se verificó a 1078 pb y el RONΔ160 se verificó a 1225 pb.

20 Con el fin de verificar adicionalmente las condiciones de RT-PCR, se usaron los cebadores publicados en una bibliografía existente y los cebadores fueron los siguientes. Directo: 5'-TGG TCA GTA GCA GCT TCT CA-3', Inverso: 5'-AGG CAG CAG GAT ACC AAG GA-3'. En las condiciones de RT-PCR, se realizaron 38 ciclos durante 5 minutos a 94 °C, durante 30 segundos a 94 °C, durante 45 segundos a 57 °C y durante 1 minuto a 72 °C y se extendieron durante 10 minutos a 72 °C. El RON de tipo silvestre se verificó 1,6 kb, el RONΔ160 se verificó 1,3 kb y el RONΔ155 se verificó 1,1 kb.

### Ejemplo 1. Actividad de EGFR de acuerdo con la actividad de la proteína RON

1-1. Presencia de la forma activa de la proteína RON en la estirpe celular de cáncer de colon humano

30 Los presentes inventores seleccionaron una estirpe celular de cáncer de colon en la que la proteína RON se activó o desactivó y verificaron la fosforilación de RON en un total de 19 estirpes celulares de cáncer de colon humano usando transferencias western.

35 La proteína RON fosforilada se consideró como la proteína de forma activa RON.

Como resultado, como se ilustra en la FIG. 1A, en cuatro estirpes celulares HT-29, KM12C, KM12L4 y SW1417 entre 18 estirpes celulares, se observó la expresión de la proteína RON fosforilada y puede observarse que las cuatro estirpes celulares tenían la actividad RON.

40 Mientras tanto, en las estirpes celulares de cáncer de colon LoVo y Colo320HSR, se demostró que la proteína RON estaba ausente.

1-2. Análisis de la expresión génica de acuerdo con la activación de la proteína RON usando análisis de micromatrices de ADN

45 Con el fin de analizar el nivel de expresión génica de acuerdo con la expresión de RON en la estirpe celular Colo320HSR en la que la proteína RON estaba ausente, los presentes inventores sobreexpresaron simultáneamente la variante Δ160 que era la forma activa de MET y RON en la célula Colo320HSR y después realizaron la micromatriz.

50 La sobreexpresión del gen de RON se consideró como la activación del gen o proteína RON.

Como se ilustra en la FIG. 1B, los genes cambiados solo por la activación de RON se analizaron comparándolos con genes en un grupo de muestra que se sobreexpresó solo con el gen MET y, como resultado, se identificaron cinco genes Adam11, Adam32, FZD4, GPER y GPR101 asociados al EGFR como los genes cambiados por el RON.

55 **1-3.** El análisis en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes relacionados con la transactivación del EGFR de acuerdo con la activación de RON en la estirpe celular de cáncer de colon

60 Con el fin de analizar el cambio en el nivel de expresión de los genes relacionados con la transactivación del EGFR de acuerdo con la activación de RON, los presentes inventores realizaron la PCR en tiempo real con respecto a los cinco genes (Adam11, Adam32, FZD4, GPER y GPR101) asociados a la transactivación del EGFR, que se estimó que la expresión fue cambiada por el RON, después de que la variante Δ160 como la forma de activación de RON se sobreexpresase en la estirpe celular de cáncer de colon Colo320HSR en la que no se expresó el RON.

65 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 1C, se observó que la expresión de los genes Adam11, Adam32, FZD4, GPER y GPR101 aumentó significativamente por la sobreexpresión de RON.

**1-4.** Análisis por RT-PCR (transcripción inversa reacción en cadena de la polimerasa) de genes relacionados con la transactivación del EGFR de acuerdo con la activación de RON en la estirpe celular de cáncer de colon

5 Con el fin de analizar el cambio en el nivel de expresión de los genes relacionados con la transactivación del EGFR de acuerdo con la activación de RON, los inventores realizaron la PCR con respecto a los cinco genes Adam11, Adam32, FZD4, GPER y GPR101 asociados a la transactivación del EGFR, que se estimó que la expresión fue cambiada por el RON, después de la variante  $\Delta 160$  cuando la forma de activación RON del gen de RON se sobreexpresó en la estirpe celular de cáncer de colon Colo320HSR en la que no se expresó el RON.

10 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 1D, mediante la activación de RON, se observó que la expresión de los genes Adam11, Adam32, FZD4, GPER y GPR101 aumentó significativamente en el grupo de muestra en el que la variante  $\Delta 160$ , como la forma de activación de RON del gen de RON, se sobreexpresase.

15 **1-5.** Análisis por PCR en tiempo real de genes relacionados con la transactivación del EGFR en la estirpe celular de cáncer de colon en la que se inhibe RON

Los inventores analizaron la expresión de los genes Adam11, Adam32, FZD4, GPER y GPR101 asociados a la transactivación del EGFR con PCR en tiempo real suprimiendo después artificialmente la actividad de RON mediante el uso de una técnica de ARNip en la estirpe celular de cáncer de colon KM12C en la que se activó el RON, con el fin de analizar el aspecto de cambio de la expresión de los genes relacionados con la transactivación del EGFR de acuerdo con la inhibición del RON.

20 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 1E, se demostró que los genes FZD4 y GPR101 se redujeron significativamente mediante la inhibición de la activación del RON.

**1-6.** Análisis de la actividad de la proteína EGFR por activación de RON

30 Como se ha descrito anteriormente, se verificó que los genes relacionados con la transactivación del EGFR que se identificaron en el Ejemplo 1-2 (FIG. 1B) y se verificaron en los Ejemplos 1-3 a 1-5 (FIG. 1C a 1E) se expresaron mediante la activación de RON. En consecuencia, los inventores verificaron si la proteína fosforilada del EGFR se expresó mediante la transferencia Western después de sobreexpresar la variante  $\Delta 160$  como la forma de activación de RON en la estirpe celular de cáncer de colon Colo320HSR en la que el RON no se expresó para verificar si la activación de la proteína EGFR se indujo de acuerdo con la activación real de RON.

35 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 1F, cuando se activó el RON, se verificó que la proteína fosforilada del EGFR aumentó (a) y se verificó que la fosforilación del EGFR se indujo a través de una matriz de proteínas RTK después de sobreexpresar la variante  $\Delta 160$  como la forma de activación de RON. En consecuencia, se observó que la actividad del EGFR se indujo de acuerdo con la activación del RON.

40 **Ejemplo 2. Cambio de la actividad de EGFR de acuerdo con la actividad de RON**

2-1. Activación de la proteína EGFR mediante la activación de la proteína RON

45 Los inventores realizaron la transferencia Western, después de sobreexpresar la variante  $\Delta 160$  como la forma de activación del gen de RON en las estirpes celulares de cáncer de colon LoVo y Colo320HSR en las que el RON no se expresó con el fin de verificar la activación de la proteína EGFR por la activación de RON.

50 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 2A, se verificó que la actividad del EGFR aumentó de acuerdo con la activación de RON.

**2-2. Cambio en la actividad de la proteína EGFR por inhibición de RON**

55 Los inventores verificaron la inducción de la fosforilación del EGFR realizando la transferencia Western, después de suprimir artificialmente el RON usando una técnica de ARNip en las estirpes celulares de cáncer de colon KM12C y HT29 en las que se expresó el RON y activaron, con el fin de verificar el cambio en la actividad de la proteína EGFR por la activación de la proteína RON.

60 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 2B, se verificó que la actividad del EGFR también disminuyó de acuerdo con la inhibición de RON.

**2-3. Cambio en la actividad del EGFR dependiente del ligando de EGFR por inhibición de RON**

65 Los inventores verificaron el grado de fosforilación del EGFR de acuerdo con un tiempo de tratamiento del ligando EGF que induce la actividad del EGFR, después de inhibir el RON usando la técnica de ARNip en la estirpe celular de cáncer de colon KM12C en la que se expresó y activó el RON con el fin de verificar el cambio en la actividad del EGFR

dependiente del ligando de EGFR.

Como resultado, como se ilustra en la FIG. 2C, se verificó que la fosforilación del EGFR inducida por el EGF disminuyó y la actividad disminuyó de acuerdo con la inhibición de RON.

5 **Ejemplo 3. Análisis de susceptibilidad a fármacos de cetuximab de acuerdo con la activación de la proteína RON**

10 3-1. Análisis de la unión en células endógenas entre la proteína RON y la proteína EGFR

Los inventores observaron la presencia o ausencia de la unión entre la proteína RON y la proteína EGFR por inmunoprecipitación usando el anticuerpo RON con el fin de analizar la presencia o ausencia de la unión entre la proteína RON y la proteína EGFR en las células de la estirpe celular de cáncer de colon CaCO2 en la que el RON no se activó y la estirpe celular de cáncer de colon KM12C en la que se activó el RON.

15 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 3A, puede observarse que en la célula CaCO2 en la que no se activó el RON, no se realizó la unión entre la proteína RON y la proteína EGFR, y en la célula KM12C en la que se activó el RON, se realizó la unión entre la proteína RON y la proteína EGFR.

20 3-2. Análisis de la unión en células exógenas entre la proteína RON y la proteína EGFR

Los inventores observaron la presencia o ausencia de la unión entre la proteína RON y la proteína EGFR mediante inmunoprecipitación usando el anticuerpo RON, después de sobreexpresar respectivamente un gen normal de RON y un gen normal de EGFR y sobreexpresar simultáneamente el gen normal de RON y el gen normal de EGFR en la estirpe celular de cáncer de colon CaCO2 en la que el RON no se activó.

25 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 3B, puede observarse que la unión entre la proteína RON y la proteína EGFR se realizó en el caso de sobreexpresar simultáneamente el gen normal de RON y el gen normal de EGFR.

30 3-3. Análisis del dominio de la proteína EGFR unida a la proteína RON a través de un ensayo *in vivo* completo

Los inventores observaron un dominio del EGFR unido a la proteína RON a través de inmunoprecipitación usando el anticuerpo RON después de sobreexpresar respectivamente una proteína RON, una proteína de dominio cinasa del EGFR y una proteína de dominio extracelular (EC) y sobreexpresar simultáneamente el RON y la proteína del dominio cinasa del EGFR en una estirpe celular 293T en la que el RON y el EGFR no se expresaron, no la estirpe celular del cáncer de colon.

35 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 3C, puede observarse que el RON y la proteína EC del EGFR estaban unidos entre sí.

40 **3-4. Análisis del dominio de la proteína EGFR unida a la proteína RON a través de un ensayo *in vitro* sin células completo**

Los inventores observaron la presencia o ausencia de unión entre la proteína normal RON y la proteína  $\Delta 160$  de forma activa mediante reacción con la proteína del dominio cinasa y la proteína EC del EGFR mediante el uso de un ensayo de inducción sin células *in vitro* completo, con el fin de verificar nuevamente la unión entre la proteína RON y la proteína EC del EGFR.

45 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 3D, puede observarse que tanto la proteína RON normal como la proteína activa forman la proteína  $\Delta 160$  unida a la proteína EC del EGFR.

50 **3-5. Análisis de la predicción del sitio de unión de la proteína RON unida a la proteína EGFR usando modelado por ordenador**

Los inventores predijeron un sitio de unión del RON unido al EGFR introduciendo una construcción de la proteína EGFR y una construcción de la proteína RON usando un sistema de modelado por ordenador, con el fin de analizar un sitio de unión principal del RON unido a la proteína EGFR.

55 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 3E, se predijeron un sitio E387 y un sitio H424 del aminoácido de la proteína RON y se analizaron como sitios que pueden unirse a la proteína EGFR.

60 **3-6. Análisis del sitio de unión de la proteína RON unida a la proteína EGFR**

Los inventores observaron la unión entre la forma normal, la forma activa y la forma normal de proteínas RON y la proteína EGFR a través de inmunoprecipitación usando el anticuerpo RON después de sobreexpresar respectivamente el gen de forma normal RON, la forma activa  $\Delta 160$  y genes de mutación puntual E387A y H424L del

RON y sobreexpresar simultáneamente el gen de EGFR en la estirpe celular 293T en la que no se expresaron el RON y el EGFR, con el fin de analizar el sitio de unión principal del RON unido a la proteína EGFR.

5 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 3F, la unión se verificó en la forma normal, la forma activa y la forma mutante E387A del RON y en la forma mutante H424L del RON, la unión de la proteína EGFR no se verificó.

3-7. Análisis de la actividad de EGFR de acuerdo con el sitio de unión de la proteína RON unida a la proteína EGFR

10 Los inventores verificaron la fosforilación del EGFR como la actividad del EGFR a través de transferencia Western sobreexpresando respectivamente el gen de forma normal de RON y la variante  $\Delta$ 160 de forma activa y el gen mutante H424L verificado en el ejemplo 3-6 (véase la FIG. 3F) y sobreexpresando simultáneamente el gen de forma normal de EGFR en la estirpe celular 293T en la que no se expresaron el RON y el EGFR, con el fin de analizar la actividad de EGFR de acuerdo con el sitio de unión del RON unido a la proteína EGFR.

15 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 3G, como el mutante de forma activa EGFR (EGFR del19), solo en el lugar que sobreexpresa simultáneamente la forma normal de EGFR, la variante  $\Delta$ 160 de forma activa del RON, se indujo la fosforilación del EGFR, en la forma normal del RON y la forma mutante H424L, la fosforilación del EGFR no se indujo y la actividad del EGFR se demostró de acuerdo con la activación del RON.

