

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 365**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

A61K 31/454 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2013** E 17198700 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** EP 3309263

54 Título: **Biomarcadores asociados con inhibidores de CDK**

30 Prioridad:

09.07.2012 US 201261669534 P

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

30.07.2020

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (33.3%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH;

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

(33.3%) y

BROAD INSTITUTE (33.3%)

72 Inventor/es:

CAPONIGRO, GIORDANO;

DELACH, SCOTT;

GARRAWAY, LEVI;

JAGANI, ZAINAB;

KIM, SUNKYU y

KRYUKOV, GREGORY

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 776 365 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

Biomarcadores asociados con inhibidores de CDK

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de farmacogenómica, y al uso de biomarcadores útiles en la determinación de la sensibilidad celular a un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina, a métodos de tratamiento y cribado de compuestos.

10 Antecedentes

La ciclina D3 humana (CCND3) se clonó por primera vez en 1992, cribando genes que regularían el ciclo celular, específicamente en la progresión de la fase G1-S (Xiong *et al.*, Genomics 1992, 13:575-584, Motokura *et al.*, J. Biol. Chem. 1992, 267:20412-20415). Es una de las tres ciclinas de tipo D (ciclinas D1, D2 y D3). Se descubrió que CCND3, como una ciclina de tipo D, se ensamblaría con las cinasas dependientes de ciclina CDK4 y CDK6 para formar holoenzimas que facilitan la progresión a través de G1 del ciclo celular (Bates *et al.*, Oncogene 1994, 9:71-79). Una vez pasada G1 tardía, CCND3 ya no es necesaria para la progresión del ciclo celular (Sherr, Trends in Bio.Sci 1995, 20(5):187-190).

20 Estructuralmente, CCND3 contiene un dominio de ciclina y dos dominios PEST. Los dominios PEST se usan en la degradación mediada por ubiquitina y se encuentran en proteínas que la célula necesita regular o reponer rápidamente. Los dominios PEST están enriquecidos en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) y varían de 12 a 60 aminoácidos de longitud. La CCND3 humana contiene un dominio PEST en los aminoácidos 256-268 (incluidos) y 271-291 (incluidos). En la investigación de la función de los dominios PEST, los investigadores han
25 descubierto que un solo alelo SNP en CCND3 provocaba un cambio de aminoácido de serina a alanina en el aminoácido 259 (S259A). El cambio S259A alteraba el dominio PEST y, como resultado, la CCND3 variante tenía estabilidad aumentada en comparación con el alelo no mutado (Savas *et al.*, OMICS 2007, 11(2): 200-208).

30 La CCND3 es necesaria en el desarrollo de los linfocitos. Cuando se generaban ratones con supresión de CCND3 (CCND3 -/-) para ensayar la función de CCND3 (Sicinska *et al.*, Cancer Cell 2003, 4(6):451-461), estos ratones con supresión no experimentaban expansión normal de los linfocitos T inmaduros, un defecto muy específico del tejido. Para abordar la función que CCND3 puede desempeñar en las neoplasias de linfocitos T, los ratones con supresión de CCND3 se cruzaron con ratones que sobreexpresaban p56LCK, que presentan números altos de tumores de linfocitos T. Los ratones que expresaban CCND3 de tipo silvestre/p56LCK formaban neoplasias de linfocitos T rápidamente. Por el contrario, la
35 formación de neoplasias de linfocitos T se retardaba 6-8 semanas en ratones con supresión de CCND3/p56LCK. Usando estos datos para investigar las neoplasias humanas, el mismo grupo usó una estrategia de ARNip para atenuar CCND3 en líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL) humana. La atenuación de CCND3 en las 12 líneas celulares ensayadas inhibió significativamente la proliferación celular, lo que confirma los datos en ratón y lo que demuestra la importancia de CCND3 en neoplasias de linfocitos T humanas.

40 Las mejoras en la facilidad, velocidad y coste de las tecnologías de secuenciación de ADN ha permitido a los investigadores examinar el genoma completo de una célula cancerosa para sus alteraciones. Adoptando esta estrategia, dos grupos realizaron un análisis del genoma completo de linfoma de linfocitos B grande difuso (DLBCL) para encontrar genes específicos y rutas que puedan ser responsables de este cáncer (Pasqualucci *et al.*, Nature Genetics 2011, 43(9): 830-837; Morin *et al.*, Nature 2011, 476:298-303). Esta estrategia encontró mutaciones de CCND3 en 3/54 de los DLBCL ensayados.

50 El documento WO-2009/150491 se refiere a un método de evaluación de si un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDK) inhibirá el crecimiento de una célula cancerosa. El método comprende medir la cantidad de ARNm o proteína de IFNEI en la célula cancerosa antes de administrar el inhibidor de CDK.

En esta divulgación, se usa una mutación de CCND3 como biomarcador o indicador, que predice y dirige a los pacientes a un tratamiento específico. El hecho de encontrar biomarcadores que indiquen qué paciente debería recibir un agente terapéutico resulta útil, especialmente en lo que se refiere al cáncer. Esto hace posible un tratamiento más agresivo y
55 puntual en lugar de una estrategia de prueba y error. Además, también resulta útil el descubrimiento de biomarcadores que indican que las células siguen siendo sensibles al tratamiento tras la administración. Estos biomarcadores se pueden usar para controlar la respuesta de los pacientes que reciben el agente terapéutico. Si los biomarcadores indican que el paciente se ha vuelto insensible al tratamiento, entonces la dosis administrada se puede incrementar, reducir, interrumpir completamente o se puede administrar un agente terapéutico adicional. Por tanto, hay una necesidad de desarrollar biomarcadores asociados con inhibidores de cinasa dependiente de ciclina (CDK). Esta estrategia garantiza que los
60 pacientes correctos reciban el tratamiento apropiado y durante el transcurso del tratamiento puede controlarse en el paciente la sensibilidad continuada al inhibidor de CDK.

65 En el desarrollo de inhibidores de CDK, los biomarcadores específicos ayudarán a comprender el mecanismo de acción tras la administración. El mecanismo de acción puede implicar una cascada compleja de mecanismos reguladores en el

ciclo celular y una expresión génica diferencial. Este análisis se hace en la fase preclínica del desarrollo de fármacos para determinar la sensibilidad particular de las células cancerosas al inhibidor de CDK candidato y la actividad del candidato. En la investigación farmacodinámica, resulta de particular interés la identificación de marcadores específicos de sensibilidad y actividad tales como los que se describen en este documento.

5

Sumario de la invención

La divulgación proporciona que una mutación en el dominio PEST de la ciclina D3 (en adelante «CCND3») actúe como biomarcador específico en la determinación de la sensibilidad de las células a inhibidores de la cinasa 4 dependiente de ciclina y/o la cinasa 6 dependiente de ciclina (en adelante «CDKi»). La divulgación incluye un análisis mutacional de CCND3 que produce una «característica génica distintiva» para CDKi que tiene precisión y especificidad aumentadas en la predicción de las células cancerosas que son sensibles a un CDKi. El método analiza la mutación de CCND3 en un dominio PEST, en una muestra de cáncer tomada de un paciente y en comparación con un control no canceroso o normal y predice la sensibilidad de la muestra de cáncer a un CDKi. El análisis de la mutación de CCND3 puede ser indicativo de una respuesta favorable o una desfavorable. La invención es un ejemplo de «medicina personalizada» en la que los pacientes se tratan basándose en una característica genómica funcional distintiva que es específica de ese individuo.

10

15

El valor predictivo de las mutaciones de CCND3 también puede usarse después del tratamiento con un CDKi para determinar si el paciente sigue siendo sensible al tratamiento. Una vez se ha administrado un agente terapéutico para CDKi, puede usarse una mutación de CCND3 como biomarcador para controlar la sensibilidad continuada del paciente al tratamiento con CDKi. Esto resulta útil a la hora de determinar que los pacientes reciben el ciclo correcto de tratamiento. La divulgación comprende un método de predicción y control de la sensibilidad de un paciente al tratamiento con CDKi. El método incluye la etapa de administración de un CDKi a un paciente y analizar para buscar una mutación de CCND3 en una muestra biológica obtenida del paciente tratado y compararla con CCND3 en una muestra no cancerosa o normal. La respuesta del paciente se evalúa basándose en la detección de una mutación de CCND3 en un dominio PEST. Además, la detección y/o alteración en el nivel de expresión proteínica de CCND3 a partir de una célula que contiene una mutación de CCND3 en comparación con una célula normal o de control de tipo silvestre puede ser predictiva de la sensibilidad del paciente al tratamiento. El patrón de cambios a nivel de expresión proteínica de CCND3 mutante puede ser indicativo de una respuesta favorable del paciente o una desfavorable.

20

25

30

Descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico de la proteína CCND3 y determinadas mutaciones. Los dominios PEST de CCND3 son los aminoácidos 256-268 y 271-291 de CCND3 humana.

35

La figura 2A es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 de tipo silvestre que demuestran insensibilidad a CDKi(1).

La figura 2B es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 mutante que demuestran sensibilidad a CDKi(1).

40

La figura 2C es un diagrama de recuadros de los valores de CE⁵⁰ para líneas celulares de CCND3 de tipo silvestre y mutada con CDKi(1).

La figura 3A es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 de tipo silvestre que demuestran insensibilidad a CDKi(2).

45

La figura 3B es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 mutante que demuestran sensibilidad a CDKi(2).

50

La figura 3C es un diagrama de recuadros de los valores de CE⁵⁰ para líneas celulares de CCND3 de tipo silvestre y mutadas con CDKi(2).

La figura 4A es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 de tipo silvestre que demuestran insensibilidad a CDKi(3).

55

La figura 4B es un gráfico de viabilidad celular para células que contienen CCND3 mutante que demuestran insensibilidad a CDKi(3).

La figura 4C es un diagrama de recuadros de los valores de CE⁵⁰ para líneas celulares de CCND3 de tipo silvestre y mutadas con CDKi(3).

60

Las figuras 5A/B son transferencias de Western que demuestran que mutaciones de CCND3 provocan estabilidad proteínica aumentada.

65

La figura 6A es una transferencia de Western que muestra que las células que contienen mutación de CCND3 producen mayores niveles de proteína CCND3 mutante.

5 La figura 6B es una representación gráfica de la expresión de ARNm en líneas celulares de tipo silvestre y líneas celulares que contienen una mutación de CCND3.

Descripción de la invención

10 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En este documento se divulga un método de determinación de la sensibilidad de una célula cancerosa a un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDKi), comprendiendo el método: a) ensayar una mutación de ciclina D3 (CCND3) en una célula cancerosa; y b) comparar la mutación de CCND3 con una célula de control no cancerosa o normal en el que la presencia de una mutación de CCND3 en la célula cancerosa indica que es sensible a un CDKi.

15 El método en el que la célula cancerosa se selecciona del grupo que consiste en: linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt.

El método en el que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST.

20 El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO: 2.

El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO: 2.

25 El método en el que la mutación de CCND3 es cualquier mutación de la tabla 2.

30 El método en el que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina a lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina a treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina a leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina a serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina a ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).

El método en el que el CDKi se selecciona de la tabla 1.

35 En este documento se divulga un método de predicción de la sensibilidad de un paciente con cáncer para el tratamiento con un CDKi, comprendiendo el método: a) ensayar una mutación de CCND3 en una muestra de cáncer obtenida del paciente; y b) comparar la mutación de CCND3 con una muestra de control no cancerosa o normal en el que la presencia de una mutación de CCND3 en la muestra de cáncer indica que el paciente es sensible al tratamiento con un CDKi.

40 El método en el que la muestra de cáncer se selecciona del grupo que consiste en: linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt.

El método en el que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST.

45 El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO: 2.

El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO: 2.

50 El método en el que la mutación de CCND3 es cualquier mutación de la tabla 2.

55 El método en el que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina a lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina a treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina a leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina a serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina a ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).

El método en el que el CDKi se selecciona de la tabla 1.

60 El método comprende, además: c) medir la expresión proteínica diferencial de CCND3 en una muestra de cáncer obtenida del paciente; y d) comparar la expresión proteínica de CCND3 en la muestra de cáncer con la expresión proteínica de CCND3 de una muestra de control no cancerosa o normal, en el que niveles aumentados de proteína CCND3 en la muestra de cáncer indican que el paciente es sensible al tratamiento con un CDKi.

5 En este documento se divulga un método de tratamiento de un paciente con cáncer con un CDKi, comprendiendo el método: a) ensayar mutaciones de CCND3 en una muestra de cáncer obtenida del paciente; b) comparar el estado mutacional de CCND3 en la muestra de cáncer con una muestra de control no cancerosa o normal en el que la presencia de una mutación de CCND3 indica que el paciente es sensible al tratamiento con un CDKi; c) administrar al paciente un CDKi; y d) ensayar la supresión del crecimiento tumoral.

El método en el que la muestra de cáncer se selecciona del grupo que consiste en: linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt.

10 El método en el que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST.

El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO: 2.

15 El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO: 2.

El método en el que la mutación de CCND3 es cualquier mutación de la tabla 2.

20 El método en el que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina a lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina a treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina a leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina a serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina a ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).

25 El método en el que el CDKi se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

El método en el que el CDKi se selecciona de la tabla 1.

30 En este documento se divulga un método de cribado de CDKi candidatos, comprendiendo el método: a) poner en contacto una célula que contiene una mutación de CCND3 con un CDKi candidato; b) medir la reducción en la viabilidad celular; y c) comparar la reducción en la viabilidad celular de la célula mutante para CCND3 en contacto con el CDKi candidato con la viabilidad celular de la célula mutante para CCND3 en contacto con un CDKi de control.

35 El método en el que el CDKi de control se selecciona de la tabla 1.

El método en el que la célula que contiene una mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt.

40 El método en el que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST.

El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO: 2.

45 El método en el que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO: 2.

El método en el que la mutación de CCND3 es cualquier mutación de la tabla 2.

50 El método en el que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina a lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina a treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina a leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina a serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina a ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).

