

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 447**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2016 PCT/EP2016/054288**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2016 WO16139192**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2016 E 16707709 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3265106**

54 Título: **Nuevo método para el tratamiento y el pronóstico del cáncer**

30 Prioridad:

**02.03.2015 EP 15305314**

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

**30.07.2020**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (25.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ DE NANTES (25.0%);  
UNIVERSITÉ D'ANGERS (25.0%) y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (25.0%)**

72 Inventor/es:

**CARTRON, PIERRE-FRANÇOIS;  
CHERAY, MATHILDE y  
VALETTE, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 776 447 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Nuevo método para el tratamiento y el pronóstico del cáncer

**Campo de la invención:**

5 La presente invención se refiere a un método in vitro para determinar el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar un buen pronóstico cuando el nivel de expresión es más bajo que el valor de referencia predeterminado y un mal pronóstico cuando el nivel de expresión es más alto que el valor de referencia predeterminado.

10 La invención también se refiere a un compuesto que es un antagonista de DNMT3A/ISGF3y e inhibe la interacción DNMT3A/ISGF3y para su uso en el tratamiento y la prevención del cáncer.

**Antecedentes de la invención:**

15 Los patrones de metilación del ADN son con frecuencia aberrantes en las células cancerosas. Por lo tanto, puede ocurrir hipometilación de regiones intergénicas, lo que conduce a tumorigénesis a través de la activación de elementos transponibles y una mayor inestabilidad genómica. La hipometilación local de los promotores de genes puede promover la expresión de oncogenes, mientras que la hipermetilación local de los promotores de genes puede conducir a la pérdida de la función supresora de tumores en las células cancerosas. Basándose en este último punto, el desarrollo de fármacos se ha centrado en los inhibidores de la metilación del ADN con el objetivo de activar los genes supresores de tumores (TSG) silenciados por la metilación del ADN. Pero en ausencia de especificidad, un inhibidor de DNMT puede promover la desmetilación de TSG, pero también de oncogenes y elementos transponibles. Por lo tanto, el uso de inhibidores inespecíficos de DNMT puede ser anti-tumorigénico o pro-tumorigénico. Además, este último punto se ilustra en varios artículos. De hecho, la bibliografía informa de que el tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina (un inhibidor inespecífico de DNMT) aumentó la invasividad de líneas celulares no invasivas de células de cáncer de mama MCF-7 y ZR-75-1 e indujo drásticamente genes pro-metastásicos [Chik F et al., 2011]. También se ha informado de que el tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina es un inductor de glioma de los astrocitos y un potenciador de la propiedad tumorigénica de las células de glioma. Sin embargo, la 5-aza-2'-desoxicitidina está aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para el tratamiento del síndrome mielodisplásico, donde demuestra una mejora significativa, aunque generalmente transitoria, en la supervivencia del paciente. A pesar de esta indudable utilidad clínica, el doble efecto del uso de inhibidores inespecíficos de DNMT proporciona evidencia para el desarrollo de inhibidores específicos de DNMT. Además, los inhibidores específicos de DNMT también podrían permitir la localización de tumores que albergan una funcionalidad aberrante de un DNMT concreto. El desarrollo de inhibidores específicos de DNMT también podría reducir los efectos distintos de los deseados asociados con el uso de inhibidores inespecíficos de DNMT.

35 En la actualidad, se desarrollan varias moléculas para que se dirijan específicamente a una DNMT concreta. Por lo tanto, DNMT1 se puede inhibir utilizando RG108, MG98 o Procainamida, DNMT3A, mientras que DNMT3B se puede inhibir específicamente utilizando 3,3'-dialato de Teaflavina o NanaomicinaA, respectivamente [Amato R et al., 2012; Kuck D et al., 2010; Kuck D et al., 2010; Lee B et al., 2005 y Rajavelu A et al., 2001]. Para identificar estos inhibidores específicos de DNMT, se desarrollan varias estrategias: los métodos de escrutinio virtuales basados en acoplamiento, el escrutinio de productos naturales, el diseño y la generación de derivados de inhibidores de DNMT ya conocidos, el modelado molecular de inhibidores de DNMT mediante el uso de estudios de estructura cristalina de las DNMT, o el diseño de ARNip dirigido a las DNMT [Kuck D et al., 2010; Medina-Franco J et al., 2011; Suzuki T et al., 2010; Yoo J et al., 2012; Yoo J et al., 2012 y Venza M et al., 2013]. En un artículo reciente, los autores de la presente invención demostraron que los inhibidores de DNMT también se pueden dirigir contra una interacción específica de DNMT/proteína-x [Cheray M et al., 2013].

**Compendio de la invención:**

50 En el presente estudio, los autores de la presente invención plantearon la pregunta para saber si la presencia de interacción existente entre DNMT3A y una proteína de unión a DNMT3A (D3A-BP) permite identificar una subpoblación de pacientes que padecen glioblastoma multiforme (GBM) que albergan un tiempo de supervivencia general más corto y cuyas células de glioma presentaron un fenotipo de resistencia al tratamiento con temozolomida/irradiación. A continuación, quisieron saber si es posible desarrollar una estrategia con el objetivo de inhibir específicamente la interacción DNMT3A/D3A-BP asociada con un mal pronóstico de supervivencia y/o respuesta al tratamiento de temozolomida/irradiación para aumentar el porcentaje de muerte celular inducida por temozolomida+irradiación, y la sensibilidad de TMZ en un modelo de gliomagénesis en ratones.

55 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método in vitro para determinar el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar un buen pronóstico cuando el nivel de expresión es

más bajo que el valor de referencia predeterminado y un mal pronóstico cuando el nivel de expresión es más alto que el valor de referencia predeterminado.

La invención también se refiere a un compuesto que es un antagonista de DNMT3A/ISGF3y e inhibe la interacción DNMT3A/ISGF3y para su uso en el tratamiento y la prevención del cáncer.

5 **Descripción detallada de la invención:**

***Métodos pronósticos y predictivos.***

10 El primer aspecto de la invención se refiere a un método in vitro para determinar el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar un buen pronóstico cuando el nivel de expresión es más bajo que el valor de referencia predeterminado y un mal pronóstico cuando el nivel de expresión es más alto que el valor de referencia predeterminado.

15 La invención también se refiere a un método in vitro para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer y tratado con un tratamiento convencional que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar un buen pronóstico cuando el nivel de expresión es más bajo que el valor de referencia predeterminado y un mal pronóstico cuando el nivel de expresión es más alto que el valor de referencia predeterminado.

20 La invención también se refiere a un método in vitro para predecir la respuesta de un paciente que padece un cáncer y tratado con un tratamiento convencional que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar una buena respuesta cuando el nivel de expresión es inferior al valor de referencia predeterminado y una mala deficiente cuando el nivel de expresión es superior al valor de referencia predeterminado.

25 Como se emplea en la presente memoria, los términos "tratamiento convencional" denotan cualquier compuesto, combinación de compuestos, combinación de tratamiento quimioterapéutico y agente radioterapéutico y combinación de tratamiento quimioterapéutico y radiación que se pueden utilizar para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, en el caso del tratamiento del glioblastoma, el tratamiento convencional puede ser el uso de una combinación de temozolomida y radiación.

30 Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un glioblastoma y tratado con radiación y temozolomida que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar un buen pronóstico cuando el nivel de expresión es más bajo que el valor de referencia predeterminado y un mal pronóstico cuando el nivel de expresión es más alto que el valor de referencia predeterminado.

35 La invención también se refiere a un método para predecir la respuesta de un paciente que padece un glioblastoma y tratado con radiación y temozolomida que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar una buena respuesta cuando el nivel de expresión es inferior al valor de referencia predeterminado y una respuesta pobre cuando el nivel de expresión es superior al valor de referencia predeterminado.

40 En una realización, el cáncer puede ser cualquier cáncer sólido o líquido. Típicamente, el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer de conducto biliar (p. ej., cáncer periférico, cáncer de conducto biliar distal, cáncer de conducto biliar intrahepático), cáncer de vejiga, cáncer de hueso (p. ej., osteoblastoma, osteocondroma, hemangioma, fibroma condromixoide, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumor de células gigantes del hueso, cordoma, linfoma, mieloma múltiple), cáncer de cerebro y sistema nervioso central (p. ej., meningioma, astrocitoma, oligodendrogliomas, glioblastoma, ependimoma, gliomas, meduloblastoma, ganglioglioma, Schwannoma, germinoma, craneofaringioma), cáncer de mama (p. ej., carcinoma ductal in situ, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma lobular in situ, ginecomastia), enfermedad de Castleman (p. ej. hiperplasia de ganglios linfáticos gigantes, hiperplasia de ganglios linfáticos angiofolliculares), cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio (p. ej., adenocarcinoma de endometrio, adenoacantoma, adenocarcinoma seroso papilar y de células claras), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células pequeñas), tumores carcinoides gastrointestinales (p. ej. coriocarcinoma, corioadenoma destruens), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (p. ej., cáncer de células renales), cáncer de laringe e hipofaringe, cáncer de hígado (p. ej. hemangioma, adenoma hepático, hiperplasia nodular focal, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas), mesotelioma, plasmacitoma, cáncer de cavidad nasal y seno paranasal (p. ej., estesionuroblastoma, granuloma de línea media), cáncer de nasofaringe,

neuroblastoma, cáncer de cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de hipófisis, cáncer de próstata, retinoblastoma, rabdomiosarcoma (p. ej., rabdomiosarcoma embrionario, rabdomiosarcoma alveolar, rabdomiosarcoma pleomórfico), cáncer de glándulas salivales, cáncer de piel (p. ej. melanoma, cáncer de piel no melanoma), cáncer de estómago, cáncer testicular (p. ej., seminoma, cáncer de células germinales no seminomatoso), cáncer de timo, cáncer de tiroides (p. ej., carcinoma folicular, carcinoma anaplásico, pobre) y carcinoma diferenciado, carcinoma medular de tiroides, linfoma de tiroides), cáncer vaginal, cáncer vulvar y cáncer uterino (p. ej. leiomiomasarcoma uterino).

En una realización concreta, el glioblastoma es un glioblastoma multiforme.

Típicamente, la muestra según la invención puede ser una muestra de sangre, plasma, suero o una biopsia de cáncer. En una realización concreta, dicha muestra es una biopsia de glioblastoma.

Como se emplea en la presente memoria, el término "DNMT3A" para "ADN metiltransferasa 3A" (número de ID Entrez Gene: 1788; referencia de secuencia de ARNm: NM\_022552.4; referencia de secuencia de proteína: Q9Y6K1) designó una ADN metiltransferasa de novo, es decir, una enzima responsable del establecimiento de patrones de metilación del ADN genómico de novo y, como tales, implicados en el desarrollo normal, así como en muchas enfermedades, incluido el cáncer.

La secuencia de proteínas de DNMT3A (SEQ ID NO: 3) es:

MPAMPSSGPGDTSSSAAEREEDRKDGEEQEEPRGKEERQEPSTTARKVGRPGRKRKH  
 PPVESGDTPKDPAVISKSPSMAQDSGASELLPNGDLEKRSEPPQEEGSPAGGQKGGAP  
 AEGEGAAETLPEASRAVENGCCPKKEGRGAPAEAGKEQKETNIESMKMEGSRGRLR  
 GGLGWESSLRQRPMPRLTFQAGDPYYISKRKRDEWLRWKREAEEKKAKVIAGMNA  
 VEENQGPGESQKVEEASPPAVQQPTDPASPTVATTPEPVGSDAGDKNATKAGDDEPE  
 YEDGRGFGIGELVWGKLRGFSWWPGRIVSWWMTGRSRAAEGTRWVMWFGDGKFS  
 VVCVEKLMPLSSFCSAFHQATYNKQPMYRKAIYEVLQVASSRAGKLFVCHDSDESD  
 TAKAVEVQNKPMIEWALGGFQPSGPKGLEPPEEEKNPYKEVYTDMWVEPEAAAYAP  
 PPPAKKPRKSTAEEKPKVKEIIDERTRERLVYEVQRQKCRNIEDICISCGSLNVTLEHPLFV  
 GGMQCNCKNCFLECAQQYDDDDGYQSYCTICCGGREVLMCGNCCRCFCVECVDL  
 LVGPGAAQAAIKEDPWNCYMCGHKGTYGLLRREDWPSRLQMFFANNHDQEFDP  
 KVYPPVPAEKRPKPIRVLSLFDGIATGLLVKDLGIQVDRIASEVCEDESITVGMVRHQ  
 GKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYR  
 LLHDARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLSNPVMIDAKEVSAHRAR  
 YFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGDQHF  
 VFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLFAPLK  
 EYFACV

Como se emplea en la presente memoria, el término "ISGF3γ" (número de ID Entrez Gene: 10379; referencia de secuencia de ARNm: NM\_006084.4; referencia de secuencia de proteína: Q00978) denota un factor de Transcripción que media la señalización mediante los IFN de tipo I. ISGF3γ se une al elemento de respuesta estimulado por IFN (ISRE) para activar la transcripción de genes estimulados por interferón, que conducen a la célula a un estado antiviral.

En otra realización, la invención se refiere a un método in vitro para determinar el pronóstico de la supervivencia global (SG) de un paciente que padece un cáncer que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3γ en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar un buen pronóstico cuando el nivel de expresión es más bajo que el valor de referencia predeterminado y un mal pronóstico cuando el nivel de expresión es más alto que el valor de referencia predeterminado.

En otra realización, la invención también se refiere a un método para predecir la supervivencia global (SG) de un paciente que padece un cáncer y tratado con un tratamiento convencional que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3γ en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho

nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar un buen pronóstico cuando el nivel de expresión es inferior al valor de referencia predeterminado y un mal pronóstico cuando el nivel de expresión es mayor que el valor de referencia predeterminado.

5 En otra realización, la invención también se refiere a un método para predecir la supervivencia global (SG) de un paciente que padece un glioblastoma y tratado con radiación y temozolomida que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar un buen pronóstico cuando el nivel de expresión es inferior al valor de referencia predeterminado y un mal pronóstico cuando el nivel de expresión es superior al valor de referencia predeterminado .

10 Como se emplea en la presente memoria, el término "Supervivencia global (SG)" denota el porcentaje de personas en un grupo de estudio o tratamiento que todavía están vivos durante un cierto período de tiempo después de que se les diagnosticara o comenzara el tratamiento para una enfermedad, tal como un cáncer (según la invención).

Como se emplea en la presente memoria, el término "Buen Pronóstico" denota a un paciente con más de 50% de posibilidades de supervivencia durante los próximos 3 años después del tratamiento.