20 **Ejemplo 4. Análisis de actividad de EGFR de acuerdo con la actividad de RON**

4-1. Análisis de la actividad de EGFR dependiente de ligando de acuerdo con la proteína de forma activa RON

25 Los inventores analizaron la actividad de EGFR por EGF, que es un ligando de EGFR de acuerdo con la presencia de la proteína  $\Delta$ 160 de forma activa del RON después de sobreexpresar la proteína de forma normal del EGFR y la proteína con cinasa inactivada del EGFR en la estirpe celular 293T en la que no se expresaron el RON y el EGFR.

30 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 4A, en el caso de que la forma activa  $\Delta$ 160 del RON no estuviera presente, solo en la proteína de forma normal del EGFR, la activación del EGFR se verificó por EGF, en el caso en el que la proteína  $\Delta$ 160 de forma activa del RON estaba presente, la activación del EGFR se observó independientemente del EGF y la proteína con cinasa inactivada EGFR y, por tanto, puede observarse que la proteína  $\Delta$  160 de forma activa del RON indujo la activación del EGFR independientemente de ligando de EGFR.

35 **4-2. Análisis de la actividad de EGFR dependiente de ligando de acuerdo con la actividad de RON dependiente de ligando**

40 Los inventores analizaron la actividad de EGFR por EGF, que es un ligando de EGFR de acuerdo con la presencia de MSP, que es un ligando que induce la actividad del RON después de sobreexpresar la proteína de forma normal del EGFR y la proteína con cinasa inactivada del EGFR en la estirpe celular 293T en la que no se expresaron el RON y el EGFR.

45 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 4B, en el caso en que el MSP como ligando que induce la actividad del RON no estaba presente, solo en la proteína de forma normal del EGFR, la activación del EGFR se verificó por EGF, en el caso en que el MSP como ligando que induce la actividad del RON estaba presente, la activación del EGFR se observó independientemente del EGF y la proteína con cinasa inactivada EGFR y, por tanto, puede observarse que si el RON era la forma activa por el MSP como el ligando que induce el actividad del RON, la activación del EGFR se indujo independientemente de ligando del EGFR.

50 Adicionalmente, como se ilustra en la FIG. 4C, cuando se sobreexpresaron RON $\Delta$ 155/K1114N (forma de inhibición de la actividad cinasa como un mutante de RON con cinasa inactivada) y EGFR, puede observarse que la actividad de EGFR se redujo en comparación con un caso en el que solo se sobreexpresó la forma activa del RON.

**Ejemplo 5. Análisis de la actividad de EGFR y asociación para cetuximab de acuerdo con la actividad de RON**

55 5-1. Análisis de la inhibición de la actividad de EGFR a través de la inhibición de la actividad de RON y la inhibición de la actividad de EGFR para cetuximab

60 Como se enumera en la Tabla 5, se sabía que la estirpe celular de cáncer de colon KM12C tenía los genes KRAS, NRAS y BRAF de tipo silvestre y tenía resistencia al cetuximab (Todd M. et al, *Dual Pharmacological Targeting of the MAP Kinase and PI3K/mTOR Pathway in Preclinical Models of Colorectal Cancer. PLOS* 2014, Volumen 9, Número 11, e113037).

[Tabla 5]



Anteriormente en el presente documento, los inventores verificaron en el Ejemplo 1-1 que el RON se activó en la estirpe celular de cáncer de colon KM12C.

En consecuencia, el grado de activación del EGFR se observó mediante transferencia Western mediante el tratamiento con cetuximab para cada vez después de inhibir artificialmente el RON mediante una técnica de ARNip en la estirpe celular de cáncer de colon KM12C que tenía genes KRAS, NRAS y BRAF de tipo silvestre, tenía resistencia a cetuximab y en la que se activó el RON, como se ha descrito anteriormente, con el fin de analizar la inhibición de la actividad del EGFR a través de la inhibición de la actividad de RON y la inhibición de la actividad de EGFR para cetuximab.

Como resultado, como se ilustra en la FIG. 5A, en la estirpe celular KM12C sin inhibir el RON, a pesar de que se trató con cetuximab, la actividad de EGFR se redujo y después aumentó a lo largo del tiempo, mientras que en la estirpe celular KM12C en la que se inhibió RON con ARNip y se trató con cetuximab, se verificó que la actividad del EGFR se redujo rápidamente y después no aumentó y, por tanto, puede observarse que la actividad del EGFR para cetuximab se reguló de acuerdo con la presencia del RON.

5-2. Análisis de la muerte celular de cetuximab de acuerdo con la presencia de actividad de RON

Como se enumera en la Tabla 6, se sabía que la estirpe celular de cáncer de colon CaCo-2 tenía los genes KRAS, NRAS y BRAF de tipo silvestre y tenía susceptibilidad a cetuximab (Giovanni B. et al, *Antitumoral Efficacy of the Protease Inhibitor Gabexate Mesilate in Colon Cancer Cells Harboring KRAS, BRAF and PIK3CA Mutations*. PLOS 2012, Volumen 7, Número 7, e41347).

[Tabla 6]

Línea celular	KRAS	BRAF
<b>CACO-2*</b>	tipo silvestre	tipo silvestre
<b>SW48*</b>	tipo silvestre	tipo silvestre
<b>HT-29*</b>	tipo silvestre	mutación en el exón 15 (V600E)
<b>Colo205*</b>	tipo silvestre	mutación en el exón 15 (V600E)
<b>SW480**</b>	mutación en el exón 2 (G12V)	tipo silvestre
<b>SW620*</b>	mutación en el exón 2 (G12V)	tipo silvestre
<b>RKO*</b>	tipo silvestre	mutación en el exón 15 (V600E)
<b>LS174T*</b>	mutación en el exón 2 (G12V)	tipo silvestre
<b>HCT-116*</b>	mutación en el exón 2 (G13D)	tipo silvestre

Anteriormente en el presente documento, los inventores verificaron en el Ejemplo 1-1 que el RON no se activó en la estirpe celular de cáncer de colon CaCo-2.

En consecuencia, con el fin de analizar el grado de muerte celular de acuerdo con la actividad de RON cuando se trató con cetuximab, como se ha descrito anteriormente, con el fin de verificar la reactividad al cetuximab en la estirpe celular de cáncer de colon CaCo-2 y la estirpe celular LIM1215 que tenía genes KRAS, NRAS y BRAF de tipo silvestre y tenía susceptibilidad al cetuximab y en la que no se activó el RON, y la estirpe celular de cáncer de colon KM12C en la que se activó el RON y que tenía resistencia al cetuximab, la muerte celular se analizó mediante recuento de células con azul de tripano.

Como resultado, como se ilustra en la FIG. 5B, en la estirpe celular CaCo-2 y la estirpe celular LIM1215 en las que no se activó el RON, se observó la muerte celular por cetuximab, mientras que en la estirpe celular KM12C en la que se activó el RON, puede verse que no se observó la muerte celular por cetuximab y la estirpe celular KM12C tenía resistencia al cetuximab.

5-3. Análisis de la muerte celular por cetuximab después de inhibir la expresión de RON

Los inventores analizaron la muerte celular mediante recuento de células con azul de tripano mediante tratamiento

con cetuximab después de inhibir artificialmente el RON mediante la técnica de ARNip en la estirpe celular de cáncer de colon KM12C que tenía la resistencia al cetuximab en la que el RON se activó.

5 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 5C, en el caso de la inhibición del RON, puede observarse que la susceptibilidad al cetuximab aumentó y la muerte celular aumentó.

#### 5-4. Análisis del mecanismo de sub-señalización por cetuximab después de inhibir la expresión de RON

10 Los inventores observaron un mecanismo de sub-señalización a través de transferencia Western mediante tratamiento con cetuximab después de inhibir artificialmente el RON mediante la técnica de ARNip en la estirpe celular de cáncer de colon KM12C que tenía la resistencia al cetuximab en la que el RON se activó.

15 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 5D, en el grupo en el que se inhibió la expresión del RON y se trató con cetuximab, puede observarse que una proteína p-ERK que desempeñaba un papel importante en la supervivencia celular se redujo y la caspasa-3 escindida como proteína marcadora de apoptosis aumentó.

#### 5-5. Análisis de la muerte celular por cetuximab después de inhibir la actividad de RON

20 Los inventores analizaron la muerte celular por recuento de células por azul de tripano en el grupo en el que se trató con un inhibidor LY2801653 capaz de inhibir la actividad del RON y con cetuximab, respectivamente, y el grupo en el que el LY2801653 y el cetuximab se usaron como tratamiento juntos, en la estirpe celular de cáncer de colon KM12C que tenía resistencia al cetuximab en la que se activó el RON.

25 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 5E, en el grupo en el que el LY2801653, inhibidor de la actividad RON y el cetuximab se usaron como tratamiento juntos, puede observarse que la muerte celular aumentó.

#### 5-6. Análisis de la muerte celular por cetuximab de acuerdo con la actividad de RON

30 Los inventores observaron la muerte celular por cetuximab después de sobreexpresar  $\Delta 160$  y  $\Delta 155$  como las formas activas del RON en las estirpes celulares de cáncer de colon CaCo-2 y SW48 que tenían susceptibilidad a cetuximab en las que el RON no se activó.

35 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 5F, en el caso de sobreexpresar  $\Delta 160$  y  $\Delta 155$  como las formas activas del RON en las estirpes celulares CaCo-2 y SW48 que tenían la susceptibilidad al cetuximab, puede observarse que la muerte celular se inhibió por el cetuximab y se demostró la resistencia a cetuximab.

#### 5-7. Análisis de la inhibición del crecimiento celular por cetuximab de acuerdo con la actividad de RON

40 Los inventores observaron el crecimiento celular para cetuximab mediante un método de formación de colonias mediante sobreexpresión de la variante  $\Delta 160$  como la forma activa del RON en la estirpe celular de cáncer de colon CaCo-2 que tenía la susceptibilidad a cetuximab en la que el RON no se activó.

45 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 5G, en una estirpe celular CaCo-2 original cuya cantidad de colonias se redujo por cetuximab, cuando se sobreexpresó la variante  $\Delta 160$  como la forma activa de RON, puede observarse que aunque se trató con cetuximab, el número de colonias casi no se redujo y la resistencia del crecimiento celular al cetuximab se demostró por la proteína  $\Delta 160$  como la forma activa del RON.

#### 5-8. Análisis de la muerte celular por cetuximab en la estirpe celular isogénica con RON inactivado

50 Los inventores observaron la muerte celular mediante tratamiento con cetuximab para cada concentración en el clon n.º 1 con buena eficiencia de inactivación de RON, con el fin de analizar la muerte celular y el crecimiento celular para cetuximab mediante la preparación de una estirpe celular en la que el gen de RON se inactivó usando un método CRISPR/Cas9 en la estirpe celular de cáncer de colon KM12C que tenía resistencia al cetuximab en la que se activó el RON.

55 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 5H, se verificó que la muerte celular aumentó en comparación con la estirpe celular parental y cuando se inactivó el RON, puede observarse que aumentó la susceptibilidad al cetuximab.

#### 5-9. Análisis de la inhibición del crecimiento celular por cetuximab en estirpe celular isogénica con RON inactivado

60 Los inventores observaron el crecimiento celular para cetuximab mediante un método de formación de colonias usando una estirpe celular en la que el gen de RON se inactivó usando el método CRISPR/Cas9 en la estirpe celular KM12C de cáncer de colon que tenía resistencia al cetuximab en la que se activó el RON.

65 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 5I, se verificó que el número de colonias disminuyó en comparación con la estirpe celular parental, y cuando se inactivó el RON, puede observarse que aumentó la susceptibilidad al cetuximab.

Ejemplo 6. Análisis del efecto de inhibición tumoral por cetuximab de acuerdo con RON en el modelo de xenoinjerto *in vivo* usando la estirpe celular isogénica con RON inactivado

5 Los inventores observaron el efecto de inhibición tumoral por cetuximab en un modelo de xenoinjerto *in vivo* usando una estirpe celular en la que el gen de RON se inactivó usando el método CRISPR/Cas9 en la estirpe celular de cáncer de colon KM12C que tenía resistencia al cetuximab en la que se activó el RON.

10 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 6, en comparación con la estirpe celular parental, en el ratón de xenoinjerto con RON inactivado, se observó que el tamaño del tumor se redujo significativamente y cuando la activación del RON se inactivó, puede observarse que la susceptibilidad *in vivo* por cetuximab aumentó.

15 En consecuencia, la activación del RON presenta la posibilidad de ser el biomarcador para predecir la susceptibilidad al cetuximab como agente dirigido contra EGFR.

**\* Ejemplo 7. Verificación de la inducción de muerte celular tratando con el agente antineoplásico de anticuerpo RON y el cetuximab juntos**

20 Los inventores verificaron la inducción de muerte celular tratando con el agente antineoplásico de anticuerpo RON y cetuximab juntos.

25 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 7, cuando se trató con narnatumab y cetuximab, que eran agentes antineoplásicos de anticuerpo dirigidos contra RON juntos, se verificó que se indujo la muerte celular. En este caso, cuando se verificó el cambio en la expresión de proteínas, se verificó que se inhibió la actividad del EGFR y el RON y se inhibió la actividad del ERK.