55 La invención se refiere a una composición que comprende un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDKi) para su uso en el tratamiento del cáncer en una población de pacientes con cáncer seleccionada, en la que la población de pacientes con cáncer se selecciona basándose en si muestra una mutación de CCND3 en una muestra de células cancerosas obtenida de dicho paciente en comparación con una muestra de células de control normales, en la que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST, en la que la muestra de cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt.

60 En este documento se divulga un kit para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para el tratamiento con un CDKi, que comprende: i) un medio para detectar una mutación de CCND3; e ii) instrucciones sobre el modo de usar dicho kit.

65

Definiciones

5 La forma del singular «un/a» y «el/la», como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluye las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión «una célula» incluye una pluralidad de células, incluidas sus mezclas.

10 Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluidos los intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no siempre se mencione explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término «aproximadamente». También debe entenderse, aunque no siempre se mencione explícitamente, que los reactivos descritos en este documento son meramente ilustrativos y que en la técnica se conocen equivalentes de estos.

15 Los términos «marcador» o «biomarcador» se usan indistintamente en este documento. Un biomarcador es un ácido nucleico o polipéptido y la presencia o ausencia de una mutación o expresión diferencial del polipéptido se usa para determinar la sensibilidad a cualquier CDKi. Por ejemplo, CCND3 es un biomarcador en una célula cancerosa cuando está mutada en comparación con CCND3 en una célula (no cancerosa) normal o célula de control.

20 Una célula es «sensible» o presenta «sensibilidad» para la inhibición con un CDKi cuando la viabilidad celular se reduce tras el tratamiento con el CDKi en comparación con un control no tratado.

«CCND3» se refiere al gen de ciclina D3. Salvo que se indique específicamente de otro modo, CCND3, como se usa en este documento, se refiere a CCND3 humana, números de acceso BC011616 (ácido nucleico de CCND3 (SEQ ID NO: 1)) y AAH11616 (proteína CCND3 (SEQ ID NO: 2)).

25 Una secuencia «de tipo silvestre», «normal» o «no mutante» se refiere a secuencias de CCND3 que comprenden los números de acceso BC011616/ AAH11616 ((ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) y proteína (SEQ ID NO: 2) respectivamente)).

30 Un «mutante» o «mutación» es cualquier cambio en la secuencia de ADN o proteínica que se desvía de CCND3 de tipo silvestre. Esto incluye, sin limitación, cambios de ácido nucleico de una sola base o cambios de un solo aminoácido, inserciones, eliminaciones y truncamientos del gen de CCND3 y su proteína correspondiente.

Una «célula de control», «célula normal» o «de tipo silvestre» se refiere a tejido o células no cancerosas.

35 Un «tejido de control», «tejido normal» o «de tipo silvestre» se refiere a tejido o células no cancerosas.

40 Las expresiones «ácido nucleico» y «polinucleótido» se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de un gen (por ejemplo, una sonda, cebador, marca SAGE o EST), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones de la estructura del nucleótido se pueden conferir antes o después del acoplamiento del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir con componentes que no sean nucleótidos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de su polimerización tal como mediante conjugación con un componente marcador. El término también se refiere a moléculas tanto mono- como bicatenarias. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de esta invención que sea un polinucleótido engloba tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que se sabe o prevé que constituirán la forma bicatenaria.

50 Un «gen» se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco abierto de lectura (ORF) que puede codificar un polipéptido o proteína particular después de transcribirse y traducirse. Se puede usar una secuencia polinucleotídica para identificar fragmentos más grandes o secuencias codificantes de longitud completa del gen con el que se asocian. Los métodos para aislar secuencias de fragmentos más grandes son conocidos por los expertos en la técnica.

55 La «expresión génica» o, como alternativa, un «producto génico» se refiere a los ácidos nucleicos o aminoácidos (por ejemplo, péptido o polipéptido) que se generan cuando un gen se transcribe y traduce.

60 El término «polipéptido» se usa indistintamente con el término «proteína» y, en su sentido más amplio, se refiere a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos o miméticos peptídicos. Las subunidades pueden estar conectadas mediante enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar conectada mediante otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc.

65 El término «aminoácido», como se usa en este documento, se refiere tanto a aminoácidos naturales como a no naturales o sintéticos, y tanto a isómeros ópticos D como a L, análogos de aminoácidos y miméticos peptídicos. Un péptido de tres

o más aminoácidos se denomina de forma común oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina de forma común polipéptido o proteína.

El término «aislado» significa separado de otros constituyentes, celulares y de otro tipo, con los que el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o su(s) fragmento(s), está(n) asociado(s) normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, un polinucleótido aislado está separado de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con los que está asociado normalmente en su entorno nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Como resulta evidente para los expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo de origen no natural o su(s) fragmento(s) no requiere(n) «aislamiento» para distinguirlo(s) de su homólogo de origen natural. Además, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o su(s) fragmento(s) «concentrado(s)», «separado(s)» o «diluido(s)», es/son distinguible(s) de su homólogo de origen natural por que la concentración o número de moléculas por volumen es mayor en una versión «concentrada» o menor en una versión «separada» que la de su homólogo de origen natural. Un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o su(s) fragmento(s) que difiere(n) del homólogo de origen natural en su secuencia primaria o, por ejemplo, en su patrón de glucosilación, no tiene(n) que estar presente(s) en su forma aislada, ya que se distingue(n) de su homólogo de origen natural por su secuencia primaria o, como alternativa, por otra característica tal como el patrón de glucosilación. Por tanto, un polinucleótido de origen no natural se proporciona como una realización separada del polinucleótido de origen natural aislado. Una proteína producida en una célula bacteriana se proporciona como una realización separada de la proteína de origen natural aislada de una célula eucariótica en la que se produce en la naturaleza.

Una «sonda», cuando se usa en el contexto de la manipulación de polinucleótidos, se refiere a un oligonucleótido que se proporciona como reactivo para detectar una diana potencialmente presente en una muestra de interés mediante hibridación con la diana. Normalmente, una sonda comprenderá un marcador o un medio por el que se pueda unir un marcador, ya sea antes o después de la reacción de hibridación. Los marcadores adecuados incluyen, sin carácter limitante, radioisótopos, fluorocromos, compuestos quimioluminiscentes, colorantes y proteínas, incluidas las enzimas.

Una «sonda» es un polinucleótido corto, generalmente con un grupo 3'-OH libre que se une a una diana o «molde» potencialmente presente en una muestra de interés mediante hibridación con la diana y posteriormente fomenta la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana. Una «reacción en cadena de la polimerasa» («PCR») es una reacción en la que se obtienen copias replicadas de un polinucleótido diana usando un «par de cebadores» o un «conjunto de cebadores» que consiste en un cebador «en dirección 5'» y uno «en dirección 3'», y un catalizador de polimerización, tal como una ADN-polimerasa, y normalmente una enzima polimerasa termoestable. Los métodos para la PCR son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *PCR: A Practical Approach*, M. MacPherson *et al.*, IRL Press en Oxford University Press (1991). Todos los procesos de producción de copias replicadas de un polinucleótido, tales como la PCR o la clonación de genes, se denominan de forma colectiva en este documento «replicación». Un cebador también se puede usar como sonda en reacciones de hibridación tales como los análisis de inmunotransferencia de Northern o Southern (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a edición (1989)).

El término «expresión», como se usa en este documento, se refiere al proceso mediante el que el ADN se transcribe en ARNm y/o el proceso mediante el que el ARNm transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se obtiene a partir de ADN genómico, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARNm en una célula eucariótica.

La expresión «expresado de forma diferencial», cuando se aplica a un gen, se refiere a la producción diferencial del ARNm transcrito y/o traducido a partir del gen o el producto proteínico codificado por el gen. Un gen expresado de forma diferencial puede estar sobreexpresado o subexpresado en comparación con el nivel de expresión de una célula normal o de control. Sin embargo, como se usa en este documento, la sobreexpresión es un aumento en la expresión génica y, en general, es al menos 1,25 veces o, como alternativa, al menos 1,5 veces o, como alternativa, al menos 2 veces o, como alternativa, al menos 3 veces o, como alternativa, al menos 4 veces la expresión sobre la detectada en una célula o tejido homólogo normal o de control. Como se usa en este documento, la subexpresión es una reducción de la expresión génica y, en general, es al menos 1,25 veces o, como alternativa, al menos 1,5 veces o, como alternativa, al menos 2 veces o, como alternativa, al menos 3 veces o, como alternativa, al menos 4 veces la expresión por debajo de la detectada en una célula o tejido homólogo normal o de control. La expresión «expresado de forma diferencial» también se refiere a cuando se detecta expresión en una célula cancerosa o tejido canceroso, pero la expresión es una célula de control o tejido normal (por ejemplo, célula o tejido no canceroso) es indetectable.

Puede producirse un alto nivel de expresión del gen a causa de la sobreexpresión del gen o un aumento en el número de copias del gen. El gen también puede traducirse en niveles proteínicos aumentados a causa de la desregulación o ausencia de un regulador negativo. Finalmente, puede producirse alta expresión del gen debido a estabilización aumentada o degradación reducida de la proteína, que provoca acumulación de la proteína.

Un «perfil de expresión génica» o «característica génica distintiva» se refiere a un patrón de expresión de al menos un biomarcador que reaparece en múltiples muestras y refleja una propiedad compartida por esas muestras, tal como mutación, respuesta a un tratamiento particular o activación de un proceso biológico o ruta particular en las células. Un perfil de expresión génica se diferencia entre muestras que comparten esa propiedad común y las que no con mejor

precisión de lo que probablemente se conseguiría asignando las muestras a los dos grupos al azar. Un perfil de expresión génica se puede usar para predecir si muestras de estado desconocido comparten esa propiedad común o no. Debe esperarse algo de variación entre el o los biomarcadores y el perfil típico, pero la similitud global del o de los biomarcadores con el perfil típico es tal que es estadísticamente improbable que la similitud se observara por casualidad en muestras que no comparten la propiedad común que refleja el o los biomarcadores.

El término «ADNc» se refiere a ADN complementario, es decir, moléculas de ARNm presentes en una célula u organismo que se convierten en ADNc con una enzima tal como la retrotranscriptasa. Una «genoteca de ADNc» es una colección de todas las moléculas de ARNm presentes en una célula u organismo, convertidas todas ellas en moléculas de ADNc con la enzima retrotranscriptasa e insertadas a continuación en «vectores» (otras moléculas de ADN que pueden seguir replicándose tras la adición de ADN exógeno). Los vectores ilustrativos para las genotecas incluyen un bacteriófago (también conocido como «fago»), virus que infectan bacterias, por ejemplo, un fago lambda. A continuación, la genoteca se puede analizar con una sonda para determinar el ADNc específico (y, por tanto, el ARNm) de interés.

Las expresiones «soporte de fase sólida» o «soporte sólido», que se usan indistintamente, como se usan en este documento, no se limitan a un tipo específico de soporte. Por el contrario, existe una amplia gama de soportes disponibles y estos son conocidos por el experto en la técnica. Los soportes de fase sólida incluyen geles de sílice, resinas, películas de plástico derivatizado, microesferas de vidrio, microesferas de plástico, geles de alúmina, micromatrices y chips. La expresión «soporte sólido», como se usa en este documento, también incluye liposomas, células y matrices sintéticas que presentan antígenos. Un soporte de fase sólida adecuado se puede seleccionar en función del uso final deseado y la idoneidad para varios protocolos. Por ejemplo, para la síntesis de péptidos, el soporte de fase sólida puede referirse a resinas tales como poliestireno (por ejemplo, resina PAM obtenida en Bachem Inc., Península Laboratories), resina poliHIPE(R)TM (obtenida en Aminotech, Canadá), resina de poliamida (obtenida en Península Laboratories), resina de poliestireno injertado con polietilenglicol (TentaGelRTM, Rapp Polymere, Tubingen, Alemania) o resina de polidimetilacrilamida (obtenida en Milligen/Biosearch, California).

También se puede unir un polinucleótido a un soporte sólido para su uso en ensayos de cribado de alto rendimiento. El documento PCT WO 97/10365, por ejemplo, divulga la construcción de chips de oligonucleótidos de alta densidad. Véanse también las patentes de EE. UU. n.º 5 405 783, 5 412 087 y 5 445 934. Usando este método, las sondas se sintetizan en una superficie de vidrio derivatizado para formar las matrices del chip. Se acoplan fosforamiditos de nucleósidos fotoprotectidos a la superficie del vidrio, se desprotegen selectivamente mediante fotólisis a través de una máscara fotolitográfica y se hacen reaccionar con un segundo fosforamidito de nucleósido protegido. El proceso de acoplamiento/desprotección se repite hasta que se completa la sonda deseada.

Como un ejemplo, la actividad transcripcional puede evaluarse midiendo los niveles de ARN mensajero usando un genochip tal como los genochips Affymetrix® HG-U133-Plus-2 (Affymetrix, Santa Clara, CA). La cuantificación de alto rendimiento en tiempo real del ARN de una gran cantidad de genes de interés, por tanto, llega a ser posible en un sistema reproducible.

Las expresiones «condiciones de hibridación rigurosas» se refiere a condiciones en las que una sonda de ácido nucleico hibridará específicamente con su subsecuencia diana y no con otras secuencias. Las condiciones que determinan la rigurosidad de la hibridación incluyen: temperatura, fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturalizantes tales como formamida. La variación de uno de estos factores puede influir sobre otro factor y un experto en la técnica apreciará los cambios en las condiciones necesarias para mantener el nivel deseado de rigurosidad. Un ejemplo de una hibridación altamente rigurosa es: cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 65-68 °C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50 % a 42 °C (véase Sambrook, *supra*). Un ejemplo de una hibridación «moderadamente rigurosa» son las condiciones de: cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 50-65 °C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 20 % a 37-50 °C. Las condiciones moderadamente rigurosas se usan cuando se desea una cantidad moderada de emparejamientos incorrectos del ácido nucleico. Un experto en la técnica apreciará que el lavado forma parte de las condiciones de hibridación. Por ejemplo, las condiciones de lavado pueden incluir SSC 0,2X-0,1X/SDS al 0,1 % y temperaturas de 42-68 °C, en las que el hecho de incrementar la temperatura incrementa la rigurosidad de las condiciones de lavado.