15 La invención también se refiere a un método para predecir la capacidad de respuesta de un paciente afectado con un glioblastoma a un tratamiento de temozolomida y radiación que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y en una muestra de dicho paciente ii) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa i) con su valor de referencia predeterminado en el que cuando el nivel de expresión determinado en la etapa i) es inferior a sus valores de referencia predeterminados, la capacidad de respuesta del paciente al tratamiento es buena, y cuando el nivel de expresión determinado en la etapa i) es mayor  
20 que su valor de referencia predeterminado, la capacidad de respuesta del paciente al tratamiento es mala.

En una realización y de acuerdo con los métodos de la invención, la determinación del nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y se puede determinar antes o después del comienzo del tratamiento del paciente.

25 En otra realización, el paciente afectado por un glioblastoma se trata principalmente con un tratamiento convencional que consiste en resección quirúrgica máxima, radioterapia y quimioterapia coadyuvante concomitante con temozolomida.

30 El término "determinar el nivel de expresión de" como se emplea anteriormente incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control. Típicamente, el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y se puede medir, por ejemplo, mediante inmunoensayos marcados y mediados por enzimas (tales como ELISA), evaluación de citometría de flujo o qRT-PCR realizada en la muestra.

El "valor de referencia" puede ser un sujeto sano, es decir, un sujeto que no padece ningún tipo de cáncer y, en particular, glioblastoma. En particular, dicho control es un sujeto saludable.

La detección del nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3y en la muestra se puede realizar midiendo el nivel de proteínas DNMT3A/ISGF3y o genes *DNMT3A/ISGF3y*

35 En el caso de la detección de proteínas DNMT3A/ISGF3y, los métodos pueden comprender poner en contacto una muestra con un compañero de unión capaz de interactuar selectivamente con las proteínas DNMT3A/ISGF3y presentes en la muestra. El compañero de unión es generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, concretamente monoclonal.

40 La presencia de la proteína se puede detectar utilizando técnicas electroforéticas e inmunodiagnósticas convencionales, que incluyen inmunoensayos tales como ensayos de competición, reacción directa o tipo sándwich. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, transferencias Western; pruebas de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación, etc. Las reacciones generalmente incluyen marcadores reveladores tales como marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivos, enzimáticos o moléculas de colorante, u otros  
45 métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos reaccionados con el mismo.

Los ensayos mencionados generalmente implican la separación de la proteína no unida en una fase líquida de un soporte en fase sólida al que se unen los complejos antígeno-anticuerpo. Los soportes sólidos que se pueden utilizar en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (p. ej., en forma de membrana o pocillos de microtitulación); poli(cloruro de vinilo) (p. ej., láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (p. ej., cuentas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilideno; papel diazotado; membranas de nylon; cuentas activadas, cuentas que responden magnéticamente y similares.

50 Más concretamente, se puede utilizar un método ELISA, en donde los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un conjunto de anticuerpos contra las proteínas que se deben probar. A continuación, se añade una muestra que contiene o se sospecha que contiene la proteína marcadora a los pocillos recubiertos. Después de un  
55

período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la placa o las placas se pueden lavar para eliminar los radicales no unidos y se añade una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable. Se permite que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, la placa se lava y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

Se conocen en la técnica varios métodos de tinción inmunoenzimática para detectar una proteína de interés. Por ejemplo, las interacciones inmunoenzimáticas se pueden visualizar utilizando diferentes enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina o diferentes cromógenos tales como DAB, AEC o Fast Red; o marcas fluorescentes tales como FITC, Cy3, Cy5, Cy7, Alexafluor, etc. Las contratincciones pueden incluir H&E, DAPI, Hoechst, siempre que dichas manchas sean comparables con otros reactivos de detección y la estrategia de visualización utilizada. Como se conoce en la técnica, los reactivos de amplificación se pueden utilizar para intensificar la señal de tinción. Por ejemplo, se pueden utilizar reactivos de tiramida. Los métodos de tinción de la presente invención pueden llevarse a cabo utilizando cualquier método o sistema adecuado como sería evidente para un experto en la técnica, incluidos sistemas automatizados, semiautomatizados o manuales.

El método de la invención puede comprender una etapa adicional que consiste en comparar la expresión de proteínas DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  con una referencia de control.

En el caso de detección de los genes *DNMT3A/ISGF3 $\gamma$* , el término "nivel de expresión de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ " se refiere a una cantidad o una concentración de un producto de transcripción, por ejemplo, ARNm que codifica genes *DNMT3A/ISGF3 $\gamma$* . Típicamente, un nivel de expresión de ARNm se puede expresar en unidades tales como transcritos por célula o nanogramos por microgramo de tejido. Un nivel de proteína se puede expresar como nanogramos por microgramo de tejido o nanogramos por mililitro de un medio de cultivo, por ejemplo. Alternativamente, se pueden emplear unidades relativas para describir un nivel de expresión.

La medición del nivel de expresión de un gen se puede realizarse mediante una variedad de mecanismos bien conocidos en la técnica.

Típicamente, el nivel de expresión de un gen se puede determinar determinando la cantidad de ARNm. Los métodos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras (p. ej., células o tejidos preparados del paciente) se extrae primero de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, utilizando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae mediante resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta a continuación mediante hibridación (p. ej., análisis de transferencia Northern, hibridación in situ) y/o amplificación (p. ej., RT-PCR).

Otros métodos de amplificación incluyen reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA).

Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y exhiben complementariedad de secuencia u homología con el ARNm de interés en la presente memoria encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que no se necesita que tales ácidos nucleicos sean idénticos, pero típicamente son al menos aproximadamente 80% idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más concretamente 85% idénticos e incluso más concretamente 90-95% idénticos. En ciertas realizaciones, será ventajoso utilizar ácidos nucleicos combinados con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación.

Típicamente, las sondas de ácido nucleico incluyen uno o más marcadores, por ejemplo, para permitir la detección de una molécula de ácido nucleico diana utilizando las sondas descritas. En diversas aplicaciones, tales como los procedimientos de hibridación in situ, una sonda de ácido nucleico incluye una marca (p. ej., una marca detectable). Una "marca detectable" es una molécula o material que se puede utilizar para producir una señal detectable que indica la presencia o concentración de la sonda (concretamente la sonda unida o hibridada) en una muestra. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico marcada proporciona un indicador de la presencia o concentración de una secuencia de ácido nucleico diana (p. ej., secuencia de ácido nucleico diana genómico) (con la que la molécula de ácido nucleico marcadamente específica se une o hibrida) en una muestra. Se puede detectar una marca asociada con una o más moléculas de ácido nucleico (tal como una sonda generada por los métodos descritos) directa o indirectamente. Una marca puede ser detectada por cualquier mecanismo conocido o por descubrir, incluida la absorción, emisión y/o dispersión de un fotón (incluidos fotones de frecuencia de radio, frecuencia de microondas, frecuencia infrarroja, frecuencia visible y frecuencia ultravioleta). Las marcas detectables incluyen moléculas y materiales coloreados, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia para proporcionar una diferencia detectable (por ejemplo convirtiendo una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o produciendo un precipitado o aumentando la turbidez de la muestra), haptenos que se pueden detectar mediante interacciones de unión de anticuerpos y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos.

Los ejemplos concretos de marcadores detectables incluyen moléculas fluorescentes (o fluorocromos). Los expertos en la técnica conocen numerosos fluorocromos, y se pueden seleccionar, por ejemplo, de Life Technologies

(anteriormente Invitrogen), p. ej., véase, *The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. Se proporcionan ejemplos de fluoróforos concretos que se pueden anclar (p. ej., conjugar químicamente) a una molécula de ácido nucleico (tal como una región de unión específicamente única) en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.866.366 de Nazarenko et al., tales como ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico, acridina y derivados tales como acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonyl]fenil]naftalimida-3,5-disulfonato (Amarillo Lucifer VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Amarillo Brillante, cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (cumarina 151); cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5"-dibromopirogalol-sulfonofaleína (Rojo de Bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-([4,6-diclorotriazin-2-il]amino)fluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y QFITC Q (RITC); 2',7'-difluorofluoresceína (OREGON GREEN®); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato Verde Malaquita; 4-metilumbeliferona; orto-cresolfaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Rojo Fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y 1-pirenobutirato de succinimidilo; Rojo Reactivo 4 (Cibacron Brilliant Red 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-rodamina (R6G), cloruro de sulfonil lisamina rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, verde rodamina, sulforodamina B, sulforodamina 101 y derivado cloruro de sulfonilo de sulforodamina 101 (Texas Red); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico y derivados de quelato de terbio. Otros fluoróforos adecuados incluyen quelatos de europio reactivos con tiol que emiten a aproximadamente 617 nm (Heyduk y Heyduk, *Analyt. Biochem.* 248:216-27, 1997; *J. Biol. Chem.* 274:3315-22, 1999), así como GFP, Lissamine™, dietilaminocumarina, fluoresceína clorotriazinilo, naftofluoresceína, 4,7-diclororodamina y xanteno (como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.800.996 de Lee et al.) y sus derivados. También se pueden utilizar otros fluoróforos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, los disponibles de Life Technologies (Invitrogen; Molecular Probes (Eugene, Oreg.)) e incluyendo la serie de colorantes ALEXA FLUOR® (por ejemplo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.696.157, 6.130.101 y 6.716.979), la serie de colorantes BODIPY (colorantes de difluoruro de dipirometanoboro, por ejemplo como se describe en las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.774.339, 5.187.288, 5.248.782, 5.274.113, 5.338.854, 5.451.663 y 5.433.896), Cascade Blue (un derivado reactivo con amina del pireno sulfonado descrito en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.132.432) y Marina Blue (Patente de Estados Unidos Núm. 5.830.912).

Además de los fluorocromos descritos anteriormente, una marca fluorescente puede ser una nanopartícula fluorescente, tal como un nanocristal semiconductor, p. ej., un QUANTUM DOT™ (obtenido, por ejemplo, de Life Technologies (QuantumDot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Eugene, Oreg.); véase también, las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.815.064; 6.682.596; y 6.649.138). Los nanocristales semiconductores son partículas microscópicas que tienen propiedades ópticas y/o eléctricas dependientes del tamaño. Cuando los nanocristales semiconductores se iluminan con una fuente de energía primaria, se produce una emisión secundaria de energía de una frecuencia que corresponde a la separación del material semiconductor utilizado en el nanocristal semiconductor. Esta emisión se puede detectar como luz de color de una longitud de onda o fluorescencia específica. Los nanocristales semiconductores con diferentes características espectrales se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.602.671. Los nanocristales semiconductores se pueden acoplar a una variedad de moléculas biológicas (incluidos dNTP y/o ácidos nucleicos) o sustratos mediante técnicas descritas en, por ejemplo, Bruchez et al., *Science* 281: 20132016, 1998; Chan et al., *Science* 281: 2016-2018, 1998; y la Patente de Estados Unidos Núm. 6.274.323. La formación de nanocristales semiconductores de diversas composiciones se describe, p. ej., en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.927.069; 6.914.256; 6.855.202; 6.709.929; 6.689.338; 6.500.622; 6.306.736; 6.225.198; 6.207.392; 6.114.038; 6.048.616; 5.990.479; 5.690.807; 5.571.018; 5.505.928; 5.262.357 y en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2003/0165951 así como en la Publicación PCT Núm. 99/26299 (publicada el 27 de mayo de 1999). Se pueden producir poblaciones separadas de nanocristales semiconductores identificables en función de sus diferentes características espectrales. Por ejemplo, se pueden producir nanocristales semiconductores que emitan luz de diferentes colores según su composición, tamaño o tamaño y composición. Por ejemplo, los puntos cuánticos que emiten luz a diferentes longitudes de onda en función del tamaño (565 nm, 655 nm, 705 nm u 800 nm de longitud de onda de emisión), que son adecuados como marcas fluorescentes en las sondas descritas en la presente memoria, están disponibles en Life Technologies (Carlsbad, Calif.).

Las marcas adicionales incluyen, por ejemplo, radioisótopos (tales como <sup>3</sup>H), quelatos metálicos tales como quelatos DOTA y DPTA de iones metálicos radiactivos o paramagnéticos tales como Gd<sup>3+</sup>, y liposomas.

Los marcadores detectables que se pueden utilizar con moléculas de ácido nucleico también incluyen enzimas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa o beta-lactamasa.

Alternativamente, se puede utilizar una enzima en un esquema de detección metalográfico. Por ejemplo, los procedimientos de hibridación in situ con plata (SISH) implican esquemas de detección metalográfico para la identificación y localización de una secuencia de ácido nucleico diana genómica hibridada. Los métodos de detección metalográficos incluyen el uso de una enzima, tal como la fosfatasa alcalina, combinado con un ion metálico soluble en agua y un sustrato rédox inactivo de la enzima. El sustrato se convierte en un agente activo rédox mediante la enzima, y el agente activo rédox reduce el ion metálico, haciendo que forme un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2005/0100976, la Publicación PCT Núm. 2005/003777 y la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2004/0265922). Los métodos de detección metalográfico también incluyen el uso de una enzima oxido-reductasa (tal como peroxidasa de rábano picante) junto con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, nuevamente para formar un precipitado detectable. (Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.670.113).

Las sondas preparadas utilizando los métodos descritos se pueden utilizar para la detección de ácido nucleico, tales como los procedimientos ISH (por ejemplo, hibridación fluorescente in situ (FISH), hibridación cromogénica in situ (CISH) e hibridación in situ con plata (SISH)) o hibridación genómica comparativa (CGH).

La hibridación in situ (ISH) implica poner en contacto una muestra que contiene la secuencia de ácido nucleico diana (p. ej., La secuencia de ácido nucleico genómico diana) en el contexto de una preparación cromosómica en metafase o interfase (tal como una muestra de células o tejidos montada en un portaobjetos) con una sonda marcada específicamente hibridable o específica para la secuencia de ácido nucleico diana (p. ej., secuencia de ácido nucleico diana genómico). Los portaobjetos se pretratan opcionalmente, p. ej., para eliminar parafina u otros materiales que puedan interferir con la hibridación uniforme. La muestra y la sonda se tratan, por ejemplo, calentando para desnaturalizar los ácidos nucleicos bicatenarios. La sonda (formulada en un tampón de hibridación adecuado) y la muestra se combinan, bajo condiciones y durante el tiempo suficiente para permitir que se produzca la hibridación (típicamente para alcanzar el equilibrio). La preparación cromosómica se lava para eliminar el exceso de sonda, y la detección del marcaje específico de la diana cromosómica se realiza utilizando técnicas convencionales.