**Ejemplo 8. Relación de análisis entre la reactividad de cetuximab y la actividad de RON**

30 Los inventores analizaron una relación entre la reactividad de cetuximab y la actividad de RON.

35 Como resultado, como se ilustra en la FIG. 8, se verificó que los pacientes con cáncer de colon tenían formas activas de RON (p-RON positivo) y formas activas de EGFR (P-EGFR positivo) (véase gráfico de la izquierda). Adicionalmente, se verificó que los pacientes recetados con cetuximab entre los pacientes con cáncer de colon (doble positivo) tenían una susceptibilidad diferente al cetuximab de acuerdo con la actividad de RON.

<110> LA FUNDACIÓN ASAN

<120> Nuevos biomarcadores para predecir la susceptibilidad al agente dirigido contra EGFR y usos de los mismos

40 <130> Asan1.104p-1

<150> KR 10-2014-0096716  
<151> 29-07-2014

45 <160> 13

<170> KopatentIn 2.0

50 <210> 1  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Cebador directo de Adam11

<400> 1  
tggcttcctc ctctgtgtca a 21

60 <210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Cebador inverso de Adam11

# ES 2 750 832 T3

	<400> 2 gcacttcct tcattgctgc	20
5	<210> 3 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo de Adam32	
15	<400> 3 aatggcagat tggaggaaa tg	22
20	<210> 4 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso de Adam32	
25	<400> 4 ttcatagcag gcaaatggag ca	22
30	<210> 5 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de FZD4	
35	<400> 5 tgactggctt gtgctatgtt gg	22
40	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador inverso de FZD4	
50	<400> 6 atgcctgaag tgatgccac	20
55	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de GPR101	
60	<400> 7 ggcagaatgg aagccaagga	20
65	<210> 8 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso de GPR101	

## ES 2 750 832 T3

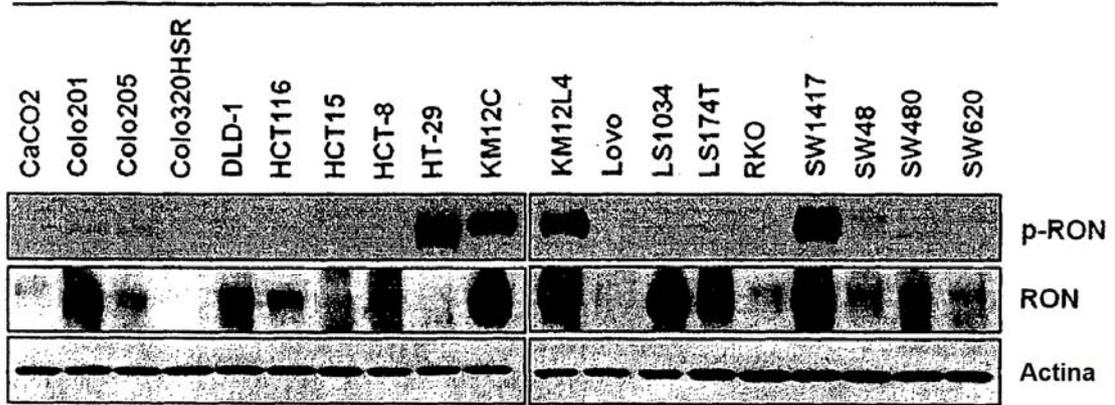
	<400> 8 ttgctgttac gacgactggg tg	22
5	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo de GPER	
15	<400> 9 atcgtgccct tcgcatcat	20
20	<210> 10 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso de GPER	
25	<400> 10 ccagtcgtga ggtttcctaa gcag	24
30	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de GAPDH	
35	<400> 11 agaaggctgg ggctcattg	20
40	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador inverso de GAPDH	
50	<400> 12 aggggccatc cacagtcttc	20
55	<210> 13 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip para RON	
	<400> 13 acuuuguaga ggaguugau u	21

## REIVINDICACIONES

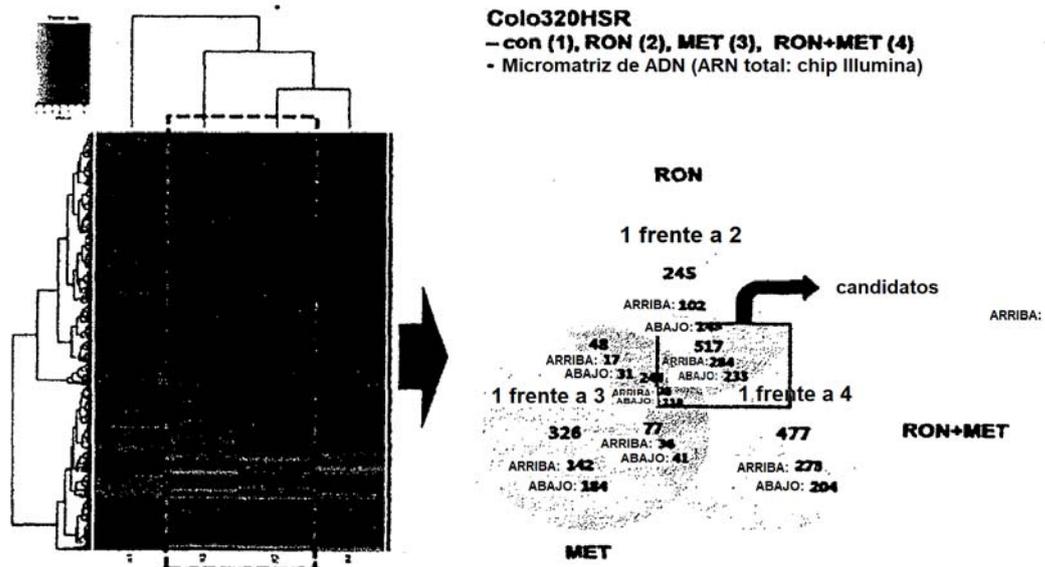
1. Uso de una composición para predecir la susceptibilidad al cetuximab en el cáncer de colon, comprendiendo la composición un agente que mide un nivel de expresión del gen de RON (recepteur d'origine nantais, N.º de acceso de Gene Bank NM\_002447.1); o un nivel de expresión o actividad de una proteína del mismo, y un agente que mide un nivel de expresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo que consiste en los genes KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, N.º de acceso de Gene Bank NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), N.º de acceso de Gene Bank NP\_002515.1), BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, N.º de acceso de Gene Bank NP\_004324.2), EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico, N.º de acceso de Gene Bank U48722.1), Adam11 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 11, N.º de acceso de Gene Bank NM\_002390.4), Adam32 (dominio metalopeptidasa de ADAM 32, N.º de acceso de Gene Bank NM\_145004.5), FZD4 (receptor 4 de la familia Frizzled, N.º de acceso de Gene Bank NM\_012193.2), GPER (receptor de estrógenos 1 acoplado a proteína G, NM\_001505.2) y GPR101 (receptor 101 acoplado a proteína G, N.º de acceso de Gene Bank NM\_054021.1); o un nivel de expresión o actividad de una proteína de los genes.
2. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, N.º de acceso de Gene Bank NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), N.º de acceso de Gene Bank NP\_002515.1) o BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, N.º de acceso de Gene Bank NP\_004324.2) es de tipo silvestre.
3. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que cuando el nivel de expresión del gen de RON; o el nivel de expresión o actividad de la proteína del mismo es bajo en comparación con un nivel normal, se determina que existe la susceptibilidad al cetuximab.
4. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que cuando el nivel de expresión del gen de RON; o el nivel de expresión o actividad de la proteína del mismo es alto en comparación con un nivel normal, se determina que existe la resistencia al cetuximab.
5. Un potenciador de la susceptibilidad al cetuximab, comprendiendo el potenciador de la susceptibilidad cetuximab y un inhibidor que inhibe un nivel de expresión del gen de RON (recepteur d'origine nantais, N.º de acceso de Gene Bank NM\_002447.1); o un nivel de expresión o actividad de una proteína del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer de colon en un sujeto, en el que el gen KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, N.º de acceso de Gene Bank NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), N.º de acceso de Gene Bank NP\_002515.1) o BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, N.º de acceso de Gene Bank NP\_004324.2) del sujeto es un gen de tipo silvestre, en el que el inhibidor es ARN de interferencia pequeño (ARNip) o Merestinib (LY2801653).
6. Un método de predicción de la susceptibilidad al cetuximab de un sujeto con cáncer de colon, comprendiendo el método:
- (a) aplicar como tratamiento la composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 a una muestra biológica obtenida del sujeto y medir un nivel de expresión de un gen de RON (Recepteur d'Origine Nantais, N.º de acceso NM\_002447.1); o un nivel de expresión o actividad de una proteína del gen, y un nivel de expresión de uno o más genes seleccionados entre el grupo que consiste en genes KRAS (homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2, N.º de acceso de Gene Bank NM\_033360.2), NRAS (homólogo de oncogén vírico de neuroblastoma RAS (v-ras), N.º de acceso de Gene Bank NP\_002515.1), BRAF (homólogo de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf B, N.º de acceso de Gene Bank NP\_004324.2), EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico, N.º de acceso de Gene Bank U48722.1), Adam11 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 11, N.º de acceso de Gene Bank NM\_002390.4), Adam32 (dominio de metalopeptidasa de ADAM 32, N.º de acceso de Gene Bank NM\_145004.5), FZD4 (receptor 4 de la familia Frizzled, N.º de acceso de Gene Bank NM\_012193.2), GPER (receptor de estrógenos 1 acoplado a proteína G, NM\_001505.2) y GPR101 (receptor 101 acoplado a proteína G, N.º de acceso de Gene Bank NM\_054021.1); o un nivel de expresión o actividad de una proteína de los genes, en la muestra biológica; y
- (b) determinar la susceptibilidad o resistencia al cetuximab del sujeto basándose en el resultado del nivel medido en la etapa (a).
7. El método de la reivindicación 6, en el que la medición del nivel de expresión del gen de RON; o el nivel de expresión o actividad de la proteína del gen comprende adicionalmente medir la presencia o ausencia de una variante de corte y empalme o un mutante del gen.

[Fig. 1a]

**Estirpes celulares de cáncer de colon**

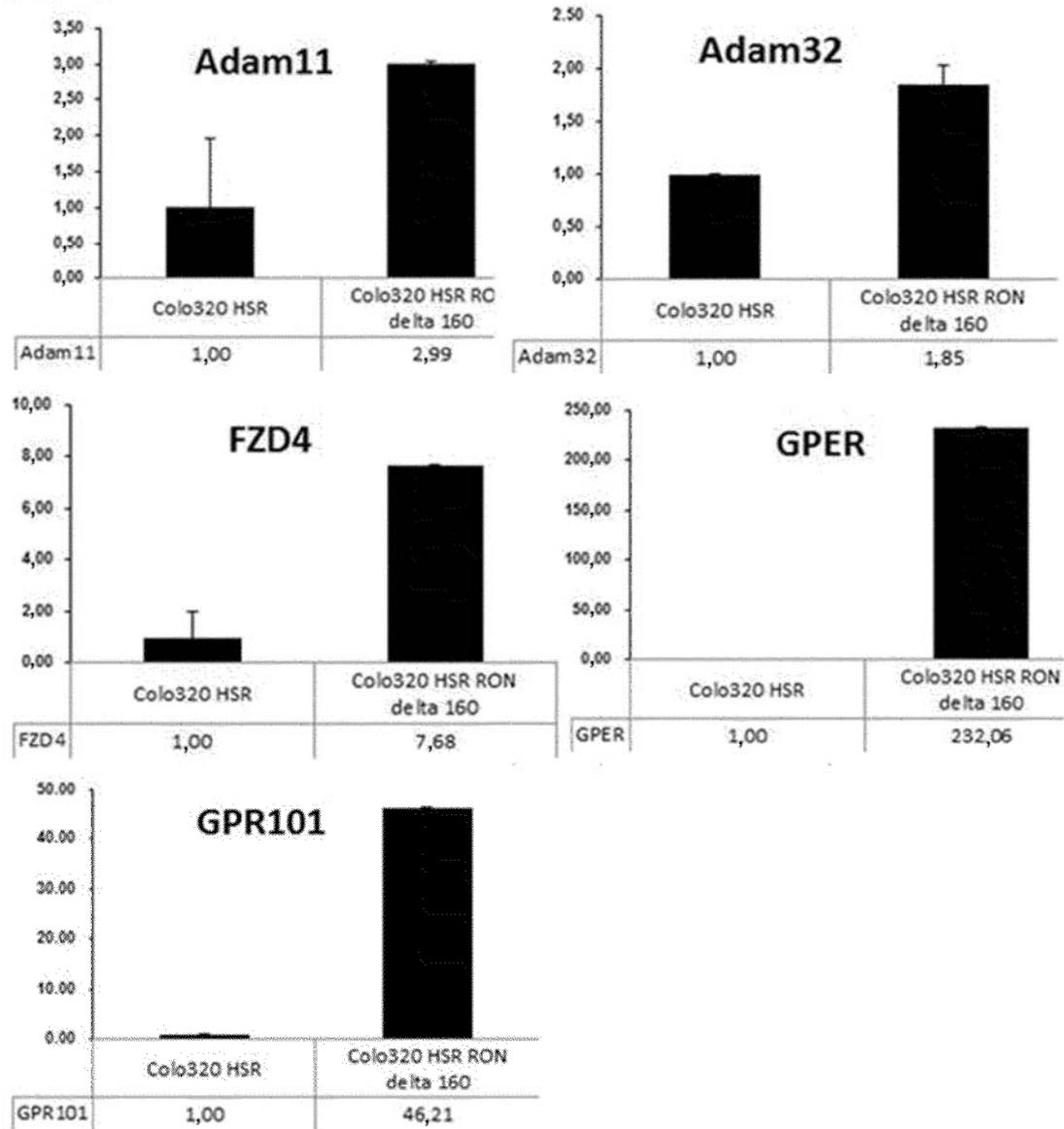


[Fig. 1b]