Cuando la hibridación se produce en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos monocatenarios, la reacción se denomina «reasociación» y se describe que esos polinucleótidos son «complementarios». Un polinucleótido bicatenario puede ser «complementario» u «homólogo» respecto a otro polinucleótido, si se puede producir hibridación entre una de las hebras del primer nucleótido y el segundo. La «complementariedad» u «homología» (el grado en que un polinucleótido es complementario respecto a otro) es cuantificable en lo que se refiere a la proporción de bases en hebras opuestas que cabe esperar que formen puentes de hidrógeno entre sí, de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases aceptadas generalmente.

Que un polinucleótido o región polinucleotídica (o un polipéptido o región polipeptídica) tenga un determinado porcentaje (por ejemplo, un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %) de «identidad de secuencia» con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son iguales al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad secuencial se pueden determinar usando programas informáticos conocidos en

la técnica, por ejemplo, los que se describen en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., (1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, se usan los parámetros por defecto para la alineación. Un programa de alineación preferente es BLAST, usando los parámetros por defecto. En particular, los programas preferentes son BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros por defecto: código genético=normal; filtro=ninguno; hebra=ambas; corte=60; expectativa=10; matriz=BLOSUM62; descripciones=50 secuencias; clasificación según=HIGH SCORE; bases de datos=no redundantes.

La expresión «trastornos proliferativos celulares» deberá incluir la desregulación de la función fisiológica normal caracterizada por una división y/o crecimiento celular anómalo o pérdida de función. Ejemplos de «trastornos proliferativos celulares» incluyen, sin carácter limitante, hiperplasia, neoplasia, metaplasia y diversos trastornos autoinmunitarios, por ejemplo, los caracterizados por la desregulación de la apoptosis de los linfocitos T.

Como se usa en este documento, las expresiones «células neoplásicas», «enfermedad neoplásica», «neoplasia», «tumor», «células tumorales», «cáncer» y «células cancerosas», (usadas indistintamente) se refieren a células que muestran crecimiento relativamente autónomo, de modo que muestran un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida importante de control de la proliferación celular (es decir, división celular desregulada). Las células neoplásicas pueden ser malignas o benignas. Una «célula o tejido metastásico» significa que la célula puede invadir y destruir las estructuras corporales circundantes. El cáncer puede incluir, sin limitación, linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt.

El término «PBMC» se refiere a leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica e incluye «PBL» - linfocitos en la sangre periférica.

«Suprimir» o «supresión» del crecimiento tumoral indica una reducción en el crecimiento de la célula tumoral cuando se pone en contacto con un CDKi en comparación con el crecimiento tumoral sin contacto con un compuesto CDKi. El crecimiento de las células tumorales se puede evaluar mediante cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, sin carácter limitante, medir el tamaño del tumor, determinar si las células tumorales están proliferando usando un ensayo de incorporación de 3H-timidina, medir la captación de glucosa mediante la formación de imágenes por FDG-PET (tomografía de emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa) o contar las células tumorales. La «supresión» del crecimiento de las células tumorales se refiere a todos o uno cualquiera de los siguientes estados: ralentización, retraso y detención del crecimiento del tumor, así como también la reducción del tumor.

Una «composición» es una combinación de agente activo y otro vehículo, por ejemplo, un compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente detectable o marcador) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizante, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservante, adyuvante o similares. Los vehículos también incluyen excipientes y aditivos farmacéuticos, por ejemplo, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcares), que pueden estar presentes de forma individual o combinados, comprendiendo por sí solos o combinados un 1-99,99 % en peso o volumen. Los excipientes glucídicos incluyen, por ejemplo, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

Los excipientes proteínicos ilustrativos incluyen seroalbúmina tal como seroalbúmina humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y similares. Los componentes de tipo aminoácido/anticuerpo representativo, que también pueden actuar en capacidad tamponante, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares.

El término «vehículo» incluye además un tampón o un agente para ajustar el pH; habitualmente, el tampón es una sal preparada a partir de una base o ácido orgánico. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales del ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o tampones de fosfato. Vehículos adicionales incluyen excipientes/aditivos poliméricos tales como as polivinilpirrolidonas, ficales (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil-cuadratura-ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como TWEEN 20™ y TWEEN 80™), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol) y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

La expresión «vehículo farmacéuticamente aceptable», como se usa en este documento, engloba cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y varios tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes y cualquiera de los vehículos mencionados anteriormente con la condición adicional de que sean aceptables para su uso *in vivo*. Para consultar ejemplos de vehículos, estabilizantes y adyuvantes,

véase *Remington's Pharmaceutical Science*, 15.^a Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y *Physician's Desk Reference*, 52.^a ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998).

5 Una «cantidad eficaz» es una cantidad suficiente para ejercer resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosis.

10 Un «sujeto», «individuo» o «paciente» se usa indistintamente en este documento, que se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, sin carácter limitante, ratones, simios, seres humanos, animales de granja, animales que participan en deportes y animales de compañía.

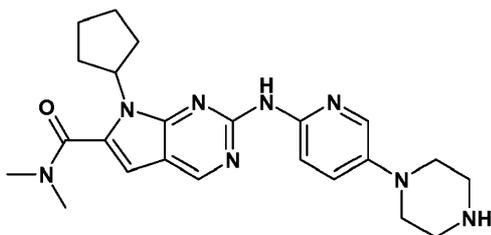
15 Un «inhibidor» de CDK (CDKi), como se usa en este documento, reduce la asociación de CCND3 y CDK4 y/o CDK6. Esta inhibición puede incluir, por ejemplo, reducir la asociación de CCND3 y CDK4/6 antes de que se unan o reducir la asociación de CCND3 y CDK4/6 después de que se unan liberando, por tanto, ambas moléculas. La reducción puede variar de una cantidad baja, pero detectable, a disociación completa de las moléculas.

20 Ahora se han identificado varias mutaciones de CCND3 como biomarcadores para CDKi. Una mutación de CCND3 en un dominio PEST puede usarse para determinar la sensibilidad del paciente a cualquier CDKi. Las mutaciones de CCND3 incluyen, sin limitación, inserciones, eliminaciones, desplazamientos del marco de lectura y una o más mutaciones puntuales en un dominio PEST. Por ejemplo y sin limitación, la mutación de CCND3 en el dominio PEST incluye: cambio de isoleucina a lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina a treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina a leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina a serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina a ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D). Por ejemplo, una mutación en CCND3 en un dominio PEST en el aminoácido 290 de isoleucina a treonina (I290T), indica que un paciente con cáncer es sensible y respondería favorablemente a la administración de cualquier CDKi.

25 Los inhibidores de CDK (CDKi) son compuestos que son inhibidores de la asociación de CCND3 - CDK4/6, y son útiles en las composiciones para el uso de la invención. Los CDKi son útiles en composiciones farmacéuticas para uso humano o veterinario cuando esté indicada la inhibición de la asociación de CCND3 - CDK4/6, por ejemplo, en el tratamiento de tumores y/o crecimiento celular canceroso. Los compuestos CDKi son útiles en el tratamiento, por ejemplo, de linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt.

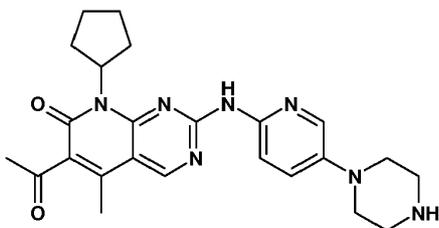
Tabla 1 - Compuestos CDKi

35 CDKi(1)

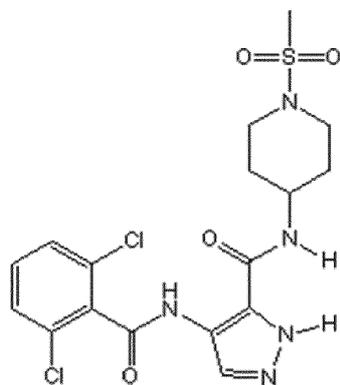


CDKi(2)

50



CDKi(3)



CDKi(4)

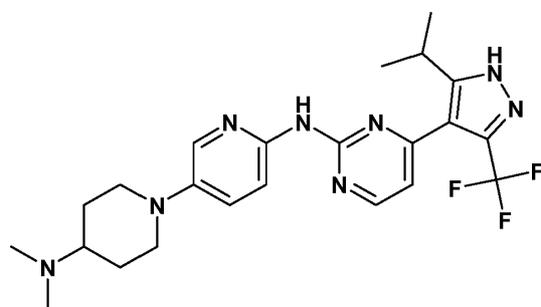


Tabla 2

Símbolo Hugo	Línea celular	Cambio de ADNc	Cambio en la proteína	AApos UniProt	Frecuencia de alelo mutante	Predicción PolyPhen	Predicción simple	Subtipo histológico
CCND3	a4fuk	c.869T>A	p.I290K	290	0,509091	Benigno	Leve	Linfoma de linfocitos B grande difuso
CCND3	bl70	c.801_802insC	p.P267fs	267_268	0,52			Linfoma, de linfocitos B, no hodgkiniano, de Burkitt
CCND3	dohh2	c.869T>C	p.I290T	290	0,45283	Benigno	Leve	Linfoma de linfocitos B grande difuso
CCND3	mc116	c.868_874delATACACC	p.I290fs	290_292	0,38			Linfoma de linfocitos B, no hodgkiniano, inespecífico
CCND3	mec1	c.860T>A	p.V287D	287	0,692308	Probablemente dañino	Dañino de sentido alterado	Leucemia linfocítica crónica

Símbolo Hugo	Línea celular	Cambio de ADNc	Cambio en la proteína	AApos UniProt	Frecuencia de alelo mutante	Predicción PolyPhen	Predicción simple	Subtipo histológico
CCND3	nudhl1	c.850C>T	p.P284S	284	0,589189	Probablemente dañino	Dañino de sentido alterado	Linfoma de linfocitos B grande difuso
CCND3	sem	c.869T>C	p.I290T	290	0,520661	Benigno	Leve	Leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda
CCND3	st486	c.851C>T	p.P284L	284	0,39881	Probablemente dañino	Neutra de sentido alterado	Linfoma de Burkitt
CCND3	sudhl10	c.869T>C	p.I290T	290	0,439024	Benigno	Leve	Linfoma de linfocitos B grande difuso

Detección de mutaciones de CCND3

5 La detección de mutaciones de CCND3 puede hacerse de muchísimas maneras, por ejemplo: secuenciación de ADN, métodos basados en PCR, incluyendo RT-PCR, análisis de micromatrices, transferencia de Southern, transferencia de Northern y análisis de tira reactiva.

10 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede usarse para amplificar e identificar mutaciones de CCND3 del ADN genómico o el ARN extraído de tejido tumoral. La PCR es bien conocida en la técnica y se describe con detalle en Saiki *et al.*, Science 1988, 239:487 y en la patente de EE. UU. n.º 4 683 195 y la patente de EE. UU. n.º 4 683 203.

15 Se proporcionan métodos de detección de mutaciones de CCND3 mediante hibridación. El método comprende identificar una mutación de CCND3 en una muestra poniendo en contacto el ácido nucleico de la muestra con una sonda de ácido nucleico que puede hibridar con el ácido nucleico con una mutación de CCND3 o fragmento del mismo y detectar la hibridación. La sonda de ácido nucleico se marca de manera detectable con un marcador tal como un radioisótopo, un agente fluorescente o un agente cromógeno. Los radioisótopos pueden incluir, sin limitación, ³H, ³²P, ³³P y ³⁵S, etc. Los agentes fluorescentes pueden incluir, sin limitación: FITC, texas red, rodamina, etc.

20 La sonda usada en la detección que puede hibridar con el ácido nucleico con una mutación de CCND3 puede ser de aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 75 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos. La sonda o sondas pueden proporcionarse en un kit, que comprende al menos una sonda oligonucleotídica que hibrida con o hibrida adyacente a una mutación de CCND3. El kit también puede proporcionar instrucciones para el análisis de muestras de cáncer de los pacientes que pueden contener una mutación de CCND3, y dichas mutaciones de CCND3 indican que el paciente es sensible o insensible al tratamiento con un CDKi.

25 También puede usarse polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP) para detectar mutaciones de CCND3. Esta técnica está bien descrita en Orita *et al.*, PNAS 1989, 86:2766-2770.

30 Los anticuerpos dirigidos contra CCND3 pueden ser útiles en la detección de cáncer y la detección de formas mutadas de CCND3. Pueden generarse anticuerpos que reconocen y se unen específicamente a un mutante específico de CCND3 y no se unen (o se unen débilmente) a CCND3 de tipo silvestre. Estos anticuerpos serían útiles en la determinación de la mutación específica que estuviera presente y también en la cuantificación del nivel de proteína CCND3. Por ejemplo, un anticuerpo puede estar dirigido contra el cambio de isoleucina a treonina en la posición del aminoácido 290 (I290T). Un anticuerpo que reconozca este cambio de aminoácido y no se una específicamente a CCND3 de tipo silvestre podría identificar la mutación específica en secciones tisulares y también los niveles de proteína por transferencia de Western. Dichos anticuerpos pueden generarse contra una mutación de CCND3 usando péptidos que contengan la mutación de CCND3 específica de interés.

40 Los anticuerpos que pueden distinguir entre epítomos fosforilados y no fosforilados son conocidos en la técnica (Luca *et al.*, PNAS USA 1986 83(4):1006-1010). Los anticuerpos dirigidos contra la forma no fosforilada de CCND3 en la treonina

en la posición 283(T283) en el dominio PEST también pueden ser útiles en la detección de formas mutantes de CCND3. Por ejemplo, una mutación en un dominio PEST de CCND3 puede reducir o evitar la fosforilación de T283. Un procedimiento de tinción con un anticuerpo que reconozca únicamente la forma no fosforilada de CCND3 combinado con un anticuerpo que reconozca únicamente una forma mutante de CCND3 validaría y confirmaría además que la muestra del paciente es sensible a un CDKi. En otro ejemplo, podría realizarse PCR en una muestra de cáncer para detectar la mutación de CCND3, usando técnicas convencionales de PCR como se describe anteriormente. Si la PCR indica una mutación de CCND3, la proteína de la muestra de cáncer puede analizarse mediante un anticuerpo anti-CCND3 que esté dirigido al epítipo fosforilado. Un resultado positivo de la reacción de PCR y una tinción positiva del anticuerpo que indica que CCND3 no está fosforilada, determinarían que el paciente sería sensible al tratamiento con un CDKi.