Por ejemplo, se puede detectar una sonda biotilada utilizando avidina marcada con fluoresceína o avidina-fosfatasa alcalina. Para la detección del fluorocromo, el fluorocromo se puede detectar directamente o las muestras se pueden incubar, por ejemplo, con avidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La amplificación de la señal de FITC se puede efectuar, si fuera necesario, mediante incubación con anticuerpos antiavidina de cabra conjugados con biotina, lavado y una segunda incubación con avidina conjugada con FITC. Para la detección mediante la actividad enzimática, las muestras se pueden incubar, por ejemplo, con estreptavidina, lavar, incubar con fosfatasa alcalina conjugada con biotina, lavar nuevamente y preequilibrar (p. ej., en tampón de fosfatasa alcalina (AP)). Para una descripción general de los procedimientos de hibridación in situ, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.888.278.

Se conocen numerosos procedimientos para FISH, CISH y SISH en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos para realizar FISH son descritos por las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.447.841; 5.472.842; y 5.427.932; y por ejemplo, por Pirkel et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. 83:2934-2938, 1986; Pinkel et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9138-9142, 1988; y Lichter et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9664-9668, 1988. La CISH es descrita, por ejemplo, por Tanner et al., en Am. J. Pathol. 157:1467-1472, 2000 y la Patente de Estados Unidos Núm. 6.942.970. Se proporcionan métodos de detección adicionales en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.280.929.

Se pueden emplear numerosos reactivos y esquemas de detección junto con los procedimientos FISH, CISH y SISH para mejorar la sensibilidad, la resolución u otras propiedades deseables. Como se comentó anteriormente, las sondas marcadas con fluoróforos (incluidos los tintes fluorescentes y QUANTUM DOTS®) se pueden detectar directamente de forma óptica cuando se realiza FISH. Alternativamente, la sonda se puede marcar con una molécula no fluorescente, tal como un hapteno (tales como los siguientes ejemplos no limitantes: biotina, digoxigenina, DNP y diversos oxazoles, pirrazoles, tiazoles, nitroarilos, benzofurazanos, triterpenos, ureas, tioureas, rotenonas, cumarina, compuestos a base de cumarina, podofilotoxina, compuestos a base de podofilotoxina y combinaciones de los mismos), ligando u otro radical detectable indirectamente. Las sondas marcadas con tales moléculas no fluorescentes (y las secuencias de ácido nucleico diana a las que se unen) se pueden detectar al poner en contacto la muestra (p. ej., la muestra de células o tejidos a la que se une la sonda) con un reactivo de detección marcado, tal como un anticuerpo (o receptor, u otro compañero de unión específico) específico para el hapteno o ligando elegido. El reactivo de detección se puede marcar con un fluoróforo (p. ej., QUANTUM DOT®) o con otro radical detectable indirectamente, o puede ponerse en contacto con uno o más agentes de unión específicos adicionales (p. ej., anticuerpos secundarios o específicos), que se pueden marcar con un fluoróforo.

En otros ejemplos, la sonda o el agente de unión específico (tal como un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo primario, receptor u otro agente de unión) se marca con una enzima que es capaz de convertir una composición fluorogénica o cromogénica en una señal detectable fluorescente, coloreada o detectable de otro modo (p. ej., como en el depósito de partículas metálicas detectables en SISH). Como se indicó anteriormente, la enzima se puede unir directa o indirectamente a través de un conector a la sonda relevante o al reactivo de detección. Los ejemplos de reactivos adecuados (p. ej., reactivos de unión) y químicas (p. ej., químicas de conector y anclaje) se describen en

las Publicaciones de las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 2006/0246524; 2006/0246523 y 2007/01 17153.

5 Los expertos en la técnica apreciarán que, al seleccionar adecuadamente los pares de agentes de unión específicos de sonda marcados, se pueden producir esquemas de detección multiplexados para facilitar la detección de  
 10 múltiples secuencias de ácido nucleico diana (p. ej., secuencias de ácido nucleico diana genómico) en un solo ensayo (p. ej., en una sola muestra de células o tejidos o en más de una muestra de células o tejidos). Por ejemplo, una primera sonda que corresponde a una primera secuencia diana se puede marcar con un primer hapteno, tal como biotina, mientras que una segunda sonda que corresponde a una segunda secuencia diana se puede marcar con un segundo hapteno, tal como DNP. Después de la exposición de la muestra a las sondas, las sondas unidas se  
 15 pueden detectar poniendo en contacto la muestra con un primer agente de unión específico (en este caso, avidina marcada con un primer fluoróforo, por ejemplo, un primer QUANTUM DOT® espectralmente distinto, p. ej., que emite a 585 nm) y un segundo agente de unión específico (en este caso un anticuerpo anti-DNP o fragmento de anticuerpo, marcado con un segundo fluoróforo (p. ej., un segundo QUANTUM DOT® espectralmente distinto, p. ej., que emite a 705 nm). Se pueden añadir pares de sondas/agentes de unión adicionales al esquema de detección multiplexado utilizando otros fluoróforos espectralmente distintos. Se pueden prever numerosas variaciones directas e indirectas (una etapa, dos etapas o más), todas los cuales son adecuadas en el contexto de las sondas y ensayos descritos.

20 Las sondas típicamente comprenden ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 y 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, entre 10 y 800, más concretamente entre 15 y 700, típicamente entre 20 y 500. Los cebadores típicamente son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, de entre 10 y 25 nucleótidos de longitud, diseñados para coincidir perfectamente o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés, que debe ser amplificado. Las sondas y los cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos con los que hibridan, es decir, hibridan concretamente en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondiente a la temperatura de fusión más alta  $T_m$ , p. ej., formamida al 50%, 5x o 6x SCC. SCC es un NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M).

25 Los cebadores o sondas de ácido nucleico utilizados en el método de amplificación y detección anterior pueden ensamblarse como un kit. Tal kit incluye cebadores consenso y sondas moleculares. Un kit particular también incluye los componentes necesarios para determinar si se ha producido la amplificación. El kit también puede incluir, por ejemplo, tampones de PCR y enzimas; secuencias de control positivo, cebadores de control de reacción; e instrucciones para amplificar y detectar las secuencias específicas.

30 En una realización concreta, los métodos de la invención comprenden las etapas de proporcionar ARN totales extraídos de células de cúmulo y someter los ARN a amplificación e hibridación con sondas específicas, más concretamente por medio de una RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa.

35 En otra realización concreta, el nivel de expresión se determina mediante análisis de chip de ADN. Tal chip de ADN o micromatriz de ácido nucleico consta de diferentes sondas de ácido nucleico que se anclan químicamente a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una cuenta del tamaño de una microesfera. Un microchip puede estar constituido por polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales a base de sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos o nitrocelulosa. Las sondas comprenden ácidos nucleicos tales como ADNc u oligonucleótidos que pueden tener de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 pares de bases. Para determinar el nivel de expresión, una muestra de un sujeto de prueba, opcionalmente sometido primero a una transcripción inversa, se marca y se pone en contacto con la micromatriz en condiciones de hibridación, lo que conduce a la formación de complejos entre ácidos nucleicos diana que son complementarios a las secuencias de sonda unidas a la superficie de las micromatrices. Los complejos hibridados marcados se detectan y pueden cuantificarse o semicuantificarse. El marcaje se puede lograr por varios métodos, p. ej. mediante el uso de marcaje radiactivo o fluorescente. Muchas variantes de la tecnología de hibridación de micromatrices están disponibles para el experto en la técnica (véase, por ejemplo, la revisión de Hoheisel, Nature Reviews, Genetics, 2006, 7:200-210).

45 El nivel de expresión de un gen se puede expresar como nivel de expresión absoluto o nivel de expresión normalizado. Típicamente, los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un gen comparando su expresión con la expresión de un gen que no es relevante para determinar la etapa de cáncer del paciente, por ejemplo, un gen de mantenimiento que se expresa constitutivamente. Los genes adecuados para la normalización incluyen genes de mantenimiento tales como el gen de actina ACTB, el gen ribosómico 18S, GUSB, PGK1 y TFRC. Según la invención, los genes de mantenimiento utilizados fueron GAPDH, GUSB, TBP y ABL1. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de paciente, con otra muestra, o entre muestras de diferentes fuentes.

55 Típicamente, un "valor umbral", "nivel umbral", "valor de referencia" o "valor de corte" se pueden determinar experimentalmente, empíricamente o teóricamente. Un valor umbral también se puede seleccionar arbitrariamente en función de las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería una persona con conocimientos normales de la técnica. En particular, el experto en la técnica puede comparar los niveles de expresión del par DNMT3A/ISGF3y obtenido de acuerdo con el método de la invención con un valor umbral definido.

Particularmente, dicho valor umbral es el nivel de expresión medio del par DNMT3A/ISGF3y de una población de

individuos sanos. Como se emplea en la presente memoria, el término "individuo sano" denota un ser humano que se sabe que es saludable, es decir, que no sufre de cáncer y en particular de un glioblastoma y no necesita ningún cuidado médico.

5 Típicamente, el experto en la técnica puede determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  en una muestra biológica, concretamente una biopsia de un cáncer de glioblastoma, por ejemplo, de 100 individuos que se sabe que son sanos. El valor medio de los niveles de expresión obtenidos se determina, de acuerdo con un análisis estadístico bien conocido, para obtener el nivel de expresión medio del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ . Dicho valor se considera normal y, por lo tanto, constituye un valor umbral. Al comparar los niveles de expresión del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  con este valor umbral, el médico puede clasificar y pronosticar el cáncer.

10 En consecuencia, el médico podría adaptar y optimizar la atención médica adecuada de un sujeto en una afección crítica y potencialmente mortal que padece cáncer. La determinación de dicho pronóstico es muy apropiada para la atención de seguimiento y la toma de decisiones clínicas.

La presente descripción también se refiere a kits útiles para los métodos de la invención, que comprenden medios para detectar la expresión de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ .

15 Los kits pueden comprender un anticuerpo anti-proteína DNMT3A y un anti-ISGF3 $\gamma$ ; y otra molécula junto con un sistema de señalización que se une a dichos anticuerpos DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  o cualquier molécula que se una al ARNm de *DNMT3A/ISGF3 $\gamma$*  genes como una sonda.

20 Típicamente, los anticuerpos o la combinación de anticuerpos están en forma de soluciones listas para su uso. En un ejemplo, el kit comprende recipientes con las soluciones listas para su uso. La presente descripción abarca cualquier otra forma y el experto en la técnica puede adaptar rutinariamente la forma al uso en inmunohistoquímica.

En otra realización, la invención se refiere a un método in vitro para controlar la respuesta del paciente al tratamiento del cáncer que comprende una etapa de medición del nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , en una muestra de un paciente.

25 Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  como biomarcador para el control de terapias anticancerosas y, más concretamente, una terapia anti-glioblastoma.

Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto que es un antagonista del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  para su uso en el tratamiento de pacientes que padecen un cáncer con un alto nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ .

30 Concretamente, la invención también se refiere a un compuesto que es un antagonista del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  para su uso en el tratamiento de pacientes que padecen un glioblastoma con un alto nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ .

### **Método terapéutico**

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un compuesto que es un antagonista de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  para su uso en el tratamiento y la prevención del cáncer.

35 Por "antagonista de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ " se entiende un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico opuesto al de un ligando natural de DNMT3A y/o ISGF3 $\gamma$ . Según la invención, el antagonista se une al par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  y bloquea la acción de estas proteínas al competir con el ligando de estas proteínas. Un antagonista se define por su capacidad para bloquear las acciones de un ligando natural. El término "antagonista de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ " se refiere a cualquier antagonista de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  que se conoce actualmente en la técnica o que se identificará en el futuro, e incluye cualquier entidad química que, tras la administración a un sujeto, da como resultado la inhibición de una actividad biológica asociada con la activación de las proteínas DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  en el sujeto, incluyendo cualquiera de los efectos biológicos posteriores que resultan de la unión a DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  de sus ligandos naturales. Alternativamente, tal antagonista puede actuar ocupando el sitio de unión al ligando o una porción del mismo de las proteínas DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , haciendo que el receptor sea inaccesible para su ligando natural, de modo que se evite o reduzca su actividad biológica normal. En una realización, el antagonista de la invención puede bloquear la unión de la proteína DNMT3A a la proteína ISGF3 $\gamma$ . Por lo tanto, un "antagonista de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ " puede ser un compuesto que se une a la proteína DNMT3A o a la proteína ISGF3 $\gamma$ .

Según la invención, un antagonista de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  se puede unir a la proteína DNMT3A en las posiciones 85-99, 103-129, 178-207, 235-246, 256-273, 331-360, 409-433 o 547-574 de SEQ ID NO: 3 e inhibir la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ .

50 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método de escrutinio de un compuesto candidato para su uso como fármaco para la prevención y el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite, en el que el método comprende las etapas de: i) proporcionar compuestos candidatos y ii) seleccionar compuestos candidatos que bloquean o suscitan antagonismo de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ .

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de escrutinio de un compuesto candidato para uso como fármaco para el tratamiento y la prevención del cáncer en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende las etapas de:

- 5 (i) proporcionar el par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , proporcionar una célula, muestra de tejido u organismo que exprese DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ ,
- (ii) proporcionar un compuesto candidato tal como una molécula orgánica pequeña, intra-anticuerpos, un péptido o un polipéptido,
- (iii) medir la actividad de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ ,
- (iv) y seleccionar compuestos candidatos positivos que bloqueen la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ .

10 Para identificar un compuesto capaz de bloquear la interacción entre DNMT3A e ISGF3 $\gamma$  o inhibir la expresión de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , se puede utilizar una prueba. Por ejemplo, se puede desarrollar una prueba que utilice el sistema de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) para analizar las interacciones DNMT3A/ISGF3 e identificar la molécula que tiene la capacidad de inhibir esta interacción. Para este propósito, el ADNc de interDNMT3A e ISGF3g se insertará en vectores diseñados para experimentos de Transferencia de

15 Energía de Resonancia de Bioluminiscencia (BRET) (pEYFP y pRLuc, Invitrogen). A continuación, estos vectores se transfecarán en células U251 (una línea celular GBM). Una vez que el ensayo sea validado, se utilizará BRET para la selección de bibliotecas de compuestos: se interpretará que una disminución de la señal destaca una molécula que tiene la capacidad de inhibir la interacción DNMT3A/ISGF3g.

20 Por "inhibidor de la expresión génica de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ " se entiende un compuesto natural o sintético que inhibe la expresión del gen *DNMT3A* o la expresión del gen *ISCF3 $\gamma$*  o ambas.

Para identificar dicho compuesto se puede utilizar una prueba. Por ejemplo, para analizar la capacidad de un compuesto para inhibir la expresión de DNMT3A e ISGF3, se pueden realizar experimentos de qPCR y ELISA.

25 La invención también se refiere a i) un compuesto de acuerdo con la invención, y ii) un agente quimioterapéutico, tal como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento y la prevención del cáncer.