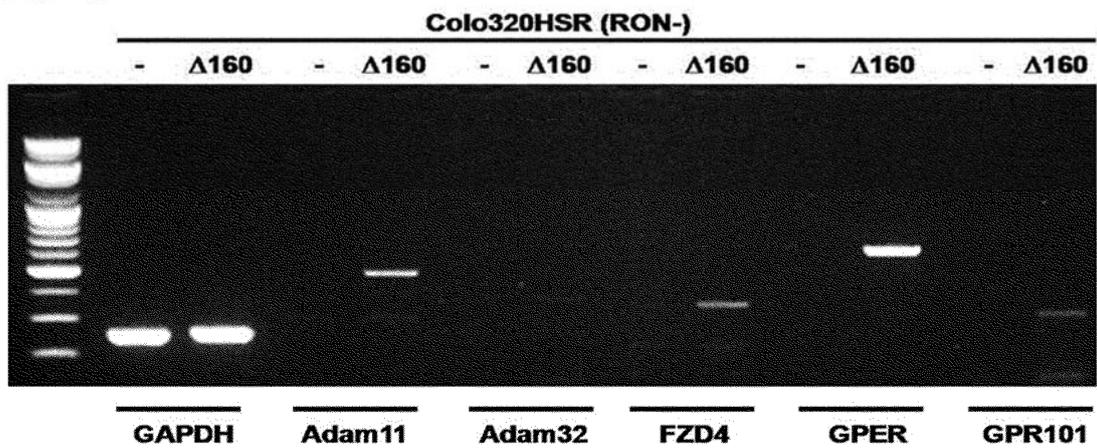


Genes	control	RON	MET	RON+MET
ADAM11	56	101	102	180
ADAM32	4	7,7	4,26	10,13
FZD4 (GPCR)	27	60	37	48
GPER (GPCR30)	18	38	16	40
GPR101 (GPCR6)	29	39	35	49

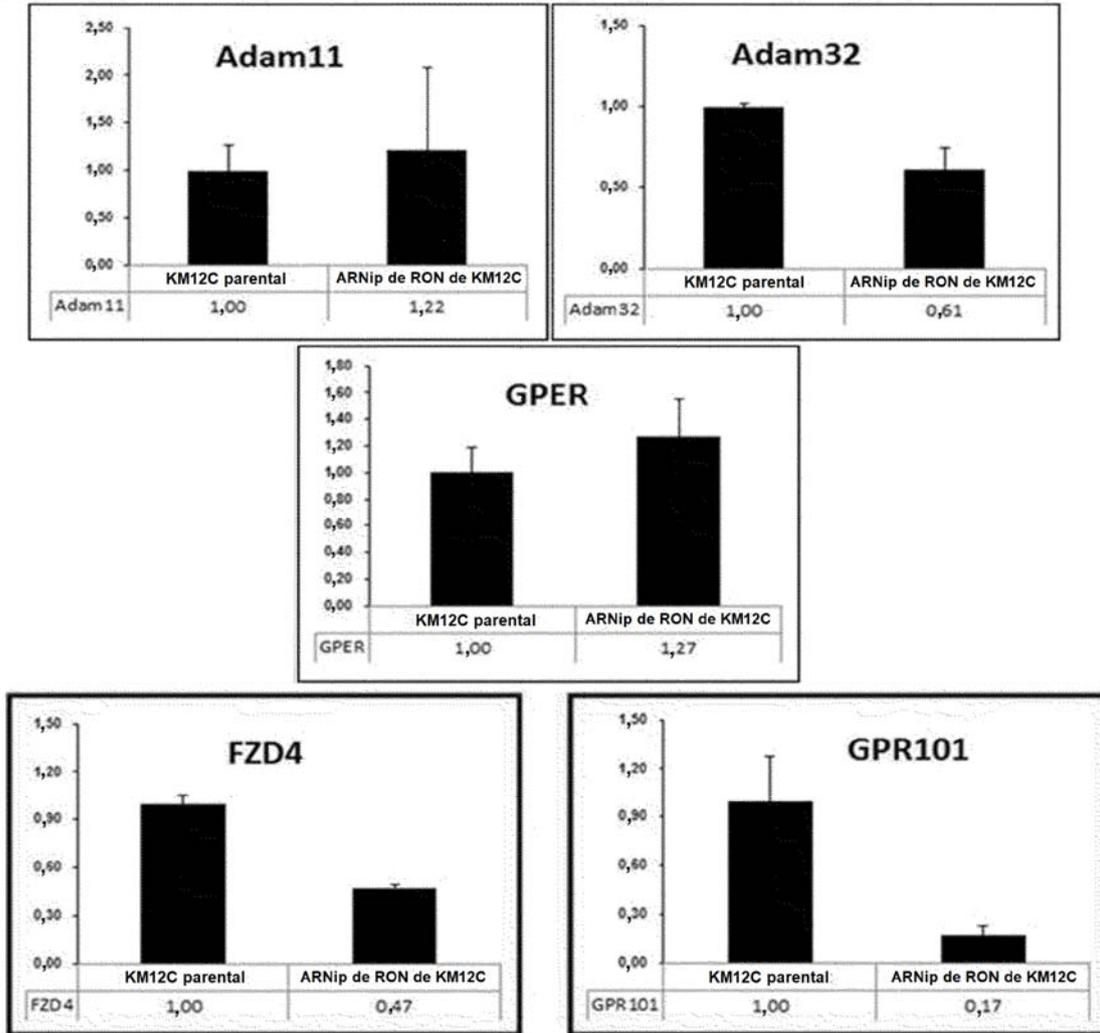
[Fig. 1c]



[Fig. 1d]



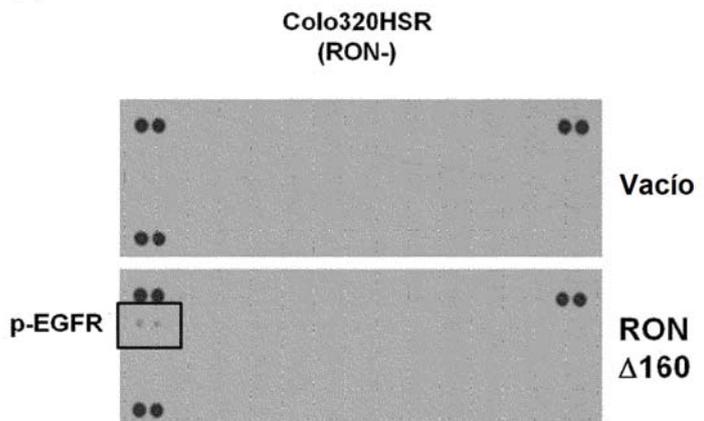
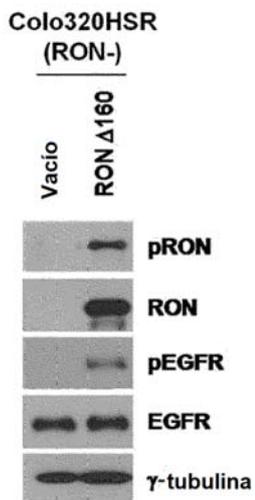
[Fig. 1e]



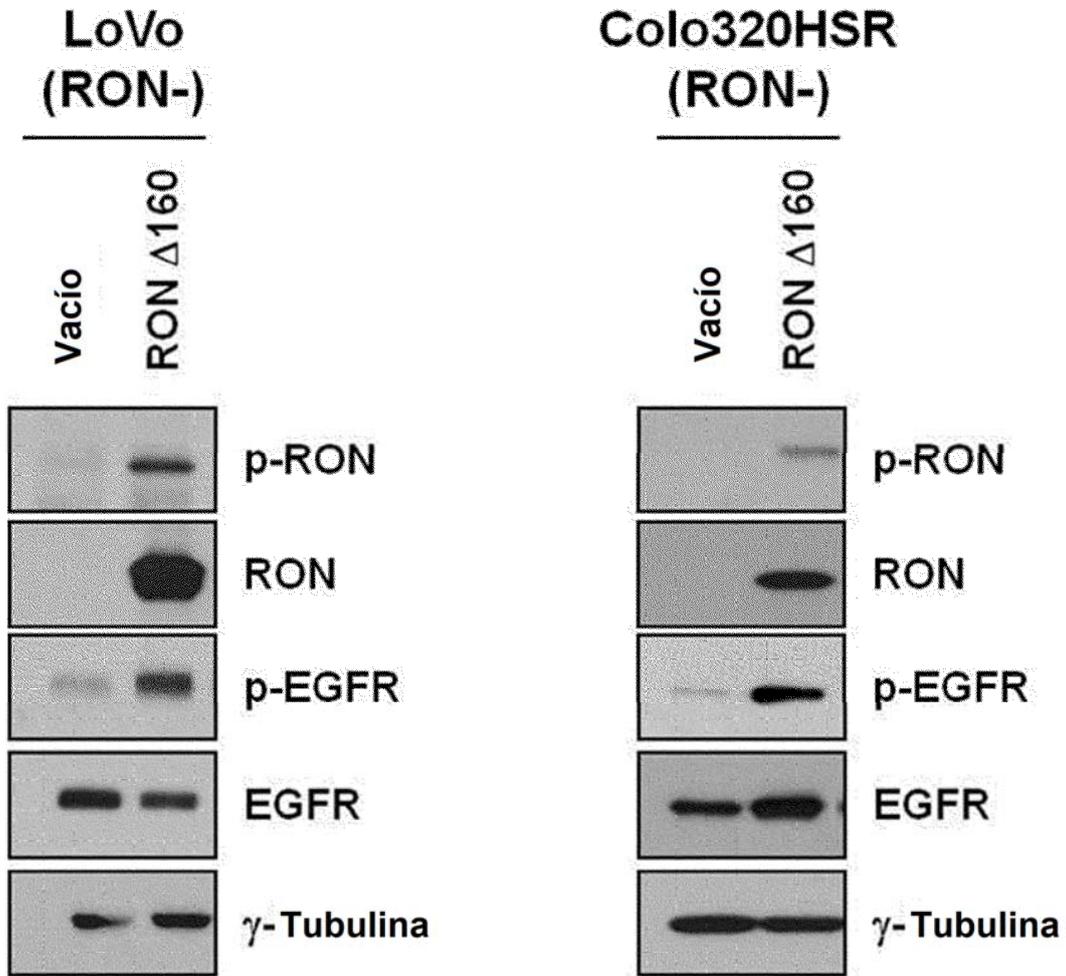
[Fig. 1f]

(a)

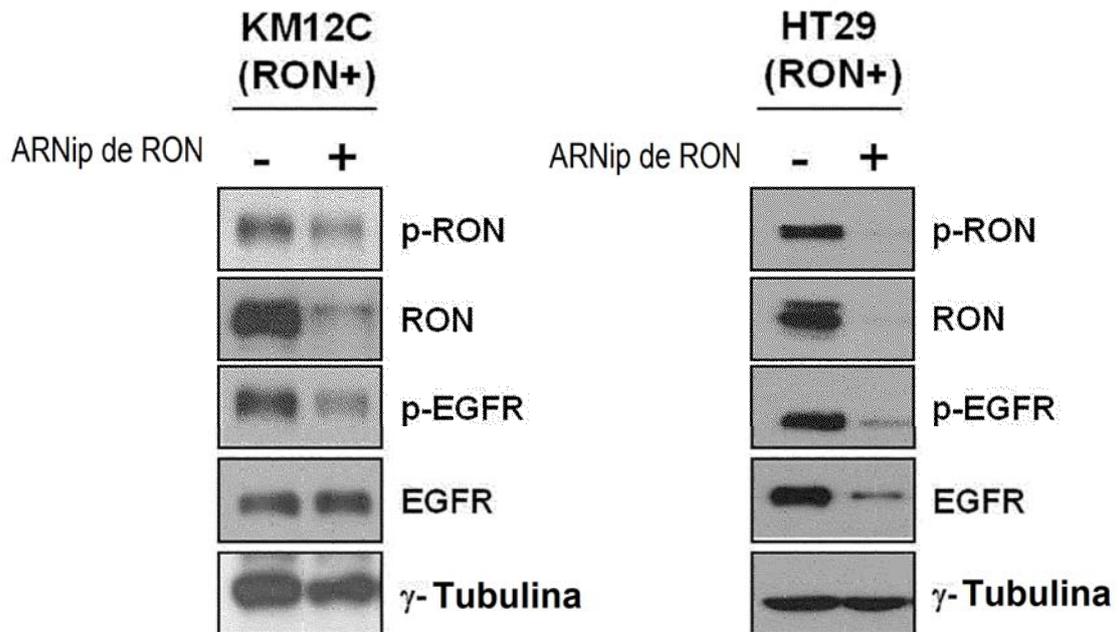
(b)