Una célula cancerosa que se cree que contiene una mutación de CCND3 puede lisarse y realizarse transferencia de Western para cuantificar la cantidad de proteína CCND3 mutante, usando una célula que contenga CCND3 de tipo silvestre como control. Poca o ninguna detección de la forma fosforilada de CCND3, combinada con detección de mayores niveles de proteína en la célula cancerosa en comparación con CCND3 de tipo silvestre en una célula normal, indicaría que se ha producido una mutación en CCND3 en la célula cancerosa que reduce o evita la fosforilación y, por tanto, esta célula cancerosa sería sensible a un CDKi.

Medición de la expresión génica

La detección de la expresión génica se puede realizar mediante cualquier método adecuado incluyendo, por ejemplo, detectar la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen o la cantidad de ADNc producido a partir de la retrotranscripción del ARNm transcrito a partir del gen o la cantidad del polipéptido o proteína codificada por el gen. Estos métodos se pueden llevar a cabo de muestra en muestra o se pueden modificar para realizar un análisis de alto rendimiento. Por ejemplo, usando chips de micromatriz Affymetrix™ U133.

En un aspecto, la expresión génica se detecta y cuantifica mediante hibridación con una sonda que hibrida específicamente con la sonda adecuada para ese biomarcador. Las sondas también se pueden unir a un soporte sólido para su uso en ensayos de cribado de alto rendimiento usando métodos conocidos en la técnica. El documento WO 97/10365 y las patentes de EE. UU. n.º 5 405 783, 5 412 087 y 5 445 934, por ejemplo, divulgan la construcción de chips de oligonucleótidos de alta densidad que pueden contener una o más de las secuencias divulgadas en este documento. Usando los métodos divulgados en las patentes de EE. UU. n.º 5 405 783, 5 412 087 y 5 445 934, las sondas de esta invención se sintetizan sobre una superficie de vidrio derivatizado. Se acoplan fosforamiditos de nucleósidos fotoprottegidos a la superficie del vidrio, se desprotegen selectivamente mediante fotólisis a través de una máscara fotolitográfica y se hacen reaccionar con un segundo fosforamidito de nucleósido protegido. El proceso de acoplamiento/desprotección se repite hasta que se completa la sonda deseada.

En un aspecto, el nivel de expresión de un gen se determina mediante la exposición de una muestra de ácido nucleico al chip modificado con la sonda. El ácido nucleico extraído se marca, por ejemplo, con una marca fluorescente, preferentemente durante una etapa de amplificación. La hibridación de la muestra marcada se lleva a cabo con un nivel adecuado de rigurosidad. El grado de hibridación de la sonda-ácido nucleico se mide cuantitativamente usando un dispositivo de detección. Véanse las patentes de EE. UU. n.º 5 578 832 y 5 631 734.

Como alternativa, uno cualquiera entre el número de copias, la transcripción o la traducción del gen se puede determinar usando técnicas conocidas. Por ejemplo, un método de amplificación tal como la PCR puede resultar útil. Los procedimientos generales para la PCR se describen en MacPherson *et al.*, *PCR: A Practical Approach* (IRL Press en Oxford University Press (1991)). Sin embargo, las condiciones de PCR usadas para cada reacción de aplicación se determinan empíricamente. Una serie de parámetros influyen sobre el éxito de una reacción. Entre ellos están la temperatura y tiempo de reasociación, el tiempo de prolongación, la concentración de Mg²⁺ y/o ATP, el pH y la concentración relativa de cebadores, moldes y desoxirribonucleótidos. Después de la amplificación, los fragmentos de ADN resultantes se pueden detectar mediante electroforesis en gel de agarosa seguida de visualización con tinción de bromuro de etidio e iluminación ultravioleta.

En una realización, los ácidos nucleicos hibridados se detectan mediante la detección de uno o más marcadores unidos a los ácidos nucleicos de la muestra. Los marcadores se pueden incorporar mediante cualquiera de varios medios muy conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, en un aspecto, el marcador se incorpora simultáneamente durante la etapa de amplificación en la preparación del ácido nucleico de la muestra. Por tanto, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores marcados o nucleótidos marcados proporcionará un producto de amplificación marcado. En una realización separada, la amplificación de la transcripción, como se describe anteriormente, usando un nucleótido marcado (por ejemplo, CTP y/o UTP marcado con fluoresceína) incorpora un marcador en los ácidos nucleicos transcritos.

Como alternativa, se puede añadir un marcador directamente a la muestra de ácido nucleico original (por ejemplo, ARNm, poliA, ARNm, ADNc, etc.) o al producto de amplificación después de que se complete la amplificación. Los medios para unir marcadores a ácidos nucleicos son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el

desplazamiento de mella o marcaje terminal (por ejemplo, con un ARN marcado) mediante la acción de una cinasa sobre el ácido nucleico y la unión posterior (ligación) de un conector de ácido nucleico que une el ácido nucleico de la muestra a un marcador (por ejemplo, un fluoróforo).

5 Los marcadores detectables adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen biotina para tinción con conjugado de estreptavidina marcado, microesferas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, texas red, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina y otras habitualmente usadas en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o microesferas de vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes que describen el uso de dichos marcadores incluyen las patentes de EE. UU. n.º 3 817 837; 3 850 752; 3 939 350; 3 996 345; 4 277 437; 4 275 149; y 4 366 241.

15 La detección de los marcadores es muy conocida por los expertos en la técnica. Por tanto, por ejemplo, los radiomarcadores se pueden detectar usando una película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes se pueden detectar usando un fotodetector para detectar la luz emitida. Las microesferas enzimáticas típicamente se detectan proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan simplemente visualizando el marcador coloreado.

20 El marcador detectable se puede añadir al ácido o ácidos nucleicos diana (muestra) antes o después de la hibridación, como se describe en el documento WO 97/10365. Estos marcadores detectables se unen directamente o se incorporan al ácido nucleico diana (muestra) antes de la hibridación. Por el contrario, los «marcadores indirectos» se unen a la doble hélice híbrida después de la hibridación. Por lo general, el marcador indirecto se conecta a un resto de unión que se ha conectado con el ácido nucleico diana antes de la hibridación. Por ejemplo, el ácido nucleico diana se puede biotinilar antes de la hibridación. Después de la hibridación, un fluoróforo conjugado con avidina se enlazarán con las dobles hélices híbridas portadoras de biotina para proporcionar un marcador que se detecta fácilmente. Para consultar un artículo de revisión detallado sobre los métodos para marcar ácidos nucleicos y detectar ácidos nucleicos hibridados marcados, véase *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Detección de polipéptidos

35 Las mutaciones de CCND3, cuando se traducen en proteínas, pueden detectarse por anticuerpos específicos. Las mutaciones en la proteína CCND3 pueden cambiar la antigenicidad de la proteína CCND3, de modo que un anticuerpo generado contra un antígeno de CCND3 mutante (por ejemplo, un péptido específico que contiene una mutación) se unirá específicamente a la CCND3 mutante y no reconocerá el tipo silvestre.

40 El nivel de expresión de mutaciones de CCND3 también puede determinarse examinando la expresión proteínica o el productor proteínico de mutantes de CCND3. La determinación del nivel proteínico implica medir la cantidad de cualquier unión inmuno-específica que se produce entre un anticuerpo que reconoce y se une selectivamente al polipéptido del biomarcador en la muestra obtenida de un paciente y comparar esta con la cantidad de unión inmuno-específica de al menos un biomarcador en una muestra de control. La cantidad de expresión proteínica de la CCND3 puede estar aumentada o reducida en comparación con la expresión de control.

45 En la técnica existen diversas técnicas disponibles para el análisis de proteínas. Estas incluyen, sin carácter limitante, ensayos radioinmunológicos, ELISA (ensayo de inmuno-adsorción enzimática), inmunoensayos de tipo «sándwich», ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos *in situ* (usando, por ejemplo, marcadores de oro coloidal, enzimas o radioisótopos), análisis por inmunotransferencia de Western, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos inmunofluorescentes, citometría de flujo, inmunohistoquímica, microscopia confocal, ensayos enzimáticos, resonancia de plasmones superficiales y PAGE-SDS.

Ensayo de biomarcadores y tratamiento con CDKi

55 Una vez que un paciente se ha ensayado para el estado de CCND3 y se ha predicho que será sensible a un CDKi, puede realizarse la administración de cualquier CDKi a un paciente en una dosis, de manera continua o intermitente a lo largo de todo el tratamiento. Los métodos para determinar el medio y la dosis de administración más eficaces son muy conocidos por el experto en la técnica y variarán según la composición usada para el tratamiento, el propósito del tratamiento, la célula diana que se esté tratando y el sujeto que se esté tratando. Se pueden llevar a cabo administraciones múltiples o únicas, siendo seleccionados el patrón y el nivel de las dosis por el médico a cargo. Las formulaciones de las dosis y los métodos para administrar los agentes adecuados se pueden ajustar empíricamente.

60 Las mutaciones de CCND3 pueden ensayarse después de la administración de CDKi para determinar si el paciente sigue siendo sensible al tratamiento con CDKi. Además, las mutaciones de CCND3 pueden ensayarse en múltiples puntos

temporales después de una sola administración de CDKi. Por ejemplo, se administra una inyección intravenosa rápida inicial de CDKi, puede ensayarse una mutación de CCND3 a 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después del primer tratamiento.

5 Las mutaciones de CCND3 pueden ensayarse después de cada administración de CDKi, de modo que si hay múltiples administraciones de CDKi, entonces el ensayo de mutaciones de CCND3 después de cada administración puede determinar la sensibilidad del paciente continuada. El paciente podría experimentar múltiples administraciones de CDKi y después someterse a ensayo para mutaciones de CCND3 en diferentes puntos temporales. Por ejemplo, un ciclo de
10 tratamiento puede requerir la administración de una dosis inicial de CDKi, una segunda dosis un periodo de tiempo especificado después y aún una tercera dosis horas después de la segunda dosis. Las mutaciones de CCND3 pueden ensayarse a 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración de cada dosis de CDKi.

15 Finalmente, pueden administrarse diferentes CDKi y seguidos de ensayo para una mutación de CCND3. En esta realización, se elige más de un CDKi y se administra al paciente. La mutación de CCND3 entonces puede ensayarse después de la administración de cada CDKi diferente. Este ensayo también puede hacerse en múltiples puntos temporales después de la administración del CDKi diferente. Por ejemplo, podría administrarse un primer CDKi al paciente y ensayarse la mutación de CCND3 a 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración. Entonces podría administrarse un segundo CDKi y puede
20 ensayarse la mutación de CCND3 de nuevo a 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración del segundo CDKi.

Pueden prepararse kits para evaluar la actividad de cualquier CDKi. Por ejemplo, puede usarse un kit que comprende cebadores de ácido nucleico para PCR o para hibridación en micromatriz para una mutación de CCND3 para evaluar la
25 sensibilidad a CDKi. Como alternativa, sería útil un kit provisto de anticuerpos para las mutaciones de CCND3 enumeradas en la tabla 2 en el ensayo para la sensibilidad a CDKi.

Es muy conocido en la técnica el hecho de que los cánceres se pueden volver resistentes a un tratamiento quimioterápico, especialmente cuando ese tratamiento se prolonga. Ensayar una mutación de CCND3 puede hacerse después de
30 tratamiento prolongado con cualquier agente quimioterápico para determinar si el cáncer sería sensible al CDKi. Por ejemplo, los inhibidores de cinasas tales como Gleevec® inhibirán de forma potente una cinasa específica, pero también pueden inhibir de forma débil otras cinasas. Si el paciente se ha tratado previamente con otro agente quimioterápico u otro CDKi, es útil ensayar una mutación de CCND3 para determinar si el tumor es sensible a un CDKi. Este ensayo puede ser especialmente beneficioso para el paciente si el cáncer remite y después se vuelve a desarrollar o ha metastatizado
35 hasta un sitio diferente.

Cribado de inhibidores de CDK

Es posible usar mutaciones de CCND3 para cribar otro CDKi. Este método comprende proporcionar una célula que
40 contenga una mutación de CCND3 de la tabla 2, poner en contacto la célula con un CDKi candidato y la CI_{50} de la célula tratada se compara con un CDKi conocido en contacto con una célula que contiene una mutación de CCND3. Por ejemplo, para células que comprenden una mutación de CCND3 en un dominio PEST, el CDKi candidato tendrá una CI_{50} mayor de o igual a CDKi(1).

Ejemplos

Ejemplo 1: Agrupación de mutaciones de CCND3

El descubrimiento inicial de mutaciones de CCND3 se hizo mediante agrupación de los datos de secuenciación de CCLE. El panel de líneas celulares es el englobado por la iniciativa Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (Barretina J., Caponigro G., *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia: using preclinical models to predict anticancer drug sensitivity, Nature 2012 483(7391):603-607). Se llevó a cabo una caracterización genómica, genética y farmacológica detallada en las líneas celulares CCLE.

55 Se construyó una colección combinada para la secuenciación de captura del exoma usando el sistema de enriquecimiento diana personalizado SureSelect (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Se cortó el ADN genómico de las líneas celulares y se ligó a adaptadores de secuenciación Illumina que incluían índices de 8 pb. El ADN ligado al adaptador entonces se seleccionó por tamaño para longitudes entre 200 y 350 pb y se hibridó con un exceso de cebo en fase en solución.

60 Entonces se combinaron colecciones de captura de exones con código de barras y se secuenciaron en instrumentos Illumina (lecturas de extremos emparejados de 76 pb). El índice de 8 pb se leyó por el instrumento al inicio de la lectura 2 y se usó para asignar lecturas de secuenciación a una muestra particular en el conjunto de agregación de datos posteriores.