La invención también se refiere a i) un compuesto de acuerdo con la invención, y ii) un agente quimioterapéutico y iii) una radioterapia o un agente radioterapéutico, tal como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento y la prevención del cáncer.

30 Como se emplea en la presente memoria, "radioterapia" puede consistir en radiación gamma, radiación de rayos X, electrones o fotones, radioterapia externa o curiterapia.

35 Como se emplea en la presente memoria, se pretende que el término "agente radioterapéutico" se refiera a cualquier agente radioterapéutico conocido por un experto en la técnica que sea eficaz para tratar o mejorar el cáncer, sin limitación. Por ejemplo, los agentes radioterapéuticos pueden ser agentes tales como los administrados en braquiterapia o terapia con radionúclidos. Tales métodos pueden comprender adicionalmente de manera opcional la administración de una o más terapias adicionales contra el cáncer, tales como, pero sin limitación, quimioterapias y/u otra radioterapia.

El agente quimioterapéutico puede ser la temozolomida, 5-aza-2'-desoxicitidina, 3,3'-dialato de Teaflavina, zebularina, decitabina, 4-amino-N-(4-aminofenilo), análogos de benzamida de SGI-1027 a base de quinolina (PMID: 24678024 o 23294304).

40 En una realización, el cáncer según la invención es un glioblastoma.

En una realización, la invención se refiere a i) compuesto de acuerdo con la invención, y ii) un agente quimioterapéutico y iii) una radioterapia, tal como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento y la prevención del glioblastoma.

45 En una realización concreta, la invención se refiere a i) un compuesto de acuerdo con la invención, y ii) la temozolomida y iii) una radioterapia, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento y la prevención del glioblastoma.

Típicamente, el compuesto de acuerdo con la invención incluye, pero sin limitación, una molécula orgánica pequeña, un anticuerpo, un intra-anticuerpo, un nanocuerpo y un polipéptido.

50 En una realización, el compuesto de acuerdo con la invención puede ser un compuesto de bajo peso molecular, p. ej. una molécula orgánica pequeña (natural o no).

El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula (natural o no) de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente utilizadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.). El tamaño de las moléculas orgánicas pequeñas concretas varía hasta aproximadamente 10000 Da, más concretamente hasta 5000 Da, más concretamente hasta 2000 Da y más concretamente hasta aproximadamente 1000 Da.

En una realización, el compuesto según la invención es un anticuerpo, un intra-anticuerpo o un nanocuerpo. Los anticuerpos, intra-anticuerpos o nanocuerpos dirigidos contra las proteínas DNMT3A o ISGF3 $\gamma$  se pueden generar de acuerdo con métodos conocidos mediante la administración del antígeno o epítipo apropiado a un animal anfitrión seleccionado, p. ej., entre cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Se pueden utilizar diversos coadyuvantes conocidos en la técnica para mejorar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra las proteínas DNMT3A o ISGF3 $\gamma$  se pueden preparar y aislar utilizando cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas de producción y aislamiento incluyen, entre otras, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica del hibridoma de células B humanas (Cote et al., 1983); y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al. 1985). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.946.778) se puede adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla de proteínas anti-DNMT3A o anti-ISGF3 $\gamma$ . Los compuestos útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos de anticuerpos anti-DNMT3A o anti-ISGF3 $\gamma$  que incluyen, pero no se limitan a fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que se pueden generar por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir la identificación rápida de fragmentos que tienen la especificidad deseada para las proteínas DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ .

Los anticuerpos anti-DNMT3A o anti-ISGF3 $\gamma$  humanizados y sus fragmentos de anticuerpos también se pueden preparar de acuerdo con técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (p. ej., roedores) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Los métodos para fabricar anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, por Winter (Patente de Estados Unidos Núm. 5.225.539) y Boss (Celltech, Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.397).

A continuación, para esta invención, se seleccionan anticuerpos neutralizadores de DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ .

En una realización, el compuesto según la invención es un anticuerpo anti-DNMT3A.

En una realización concreta, el anticuerpo según la invención puede ser el anticuerpo ab23565 adquirido de Abcam o el anticuerpo H-295 adquirido a Santa Cruz.

En otra realización, el compuesto según la invención es un anticuerpo anti-ISGF3 $\gamma$ .

En una realización, el compuesto según la invención es un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos se pueden aislar mediante Evolución Sistemática de Ligandos mediante Enriquecimiento EXponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como describen Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas han sido revisadas por Jayasena SD, 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo constreñida conformacionalmente mostrada por una proteína de la plataforma, tal como Tiorredoxina A de E. coli que son seleccionados de bibliotecas combinatorias por dos métodos híbridos (Colas et al., 1996).

A continuación, para esta invención, se seleccionan aptámeros neutralizantes de DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ .

En una realización, el compuesto según la invención es un péptido, un polipéptido o una proteína.

En una realización concreta, el péptido, el polipéptido o la proteína pueden ser un equivalente funcional de DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ . Como se emplea en la presente memoria, un "equivalente funcional" de DNMT3A o ISGF3 $\gamma$  es un compuesto que es capaz de unirse a DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ . El término "equivalente funcional" o "variantes conservadoras de la función" incluye fragmentos, mutantes y muteínas de DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ . El término "funcionalmente equivalente" incluye, por lo tanto, cualquier equivalente de DNMT3A o ISGF3 $\gamma$  obtenido al alterar la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, mediante una o más deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar, por ejemplo, mediante mutación puntual del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos.

Los equivalentes funcionales incluyen formas solubles de DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ . Una forma soluble adecuada de estas proteínas, o equivalentes funcionales de las mismas, podría comprender, por ejemplo, una forma truncada de la proteína de la que se ha eliminado el dominio transmembrana por métodos químicos, proteolíticos o recombinantes.

Particularmente, el equivalente funcional es al menos 80% homólogo a la proteína correspondiente. En una realización concreta, el equivalente funcional es al menos 90% homólogo según lo evaluado por cualquier algoritmo de análisis convencional tal como, por ejemplo, el soporte lógico de análisis de secuencia Pileup (Manual de Programa para el Paquete Wisconsin, 1996).

El término "un fragmento funcionalmente equivalente" como se emplea en la presente memoria también puede significar cualquier fragmento o conjunto de fragmentos de DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ .

Los fragmentos funcionalmente equivalentes pueden pertenecer a la misma familia de proteínas que el DNMT3A o ISGF3 $\gamma$  identificado en la presente memoria. Por "familia de proteínas" se entiende un grupo de proteínas que comparten una función común y exhiben una homología de secuencia común. Las proteínas homólogas se pueden obtener de especies no humanas. En particular, la homología entre secuencias de proteínas funcionalmente equivalentes es al menos del 25% a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos de la proteína completa. Más concretamente, la homología es al menos 50%, incluso más concretamente 75% a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos de la proteína o fragmento de proteína. Más concretamente, la homología es mayor de 80% a lo largo de toda la secuencia. Más concretamente, la homología es mayor de 90% a lo largo de toda la secuencia. Más concretamente, la homología es mayor de 95% a lo largo de toda la secuencia.

Los polipéptidos de la invención se pueden producir por cualquier medio adecuado, como será evidente para los expertos en la técnica. Para producir cantidades suficientes de péptido, polipéptido o proteína de acuerdo con la invención o equivalentes funcionales de los mismos para su uso de acuerdo con la presente invención, la expresión se puede lograr convenientemente cultivando en condiciones apropiadas células anfitrionas recombinantes que contienen el polipéptido de la invención. Particularmente, el polipéptido se produce por medios recombinantes, mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico codificante. Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células anfitrionas diferentes son bien conocidos.

Cuando se expresa en forma recombinante, el polipéptido se puede generar mediante expresión a partir de un ácido nucleico codificante en una célula anfitriona. Se puede utilizar cualquier célula anfitriona, dependiendo de los requisitos individuales de un sistema concreto. Las células anfitrionas adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células vegetales, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría hámster y muchas otras. Las bacterias también son anfitriones para la producción de proteínas recombinantes, debido a la facilidad con la que las bacterias pueden ser manipuladas y cultivadas. Un anfitrión bacteriano común es *E. coli*.

En realizaciones específicas, se contempla que los polipéptidos utilizados en los métodos terapéuticos de la presente invención se puedan modificar para mejorar su eficacia terapéutica. Tal modificación de compuestos terapéuticos se puede utilizar para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo circulante o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes se puede disminuir significativamente mediante la combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución. Por ejemplo, la adición de dipéptidos puede mejorar la penetración de un agente circulante en el ojo a través de la barrera retiniana sanguínea mediante el uso de transportadores endógenos.

Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Se ha demostrado que varios polímeros solubles en agua modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas; y modifican la tasa de aclaramiento del organismo. Para lograr un efecto de liberación dirigida o sostenida, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen radicales de fármaco como grupos terminales, como parte de la cadena principal o como grupos colgantes en la cadena de polímero.

El polietilenglicol (PEG) se ha utilizado ampliamente como portador de medicamentos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. Se ha demostrado que el anclaje a diversos medicamentos, proteínas y liposomas mejora el tiempo de residencia y disminuye la toxicidad. El PEG se puede acoplar a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y mediante otros métodos químicos; sin embargo, el

propio PEG está limitado como máximo a dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, los copolímeros de PEG y aminoácidos se exploraron como nuevos biomateriales que retendrían las propiedades de biocompatibilidad del PEG, pero que tendrían la ventaja adicional de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando una mayor carga de fármaco), y que podría ser diseñado sintéticamente para adaptarse a una variedad de aplicaciones.

Los expertos en la técnica conocen las técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de fármacos. Por ejemplo, VectraMed (Plainsboro, N.J.) ha utilizado polímeros de suministro de fármacos que consisten en polímeros alternos de PEG y monómeros trifuncionales tales como lisina. Las cadenas de PEG (típicamente 2000 daltons o menos) están conectadas a los grupos α y ε-amino de la lisina a través de conexiones uretano estables. Tales copolímeros retienen las propiedades deseables del PEG, al tiempo que proporcionan grupos colgantes reactivos (los grupos de ácido carboxílico de lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena del polímero. Los grupos colgantes reactivos se pueden utilizar para derivatización, entrecruzamiento o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles para producir profármacos estables de larga circulación variando el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG y el enlace escindible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta a la separación del complejo fármaco/grupo conector y la cantidad de fármaco por peso molecular del producto conjugado (los segmentos de PEG más pequeños proporcionan una mayor carga de fármaco). En general, el aumento del peso molecular global del producto conjugado del copolímero en bloque aumentará la vida media circulante del producto conjugado. Sin embargo, el producto conjugado debe ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo del límite umbral de filtración glomerular (p. ej., menos de 60 kDa).

Además, dado que la cadena principal del polímero es importante para mantener la vida media circulante y la biodistribución, se pueden utilizar conectores para mantener el agente terapéutico en forma de profármaco hasta que se libera del polímero principal a través de un detonante específico, típicamente actividad enzimática en el tejido elegido como diana. Por ejemplo, este tipo de suministro de fármaco activado en el tejido es concretamente útil cuando se requiere el suministro a un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libera en o cerca del sitio de la patología. Los expertos en la técnica conocen las bibliotecas de grupos conectores para su uso en la administración activa de fármacos y se pueden basar en la cinética enzimática, la prevalencia de la enzima activa y la especificidad de escisión de las enzimas específicas de la enfermedad seleccionadas. Tales conectores se pueden utilizar para modificar la proteína o fragmento de la proteína descrita en la presente memoria para la administración terapéutica.

En una realización, el péptido de la invención es el péptido P1 (SEQ ID NO: 1).

Por lo tanto, la invención también se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos: RMPRLTFQAGDPYYI (SEQ ID NO: 1) o una variante conservadora de la función del mismo.

Por lo tanto, el péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una variante conservadora de la función se pueden utilizar para tratar o prevenir el cáncer.

Así, según una realización concreta, la invención se refiere a i) un compuesto que es el péptido P1 (SEQ ID NO: 1) o una variante conservadora de la función del mismo, y ii) la temozolomida, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento y la prevención del cáncer.

Así, según una realización concreta, la invención se refiere a i) un compuesto que es el péptido P1 (SEQ ID NO: 1) o una variante conservadora de la función del mismo, y ii) la temozolomida, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento y la prevención del glioblastoma.

Así, según una realización concreta, la invención se refiere a i) un compuesto que es el péptido P1 (SEQ ID NO: 1), y ii) la temozolomida y iii) una radioterapia, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento y la prevención del cáncer.

Así, según una realización concreta, la invención se refiere a i) un compuesto que es el péptido P1 (SEQ ID NO: 1), y ii) la temozolomida y iii) una radioterapia, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento y la prevención del glioblastoma.

En una realización, el compuesto es un fragmento funcionalmente equivalente del péptido P1.

En una realización, el péptido P1 de SEQ ID NO: 1 se utiliza para sensibilizar las células cancerosas a un agente quimioterapéutico y concretamente a la temozolomida.

P1: SEQ ID NO: 1: RMPRLTFQAGDPYYI

P1mut: SEQ ID NO: 2: RMPRLTUNQAGUNPYII

En una realización concreta, la invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o una variante conservadora de su función.

La invención también abarca péptidos que son variantes conservadoras de la función del péptido que comprende SEQ ID NO: 1 como se ha descrito en la presente memoria anteriormente.

5 En una realización, el péptido de acuerdo con la invención puede diferir de 1, 2 o 3 aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En otra realización, el péptido según la invención puede diferir de 4 aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En una realización, el péptido de la invención comprende al menos 75% de identidad sobre dicho SEQ ID NO: 1, incluso más preferiblemente al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97 % y todavía puede disminuir la proliferación de células tumorales o aún puede inducir PCD en las células tumorales.

10 En una realización, el péptido de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1 o una variante del mismo que comprende al menos 75%, preferiblemente al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad con SEQ ID NO: 1 y aún puede interrumpir la interacción DNMT3A/ISGF3y.

15 Para verificar si los péptidos recién generados inducen una interrupción de la interacción DNMT3A/ISGF3y, se puede realizar una prueba como se describió anteriormente.

En una realización de la invención, dicho péptido es una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como se ha definido en la presente memoria anteriormente.

20 En otra realización de la invención, dicho péptido soluble es una secuencia de aminoácidos de menos de 45 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como se ha definido en la presente memoria anteriormente.

En otra realización de la invención, dicho péptido soluble es una secuencia de aminoácidos de menos de 40 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como se ha definido en la presente memoria anteriormente.

25 En otra realización de la invención, dicho péptido soluble es una secuencia de aminoácidos de menos de 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como se ha definido en la presente memoria anteriormente.