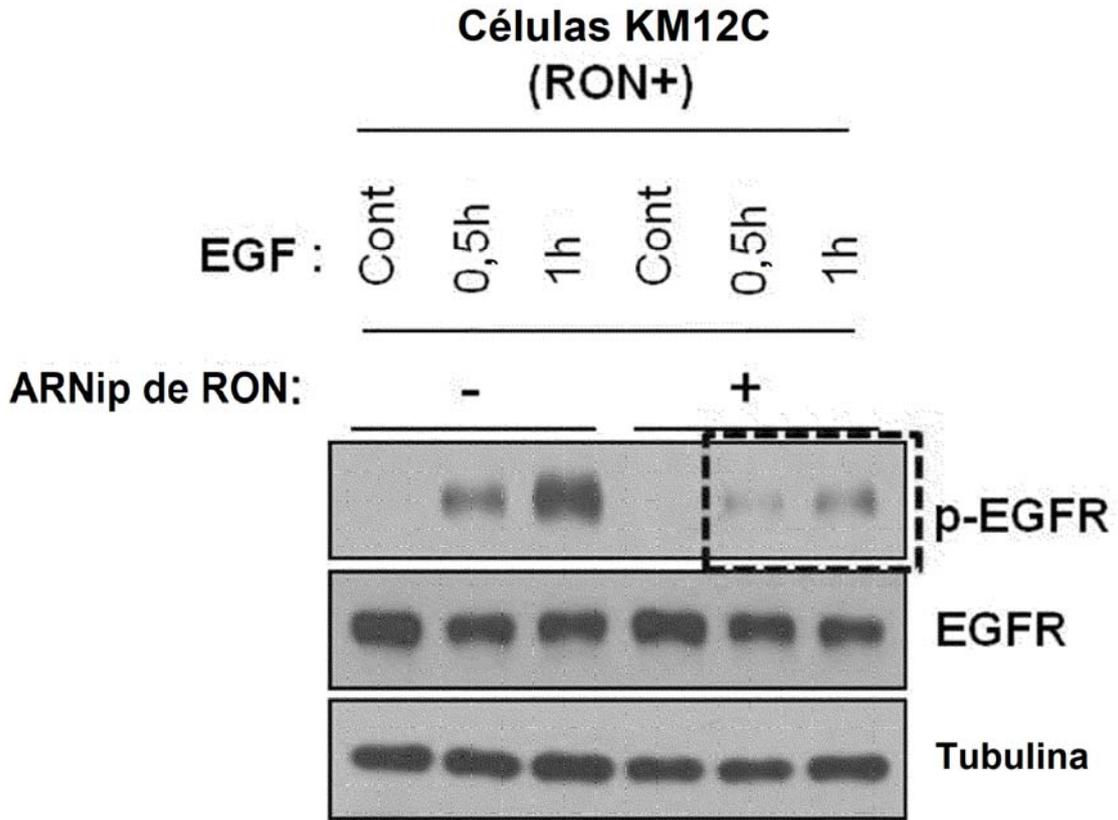
[Fig. 2a]



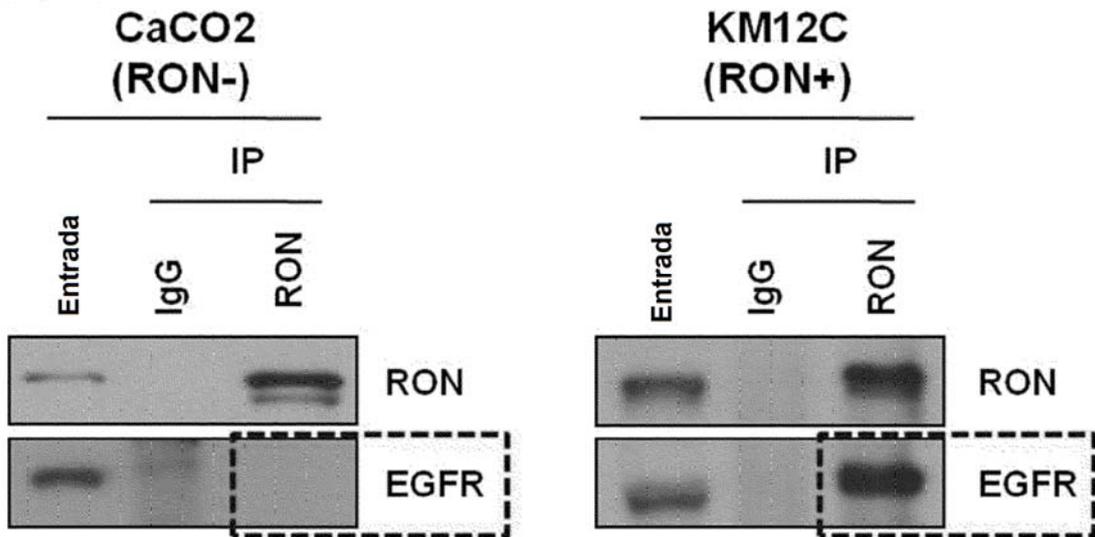
[Fig. 2b]



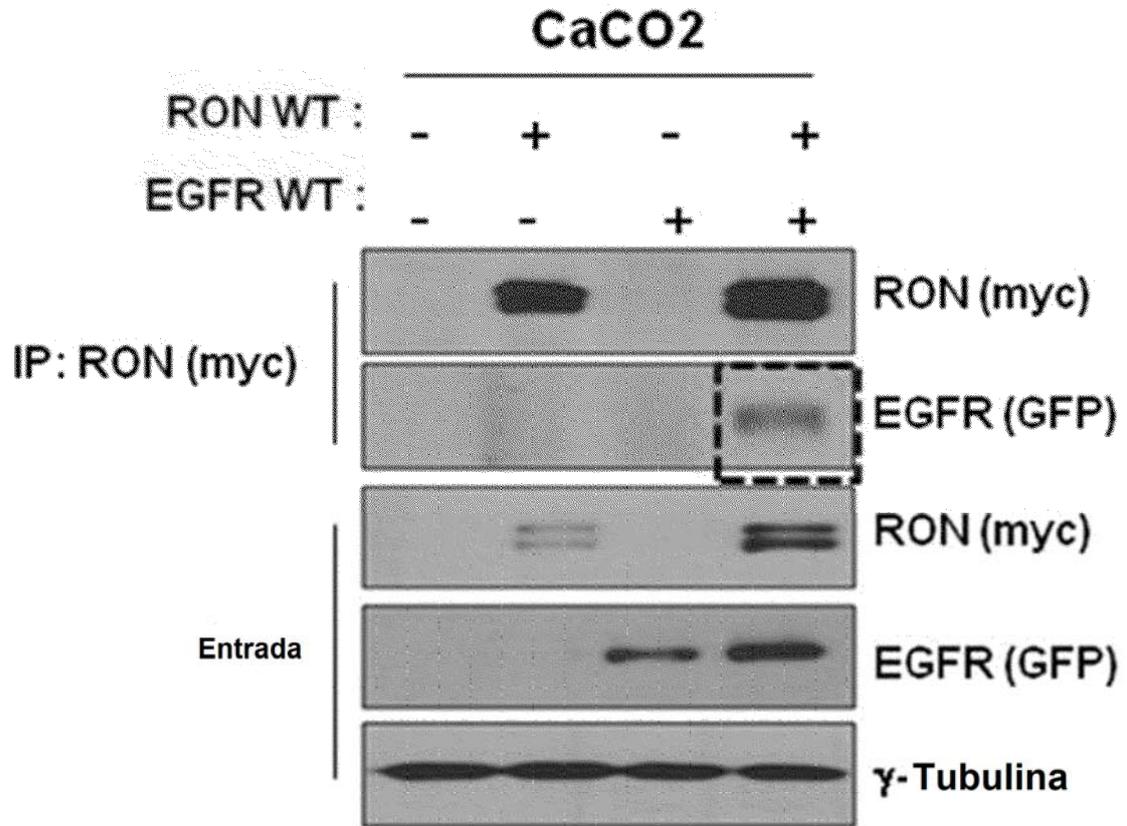
[Fig. 2c]



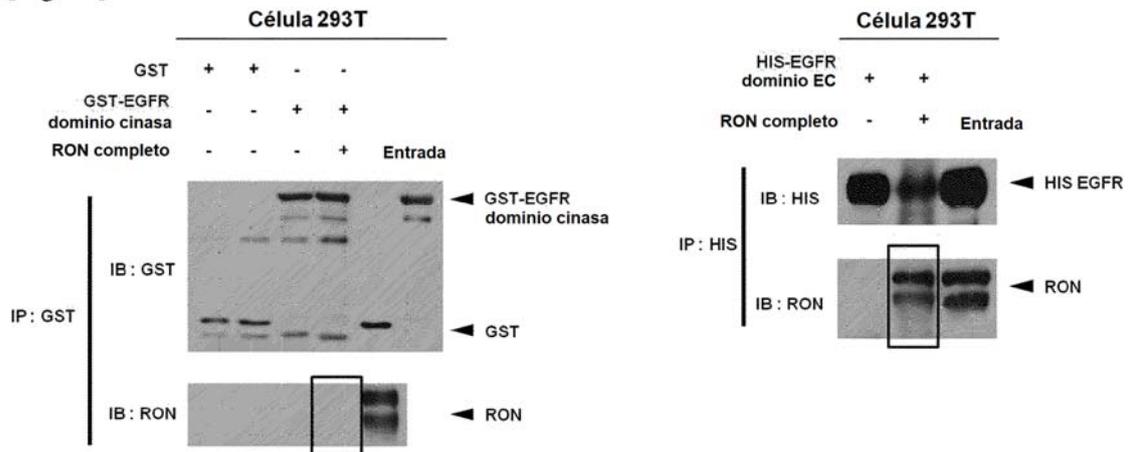
[Fig. 3a]



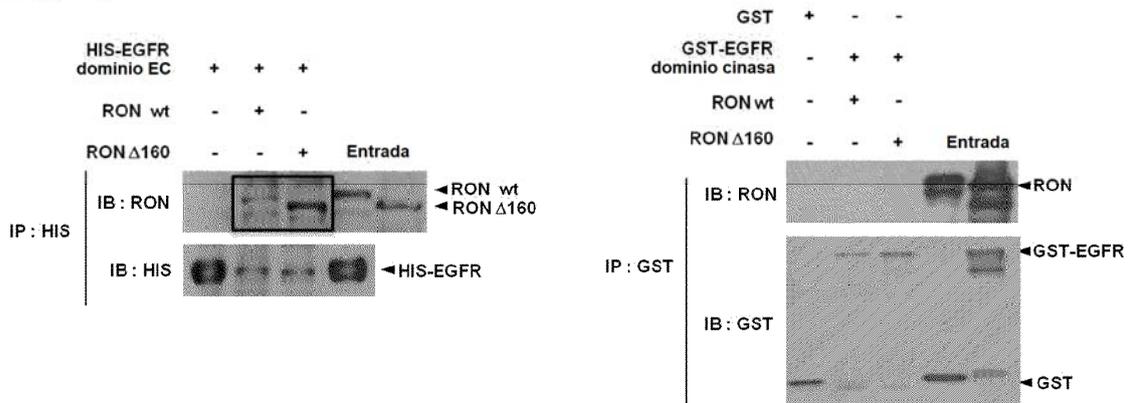
[Fig. 3b]



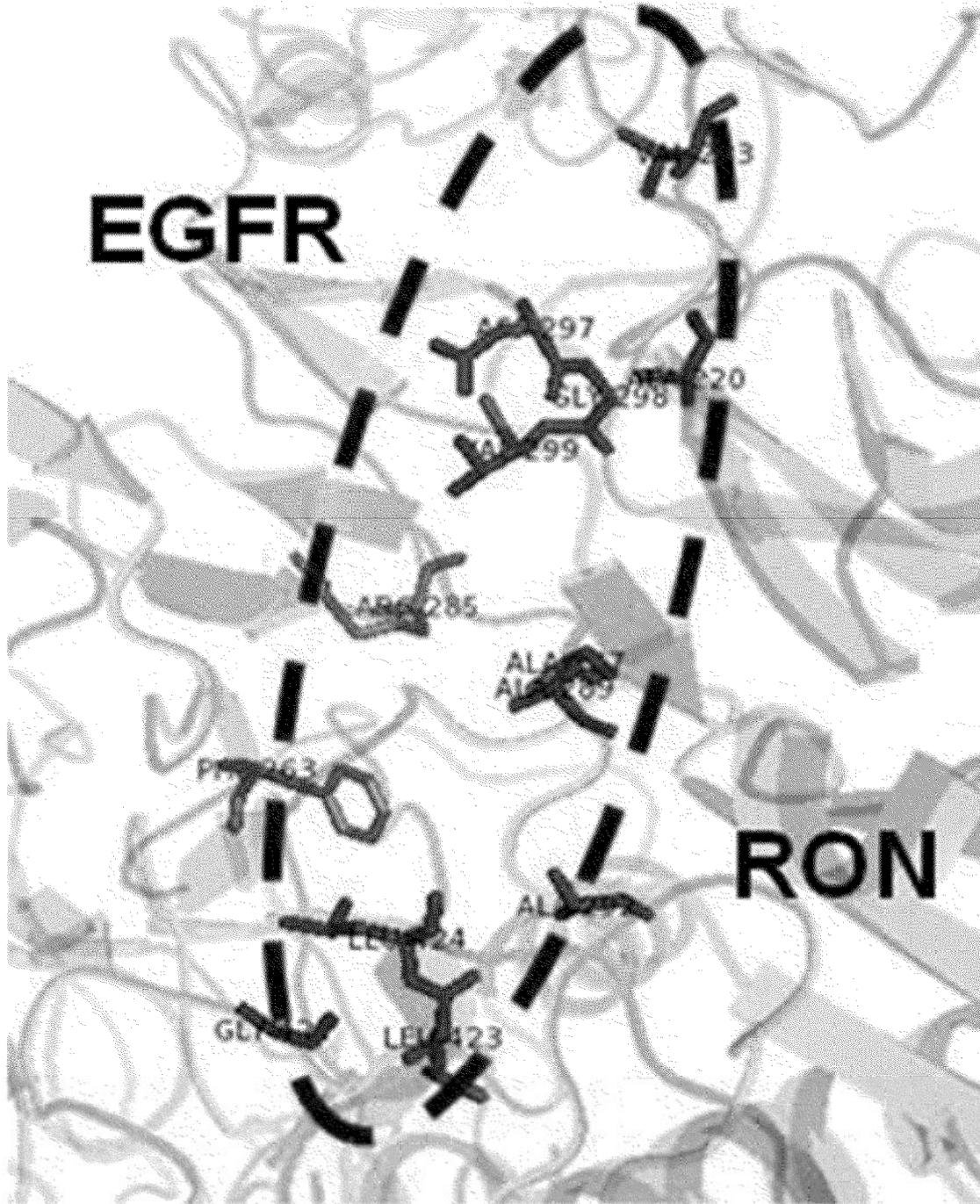
[Fig. 3c]