65

Las lecturas de secuencia se alinearon con el genoma de referencia humano del NCBI GRCh37 por el programa informático BWA (Li *et al.*, Bioinformatics 2010 25:1754-60). Las lecturas de secuencia correspondientes a regiones genómicas que pueden albergar pequeñas inserciones o eliminaciones (indel) se realinearon conjuntamente usando el realineador local GATK (DePristo *et al.*, Nat Genet 2011 43:491-8) como se describe para mejorar la detección de indel y disminuir el número de falsos positivos de variaciones de un solo nucleótido causadas por lecturas alineadas incorrectamente, particularmente en el extremo 3'. Los sitios con probabilidad de contener indel se definieron como sitios de variación de indel en la línea germinal conocida de la base de datos de sitios dbSNP (Sherry *et al.*, Nucleic Acids Res 2001 29:308-11) que contiene lecturas inicialmente alineadas por BWA con indel y sitios adyacentes al grupo de sustituciones de nucleótidos detectadas.

Calificación, anotación y filtración de variantes.

Se detectaron sustituciones de nucleótidos con MuTect y se calificaron indel cortos con el programa informático Indelocator desarrollado en el Broad Institute. Ambos programas se suscitaron en el modo que no requiere emparejamiento de ADN normal e identifica todas las variantes que difieren del genoma de referencia. Las variantes detectadas se anotaron usando transcritos de referencia derivados de transcritos de la ruta «UCSC Genes» del Genome Browser de la UCSC.

Exclusión de variantes con baja fracción alélica

La fracción alélica se calculó para cada variante detectada en cada muestra como una función de las lecturas que mantienen un alelo alternativo (diferente de la referencia) entre las lecturas que solapan la posición. Para limitar los efectos de la posible contaminación de la muestra, eventos subclonales y falsos positivos debidos a artefactos de alineación se usaron únicamente mutaciones con fracción alélica por encima de un 20 % en el análisis posterior.

Exclusión de variantes de la línea germinal comunes

Las variantes que se han presentado previamente como polimorfismo de la línea germinal y para las que la frecuencia alélica global (GAF) en dbSNP134 o la frecuencia alélica detectada en el Exome Sequencing Project del NHLBI era mayor de un 0,1 % se excluyeron del análisis adicional. Se sabe que la selección natural es muy eficiente eliminando las mutaciones perjudiciales funcionales y habitualmente no les permite alcanzar una frecuencia relativamente alta en las poblaciones; sin embargo, los polimorfismos en el extremo inferior de frecuencia de poblaciones pueden ser extremadamente perjudiciales y ser idénticos a algunas de las mutaciones somáticas. Por tanto, se retuvieron pocas mutaciones idénticas a polimorfismos de la línea germinal conocidos, pero con frecuencia de poblaciones en o por debajo de un 0,1 %.

Exclusión de variantes observadas en paneles de normales

Variantes detectadas también en un panel de 278 muestras de exomas completos secuenciadas en el Broad como parte del 1000 Genomes Project se excluyeron del análisis adicional. Además de eliminar la variación adicional de la línea germinal, esta etapa permitió una eliminación eficiente de los falsos positivos comunes originados predominantemente por artefactos de alineación.

Exclusión de mutaciones neutras

Se excluyó cualquier sustitución de aminoácido que creara un residuo observado como tipo silvestre en la posición homóloga en ortólogos de la proteína en al menos dos vertebrados de sangre caliente del análisis adicional como probablemente neutras. Para esta etapa de filtración, se usaron múltiples alineaciones de aminoácidos creadas por el programa BLASTZ y obtenidas del repositorio Genome Browser de la University of California Santa Cruz.

Identificación de mutaciones C terminales de ciclina D3 (CCND3) como específicas para neoplasias hemáticas de linfocitos B

Se clasificaron 883 líneas celulares en 37 clases por su linaje celular y tipo de cáncer. Entonces se buscaron mutaciones que tuvieran una distribución no aleatoria estadísticamente significativa entre las clases. Se usó la prueba de la ji al cuadrado después de normalización para una tasa de mutación ampliamente diferente en diferentes tumores y para una profundidad de secuenciación variable (que afecta a la capacidad de detectar mutaciones). Uno de los genes que se mostró como un fuerte resultado positivo en este análisis fue CCND3. Había mutaciones en CCND3 presentes en 10 líneas celulares establecidas a partir de neoplasias hemáticas, por ejemplo, linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt, pero estaban ausentes en líneas celulares derivadas de tumores sólidos, y estos datos se presentan en la tabla 2. Las mutaciones estaban localizadas en el dominio C terminal que se sabe que facilita la degradación de ciclina D3 y la localización nuclear (figura 1).

Ejemplo 2: Células que contienen mutaciones de CCND3 muestran sensibilidad aumentada a CDKi con respecto a células no mutantes

Usando la caracterización farmacológica de las líneas celulares CCLE, se ensayaron líneas celulares que contenían mutaciones de CCND3 para la sensibilidad a CDKi. Se adquirieron células DOHH-2, NU-DHL-1, SEM, SU-DHL-4, SU-DHL-6 y SU-DHL-10 de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Se adquirieron células DB y Pfeiffer de la American Type Culture Collection (ATCC). Se adquirieron células A4/FUK del Health Science Research Resources Bank (HSRRB). Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 (ATCC) complementado con un 10 % (células A4/FUK, DB, DOHH-2, Pfeiffer y SEM) o un 20 % (NU-DHL-1, SU-DHL-4, SU-DHL-6 y SU-DHL-10) suero bovino fetal (Gibco) y se incubaron a 37 °C/CO₂ al 5 %. Para el cribado, las células se sembraron en 80 µl de medio en placas de 96 pocillos (Costar n.º 3904) a densidades de 10 000 (DB, DOHH-2, NU-DHL-1, SEM, SU-DHL-4, SU-DHL-6 y SU-DHL-10), 15 000 (A4/FUK) o 20 000 (Pfeiffer) células y se incubaron durante una noche antes de la adición de compuesto. Las células A4/FUK, DOHH-2, NU-DHL-1, SU-DHL-10, DB, Pfeiffer, SU-DHL-4 y SU-DHL-6 son líneas celulares de linfoma de linfocitos B grande difuso (DLBCL). Las células SEM son células de leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda.

Se preparó de manera reciente una reserva de compuesto (5x) en el medio de cultivo apropiado, y se añadió manualmente a las placas mediante pipeta electrónica multicanal. En un mínimo de tres pocillos replicados, se evaluó el número y la viabilidad de las células en el momento de la adición del compuesto, así como los efectos del agente individual después de 72 horas, por cuantificación de los niveles de ATP celular mediante Cell Titer Glo (Promega, Madison, WI) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se calculó la CE⁵⁰ con resta del día 0 usando ajuste convencional de curva de cuatro parámetros (XLfit, modelo 205).

CDKi(1)-CDKi(3) se sintetizaron en Novartis Pharma AG, y se prepararon reservas de compuesto en DMSO a una concentración final de 10 mM. Las reservas de trabajo se diluyeron en serie en el medio de cultivo celular apropiado en incrementos de factor 3 para conseguir las concentraciones finales del ensayo que varían de 10 µM a 1,5 nM.

Las curvas de CE⁵⁰ con resta del día 0 se muestran para modelos DLBCL que albergan CCND3 de tipo silvestre como se muestra en la figura 2A o CCND3 mutante como se muestra en la figura 2B. Obsérvese que las células que contienen CCND3^{WT} eran sensibles al tratamiento con CDKi(1), y la viabilidad celular se reduce a una concentración convencional. Por el contrario, las células que contienen mutaciones de CCND3 presentan una viabilidad celular muy reducida cuando se tratan con CDKi(1), lo que demuestra sensibilidad aumentada a CDKi(1) en comparación con células que contienen CCND3 de tipo silvestre.

Se muestra un resumen de esto en la figura 2C. Se muestran diagramas de recuadros de los valores de CE₅₀ con resta del día 0 para CCND3 de tipo silvestre o mutada. Los recuadros rellenos centrales muestran los cuartiles inferior y superior, con la mediana de grupo indicada con una línea blanca. Las patillas representan el mínimo de muestra (patilla inferior) y el máximo (patilla superior), representando los círculos negros los máximos de muestra que podrían considerarse valores atípicos. El «recuento» se refiere al número de líneas celulares por grupo. Se observó un desplazamiento mayor de 3x en la sensibilidad a CDKi(1) en modelos con mutación del dominio PEST en CCND3 en comparación con el tipo silvestre.

CDKi(2) es un compuesto diferente y también se conoce como PD0332991 (Fry *et al.*, Mol. Cancer Ther. 2004, 3(11):1427-1438). CDKi(2) se ensayó en las mismas líneas celulares usando el mismo protocolo que para CDKi(1) descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 3A y 3B. Similar a CDKi(1) las células que contenían CCND3^{WT} mostraron sensibilidad normal al tratamiento con CDKi(2), con reducción de la viabilidad celular a concentraciones convencionales. Cuando se ensayó CDKi(2) sobre células con CCND3 mutante, la viabilidad celular se redujo a concentraciones muy inferiores, lo que indica que estas células eran más sensibles a CDKi(2) en comparación con células que contienen CCND3^{WT}. El diagrama de recuadros de la figura 3C muestra un desplazamiento 3X en la sensibilidad en las células con una mutación del dominio PEST en CCND3 en comparación con el tipo silvestre.

CDKi(3) es un inhibidor universal de CDK que actúa sobre todos los miembros de la familia de CDK con grados variables de inhibición. Cuando se ensayó CDKi(3), se descubrió que todos los tipos celulares ensayados (tanto CCND3 como el tipo silvestre) eran más sensibles al inhibidor universal de CDK que a los inhibidores específicos de CDK 4/6. Esto puede observarse en las curvas de viabilidad celular en las figuras 4A y 4B, y no hay diferencia en la CE⁵⁰ como se muestra en la figura 4C.

55 Ejemplo 3: Mutaciones de CCND3 provocan estabilidad proteínica aumentada

Las células se trataron con 100 µg/ml de cicloheximida y se recogió un mínimo de 2 x 10⁶ células por punto temporal para el aislamiento de la proteína total. Se prepararon lisados celulares cada 30 minutos durante 2 horas y, cada 2 horas después de ellos, hasta 8 horas de tratamiento. Las células DLBCL se lisaron en tampón que contenía Tris 50 mM, pH 7,2, NaCl 120 mM, EDTA 1 mM, EGTA 6 mM y proteasa NP40 plus al 1 % (Roche n.º 05892791001, Nutley, NJ) e inhibidores de fosfatasa (Calbiochem n.º 524625, Billerica, MA). Después de la lisis, se determinó la concentración de proteína usando el método de BCA (Pierce n.º 2325, Rockford, IL). Se separaron cantidades iguales de proteína total, por línea celular, en un gel de NuPAGE SDS con Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, Grand Island, NY) y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, Grand Island, NY) usando un sistema de transferencia en seco

(Invitrogen iBLOT, Grand Island, NY). Las proteínas se detectaron usando los anticuerpos primarios apropiados y un sistema de detección por infrarrojo de tintes (Odyssey IRDye, LI-COR, Lincoln, NE) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los anticuerpos monoclonales, para el análisis por transferencia de Western, son los siguientes: ciclina D3 (BD Biosciences n.º 610279, Billerica, MA), Mcl-1 (Cell Signaling Technology n.º 4572, Danvers, MA) y β -actina (Ambion n.º 4302 Grand Island, NY). La cicloheximida se adquirió de Sigma (n.º C4859 St. Louis, MO).

En la figura 5A, las células que contenían CCND3 de tipo silvestre se trataron con cicloheximida durante los tiempos indicados, y se separaron cantidades iguales de proteína total mediante SDS-PAGE. Se muestran los niveles de proteína de CCND3, β -actina y Mcl-1. La proteína Mcl-1 tiene una semivida corta y se usó como control. En células DLBCL de tipo silvestre, CCND3 se redujo significativamente a las 4-6 horas de tratamiento. En la figura 5B, las células con CCND3 mutante también se trataron con cicloheximida, y presentaron poca o ninguna reducción tan tarde como a las 8 horas. Por el contrario, la β -actina fue equivalentemente estable, y Mcl-1 inestable en las diferentes líneas celulares. Estos datos sugieren que una mutación en el dominio PEST de CCND3 da lugar a un aumento en la estabilidad de la proteína.

Esta estabilidad de la proteína puede dar lugar a acumulación de la proteína CCND3. La figura 6A es una transferencia de Western que demuestra que células que contienen una mutación en el dominio PEST de CCND3 tienen mayores niveles de proteína de CCND3 mutante. Cuando el nivel de ARNm de células con CCND3^{WT} y con CCND3 mutante se compara, los niveles de expresión son bastante similares, lo que indica que el aumento en la proteína CCND3 muy probablemente se debe a un aumento en la estabilidad de la proteína y no a un aumento en la expresión.

Por tanto, sin limitación a teoría particular alguna, como una mutación de CCND3 no promueve o reduce la expresión de ARNm de CCND3, una mutación de CCND3 puede actuar a nivel postraducciona. Una presentación de la proteína CCND3 se muestra gráficamente en la figura 1, y cuando la treonina en la posición del aminoácido 283 (T283) se fosforila, esto dirige la proteína CCND3 a ubiquitinación y posterior degradación. La CCND3 tiene dominios PEST en los aminoácidos 256-268 y 271-291. Una mutación en un dominio PEST puede bloquear o reducir este evento de fosforilación estabilizando, por tanto, CCND3, lo que provoca una semivida aumentada y acumulación en la célula. Esta CCND3 estabilizada entonces está libre para unirse a y activar CDK4/CDK6, lo que inicia una proliferación celular incontrolada, que da lugar a cáncer. Las células cancerosas se ven impulsadas por o dependen de niveles mayores de activación de CDK4/6, de modo que cualquier CDKi que se una a CDK4/6 y reduzca la asociación de CDK4/6 con CCND3 provocaría una reducción de la proliferación celular a pesar de los niveles elevados de CCND3.

