



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 292 348**

② Número de solicitud: 200601549

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **08.06.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2008**

Fecha de la concesión: **10.09.2008**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2008**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.10.2008

⑰ Titular/es:
Universidade de Santiago de Compostela
Edif. CACTUS-CITT, Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑱ Inventor/es: **García García, Abel;**
Otero Rey, Eva;
Somoza Martín, José Manuel;
Carracedo Álvarez, Ángel y
Barros Angueira, Francisco

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Método y kit de diagnóstico precoz y/o pronóstico del carcinoma oral de células escamosas (COCE).**

㉑ Resumen:

Método y kit de diagnóstico precoz y/o pronóstico del carcinoma oral de células escamosas (COCE).

Método de diagnóstico precoz y de pronóstico del carcinoma oral de células escamosas (COCE) mediante la evaluación de la sobreexpresión del gen ATPV1C1 y/o sus productos de transcripción. Además compuestos inhibidores de la sobreexpresión del gen ATPV1C1 pueden ser utilizados en el tratamiento de dicha enfermedad cancerígena. Así como el kit para llevar a cabo el método citado anteriormente.

ES 2 292 348 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método y kit de diagnóstico precoz y/o pronóstico del carcinoma oral de células escamosas (COCE).

5 La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico precoz y/o pronóstico del COCE mediante la evaluación de la sobreexpresión del gen ATP6VIC1, además del uso de dicho gen y/o sus productos de transcripción para el tratamiento de esta enfermedad y el kit para llevar a cabo el método citado anteriormente.

Estado de la técnica anterior

10 El carcinoma oral de células escamosas (COCE), tumor maligno de origen epitelial, es la neoplasia más frecuente de la cavidad oral. Representa entre un 90 y un 95% de todas las lesiones malignas de la boca.

15 Aunque clásicamente se consideraba que el cáncer oral comprendía todas las neoplasias malignas que afecten los labios, la lengua y los tejidos intraorales, incluida la orofaringe, en la última edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), (cf. Moore *et al.*, 2000 *Oral Dis*, vol. 6; pp. 161-3) sugieren que las lesiones asentadas en la porción móvil de la lengua, suelo de boca, mucosa bucal, mucosa del reborde alveolar superior e inferior y paladar, deben ser agrupadas bajo la denominación de cáncer oral, y que el cáncer de labio, orofaringe y de glándulas salivales deben ser analizados por separado.

20 Estudios epidemiológicos recientes (cf. Nieto A. *et al.*, 2002 *J Oral Pathol Med*, vol. 31; pp. 147-52) han demostrado un aumento de la mortalidad anual por cáncer oral, de un 25% para los hombres y de un 9% para las mujeres, durante el período de 1975-1994, lo que hace que el cáncer oral deba ser considerado un problema de salud pública.

25 Desafortunadamente, los rasgos clínico-patológicos de la enfermedad son la única medida disponible para predecir su pronóstico, guiar el tratamiento y aconsejar a los pacientes. El tratamiento convencional, ya sea con cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, está asociado con una elevada morbilidad afectando el habla, la deglución y, en general, la calidad de vida del paciente. Pese a los avances en estas intervenciones, la recurrencia de la enfermedad se observa en más del 50% de los pacientes con altas tasas de mortalidad asociada (cf. Siczka E. *et al.* 2001, *Am J Otolaryngol*, vol. 22; pp. 395-9). Esto viene acompañado del hecho de que mientras la habilidad para controlar localmente la enfermedad ha progresado, la tasa total de supervivencia a los 5 años no ha mejorado significativamente en las pasadas tres décadas.

35 El COCE, como enfermedad neoplásica de etiología multifactorial, es una de las enfermedades más heterogéneas. Pese a los esfuerzos para identificar biomarcadores, ningún marcador específico puede ser usado con confianza en la detección precoz o como indicador de pronosis.

40 Son las limitaciones de las características clínicas en pacientes con cáncer oral las que han llevado a la búsqueda de biomarcadores de pronóstico por parte de diversos grupos de investigación. Inicialmente los esfuerzos se centraron en marcadores individuales, como *p53*, queratinas o *p16*, pero su utilidad es limitada dada su penetrancia incompleta y expresión variable (cf. Gleich LI. *et al.* 2002, *Cancer Control*, vol. 9; pp. 369-78). Es por ello que los esfuerzos recientes se han centrado en el análisis de los cambios de expresión génica global con la esperanza de identificar cambios asociados con la carcinogénesis en estos tumores, y de identificar firmas genéticas específicas que permitan predecir las consecuencias de la enfermedad (cf. Villaret DB. *et al.* 2000, *Laryngoscope*; vol. 110; pp. 374-81).