[Fig. 3d]

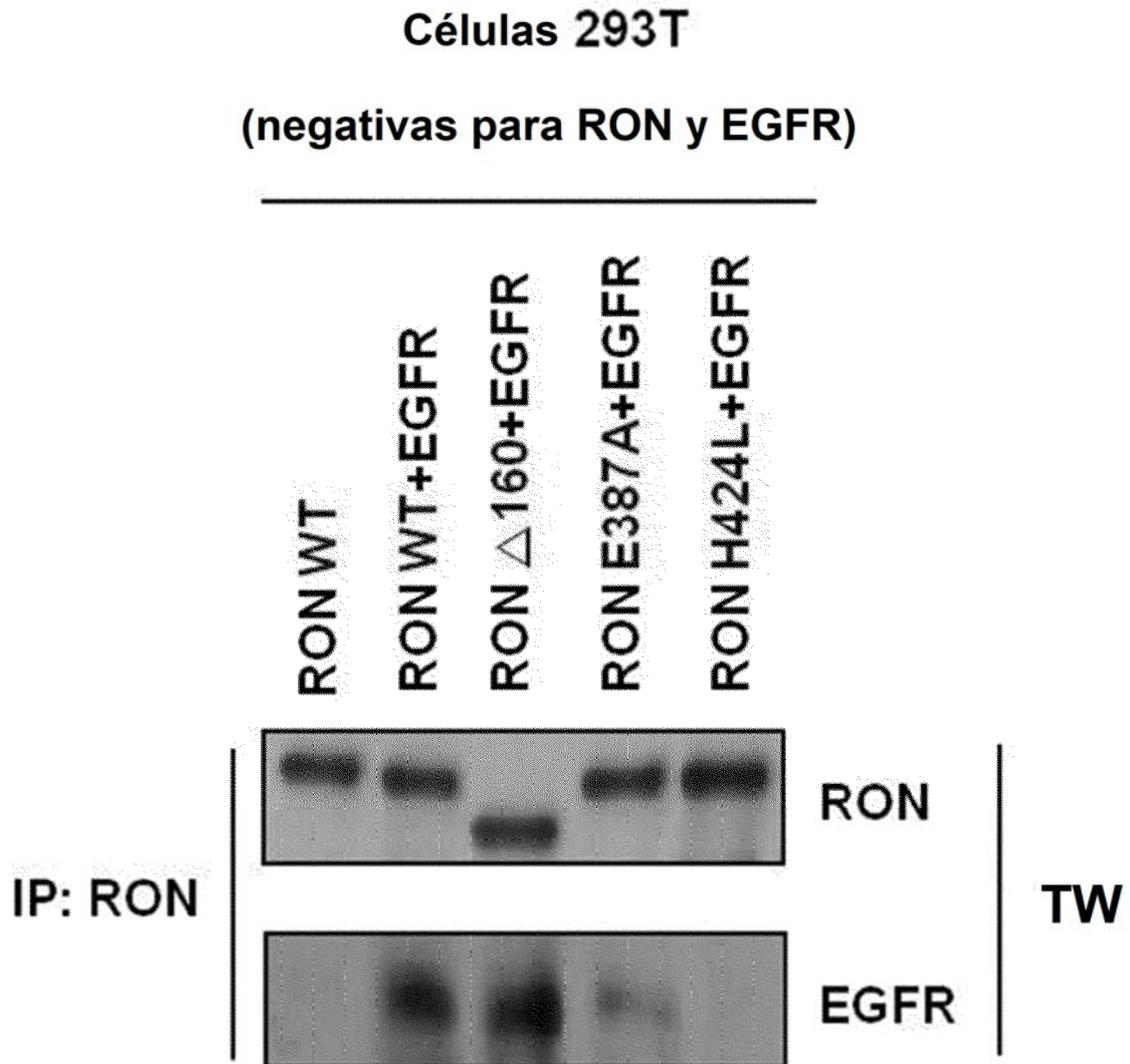


[Fig. 3e]

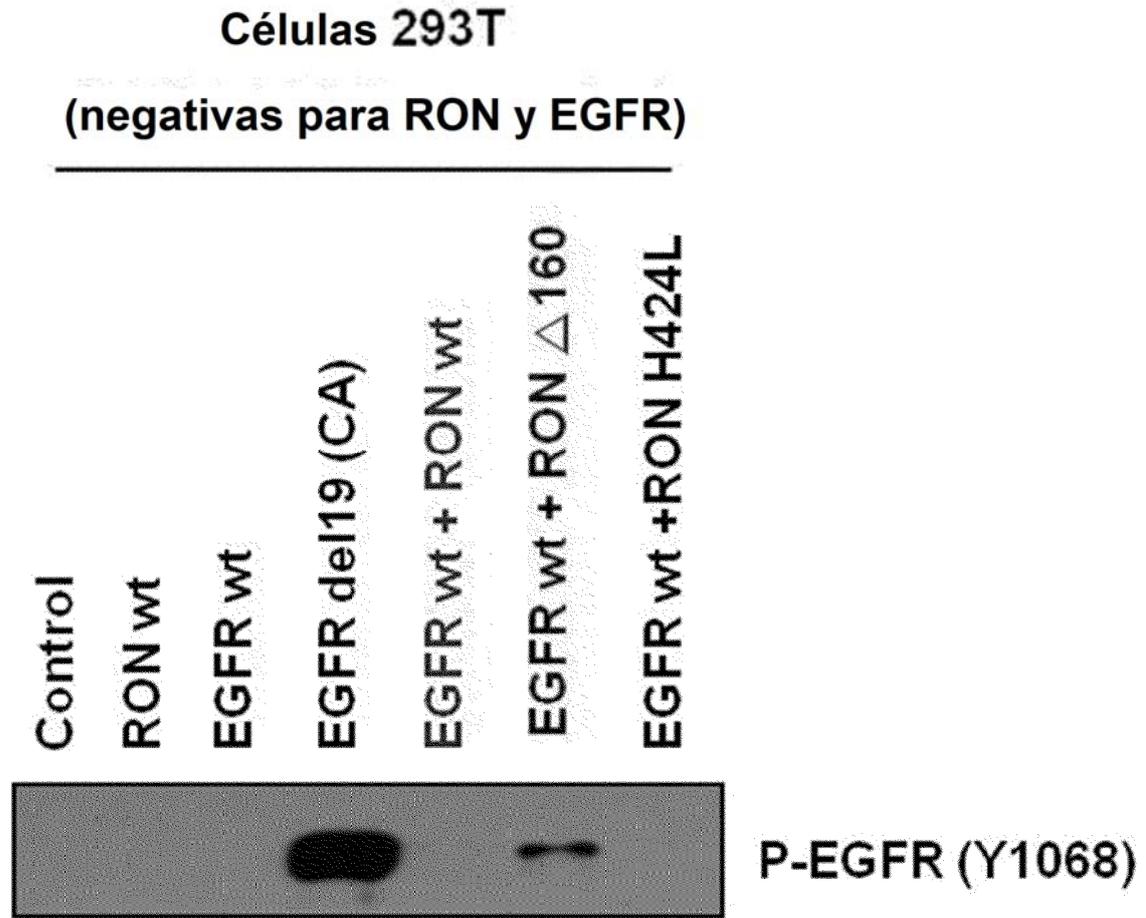


**Por modelado por ordenador**

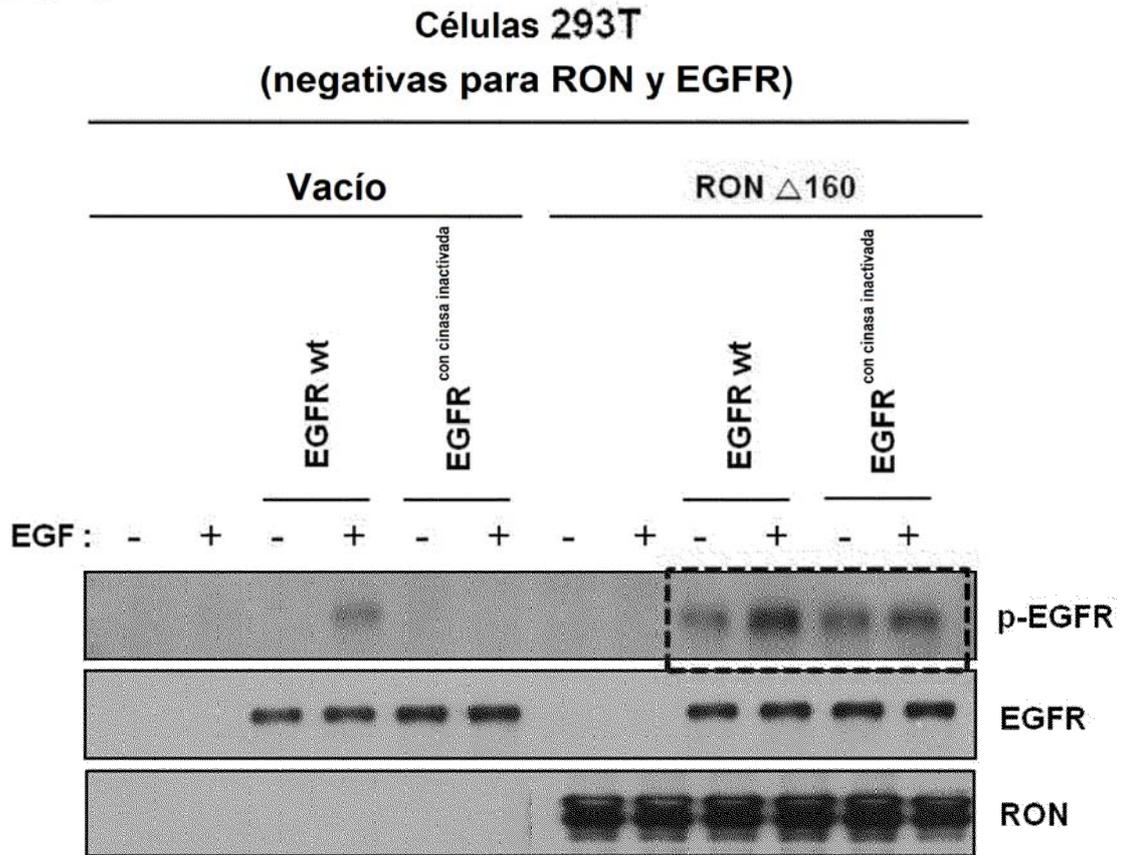
[Fig. 3f]