ES 2 776 365 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novartis Institutes for Biomedical Science

<120> BIOMARCADORES ASOCIADOS CON INHIBIDORES DE CDK

<130> PAT055187-US-PSP

<140> US61/669534

<141> 09/07/2012

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2011

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

cgcgccccgc gctctccggc ccgtcgcctg ccttgggact cgcgagcccg cactcccgcc      60
ctgcctgttc gctgcccag tatggagctg ctgtgttgcg aaggcaccoc gcacgcgccc      120
cgggccgggc cggaccocg gctcctgggg gaccagcgtg tcctgcagag cctgctccgc      180
ctggaggagc gctacgtacc ccgcgcctcc tacttccagt gcgtgcagcg ggagatcaag      240
ccgcacatgc ggaagatgct ggcttactgg atgctggagg tatgtgagga gcagcgtgt      300
gaggaggaag tcttccccct ggccatgaac tacctggatc gctacctgtc ttgcgtcccc      360
acccgaaagg cgcagttgca gtcctcgggt gcggtctgca tgctgctggc ctccaagctg      420
cgcgagacca cggccctgac catcgaaaaa ctgtgcatct acaccgacca cgtgtctct      480
ccccgccagt tgcgggactg ggaggtgctg gtcctagga agctcaagtg ggacctggct      540
gctgtgattg cacatgattt cctggccttc attctgcacc ggctctctct gcccctgac      600
cgacagccct tgggtcaaaaa gcatgcccag acctttttgg ccctctgtgc tacagattat      660
acctttgcca tgtaccocgc atccatgatc gccacgggca gcattggggc tgcagtgcaa      720
ggcctgggtg cctgctccat gtccgggat gagctcacag agctgctggc aggatcact      780
ggcactgaag tggactgcct gcgggcctgt caggagcaga tcgaagctgc actcagggag      840
agcctcaggg aagcctctca gaccagctcc agccagcgc ccaaagcccc cggggctcc      900
agcagccaag ggcccagcca gaccagcact cctacagatg tcacagccat acacctgtag      960
ccctggagag gccctctgga gtggccacta agcagaggag gggccgctgc caccacctc     1020
cctgcctcca ggaaccacac cacatctaag cctgaagggg cgtctgttcc cccttcaaa     1080
agcccaaggg atctggctct acccatcccc gcagtgtgca ctaaggggcc cggccagcca     1140
tgtctgattc tcgggtgcta gtcaagctcc tcctccctgc atctgaccag cagcgccttt     1200
cccaactcta gctgggggtg ggccaggctg atgggacaga attggatata tacaccagca     1260

```

ES 2 776 365 T3

```

ttccttttga acgccccccc ccaccctggt gggctctcat gttttcaact gccaaaatgc      1320
tctagtgcct tctaaaggtg ttgtcccttc tagggttatt gcatttggat tggggtcctt      1380
ctaaaattta atgcatgata gacacatatg agggggaata gtctagatgg ctcctctcag      1440
tactttggag gccctatgt agtccgtgct gacagctgct cctagaggga ggggcctagg      1500
cctcagccag agaagctata aattcctctt tgctttgctt tctgctcagc ttctcctgtg      1560
tgattgacag ctttgctgct gaaggctcat ttttaatttat taattgcttt gagcacaact      1620
ttaagaggac gtaatggggg cctggccatc ccacaagtgg tggtaacctt ggtggttgct      1680
gttttcctcc cttctgctac tggcaaaagg atctttgtgg ccaaggagct gctatagcct      1740
ggggtggggg catgccctcc tctcccattg tccctctgcc ccatcctcca gcagggaaaa      1800
tgcagcaggg atgccctgga ggtggctgag ccctgtcta gagagggagg caagccctgt      1860
tgacacaggt ctttcctaag gctgcaaggt ttaggctggt ggcccaggac catcatccta      1920
ctgtaataaa gatgattgtg aaataaaact ggctttggct tcttgaaaaa aaaaaaaaaa      1980
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a                                2011

```

<210> 2

<211> 292

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Glu Leu Leu Cys Cys Glu Gly Thr Arg His Ala Pro Arg Ala Gly
 1              5              10              15

Pro Asp Pro Arg Leu Leu Gly Asp Gln Arg Val Leu Gln Ser Leu Leu
      20              25              30

Arg Leu Glu Glu Arg Tyr Val Pro Arg Ala Ser Tyr Phe Gln Cys Val
      35              40              45

Gln Arg Glu Ile Lys Pro His Met Arg Lys Met Leu Ala Tyr Trp Met
 50              55              60

Leu Glu Val Cys Glu Glu Gln Arg Cys Glu Glu Glu Val Phe Pro Leu
 65              70              75              80

Ala Met Asn Tyr Leu Asp Arg Tyr Leu Ser Cys Val Pro Thr Arg Lys
      85              90              95

Ala Gln Leu Gln Leu Leu Gly Ala Val Cys Met Leu Leu Ala Ser Lys
      100             105             110

Leu Arg Glu Thr Thr Pro Leu Thr Ile Glu Lys Leu Cys Ile Tyr Thr

```


REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDKi) para su uso en el tratamiento del cáncer en una población de pacientes con cáncer seleccionada, en la que la población de pacientes con cáncer se selecciona basándose en si muestra una mutación de CCND3 en una muestra de células cancerosas obtenida de dicho paciente en comparación con una muestra de células de control normales, en la que la mutación de CCND3 está en un dominio PEST, en la que la muestra de células cancerosas se selecciona del grupo que consiste en linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma, leucemia linfocítica, leucemia de linfocitos B linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 256-268 de la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la mutación de CCND3 es al menos un cambio de aminoácido en los aminoácidos 271-292 de la SEQ ID NO: 2.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la mutación de CCND3 es cualquier mutación de la tabla 2.
- 20 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la mutación de CCND3 se selecciona del grupo que consiste en: cambio de isoleucina a lisina en el aminoácido 290 (I290K), cambio de isoleucina a treonina en el aminoácido 290 (I290T), cambio de prolina a leucina en el aminoácido 284 (P284L), cambio de prolina a serina en el aminoácido 284 (P284S) y cambio de valina a ácido aspártico en el aminoácido 287 (V287D).
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el CDKi se selecciona de la tabla 1.

FIGURA 1

Representación gráfica de la proteína CCND3

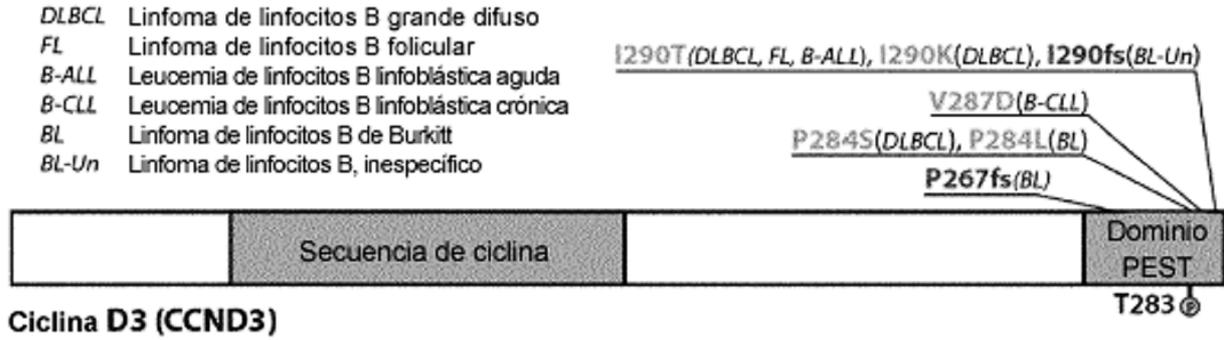


FIGURA 2(A)

Células que contienen CCND3 de tipo silvestre muestran sensibilidad normal a CDKi(1)

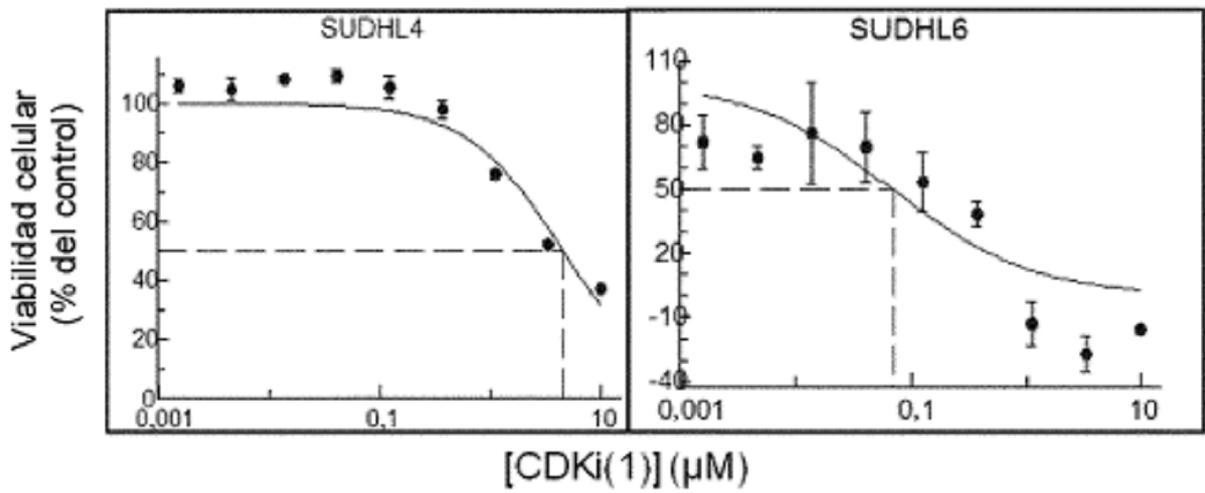
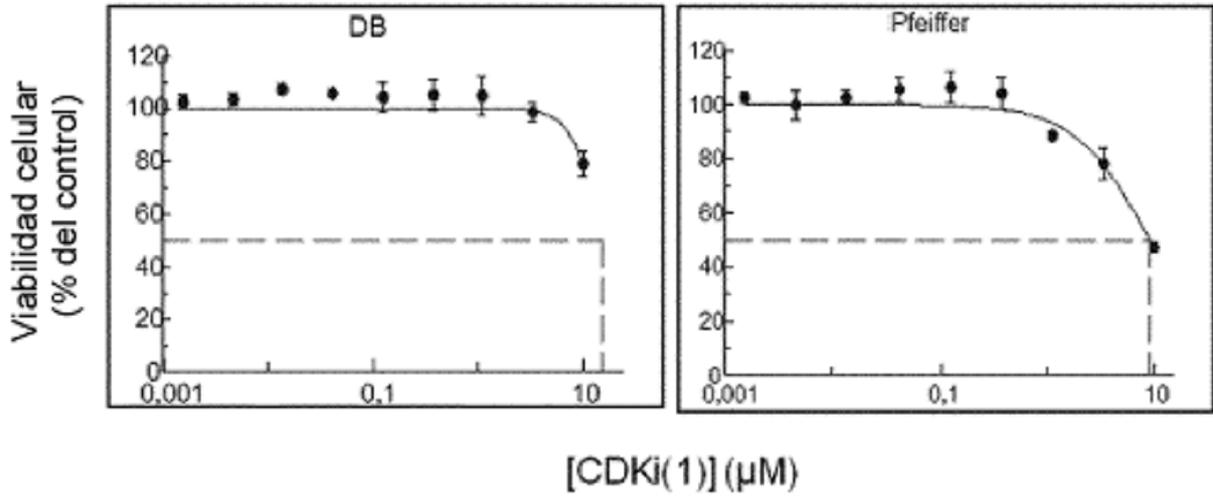


FIGURA 2(B)

Células que contienen mutaciones de CCND3 muestran sensibilidad aumentada a CDKi(1)

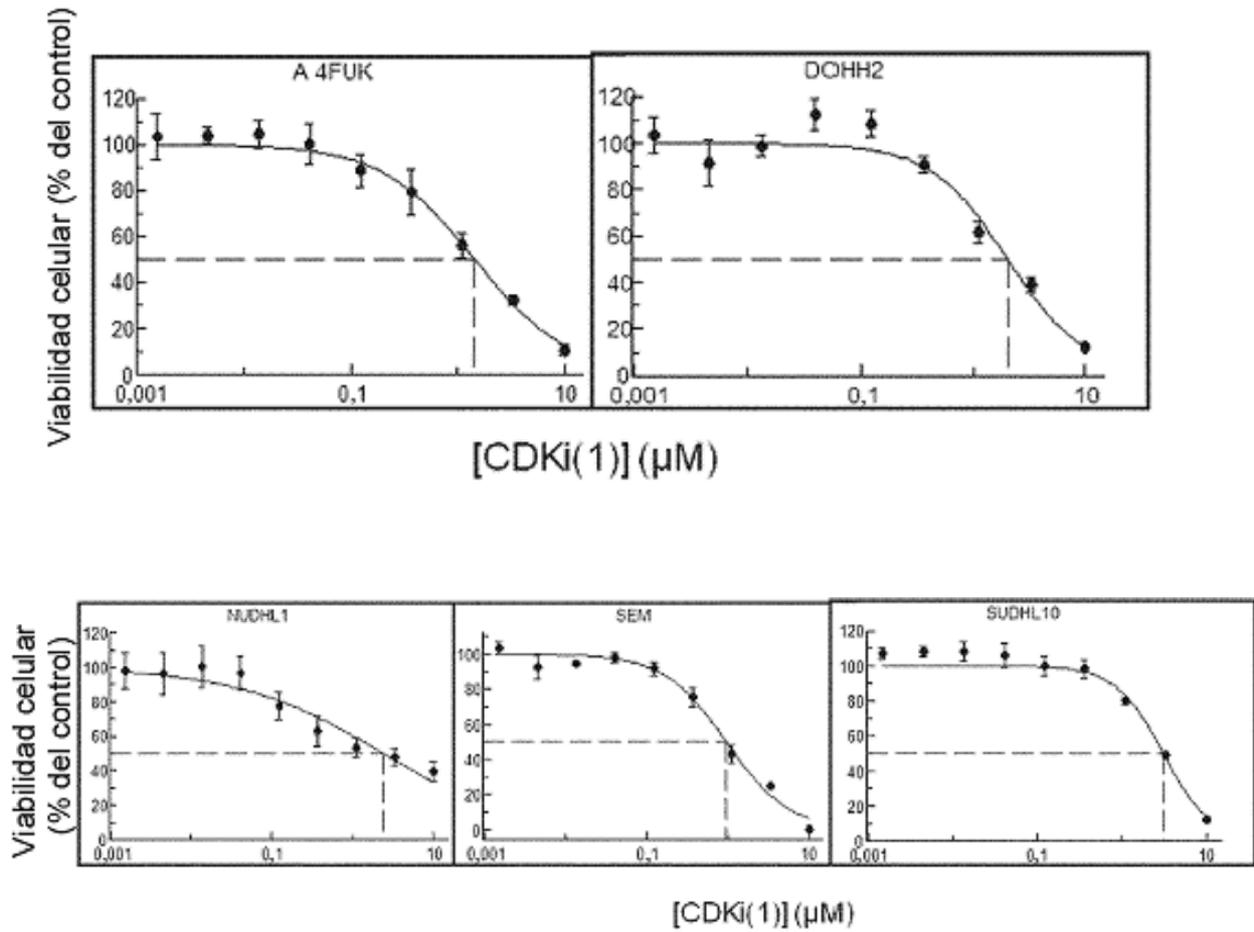


FIGURA 2(C)