45 El proyecto Genoma Humano ha sido el catalizador para el desarrollo de tecnologías de alta productividad que han permitido mapear y secuenciar genomas complejos. En los últimos años tales tecnologías se han extendido hasta permitir la medida de la expresión relativa de miles de genes simultáneamente en un único experimento. La plataforma con mayor responsabilidad en esta nueva frontera de la investigación genómica es la de *microarrays* de ADN, también conocida como chip de ADN o chip génico.

Explicación de la invención

55 Existe la necesidad de encontrar un marcador o marcadores específicos para el diagnóstico precoz o pronóstico del COCE.

El primer paso dado por los inventores para un diagnóstico precoz del COCE, la posibilidad de predecir cómo va a evolucionar, y el desarrollo de terapias génicas específicas, es descifrar y comprender su comportamiento desde un punto de vista genético.

60 Por lo tanto, los inventores de la presente invención consideraron importante el estudio o análisis previo con *microarrays* donde se identificaron diversos genes alterados en el COCE, y se seleccionaron algunos como pueden ser ADRBK2, ADRB1, ADRA2B, AXIN 2, ATP6VIC1 y ATP6V0E, para validar su sobreexpresión en dicho tumor mediante la tecnología de la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), y estudiar cómo puede influir su comportamiento en el crecimiento y desarrollo del tumor.

65 Al no encontrar variaciones en la expresión de los genes estudiados dependientes del estadio tumoral, se demuestra que la gran mayoría de las alteraciones genéticas observadas en el COCE aparecen ya en estadios iniciales del tumor,

no observándose grandes cambios durante la evolución posterior del mismo. El hecho de que el grupo de genes implicados en la patogénesis del COCE sea un grupo reducido y, además, no varíe sustancialmente durante su evolución, demuestra que algunos de estos genes podrían ser utilizados como marcadores tumorales en el diagnóstico y estudio de la progresión de estos tumores, así como para su uso como dianas terapéuticas durante el desarrollo de terapias génicas.

Sorprendentemente, de todos los genes estudiados y que están relacionados con esta enfermedad, ninguno de ellos se sobreexpresa de forma continua y en cualquier estadio tumoral, a excepción del gen ATP6V1C1.

Puesto que la V-ATPasa se compone de un dominio V1 citosólico y un dominio V0 transmembrana, son dos las variantes de transcripción alternativas que codifican distintas isoformas que se han encontrado en este gen, ATP6V1C1 y ATP6V0E.

La V-ATPasa es una bomba de protones reguladora del pH celular, de ahí su implicación en la progresión neoplásica. De esta forma, las V-ATPasas están implicadas en la transformación celular, carcinogénesis y metástasis tumoral.

Con estos datos se podría llegar a pensar que el gen ATP6V0E también se sobreexpresa en este tipo de cáncer, pero los autores de la presente invención han encontrado solamente relación entre ATP6V1C1 y el COCE.

El pH celular es crucial para diversas funciones biológicas como la proliferación celular, invasión y metástasis, resistencia a medicamentos y apoptosis. Las condiciones hipóxicas son un fenómeno frecuente durante el desarrollo de tumores sólidos y desencadenan una acidosis intra y extracelular. Esta acidosis celular parece ser un desencadenante de la apoptosis y permite la activación de endonucleasas que inducen la fragmentación del ADN. Para evitar la acidificación intracelular bajo estas condiciones, los reguladores de pH deben estar sobre-regulados en las células tumorales. Esto se cumple también en los pacientes con la sobreexpresión de ATP6V1C1, puesto que la hipoxia también es un fenómeno característico del COCE, como tumor sólido que es.

Además, los autores de la presente invención han encontrado una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión del gen ATP6V1C1 y el consumo de tabaco. Esta relación también se debería cumplir en la otra bomba de protones como es el gen ATP6V0E, pero esta relación no llega a ser estadísticamente significativa.

Por otro lado, es interesante destacar que el aumento de la actividad de la bomba de protones reguladora del pH se logró incrementando la actividad catalítica (relacionada con ATP6V1C1) y no el número de canales intramembrana (relacionada con los otros genes estudiados pertenecientes a los complejos V0 y V1).

El tabaco es un agente tóxico que hace que las condiciones de hipoxia y acidosis intracelular en el tumor se incrementen, resultando de todo ello un aumento de la actividad de la bomba de protones.

Además el hecho de que la correlación entre la expresión de ATP6V1C1 y el tabaco sea significativa, podría indicar que el estrés ambiental producido por el tabaco se acompaña de un mayor desarrollo de los mecanismos de protección celular.