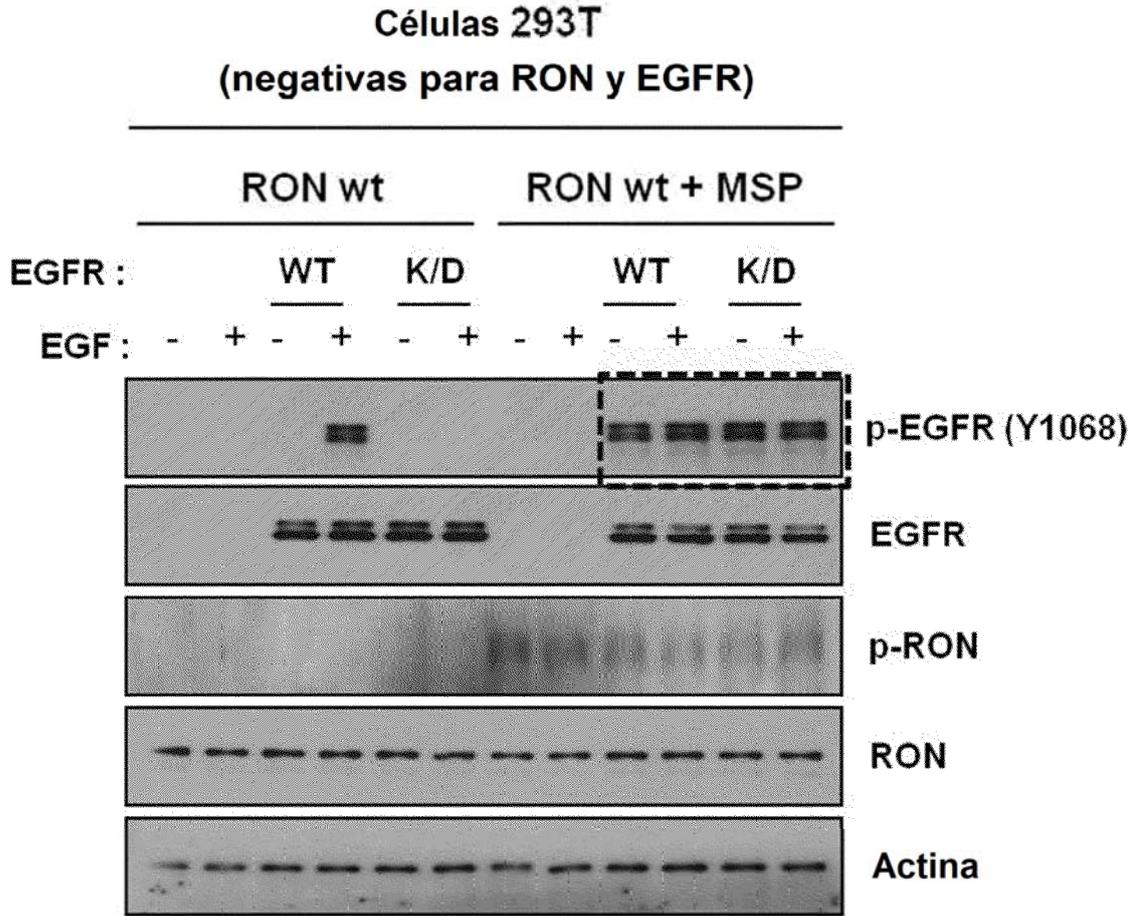
[Fig. 3g]



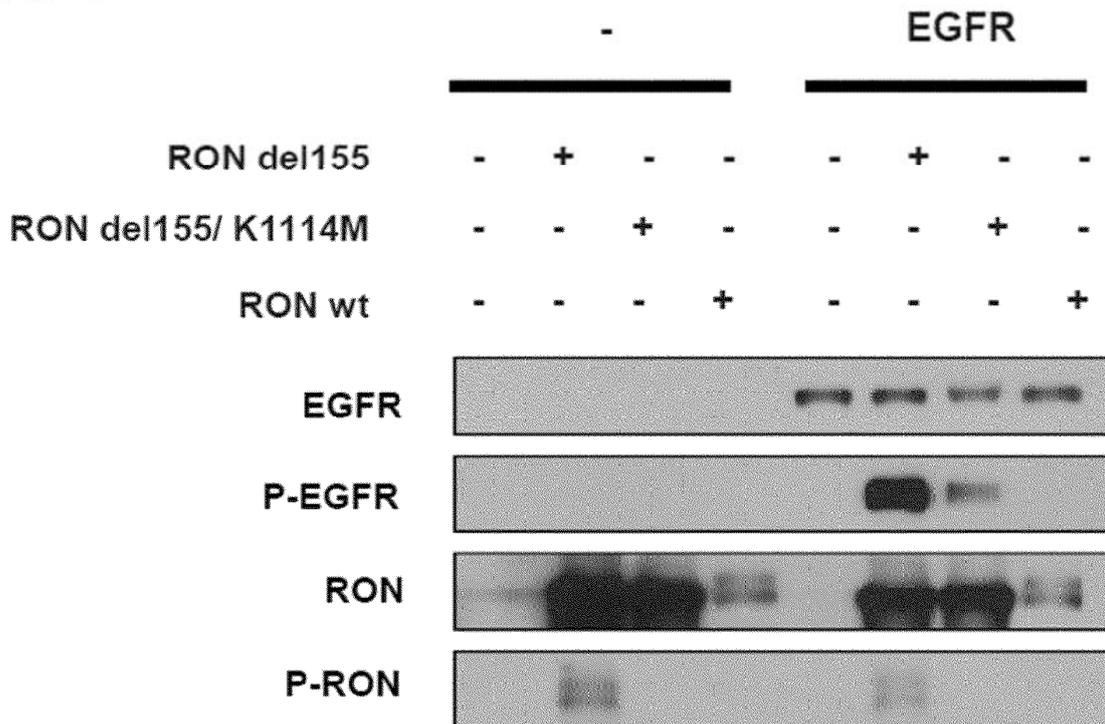
[Fig. 4a]



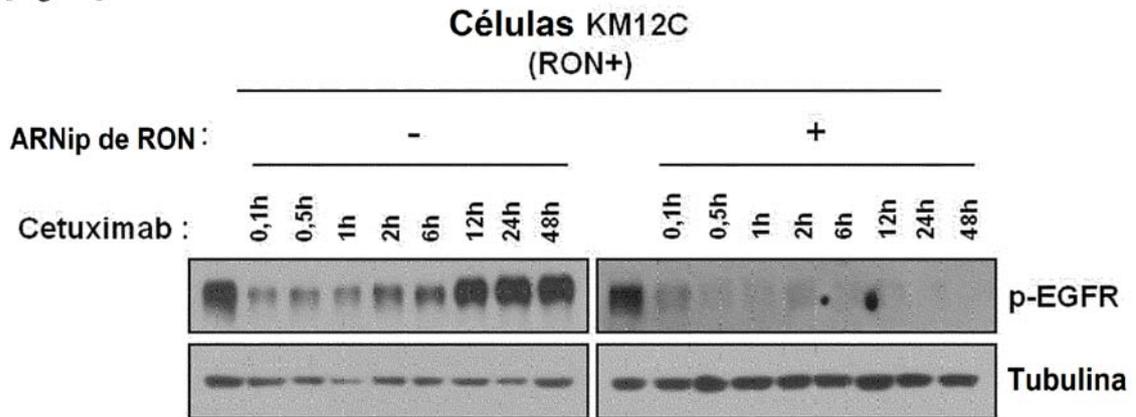
[Fig. 4b]



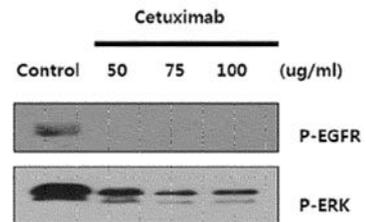
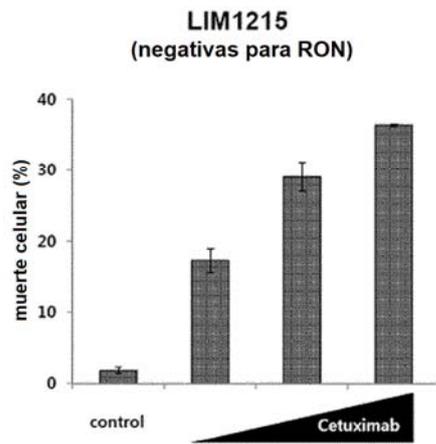
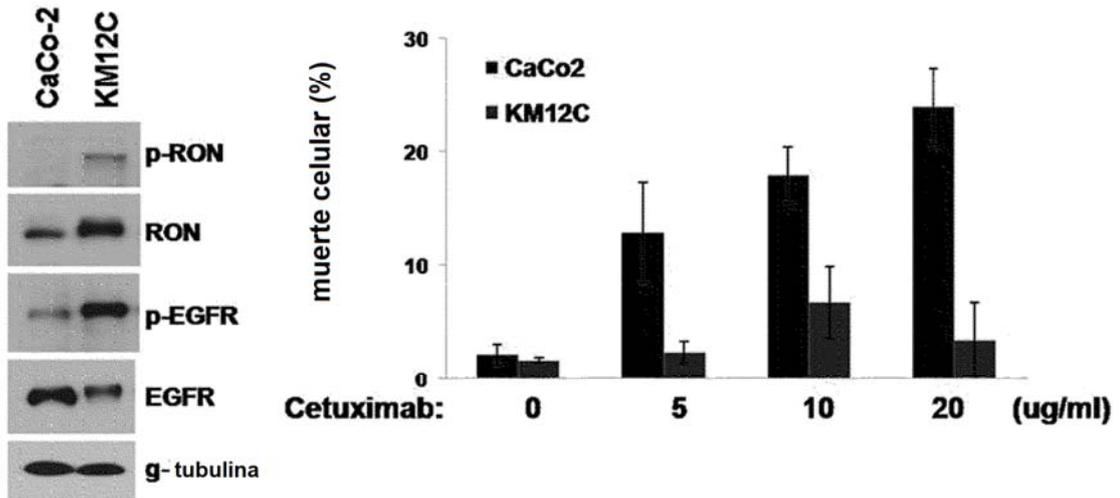
[Fig. 4c]



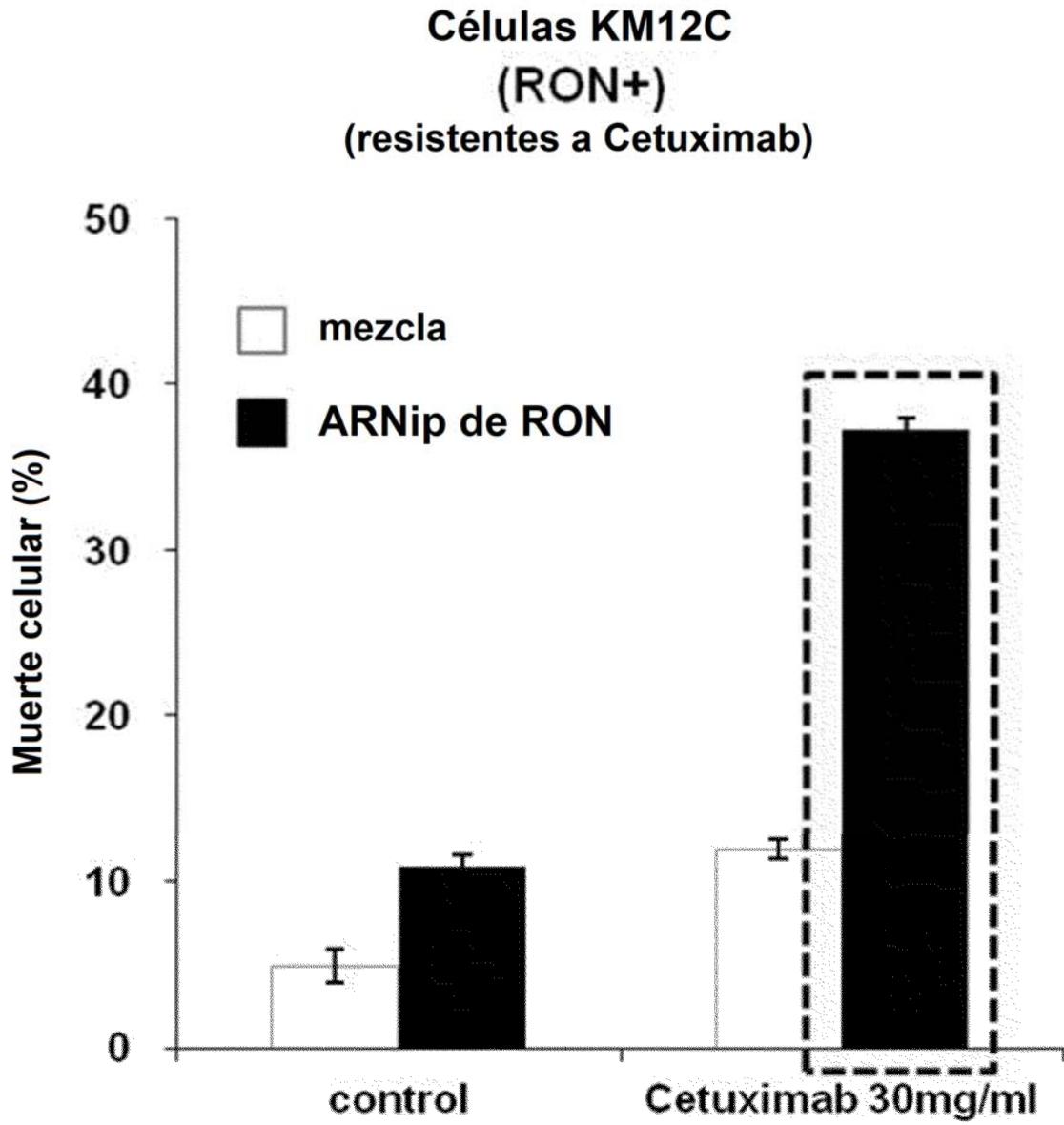
[Fig. 5a]



[Fig. 5b]



[Fig. 5c]



[Fig. 5d]

**Células KM12C  
(RON+)  
(resistentes a Cetuximab)**

ARNip de RON :