30 En otra realización de la invención, dicho péptido soluble es una secuencia de aminoácidos de menos de 20 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como se ha definido en la presente memoria anteriormente.

En otra realización de la invención, dicho péptido soluble es una secuencia de aminoácidos de menos de 15 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 como se ha definido en la presente memoria anteriormente.

35 En algunas realizaciones, el péptido, el polipéptido o la proteína de la invención y concretamente el péptido P1 se conecta con al menos un péptido de penetración celular (CPP).

Los términos "péptido de penetración celular" o "CPP" se usan indistintamente y se refieren a péptidos catiónicos de penetración de células, también llamados péptidos de transporte, péptidos portadores o dominios de transducción de péptidos. El CPP, como se muestra en la presente memoria, tiene la capacidad de inducir la penetración en la célula de un péptido fusionado con el CPP dentro de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de las células de una población de cultivo celular dada, incluidos todos los enteros intermedios, y permitir la translocación macromolecular dentro de múltiples tejidos in vivo tras la administración sistémica. Un péptido que penetra en las células también se puede referir a un péptido que, cuando se pone en contacto con una célula en condiciones apropiadas, pasa del entorno externo al entorno intracelular, incluido el citoplasma, orgánulos tales como las mitocondrias o el núcleo de la célula, en condiciones significativamente mayores que la difusión pasiva. Tales péptidos penetrantes pueden ser los descritos por Fonseca S.B. et al., en *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61:953-964, Johansson et al., en *Methods in Molecular Biology*, 2011, vol. 683, Capítulo 17, Bechara y Sagan, (2013) en *FEBS letters* 587, 1693-1702.; Jones y Sayers (2012), en *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 161, 582-591; Khafagy el y Morishita, (2012) en *Advanced drug delivery reviews* 64, 531-539; Malhi y Murthy, (2012) *Expert opinion on drug delivery* 9, 909-935, en el documento WO2004/011595 y en el documento WO2003/011898.

50 En una realización concreta, el péptido de penetración celular comprende o consiste en: péptido Tat, péptido con poliargininas, péptido HA2-R9, péptido Penetratina, péptido Transportán, péptido Vectocell®, péptido maurocalcina, péptido decalisina, péptido PTD4 derivado de VIH-Tat, péptido con Motivo de Translocación del virus de la Hepatitis B (PTM), péptido mPrP1-28, POD, pVEC, EB1, Rath, CADY, Histatina 5, péptido Antp, péptido Cyt86-101, péptido DPT.

En otra realización concreta, el péptido, el polipéptido o la proteína de la invención están unidos a dos, tres o más péptidos de penetración.

En otro ejemplo, el compuesto de acuerdo con la invención es un inhibidor de la expresión del gen DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ .

5 Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de DNMT3A o ISGF3 $\gamma$  para su uso en la presente invención.

10 La expresión del gen DNMT3A o ISGF3 $\gamma$  se puede reducir poniendo en contacto un sujeto o célula con un ARN de doble hebra pequeño (ARNdh), o un vector o construcción que provoca la producción de un ARN de doble hebra pequeño, de modo que se inhibe específicamente la expresión del gen DNMT3A o ISGF3 $\gamma$  (es decir, interferencia de ARN o ARNi). Los métodos para seleccionar un ARNdh o un vector que codifica un ARNdh apropiados son bien conocidos en la técnica para genes cuya secuencia es conocida (p. ej., véase Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, SM et al. (2001); Hannon, G.J. (2002); McManus, MT. Et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.573.099 y 6.506.559; y las Publicaciones Internacionales de Patentes Núm. WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836).

15 En un ejemplo, se puede utilizar miARN como inhibidores de la expresión del gen DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ . Por ejemplo, se pueden utilizar miARNA-29a y b, miARN-143, miARN-101 y miARN 369 para inhibir la expresión del gen DNMT3A y se puede utilizar miARN-106 para inhibir la expresión del gen ISGF3G.

20 Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión del gen DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ . Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción de la ribozima implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima con diseño de horquilla o cabeza de martillo que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de las secuencias de ARNm de DNMT3A o ISGF3 $\gamma$  son útiles dentro del alcance de la presente descripción. Los sitios específicos de escisión de ribozima dentro de cualquier diana potencial de ARN se identifican inicialmente escaneando la molécula diana en busca de sitios de escisión de ribozima, que típicamente incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las secuencias cortas de ARN de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar para determinar las características estructurales pronosticadas, tales como la estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia de oligonucleótidos sea inadecuada. La idoneidad de las dianas candidatas también se puede evaluar probando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, utilizando, p. ej., ensayos de protección de ribonucleasa.

30 Los oligonucleótidos antisentido y las ribozimas útiles como inhibidores de la expresión del gen DNMT3A o ISGF3 $\gamma$  se pueden preparar por métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para síntesis química tales como, p. ej., mediante síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN antisentido se pueden generar mediante la transcripción in vitro o in vivo de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar a una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Se pueden introducir diversas modificaciones en los oligonucleótidos de la invención como un medio de aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las posibles modificaciones incluyen, entre otras, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de conexiones fosfodiéstera dentro de la cadena principal del oligonucleótido.

40 Los oligonucleótidos antisentido ARNip y ribozimas de la invención se pueden administrar in vivo solos o asociados con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido antisentido o ácido nucleico de ribozima a las células y concretamente a las células que expresan DNMT3A o ISGF3 $\gamma$ . Particularmente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con reducción de la degradación con respecto al grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación del oligonucleótido antisentido o secuencias de ácido nucleico de ribozima. Los vectores virales son un tipo particular de vector e incluyen, entre otros, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus del sarcoma murino de Harvey, el virus del tumor mamario murino y el virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociados; Virus de tipo SV40; virus del polio; Virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes virus vaccinia; virus de la polio; y virus de ARN tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

55 Los vectores virales particulares se basan en virus eucarióticos no citopáticos en los que los genes no esenciales han sido reemplazados por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (p. ej., lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa de ARN viral genómico a ADN con la posterior integración proviral en el ADN celular del anfitrión. Los retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes para la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas

deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovirales genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de genes de alta eficacia in vivo. Los protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes para la replicación (incluidas las etapas de incorporación de material genético exógeno a un plásmido, transfección de una célula de empaquetamiento recubierta con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, recolección de partículas virales de medios de cultivo de tejidos, e infección de las células diana con partículas virales) son proporcionados por Kriegler, 1990 y Murry, 1991).

Los virus concretos para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adenoasociados, que son virus de ADN de doble hebra que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. El virus adenoasociado puede ser diseñado para que sea deficiente para la replicación y sea capaz de infectar una amplia gama de tipos y especies celulares. Tiene además ventajas tales como estabilidad frente al calor y a los solventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluidas las células hemopoyéticas; y la falta de inhibición de la sobreinfección, lo que permite múltiples series de transducciones. Según se informa, el virus adenoasociado se puede integrar en el ADN celular humano de una manera específica del sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis insercional y la variabilidad de la expresión génica insertada característica de la infección retroviral. Además, las infecciones por virus adenoasociados de tipo salvaje se han seguido en cultivo de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un evento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de forma extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase p. ej. Sambrook et al., 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han utilizado como vacunas de ADN para suministrar genes que codifican el antígeno a las células in vivo. Son concretamente ventajosos para esto debido a que no tienen los mismos problemas de seguridad que con muchos de los vectores virales. Sin embargo, estos plásmidos, que tienen un promotor compatible con la célula anfitriona, pueden expresar un péptido de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos de uso común incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, los plásmidos se pueden diseñar a medida utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligación para eliminar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos se pueden suministrar por una variedad de rutas parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, el plásmido de ADN se puede inyectar por vía intramuscular, ocular, intradérmica, subcutánea u otras vías. También se puede administrar mediante aerosoles o gotas intranasales, supositorios rectales y por vía oral. También se puede administrar a la epidermis o a la superficie de la mucosa utilizando una pistola de genes. Los plásmidos se pueden administrar en una solución acuosa, secar sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN que incluye, entre otros, liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

En un ejemplo concreto, la secuencia de ácido nucleico antisentido de oligonucleótidos, ARNip, ARNdh o ribozima está bajo el control de una región reguladora heteróloga, p. ej., un promotor heterólogo. El promotor puede ser específico para células gliales de Muller, células de microglía, células endoteliales, células pericíticas y astrocitos. Por ejemplo, se puede obtener una expresión específica en células gliales de Muller a través del promotor del gen de la glutamina sintetasa. El promotor también puede ser, p. ej., un promotor viral, tal como el promotor de CMV o cualquier promotor sintético.

Otro objeto de la invención se refiere a un método para tratar y prevenir el cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que es un antagonista de DNMT3A/ISGF3γ.

En una realización, la invención se refiere a un método para tratar y prevenir el glioblastoma que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que es un antagonista de DNMT3A/ISGF3γ.

### **Composición terapéutica**

Otro objeto de la invención se refiere a una composición terapéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento y la prevención del cáncer.

En una realización, la invención se refiere a una composición terapéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento y la prevención de glioblastoma

Cualquier agente terapéutico de la invención se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administra a un mamífero, especialmente a un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables se refieren a una carga, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar sólidos, semisólidos o líquidos no tóxicos de cualquier tipo.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen dependen naturalmente de la afección que se vaya a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formular para una administración tópica, oral, intranasal, parenteral, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea y similares.

5 Particularmente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación susceptible de ser inyectada. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que después de la adición, dependiendo de caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

10 Las dosis utilizadas para la administración se pueden adaptar en función de diversos parámetros, y en particular en función del modo de administración utilizado, de la patología relevante o, alternativamente, de la duración deseada del tratamiento.

Además, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej. comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación prolongada; y, actualmente, se puede utilizar cualquier otra forma.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender un agente activo terapéutico adicional. La presente descripción también se refiere a un kit que comprende un compuesto de acuerdo con la invención y un agente activo terapéutico adicional.

En una realización, dicho agente terapéutico activo puede ser un agente anticanceroso.

20 La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, no se debe interpretar de ninguna manera que estos ejemplos y figuras limitan el alcance de la presente invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas.

#### Figuras:

**Figura 1.** Un alto nivel de interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  es un mal factor de pronóstico.

25 Las curvas de Kaplan-Meier ilustran la diferencia de supervivencia global (SG) entre pacientes con niveles altos (H) y bajos (L) de interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , el valor p se obtiene al realizar una prueba de Regresión de Supervivencia de Riesgos Proporcionales de Cox.

**Figura 2.** Interrupción específica de la interacción DNMT3a/ISGF3 $\gamma$ .

30 A y B. Impacto de los péptidos que imitan las regiones de unión de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  en la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ . Las imágenes y los gráficos son representativos de tres experimentos de interacción y precipitación ("pull-down") independientes. I: entrada. Los valores de p se obtuvieron realizando una prueba t.

**Figura 3.** Efecto de un tratamiento que asocia el péptido P1 con TMZ en un modelo de ratones atímicos Swiss de tumores establecidos.

35 A. Diseño del experimento. El establecimiento del tumor indica que se inyectaron 2.106 PCTC-GBM para formar un tumor cuyo volumen era igual a 100 mm<sup>3</sup>  $\pm$  33,3. A continuación, los ratones fueron tratados con el tratamiento indicado. D: día, w: semana, it: intratumoral, ip: intraperitoneal.

B. El gráfico ilustra el impacto de los 4 tratamientos considerados en el peso tumoral de los tumores establecidos. Los círculos abiertos representan ratones. Los círculos de color negro representan el promedio  $\pm$  desviación típica obtenidos para cada tratamiento, los valores p se obtuvieron realizando una prueba t.

#### Ejemplo:

#### 40 Material y métodos

##### Características del paciente

45 La supervivencia global se midió desde la fecha de la resección quirúrgica hasta la muerte. En cada grado tumoral, todos los pacientes incluidos en este estudio tuvieron un manejo similar y un tratamiento similar (incluida la temozolomida (TMZ) para GBM). El material del paciente, así como los registros (diagnóstico, edad, sexo, fecha de fallecimiento, puntuación de rendimiento de Karnofsky (KPS)) se utilizaron con confidencialidad de acuerdo con las leyes francesas y las recomendaciones del Comité Nacional de Ética francés.

##### Células tumorales primarias cultivadas (PCTC).

Se recogieron y procesaron tejidos de nueva aportación de tumor cerebral obtenidos del servicio de neurocirugía del Hospital Laennec (Nantes/Saint-Herblain, Francia) en el plazo de los 30 minutos posteriores a la resección. El

protocolo clínico fue aprobado por las leyes éticas francesas con el consentimiento informado obtenido de todos los sujetos. Las células tumorales primarias cultivadas se obtuvieron después de la disociación mecánica de acuerdo con la técnica descrita anteriormente. Brevemente, el tejido tumoral se cortó en trozos de 1-5 mm<sup>3</sup> y se cultivó en placas de cultivo de tejidos de 60 mm<sup>2</sup> con DMEM con FBS al 10% y antibióticos. Además, y en paralelo, se incubaron trozos de tumor desmenuzados con 200 U/ml de colagenasa I (Sigma, Francia) y 500 U/ml de DNasa I (Sigma, Francia) en PBS durante 1 hora a 37°C con agitación vigorosa constante. La suspensión de células individuales se filtró a través de un filtro de células de 70 mm (BD Falcon, Francia), se lavó con PBS y se suspendió en DMEM-FBS al 10%. Los cultivos celulares se dividieron posteriormente 1:2 cuando llegaron a la confluencia y los experimentos se realizaron antes del pase 3-5.

#### 10 **Ensayo de ligación de proximidad in situ (P-LISA).**

Las células se cultivaron durante 24 h sobre cubreobjetos. Las células se fijaron a continuación con paraformaldehído al 4% en PBS de pH 7,4 durante 15 minutos a temperatura ambiente. La permeabilización se realiza con PBS que contiene Triton X-100 al 0,5% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las etapas de bloqueo, tinción, hibridación, ligación, amplificación y detección se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Olink Bioscience, Suecia). Todas las incubaciones se realizaron en una cámara de humedad. Las etapas de amplificación y detección se realizaron en un cuarto oscuro. La fluorescencia se visualizó utilizando el sistema de microscopía Axiovert 200M (Zeiss, Le Pecq, Francia) con el módulo ApoTome (X63 y apertura numérica 1.4). Las preparaciones se montaron utilizando el reactivo ProLong Gold Antifade con DAPI (Life Technologies, Francia). La adquisición de imágenes se realizó en microscopía de iluminación estructurada. Después de la desconvolución (soporte lógico Huygens Essential 3.5 (SVI)), se obtuvo una vista 3D utilizando el programa Amira.4.1.1. Finalmente, las imágenes se analizaron utilizando el programa gratuito "BlobFinder" disponible para descargar desde [www.cb.uu.se/~amin/BlobFinder](http://www.cb.uu.se/~amin/BlobFinder). Por lo tanto, los autores de la presente invención obtuvieron cualquier número de señales por núcleo ya que los núcleos pueden identificarse automáticamente.