Células que contienen mutaciones de CCND3 muestran sensibilidad aumentada a CDKi(1), con respecto a células no mutantes coincidentes

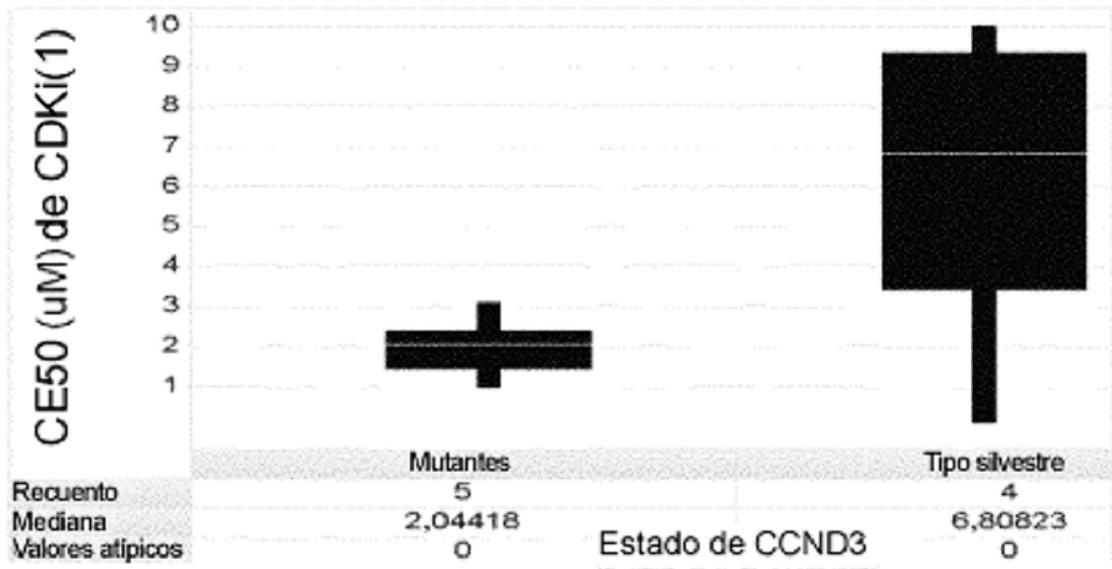


FIGURA 3(A)

Células que contienen CCND3 de tipo silvestre muestran sensibilidad normal a CDKi(2)

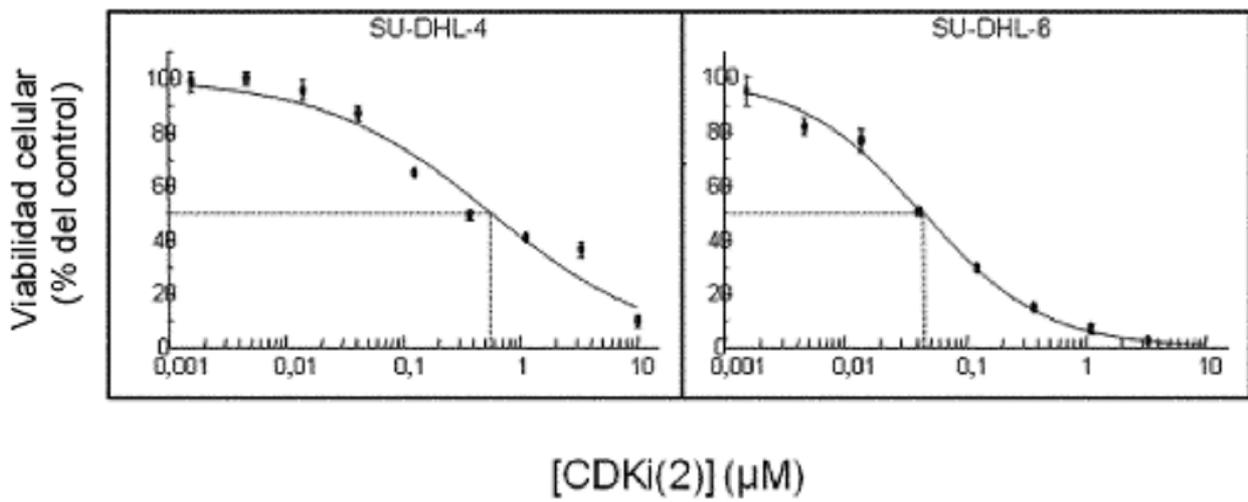
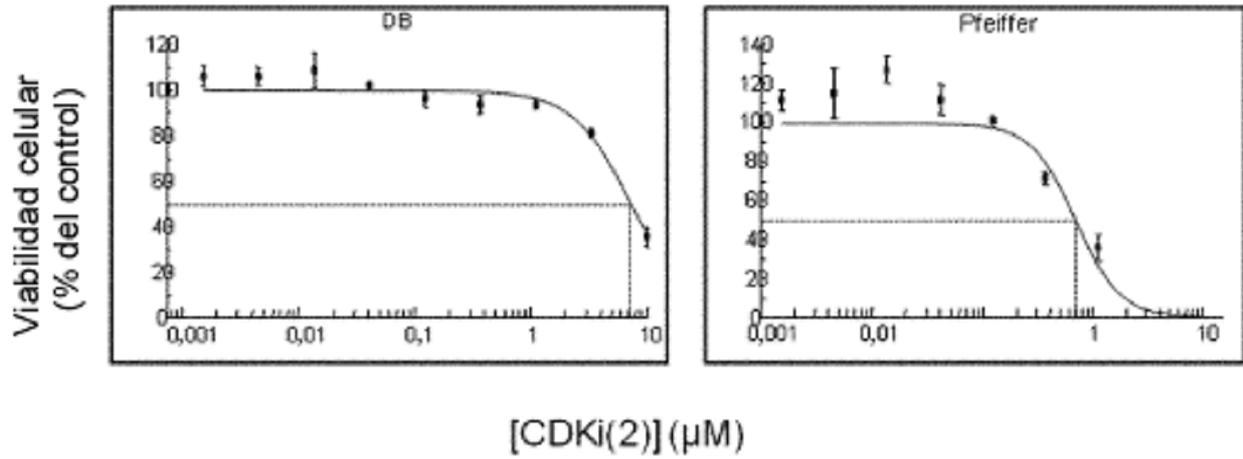


FIGURA 3(B)

Células que contienen mutaciones de CCND3 muestran sensibilidad aumentada a CDKi(2)

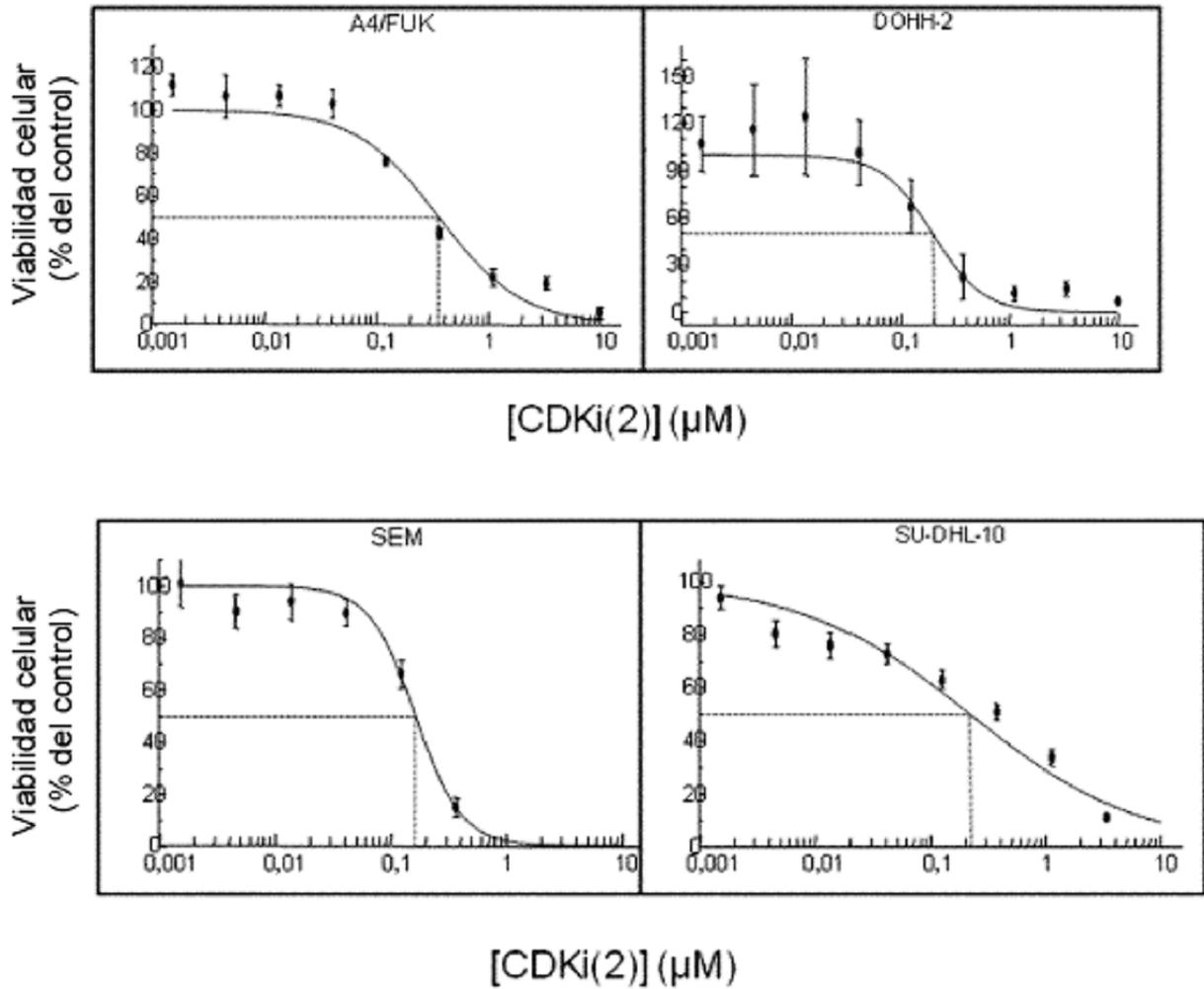


FIGURA 3(C)

Células que contienen mutaciones de CCND3 muestran sensibilidad aumentada a CDKi(2), con respecto a células no mutantes coincidentes

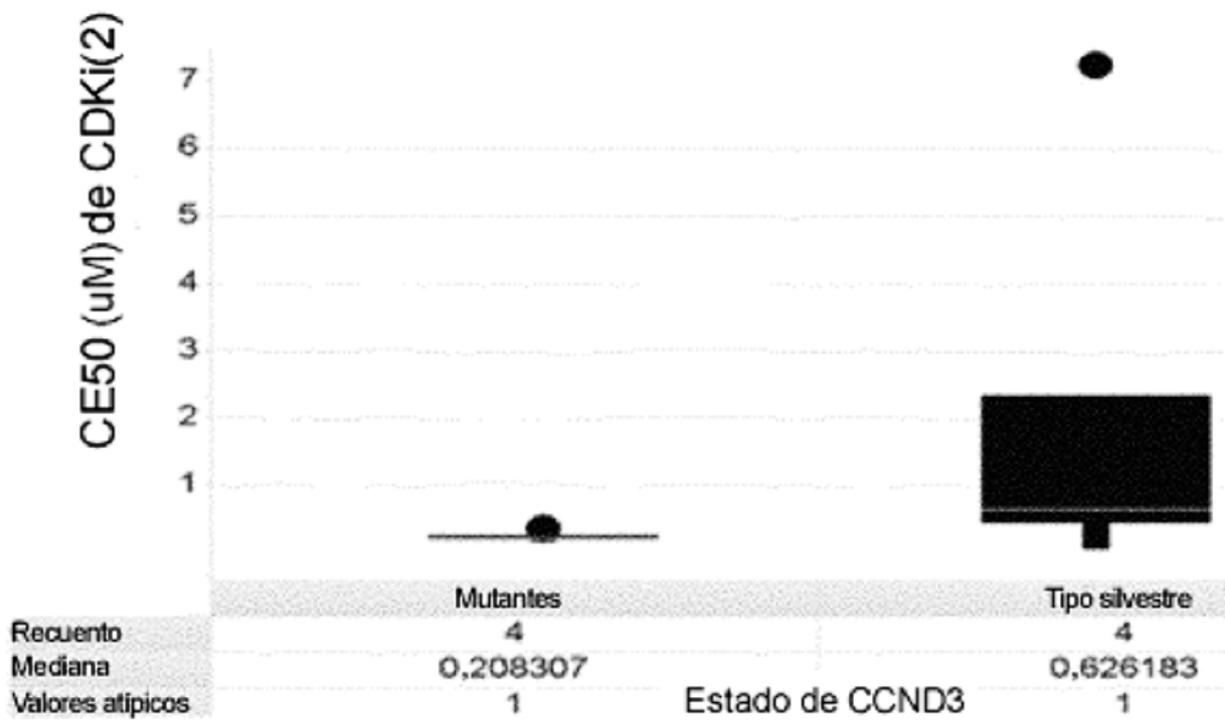


FIGURA 4(A)

Células que contienen CCND3 de tipo silvestre son sensibles a CDKi(3)