-

+

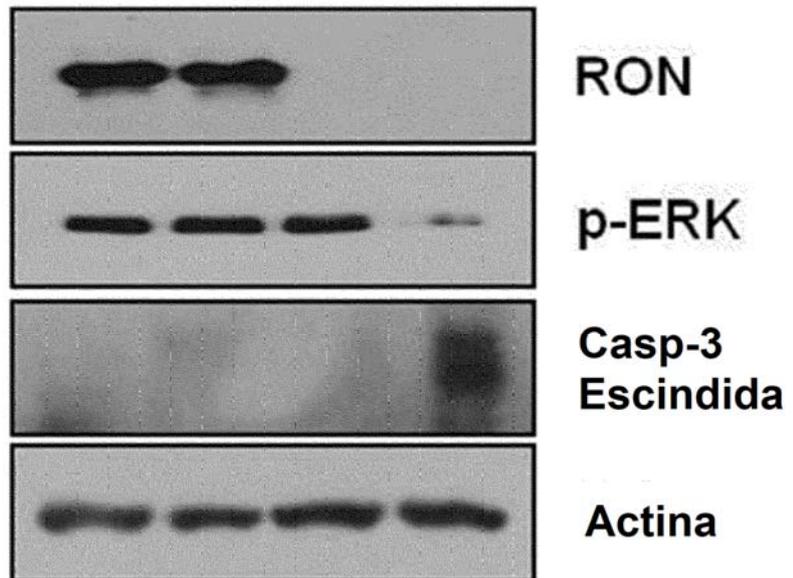
Cetuximab :

-

+

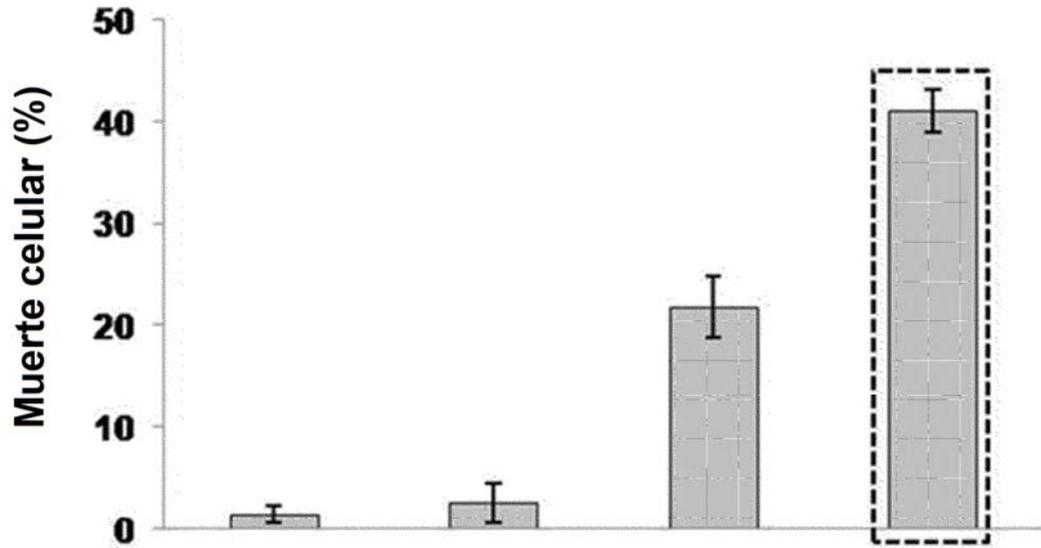
-

+



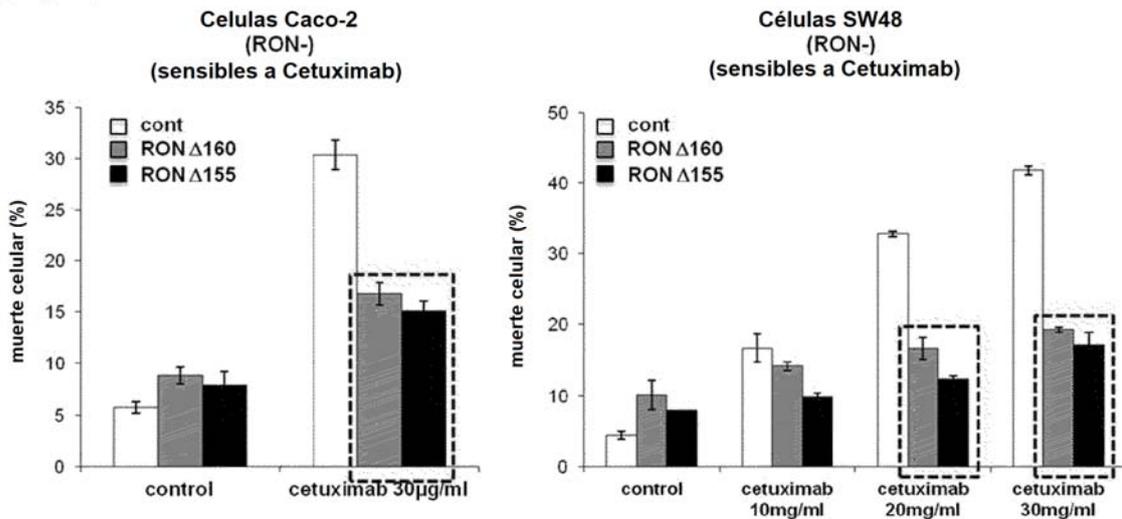
[Fig. 5e]

**Células KM12C  
(RON+)  
(resistentes a Cetuximab)**

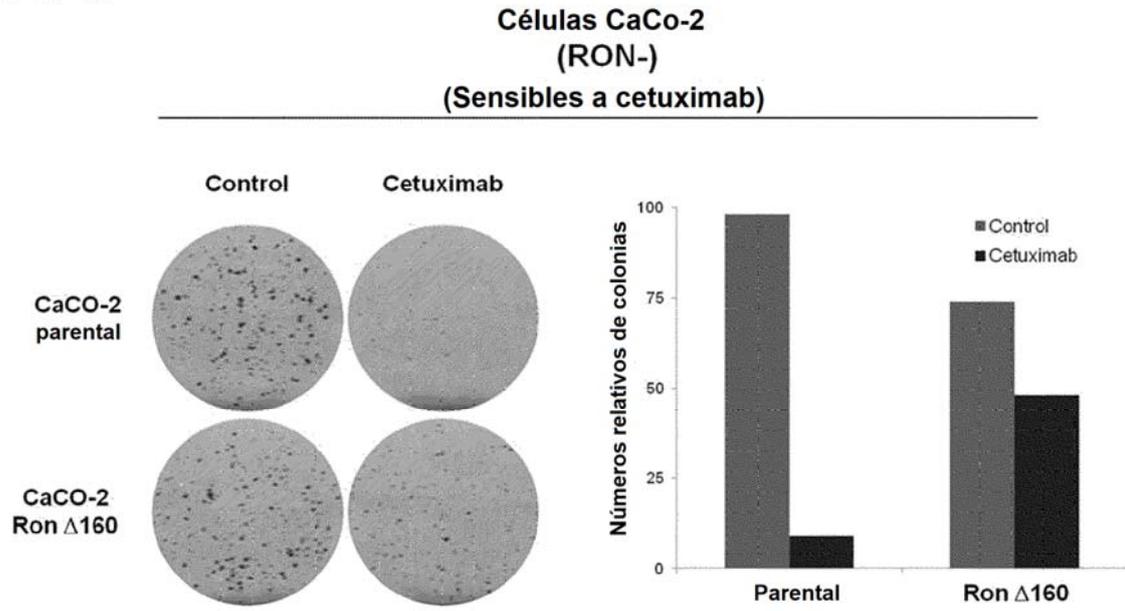


**Cetuximab:**    -                    +                    -                    +  
**LY2801653:**   -                    -                    +                    +

[Fig. 5f]

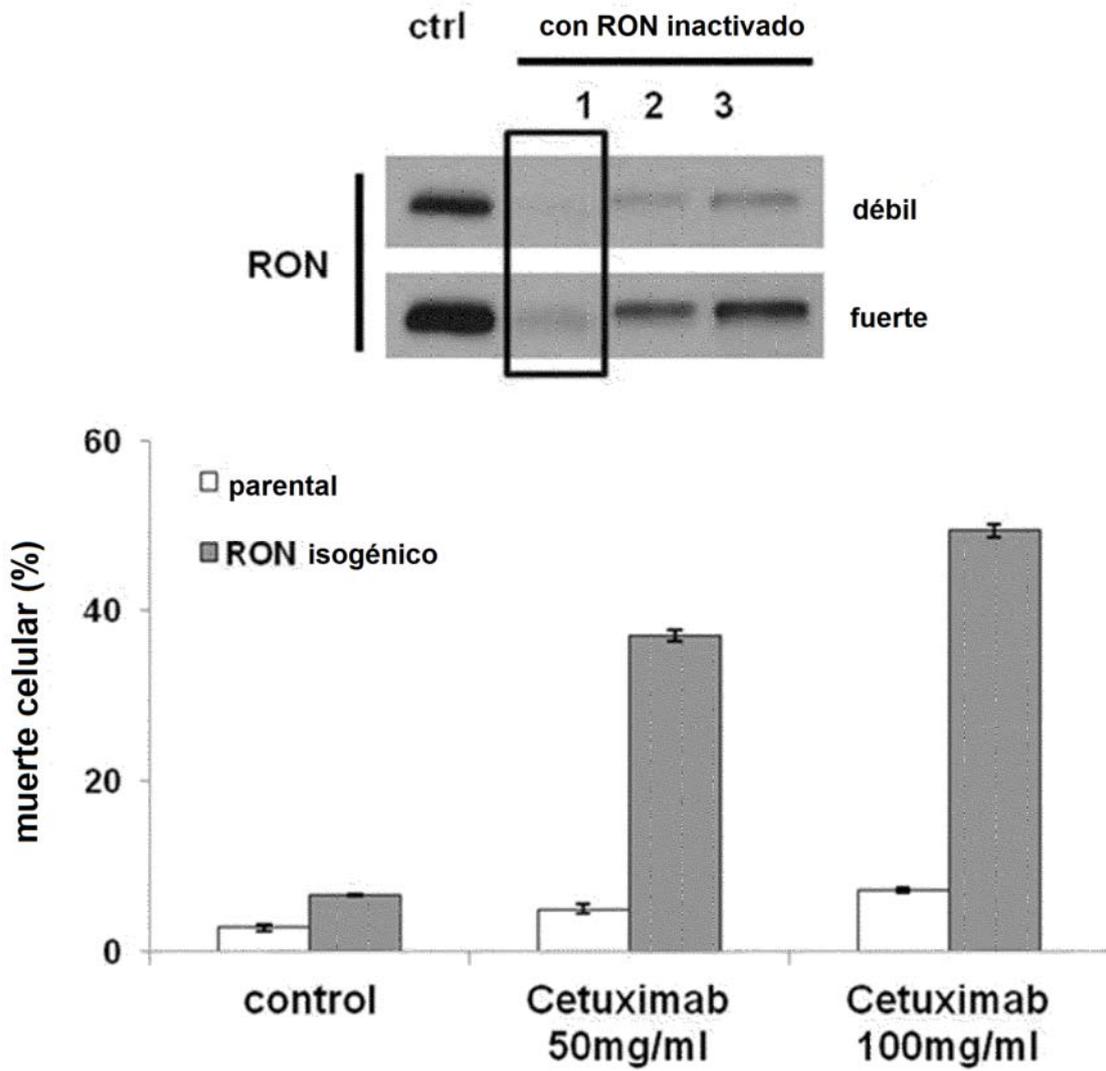


[Fig. 5g]



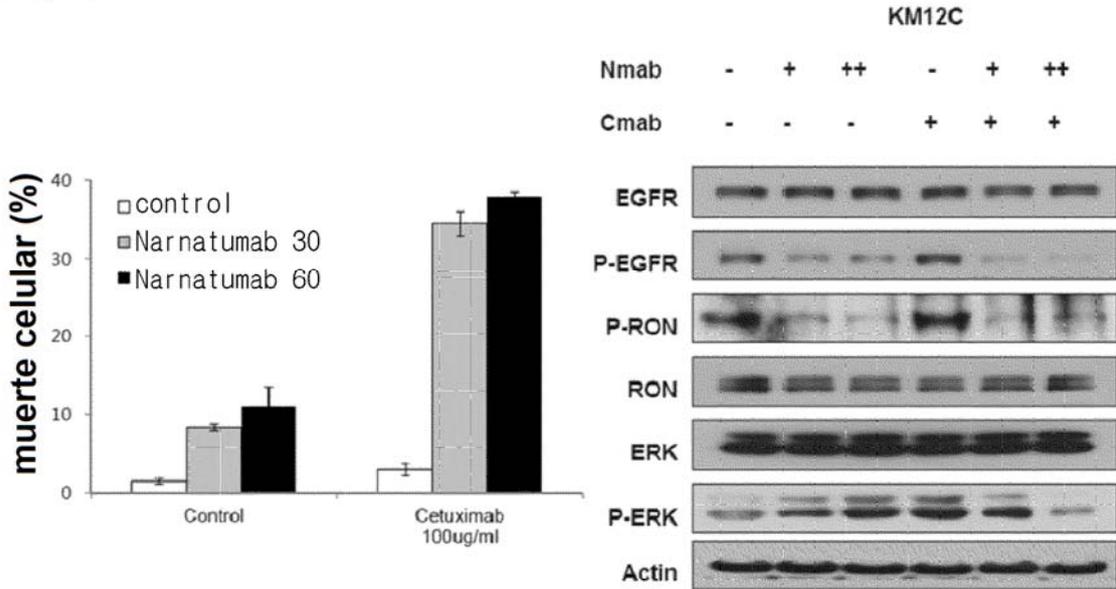
[Fig. 5h]

**Células KM12C  
(RON+)  
(resistentes a cetuximab)**





[Fig. 7]



[Fig. 8]