#### **Mapeo de epítomos.**

Los péptidos se aplicaron en una membrana Amino-PEG500-UC540 utilizando un sintetizador de péptidos MultiPep (Intavis AG, Colonia, Alemania) a una capacidad de carga de 400 nmoles/cm<sup>2</sup>. Después de la síntesis, la membrana se secó y a continuación las cadenas laterales tapadas se desprotegeron por escisión durante 1 hora con un cóctel que contenía ácido trifluoroacético al 95%, triisopropilo al 3%, H<sub>2</sub>O al 2%. El ácido trifluoroacético se retiró y la membrana se enjuagó con diclorometano, seguido de dimetilformaldehído y a continuación etanol. La membrana se saturó antes de la incubación con la proteína recombinante considerada durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lo cual, se lavó tres veces, se revelaron péptidos positivos utilizando anticuerpos acoplados a un fluorocromo. Se utilizó Typhoon (GE Healthcare, Francia) para determinar la fluorescencia. Las intensidades de unión de la proteína recombinante considerada para los péptidos aplicados se determinaron mediante cuantificación utilizando el soporte lógico ImageJ y se convirtieron en unidades normalizadas específicas de secuencia. Las intensidades obtenidas para cada péptido que cubre un aminoácido dado se añadieron y dividieron por el número de péptidos.

#### **Ensayo de interacción y precipitación.**

Los ensayos de interacción y precipitación se realizaron utilizando GST/His Tagged-Protein Interaction Pull-Down Kits (Thermo Scientific, Francia). Brevemente, se inmovilizaron 100 µg de proteína cebo en la columna mediante una incubación a 4°C durante 1 hora con mezcla suave. Después del lavado, se añadió 1 µg de proteína presa durante 1 hora a 4°C con un suave movimiento de balanceo sobre una plataforma giratoria. Después de los lavados y la elución, se analizó la interacción "cebo-presa" mediante SDS-PAGE y métodos de transferencia Western. Se realizaron experimentos de extracción competitiva preincubando los péptidos considerados durante 1 hora a 37°C.

#### **Análisis de transferencia Western.**

En resumen, las proteínas se fraccionaron por tamaño mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa o membrana de PVDF. La saturación y la transferencia se realizaron utilizando el sistema de detección de proteínas SNAP i.<sup>TM</sup> (Millipore, Francia). La detección de proteínas se realizó utilizando reactivos de quimioluminiscencia ECL<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Francia) y/o SuperSignal west femto Maximum Sensitivity (Thermo Scientific, Francia). La detección de proteínas se realizó con FusionX7 Imager (Fisher Scientific, Francia).

#### **Transferencia de péptidos a las células mediante electroporación.**

Para la electroporación, se añadió la secuencia NLS a los péptidos. Las células se cosecharon durante la fase de crecimiento exponencial mediante tripsinización y se resuspendieron en sus medios originales. Se lavaron en PBS, pH 7,2 (NaCl 0,14 M, KCl 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM) y se resuspendieron a una concentración de 0,6x10<sup>6</sup> células/ml en medio de cultivo original. A continuación, se mezclaron 0,8 ml de la suspensión celular con los péptidos (50 µg/ml), se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se añadieron a una cubeta desechable de electroporación Bio-Rad de 0,4 cm (Bio-Rad, Francia). Se añadió un volumen equivalente de DMSO a una suspensión celular sin péptido para su uso como control (también denominado no tratado). La eficacia de

electroporación para cada línea celular se determinó inicialmente mediante citometría de flujo mediante la absorción del colorante fluorescente, amarillo lucifer (Sigma, Francia). La electroporación se realizó en un Gene-Pulser (Bio-Rad, Francia) con células expuestas a un pulso. Se utilizaron los siguientes parámetros: espacio de cubeta 0,4 cm, voltaje 0,3 kV, constante de tiempo 35 ms y condensador 960  $\mu$ F. Después de la electroporación, se permitió que las células se recuperaran permaneciendo a temperatura ambiente durante 10 minutos, a continuación, se retiraron de la cámara de electroporación, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo original.

#### **Medida de la metilación global del ADN.**

El ADN se extrajo utilizando el QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Francia). A continuación, se estimó la metilación global del ADN cuantificando la presencia de 5-metilcitosina utilizando el kit de Cuantificación de metilación Global de ADN Methylamp (Euromedex-Epigentek, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **Medida de la muerte celular.**

Los porcentajes de muerte celular se evaluaron mediante el uso de una Colorante Azul Tripán al 0,4% y el Contador de Células Automatizado Countess® (Life Technologies, Francia). La muerte celular se indujo utilizando temozolomida (25  $\mu$ M) e irradiación (2 Gy) tal como se describió previamente.

#### **Ensayo de proliferación y tiempo de duplicación.**

El tiempo de duplicación (es decir, el período de tiempo requerido para que una cantidad se duplique) se calculó utilizando el sitio web Doubling Time Online Calculator (Roth V. 2006, <http://www.doubling-time.com/compute.php>) y contando la proliferación de 103 células durante 120 horas. Se determinó el número de células, cada 24 h durante 120 h, utilizando el contador de células automatizado Countess® (Life Technologies, Francia).

#### **Ensayo de migración - Prueba de raspado.**

El ensayo de migración celular se realizó utilizando una técnica de raspado. Las células se colocaron en placas de 6 pocillos al 80-90%, y se trataron con 10  $\mu$ g/ml de mitomicina C (Sigma, Francia) durante 2 horas (para eliminar la influencia de la proliferación celular). A continuación, se rasparon las células. La migración celular se controló por microscopía. Las imágenes adquiridas para cada muestra se analizaron cuantitativamente. Para cada imagen, se midieron las distancias entre un lado de raspado y el otro. Al comparar las imágenes desde el tiempo 0 hasta el último punto de tiempo (24 horas), los autores de la presente invención obtienen la distancia de cada cierre de raspado en función de las distancias que se miden.

#### **Ensayo de invasión.**

Todos los procedimientos se siguieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QCM 24-Well Collagen-Based Cell Invasion Assay, Millipore, Francia). En resumen, se sembraron 200  $\mu$ l de medio sin suero que contenía  $2 \times 10^5$  células en la cámara de invasión y se colocaron en la placa de 24 pocillos que contenía 500  $\mu$ l de medio completo. Después de 72 h de incubación a 37°C, se retiraron los medios de la cámara y las células se tiñeron poniendo la cámara en solución de tinción durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células no invadidas se retiraron cuidadosamente del lado superior de la cámara. La cámara teñida se insertó en un pocillo limpio que contenía 200  $\mu$ l de tampón de extracción durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron 100  $\mu$ l de solución teñida extraída de la cámara a la placa de 96 pocillos y se midió la densidad óptica a 560 nm con un espectrofotómetro.

#### **Ensayo de tumorigenicidad.**

Las células cultivadas se cosecharon mediante tripsinización, se lavaron y se resuspendieron en tampón salino. Las suspensiones celulares se inyectaron s.c. como 2.106 células en 0,05 ml de PBS con igual volumen de matriz matrigel (Becton Dickinson, Francia) en el costado de ratones hembra NMRI-nu atímicos de 7/8 semanas de edad (Janvier, Francia). Después del establecimiento del tumor, los ratones fueron tratados con temozolomida y/o péptidos mediante inyección intratumoral (it). Para obtener el peso del tumor, cada tumor se extirpó quirúrgicamente y se pesó. Todos los procedimientos experimentales con animales se realizaron de acuerdo con las directrices del Cuidado Institucional de Animales y el Comité Nacional de Ética de Francia.

#### **Análisis estadístico.**

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado. La importancia de las diferencias en las medias se calculó mediante la prueba t de Student. Las curvas de supervivencia se trazaron de acuerdo con el método de Kaplan-Meier y se compararon mediante el análisis de regresión de supervivencia de riesgos proporcionales de Cox (como se indica en las figuras correspondientes). La importancia de la correlación entre dos parámetros se calculó mediante la prueba de Pearson.

### **Resultados**

**Un alto nivel de interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  se correlaciona con un bajo nivel de sensibilidad a la muerte celular inducida por temozolomida/irradiación.**

Para determinar si la presencia de interacción entre DNMT3A y una proteína de unión a DNMT3A (D3ABP) podría permitir identificar una subpoblación de pacientes con GBM cuyas células de glioma albergan un fenotipo de resistencia al tratamiento con temozolomida/irradiación, los autores de la presente invención han establecido 31 tumores primarios cultivados células (PCTC) de biopsias derivadas de pacientes. A continuación, estos PCTC se utilizaron para evaluar la supuesta correlación entre el número de ciertas interacciones DNMT3A/D3A-BP y el porcentaje de muerte celular inducida por temozolomida/irradiación (TMZ/IR) (datos no mostrados). En el estudio de los autores de la presente invención, se centraron en la interacción DNMT3A/HDAC1, DNMT3A/AP2 $\alpha$ , DNMT3A/GATA1 y DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  ya que los autores de la presente invención y otros ya han demostrado su existencia [Fuks F et al., 2001 y Hervouet E et al., 2009]. Se utilizó el Ensayo de Ligación por Proximidad In Situ (P-LISA) para controlar la interacción de interés. El porcentaje de muerte celular inducida por TMZ/IR se estimó utilizando el método de azul tripán (datos no mostrados). El número de interacciones de interés DNMT3A/D3A-BP y el porcentaje de muerte celular inducida por TMZ/IR se representaron entre sí (datos no mostrados). El análisis estadístico utilizando la prueba de correlación de Pearson mostró una correlación significativa e inversa solo entre el número de interacciones DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  y el porcentaje de muerte celular inducida por TMZ/IR ( $p = 0,002$ ) (datos no mostrados). Estos resultados sugirieron que DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  podría desempeñar un papel crucial en el mal pronóstico de respuesta de las células de glioma al tratamiento con TMZ/IR.

**Un alto nivel de interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  es un factor de mal pronóstico.**

Los 31 pacientes se dividieron en dos grupos en función de los niveles de interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  encontrados en sus biopsias tumorales. Los tumores de 15 pacientes expresaron altos niveles de interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  (mayor que la mediana de la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , 12.5), mientras que 16 pacientes tuvieron una interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  igual o inferior a 12.5. Las curvas de supervivencia general se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier y se compararon con el Análisis de regresión de supervivencia de riesgos proporcionales de Cox (Figura 1). Se observó una diferencia significativa en la supervivencia global ( $p = 0.0092$ ) entre pacientes cuyos tumores tenían niveles altos de interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  y aquellos cuyos tumores no. Estos datos indican que un alto nivel de interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  es un factor de mal pronóstico.

**Interrupción específica de la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ .**

El doble hecho de que el alto nivel de interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  se asoció con un mal pronóstico de respuesta al tratamiento con temozolomida/irradiación y se asoció con un mal pronóstico de supervivencia general, sugiere que la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  podría utilizarse como una diana terapéutica.

Para desarrollar una estrategia terapéutica con el objetivo de inhibir la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , los autores de la presente invención realizaron un conjunto de experimentos con el objetivo de caracterizar la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ . En este conjunto de experimentos, se realizó un análisis de mapeo de epítomos para identificar la región de aminoácidos de la interacción de DNMT3A con ISGF3 $\gamma$ . Por lo tanto, la secuencia primaria de DNMT3A se descompuso en péptidos de 12 unidades que se solapan con 10 residuos unidos covalentemente a una membrana de nitrocelulosa. Se realizaron dos controles negativos para observar que ni la incubación de la proteína GST (2  $\mu$ g) ni el uso de anticuerpos contra ISGF3 $\gamma$  indujeron la detección de péptidos positivos (datos no mostrados). A continuación, se incubaron 2  $\mu$ g de proteína GST-ISGF3 $\gamma$  con la membrana. Los péptidos positivos para una interacción con GST-ISGF3 $\gamma$  se detectaron a continuación utilizando Thyphoon y anticuerpos dirigidos contra ISGF3 $\gamma$  (datos no mostrados). Después de la cuantificación de fluorescencia, se determinaron las secuencias de aminoácidos de DNMT3A que interactúan con GST-ISGF3 $\gamma$  (datos no mostrados). Por lo tanto, observamos que las secuencias 85-99, 103-129, 178-207, 235-246, 256-273, 331-360, 409-433 y 547-574 de la secuencia de la proteína DNMT3A estaban implicadas en la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ .

Para validar la implicación de estos dominios de aminoácidos en la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , los autores de la presente invención obtuvieron péptidos de estos dominios para probar la capacidad de estos péptidos para inhibir la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  en un ensayo de interacción y precipitación (datos no mostrados). Por lo tanto, los autores de la presente invención observaron que solo P1 (RMPRLTFQAGDPYYI, SEQ ID NO: 1) inhibió la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  (Figura 2A). La eficacia de P1 para inhibir la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  también se vio reforzada por el hecho de que 1) un péptido P1 mutado (P1<sup>mut</sup>, RMPRLT**A**QAG**A**PYYI, SEQ ID NO: 2) no inhibe la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  (Figura 2A) y 2) la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  disminuyó en presencia de una concentración creciente de péptido P1 (Figura 2B).

Los Ensayos de Ligación por Proximidad In Situ (P-LISA) se utilizaron a continuación para controlar las interacciones DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  en las células. Para estos experimentos, los autores de la presente invención utilizaron un PCTC (denominado PCTC Núm. 1). La electroporación se utilizó para transfectar P1 en las células. Los P-LISA se realizaron 12 horas después de la electroporación. Por lo tanto, los autores de la presente invención notaron que los puntos rojos que representaban las interacciones DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  disminuyeron cuando las células fueron tratadas con P1 y no en presencia de P1<sup>mut</sup> (datos no mostrados).

Todos estos resultados indicaron que el péptido P1 indujo la interrupción de las interacciones DNMT3A/ISGF3y.

**Efecto específico del péptido P1.**

P1 fue diseñado para inhibir las interacciones DNMT3A/ISGF3y. Sin embargo, P1 también podría afectar a otra interacción existente entre DNMT3 y una D3A-BP. Para investigar este punto, los autores de la presente invención analizaron el efecto de P1 sobre las interacciones de interés DNMT3A/D3A-BP. Observaron que P1 no tiene ningún efecto sobre la integridad de las interacciones DNMT3A/GATA1, DNMT3A/AP2y y DNMT3A/HDAC1 en PCTC Núm. 1.