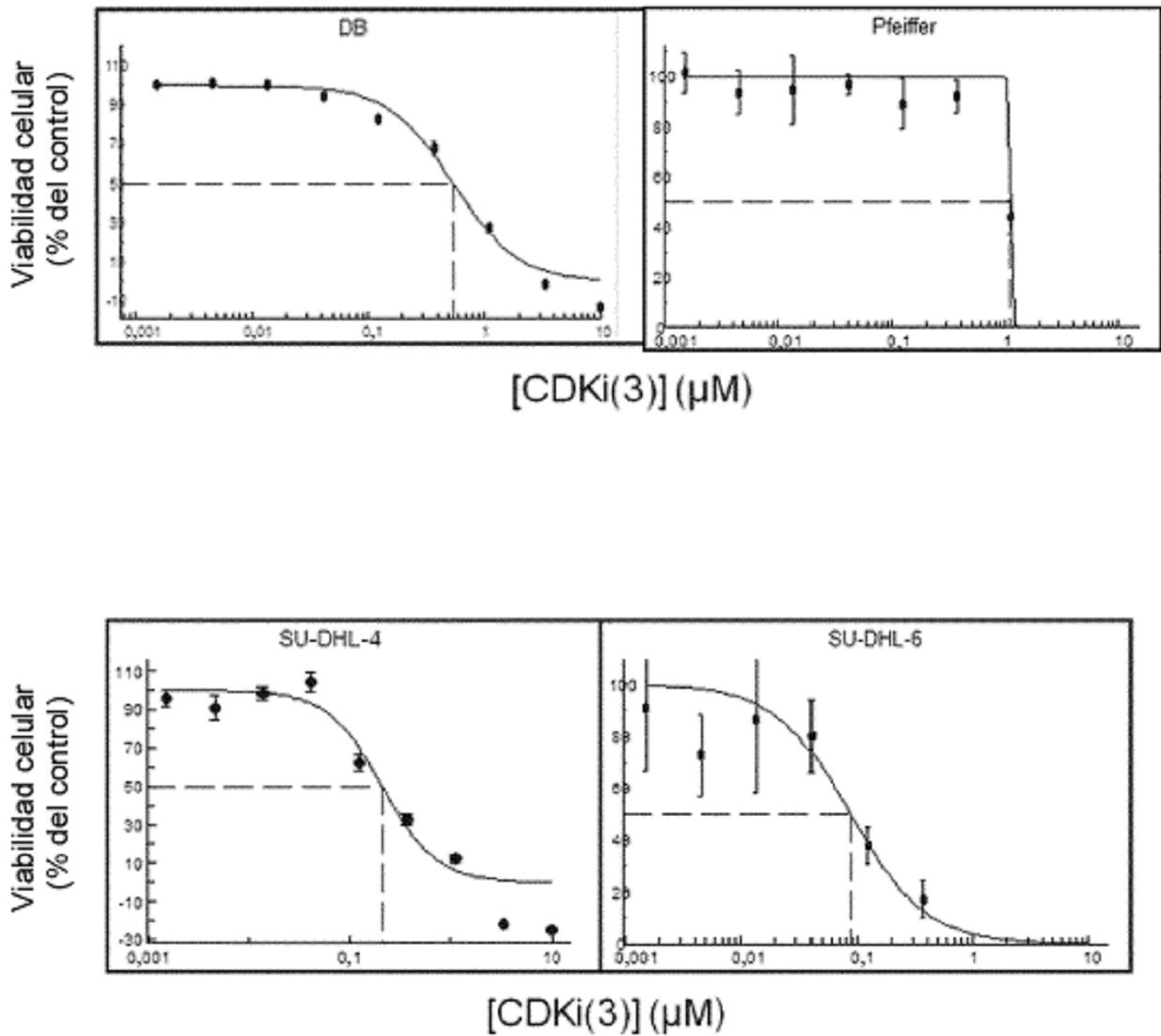


FIGURA 4(B)

Células que contienen mutaciones de CCND3 son sensibles a CDKi(3)

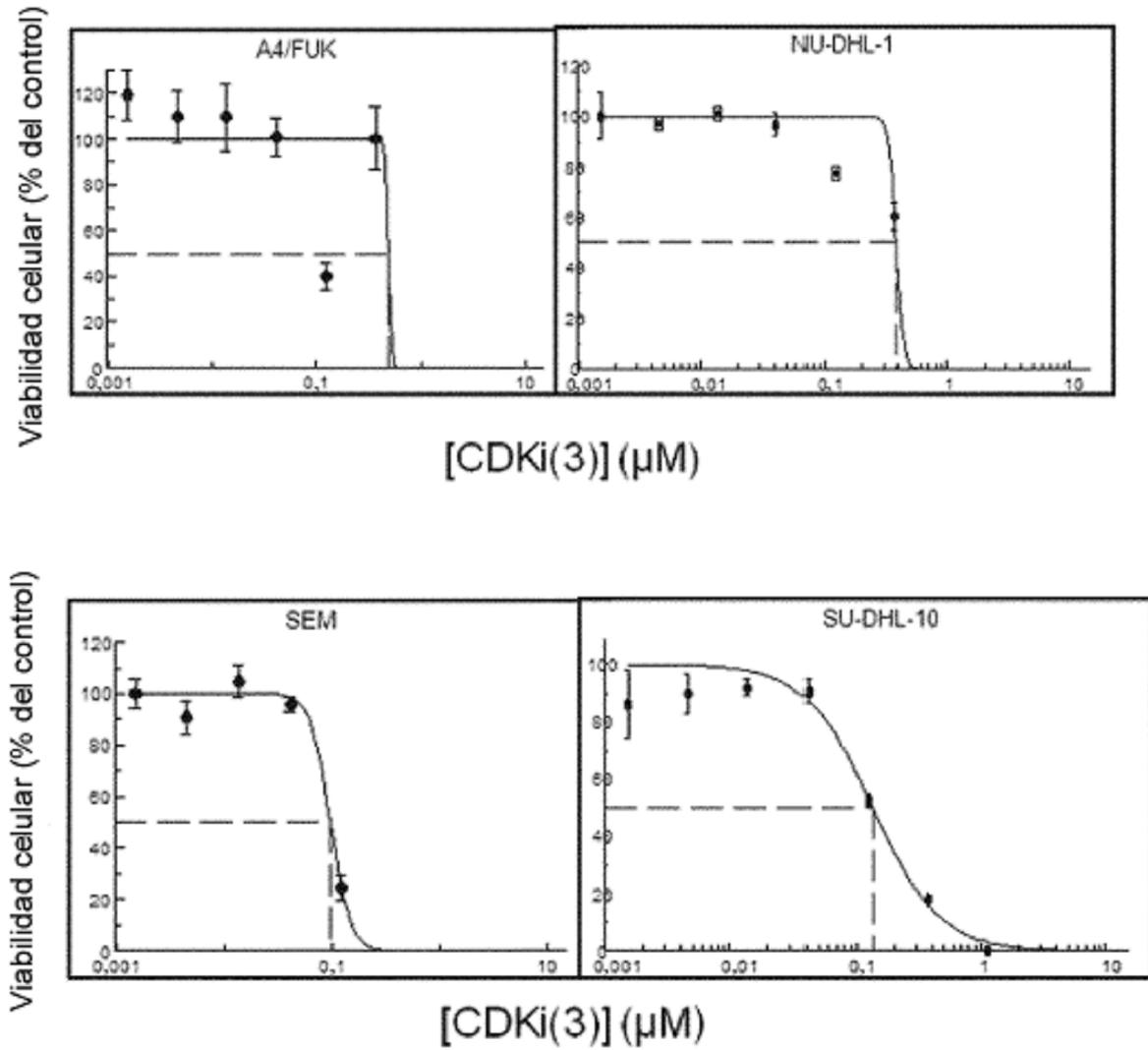


FIGURA 4(C)

Células que contienen mutaciones de CCND3 son sensibles a CDKi(3)

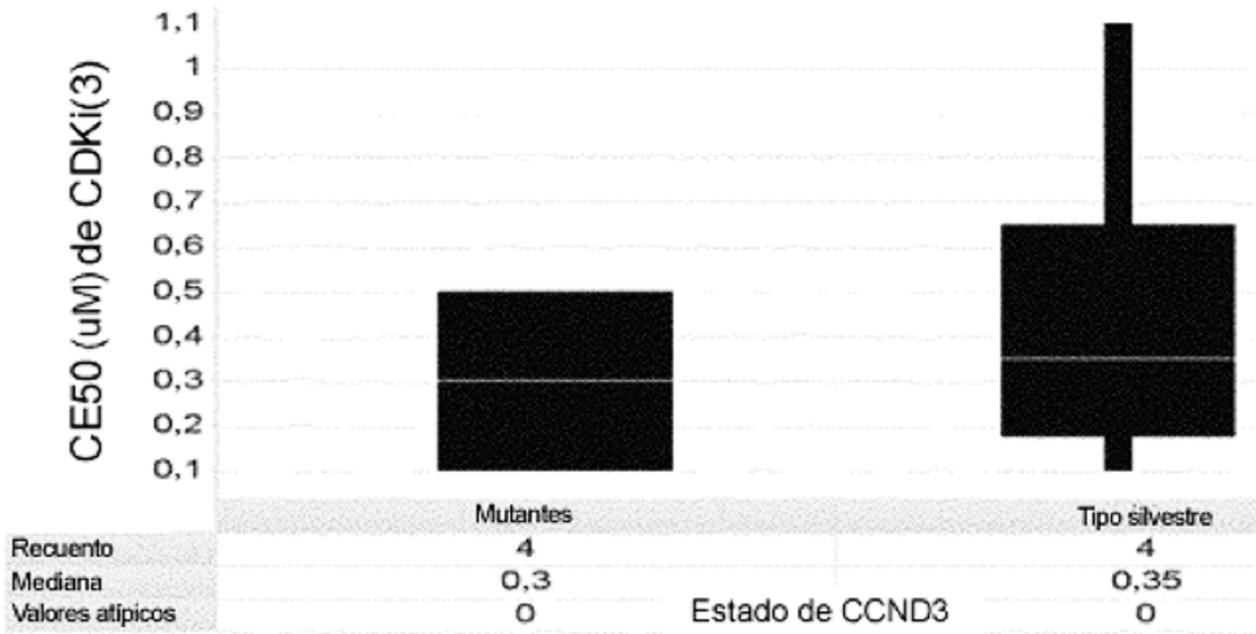


FIGURA 5A/B

Figura 5A/B- mutaciones de CCND3 provocan estabilidad proteinica aumentada

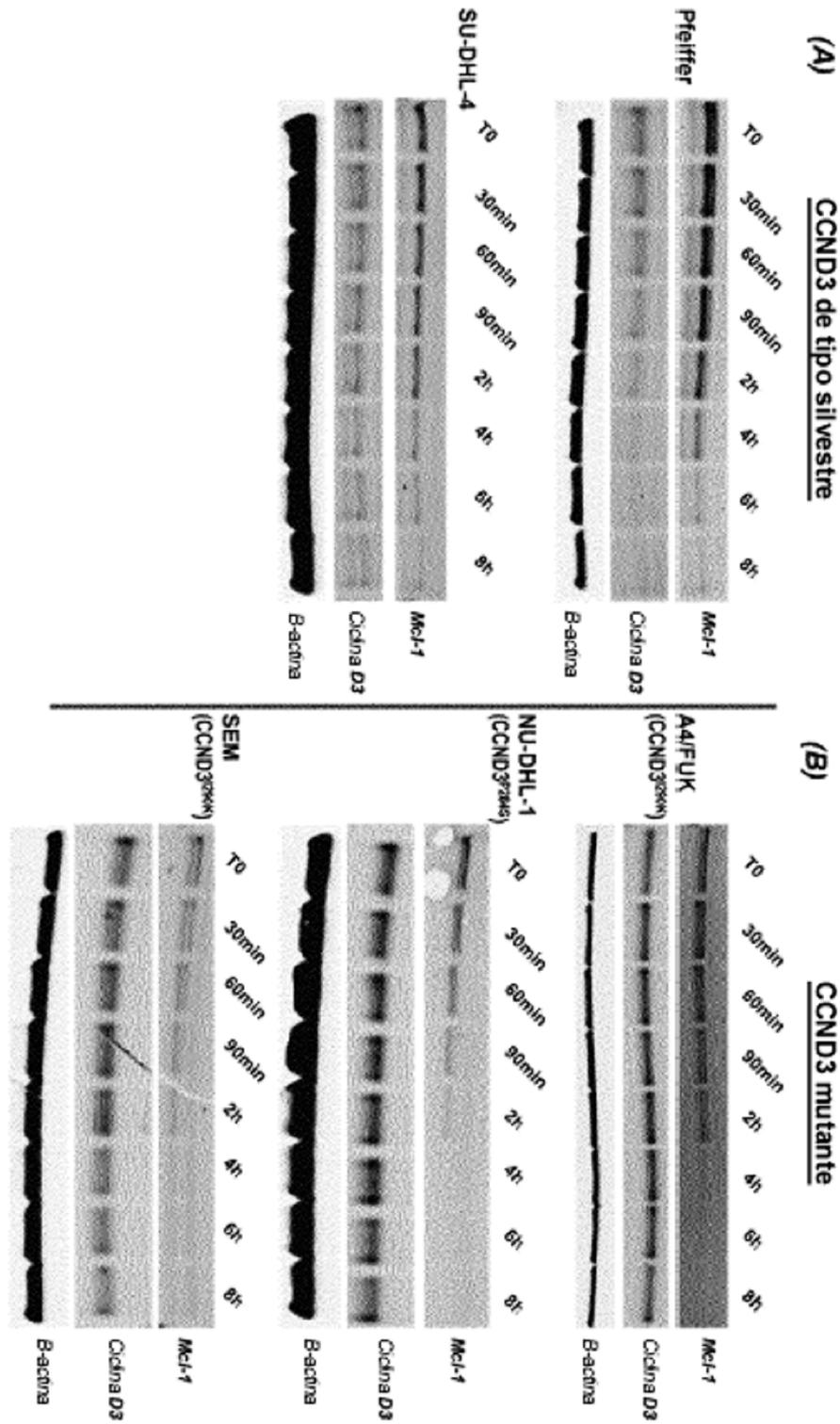


FIGURA 6A/B