Siendo imposible el análisis de todas las interacciones, los autores de la presente invención postularon que si P1 inhibe una gran cantidad de interacciones DNMT3A/D3A-BP, sería observable un fenotipo de hipometilación. Para observar la supuesta hipometilación del ADN inducida por P1, PCTC Núm. 1 se trató durante 30 días con P1 (datos no mostrados). Otros inhibidores de DNMT (5-aza-2-desoxicitidina (5-aza), 3,3-digalato de teaflavina (un inhibidor de DNMT3A, en adelante denominado TFD) o péptidos (péptido UP, un péptido que inhibe las interacciones DNMT1/PCNA/UHRF1)) también se utilizaron como condiciones de control. El seguimiento mediante ELISA del nivel global de 5-metilcitosina reveló que P1 no tuvo efecto sobre el nivel global de 5-metilcitosina, mientras que los tratamientos con 5-aza, TFD y UP disminuyeron el nivel global de metilación del ADN (datos no mostrados).

En base a estos datos, los autores de la presente invención concluyeron que P1 parece ser específico para interrumpir la interacción DNMT3A/ISGF3y y sin promover la hipometilación global del ADN.

**Impacto del péptido P1 sobre los rasgos distintivos/fenotipos del cáncer.**

A continuación, los autores de la presente invención determinaron el impacto de la interrupción inducida por P1 de las interacciones DNMT3A/ISGF3y en varios rasgos distintivos/fenotipos del cáncer, incluido el nivel de proliferación, invasión, migración y evasión de la apoptosis (o más concretamente la sensibilidad de la apoptosis inducida por un tratamiento terapéutico). Para este propósito, las células fueron tratadas con P1 y TDF como se describió previamente.

Para evaluar el impacto de la interrupción inducida por P1 de las interacciones DNMT3A/ISGF3y sobre la sensibilidad de la apoptosis inducida por un tratamiento terapéutico, los autores de la presente invención midieron el porcentaje de muerte celular inducida por temozolomida + irradiación ya que la temozolomida (TMZ) y la irradiación se conjugan en el tratamiento anti-GBM [Cheray M et al., 2013 y Louis D et al., 2007]. Los resultados muestran que el porcentaje de muerte celular de las células tratadas con P1 y TDF aumentó, y el porcentaje de muerte celular de las células tratadas con P1 fue mayor que el obtenido con TDF. Por lo tanto, los autores de la presente invención concluyeron que P1 actúa como un sensibilizador de la muerte celular inducida por temozolomida+irradiación.

Para estimar el impacto de la interrupción inducida por P1 de las interacciones DNMT3A/ISGF3y en la proliferación, los autores de la presente invención calcularon el tiempo de duplicación. Los autores de la presente invención encontraron que los tratamientos con P1 y TFD no tienen ningún efecto sobre el tiempo de duplicación de las células (datos no mostrados).

A continuación se estimó el impacto de la interrupción inducida por P1 de las interacciones DNMT3A/ISGF3y sobre la capacidad de migración realizando un ensayo de prueba de raspado. Los resultados indican que el tratamiento con P1 disminuyó la migración celular mientras que los tratamientos con TFD no tuvieron efecto sobre la migración celular.

El impacto de los tratamientos P1 y TFD en la invasión celular se estimó a continuación realizando un ensayo de invasión celular basado en colágeno. Los resultados indican que P1 no modificó la característica de invasión celular, mientras que el tratamiento con TDF promovió la invasión celular.

Para resumir estos datos, los autores de la presente invención crearon y calcularon la Puntuación de Modulación de los Rasgos Distintivos del Cáncer (SMoCH) al atribuir -1 cuando el péptido/tratamiento mejoró un rasgo distintivo del cáncer, 0 cuando el péptido/tratamiento no modificó un rasgo distintivo del cáncer y +1 cuando el péptido/el tratamiento inhibió un rasgo distintivo del cáncer. Por lo tanto, un SMoCH positivo sugiere que el péptido/tratamiento considerado inhibe más rasgos distintivos del cáncer que los que promueve, por lo que el equilibrio beneficio/riesgo es favorable para utilizar el péptido/tratamiento considerado en la terapia contra el cáncer. Con los resultados que indican que el tratamiento con P1 se encuentra en esta situación, los autores de la presente invención concluyen que el tratamiento con P1 podría ser eficaz en la terapia contra el cáncer.

**Efecto de un tratamiento que asocia el péptido P1 con TMZ en un modelo de ratones atímicos Swiss de tumores establecidos.**

Después del tratamiento convencional anti-GBM con temozolomida como agente quimioterapéutico, los autores de la presente invención investigan el efecto de un tratamiento que asocia el péptido P1 con TMZ en un modelo de ratones atímicos Swiss de tumores establecidos. Para este propósito, a 16 ratones atímicos Swiss se les inyectaron subcutáneamente 2·10<sup>6</sup> células de glioma (que tienen un alto nivel de interacciones DNMT3A/ISGF3y (Figura 3A)). A

continuación, cuando el volumen del tumor era igual a 100 mm<sup>3</sup>, 4 ratones al azar se dejaron sin tratar, se trataron con TMZ, TMZ+P1, TMZ+P1<sup>mut</sup> o P1 (denominados T1 y T5 respectivamente). Después de 3 semanas de tratamiento, los autores de la presente invención observaron que el tratamiento con TMZ fue ineficaz para limitar el crecimiento del tumor ya que no se observó diferencia estadística entre los ratones no tratados y los ratones tratados con TMZ solamente, y entre los ratones no tratados y los ratones tratados con P1 (Figura 3B). Más interesante, los autores de la presente invención observaron que el tratamiento con TMZ + P1 redujo los volúmenes de los tumores, mientras que el tratamiento con TMZ + P1<sup>mut</sup> es ineficaz para reducir el crecimiento tumoral. Por lo tanto, los datos de los autores de la presente invención indicaron que el uso de P1 con TMZ promovió la reducción del crecimiento tumoral inducida por TMZ.

El uso del péptido P1 no promueve la hipometilación global del ADN y la desmetilación de MGMT.

En el glioma, la metilación de MGMT se asocia con una buena respuesta al tratamiento anti-glioma que incluye TMZ e irradiación [Esteller M et al., 2000 y Hegi M et al., 2005]. Por lo tanto, los autores de la presente invención han analizado si el uso de P1 podría modular el nivel de metilación de MGMT. El experimento qMSP indicó que el nivel de metilación de MGMT permanece sin cambios cuando las células fueron tratadas con P1 (datos no mostrados).

## Referencias

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Amato R, Stephenson J, Hotte S, Nemunaitis J, Bélanger K, Reid G, et al. MG98, a second-generation DNMT1 inhibitor, in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer Invest.* 2012; 30: 415-21.

Cheray M, Pacaud R, Nadaradjane A, Vallette F, Cartron PF. Specific inhibition of one DNMT1-including complex influences the tumor initiation and progression. *Clinical Epigenetics.* 2013; 5: 9.

Chik F, Szyf M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. *Carcinogenesis.* 2011; 32: 224-32.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1350-4.

Fuks F, Burgers W, Godin N, Kasai M, Kouzarides T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J.* 2001; 20: 2536-44.

Hegi M, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352: 991-1003.

Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics.* 2009; 4.

Kuck D, Singh N, Lyko F, Medina-Franco J. Novel and selective DNA methyltransferase inhibitors: Docking-based virtual screening and experimental evaluation. *Bioorg Med Chem.* 2010; 18: 822-9.

Kuck D, Caulfield T, Lyko F, Medina-Franco J. Nanaomycin A selectively inhibits DNMT3B and reactivates silenced tumor suppressor genes in human cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9: 3015-23.

Lee B, Yegnasubramanian S, Lin X, Nelson W. Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *J Biol Chem.* 2005; 280: 40749-56.

Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, Burger P, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007; 114: 97-109.

Medina-Franco J, Lopez-Vallejo F, Kuck D, Lyko F. Natural products as DNA methyltransferase inhibitors: a computer-aided discovery approach. *Mol Divers.* 2011; 15: 293-304.

Rajavelu A, Tulyasheva Z, Jaiswal R, Jeltsch A, Kuhnert N. The inhibition of the mammalian DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by dietary black tea and coffee polyphenols. *BMC Biochem.* 2011; 21: 12-6.

Suzuki T, Tanaka R, Hamada S, Nakagawa H, Miyata N. Design, synthesis, inhibitory activity, and binding mode study of novel DNA methyltransferase 1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20: 1124-7.

Venza M, Visalli M, Catalano T, Fortunato C, Oteri R, Teti D, et al. Impact of DNA methyltransferases on the epigenetic regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in malignant melanoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441: 743-50.

Yoo J, Medina-Franco J. Inhibitors of DNA methyltransferases: insights from computational studies. *Curr Med Chem.* 2012; 19: 3475-87.

Yoo J, Kim J, Robertson K, Medina-Franco J. Molecular modeling of inhibitors of human DNA methyltransferase with a crystal structure: discovery of a novel DNMT1 inhibitor. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2012; 87: 219-47.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSERM

5 <120> NUEVO METODO PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER

<130> BIO14318 CARTRON

<160> 3

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 16

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> P1

20 <400> 1

Arg Pro Met Pro Arg Leu Thr Phe Gln Ala Gly Asp Pro Tyr Tyr Ile

1 5 10 15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> P1mut

30 <400> 2

Arg Pro Met Pro Arg Leu Thr Ala Gln Ala Gly Ala Pro Tyr Tyr Ile

1 5 10 15

<210> 3

<211> 912

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <400> 3

Met Pro Ala Met Pro Ser Ser Gly Pro Gly Asp Thr Ser Ser Ser Ala

1 5 10 15

Ala Glu Arg Glu Glu Asp Arg Lys Asp Gly Glu Glu Gln Glu Glu Pro

20 25 30

Arg Gly Lys Glu Glu Arg Gln Glu Pro Ser Thr Thr Ala Arg Lys Val

35 40 45

Gly Arg Pro Gly Arg Lys Arg Lys His Pro Pro Val Glu Ser Gly Asp

50 55 60

ES 2 776 447 T3

Thr Pro Lys Asp Pro Ala Val Ile Ser Lys Ser Pro Ser Met Ala Gln  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Gly Ala Ser Glu Leu Leu Pro Asn Gly Asp Leu Glu Lys Arg  
 85 90 95  
 Ser Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Gly Gln Lys Gly  
 100 105 110  
 Gly Ala Pro Ala Glu Gly Glu Gly Ala Ala Glu Thr Leu Pro Glu Ala  
 115 120 125  
 Ser Arg Ala Val Glu Asn Gly Cys Cys Thr Pro Lys Glu Gly Arg Gly  
 130 135 140  
 Ala Pro Ala Glu Ala Gly Lys Glu Gln Lys Glu Thr Asn Ile Glu Ser  
 145 150 155 160  
 Met Lys Met Glu Gly Ser Arg Gly Arg Leu Arg Gly Gly Leu Gly Trp  
 165 170 175  
 Glu Ser Ser Leu Arg Gln Arg Pro Met Pro Arg Leu Thr Phe Gln Ala  
 180 185 190  
 Gly Asp Pro Tyr Tyr Ile Ser Lys Arg Lys Arg Asp Glu Trp Leu Ala  
 195 200 205  
 Arg Trp Lys Arg Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Val Ile Ala Gly Met  
 210 215 220  
 Asn Ala Val Glu Glu Asn Gln Gly Pro Gly Glu Ser Gln Lys Val Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Ala Ser Pro Pro Ala Val Gln Gln Pro Thr Asp Pro Ala Ser Pro  
 245 250 255  
 Thr Val Ala Thr Thr Pro Glu Pro Val Gly Ser Asp Ala Gly Asp Lys  
 260 265 270  
 Asn Ala Thr Lys Ala Gly Asp Asp Glu Pro Glu Tyr Glu Asp Gly Arg  
 275 280 285  
 Gly Phe Gly Ile Gly Glu Leu Val Trp Gly Lys Leu Arg Gly Phe Ser  
 290 295 300  
 Trp Trp Pro Gly Arg Ile Val Ser Trp Trp Met Thr Gly Arg Ser Arg  
 305 310 315 320

ES 2 776 447 T3

Ala Ala Glu Gly Thr Arg Trp Val Met Trp Phe Gly Asp Gly Lys Phe  
 325 330 335

Ser Val Val Cys Val Glu Lys Leu Met Pro Leu Ser Ser Phe Cys Ser  
 340 345 350

Ala Phe His Gln Ala Thr Tyr Asn Lys Gln Pro Met Tyr Arg Lys Ala  
 355 360 365

Ile Tyr Glu Val Leu Gln Val Ala Ser Ser Arg Ala Gly Lys Leu Phe  
 370 375 380

Pro Val Cys His Asp Ser Asp Glu Ser Asp Thr Ala Lys Ala Val Glu  
 385 390 395 400

Val Gln Asn Lys Pro Met Ile Glu Trp Ala Leu Gly Gly Phe Gln Pro  
 405 410 415

Ser Gly Pro Lys Gly Leu Glu Pro Pro Glu Glu Glu Lys Asn Pro Tyr  
 420 425 430

Lys Glu Val Tyr Thr Asp Met Trp Val Glu Pro Glu Ala Ala Ala Tyr  
 435 440 445

Ala Pro Pro Pro Pro Ala Lys Lys Pro Arg Lys Ser Thr Ala Glu Lys  
 450 455 460

Pro Lys Val Lys Glu Ile Ile Asp Glu Arg Thr Arg Glu Arg Leu Val  
 465 470 475 480

Tyr Glu Val Arg Gln Lys Cys Arg Asn Ile Glu Asp Ile Cys Ile Ser  
 485 490 495

Cys Gly Ser Leu Asn Val Thr Leu Glu His Pro Leu Phe Val Gly Gly  
 500 505 510

Met Cys Gln Asn Cys Lys Asn Cys Phe Leu Glu Cys Ala Tyr Gln Tyr  
 515 520 525

Asp Asp Asp Gly Tyr Gln Ser Tyr Cys Thr Ile Cys Cys Gly Gly Arg  
 530 535 540

Glu Val Leu Met Cys Gly Asn Asn Asn Cys Cys Arg Cys Phe Cys Val  
 545 550 555 560

Glu Cys Val Asp Leu Leu Val Gly Pro Gly Ala Ala Gln Ala Ala Ile  
 565 570 575

ES 2 776 447 T3

Lys Glu Asp Pro Trp Asn Cys Tyr Met Cys Gly His Lys Gly Thr Tyr  
 580 585 590

Gly Leu Leu Arg Arg Arg Glu Asp Trp Pro Ser Arg Leu Gln Met Phe  
 595 600 605

Phe Ala Asn Asn His Asp Gln Glu Phe Asp Pro Pro Lys Val Tyr Pro  
 610 615 620

Pro Val Pro Ala Glu Lys Arg Lys Pro Ile Arg Val Leu Ser Leu Phe  
 625 630 635 640

Asp Gly Ile Ala Thr Gly Leu Leu Val Leu Lys Asp Leu Gly Ile Gln  
 645 650 655

Val Asp Arg Tyr Ile Ala Ser Glu Val Cys Glu Asp Ser Ile Thr Val  
 660 665 670

Gly Met Val Arg His Gln Gly Lys Ile Met Tyr Val Gly Asp Val Arg  
 675 680 685

Ser Val Thr Gln Lys His Ile Gln Glu Trp Gly Pro Phe Asp Leu Val  
 690 695 700

Ile Gly Gly Ser Pro Cys Asn Asp Leu Ser Ile Val Asn Pro Ala Arg  
 705 710 715 720

Lys Gly Leu Tyr Glu Gly Thr Gly Arg Leu Phe Phe Glu Phe Tyr Arg  
 725 730 735

Leu Leu His Asp Ala Arg Pro Lys Glu Gly Asp Asp Arg Pro Phe Phe  
 740 745 750

Trp Leu Phe Glu Asn Val Val Ala Met Gly Val Ser Asp Lys Arg Asp  
 755 760 765

Ile Ser Arg Phe Leu Glu Ser Asn Pro Val Met Ile Asp Ala Lys Glu  
 770 775 780

Val Ser Ala Ala His Arg Ala Arg Tyr Phe Trp Gly Asn Leu Pro Gly  
 785 790 795 800

Met Asn Arg Pro Leu Ala Ser Thr Val Asn Asp Lys Leu Glu Leu Gln  
 805 810 815

Glu Cys Leu Glu His Gly Arg Ile Ala Lys Phe Ser Lys Val Arg Thr



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método in vitro para determinar el pronóstico del tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar un buen pronóstico cuando el nivel de expresión es más bajo que el valor de referencia predeterminado y un mal pronóstico cuando el nivel de expresión es más alto que el valor de referencia predeterminado.
- 10 2. Un método in vitro para predecir el tiempo de supervivencia de un paciente que padece un cáncer y tratado con un tratamiento convencional que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho expresión nivel con un valor de referencia predeterminado y
- 15 iii) proporcionar un buen pronóstico cuando el nivel de expresión es más bajo que el valor de referencia predeterminado y un mal pronóstico cuando el nivel de expresión es más alto que el valor de referencia predeterminado.
- 20 3. Un método in vitro para predecir la respuesta de un paciente que padece un cáncer y tratado con un tratamiento convencional que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión del par DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  en una muestra de dicho paciente, ii) comparar dicho nivel de expresión con un valor de referencia predeterminado y iii) proporcionar una buena respuesta cuando el nivel de expresión es inferior al valor de referencia predeterminado y una mala respuesta cuando el nivel de expresión es superior al valor de referencia predeterminado.
- 25 4. Un método in vitro según las reivindicaciones 1 a 3 en donde el cáncer es un glioblastoma.
5. Un método in vitro según las reivindicaciones 2 a 4 en donde el tratamiento convencional es temozolomida y radiación.
- 30 6. Un compuesto que es un antagonista de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  e inhibe la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  para su uso en el tratamiento y la prevención del cáncer.
7. A i) Un antagonista de DNMT3A/ISGF3 $\gamma$  que inhibe la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , y ii) un agente quimioterapéutico y iii) una radioterapia o un agente radioterapéutico, tal como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento y la prevención del cáncer.
8. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos: RPMPRLTFQAGDPYYI (SEQ ID NO: 1) o una variante del mismo que comprende al menos 75% de identidad con SEQ ID NO: 1 y que puede interrumpir la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , en donde el péptido es una secuencia de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos de largo.
- 35 9. Un péptido según la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento y la prevención del cáncer.
10. A i) Un compuesto de secuencia de SEQ ID NO: 1 o una variante del mismo que comprende al menos el 75% de identidad con SEQ ID NO: 1 y que puede interrumpir la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ , y ii) la temozolomida y iii) una radioterapia, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento y la prevención del glioblastoma.
- 40 11. Una composición terapéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 con excipientes farmacéuticamente aceptables para utilizar en el tratamiento y la prevención del cáncer.
12. Un método de escrutinio de un compuesto candidato para su uso como fármaco para la prevención y el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende las etapas de: i) proporcionar compuestos candidatos y ii) seleccionar compuestos candidatos que bloqueen o susciten antagonismo de la interacción DNMT3A/ISGF3 $\gamma$ .

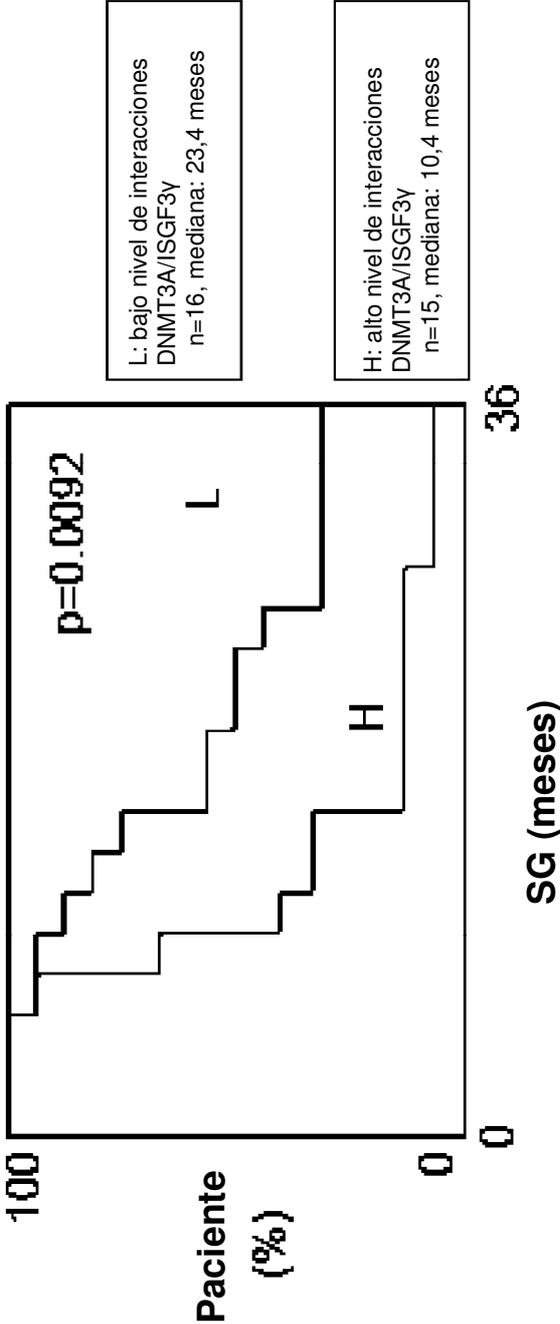


Figura 1

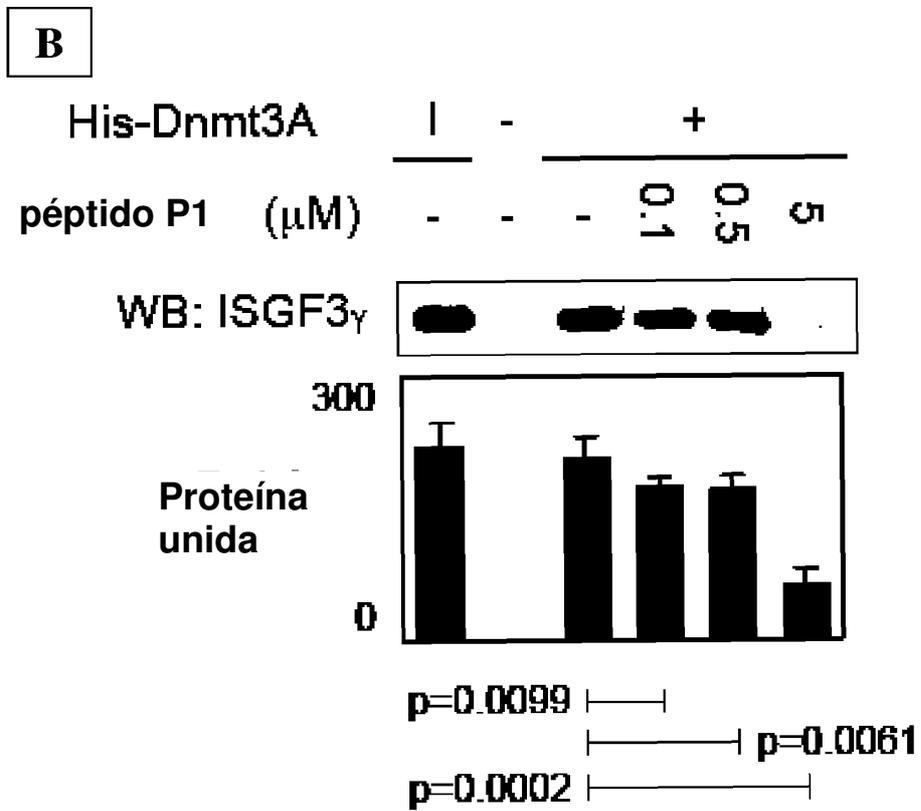
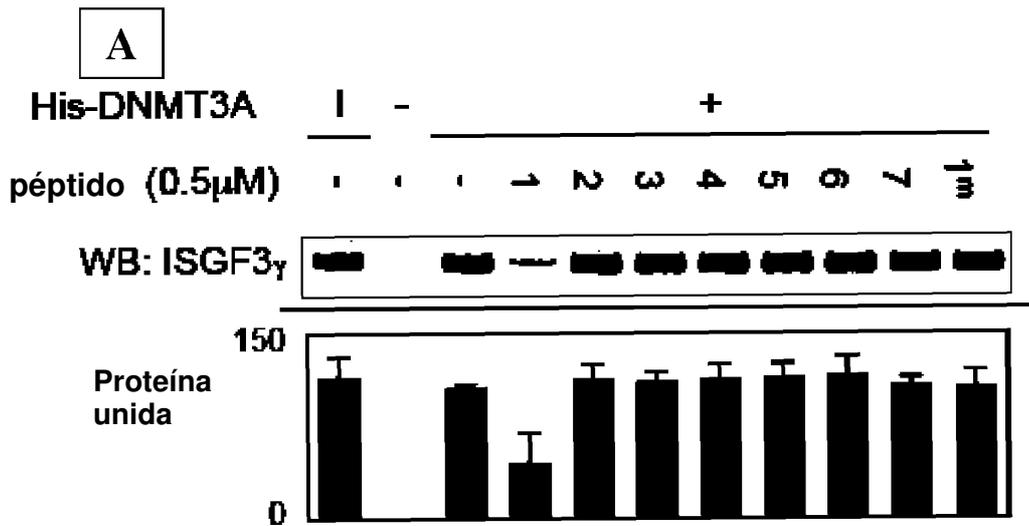


Figura 2A y B

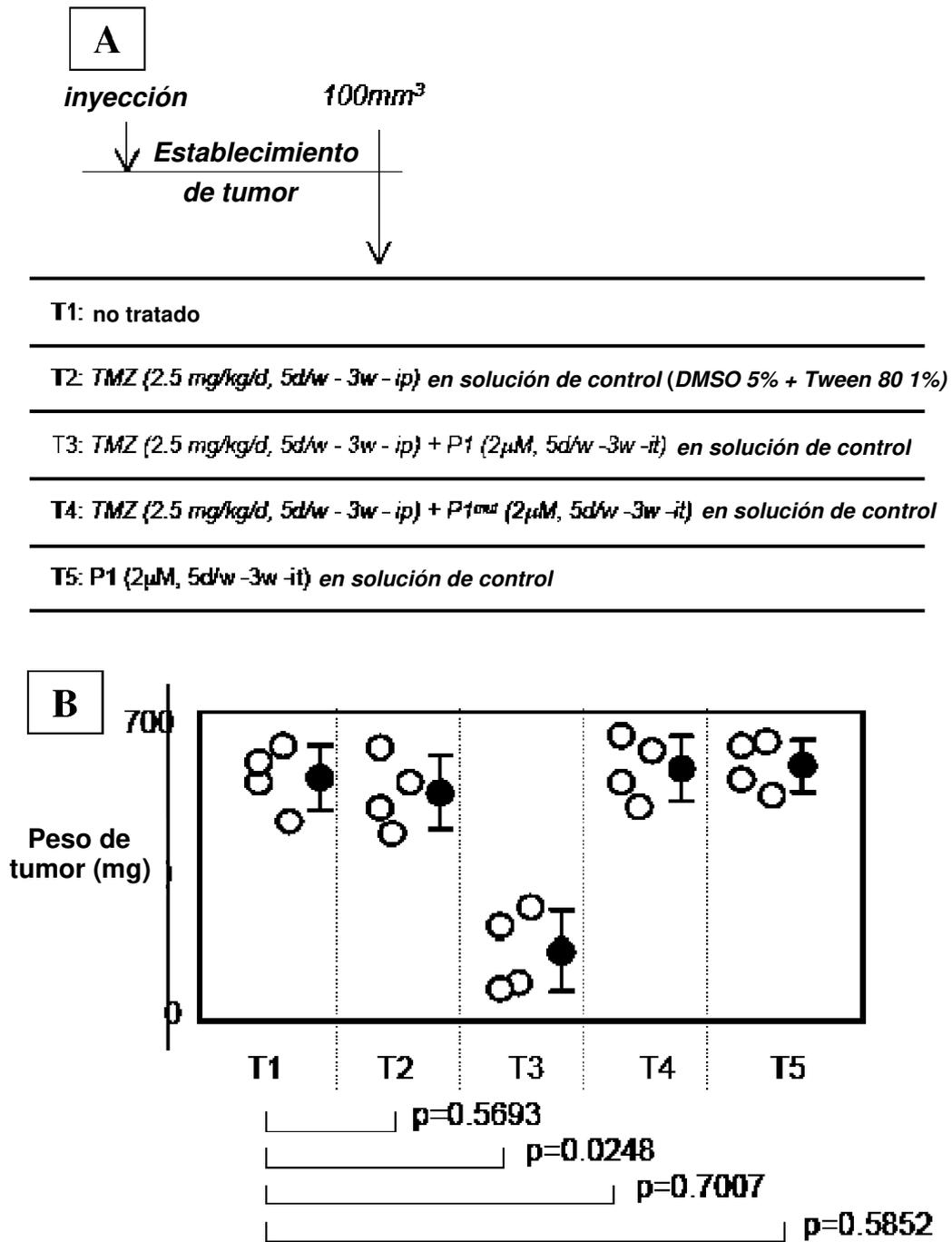


Figura 3A y B