A la luz de lo expuesto, se puede considerar que el gen ATP6V1C1 inicia el proceso de alteración de acidificación del medio extracelular antes descrito e imprescindible para la progresión y diseminación del cáncer y, esto explica su sobreexpresión persistente y mantenida en todas las muestras tumorales y su independencia del estadio tumoral.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención proporciona un método *in vitro* de diagnóstico precoz y pronóstico de COCE que comprende los siguientes pasos:

- a) Obtención de una muestra tumoral biológica aislada y una muestra de tejido homólogo sano del mismo paciente.

Tras la obtención de las muestras tumoral y sana se procede a la congelación de las mismas por inclusión en nitrógeno líquido.

Se puede conservar congelada a una temperatura de unos -80°C por un tiempo considerable, que puede ir desde semanas hasta incluso un año.

Tal y como se describe en los ejemplos de la presente invención se toman dos muestras de un mismo paciente, una de tejido tumoral y otra de mucosa oral normal del lado contralateral. Esto es de suma importancia, ya que se evita el posible problema de diferencias individuales en la expresión genética.

En relación al tipo de tejido a analizar, se pueden realizar dos tipos principales de estudios: los que utilizan el tejido tumoral íntegro, y los que únicamente emplean fragmentos de tumor elegidos por medio de técnicas de captura o microdissección láser. Las técnicas de microdissección láser nos permiten seleccionar fragmentos de tejido bajo un microscopio. Sin embargo, se sabe que en la carcinogénesis y el desarrollo tumoral, no sólo están implicadas las células parenquimatosas (en este caso células epiteliales), sino que las células estromales también juegan un papel fundamental. Por tanto, eliminar el estroma en este tipo de investigaciones, en las que se pretende identificar alteraciones genéticas de un tumor determinado, también puede eliminar información vital sobre sus mecanismos de crecimiento e

ES 2 292 348 B2

invasión. Por todo ello, es fundamental incluir el tejido tumoral completo, incluyendo parénquima y estroma tumoral, reservando el análisis de tejidos específicos para aquellos casos en los que el diseño experimental así lo requieran.

5 b) Normalizar la señal de ATP6V1C1 con la obtenida en la reacción con una pareja de primers y sonda tipo taqman que son complementarias a una secuencia del gen GUS, esto es lo que denominamos ratio ATP6V1C1/GUS.

c) Evaluar la sobreexpresión comparando la ratio ATP6V1C1/GUS de la muestra problema con la su tejido homólogo sano.

10 En una realización preferida de la presente invención comprende los siguientes primers y sonda tipo taqman:

ATP6V1C1:

15 5'-SEQ ID N° 1-3'

5'-SEQ ID N° 2-3'

5'-6FAM- SEQ ID N° 3 -TAMRA

20 GUS:

5'-SEQ ID N° 4-3'

25 5'- SEQ ID N° 5-3'

5'-6-FAM- SEQ ID N° 6 -TAMRA.

30 Otra realización preferida de la presente invención comprende la evaluación de la sobreexpresión del gen ATP6V1C1. Esta se realiza determinando el nivel de los productos de transcripción (ARN mensajero) correspondientes a dicho gen normalizándolo contra un gen control y comparando esta ratio con la obtenida para la muestra normal del mismo paciente., mediante, pero sin limitarnos, análisis Northern blot, mapeo con la nucleasa S1, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena ligasa (RT-LCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), PCR multiplex, PCR tiempo real con doble lectura, microarrays, técnicas basadas en el empleo de anticuerpos, técnicas basadas en el diagnóstico por imagen *in vivo*, citometría de flujo o proteómica.

40 En una realización aún más preferida, se extrae el ARN total de las muestras y se comprueba la cantidad y calidad de ARN obtenido por electroforesis en gel de agarosa convencional o empleando un bioanalizador Agilent. Posteriormente se realiza una retrotranscripción y obtención de ADN copia (cADN). Se procede a la cuantificación del gen ATP6V1C1, preferiblemente mediante PCR cuantitativa empleando un sistema de PCR en tiempo real y usando sondas taqman marcadas con FAM. Como gen control se empleará GUS, también con sondas taqman marcadas preferiblemente con FAM, si se emplean PCRs individuales, o bien otros marcadores si se requiere el empleo de PCR multiplex y de sistemas de PCR en tiempo real con doble lectura. Para ambos genes se deben incorporar al experimento curvas de calibrado construidas con diluciones seriadas de muestras control. La cuantificación de ATP6V1C1 y GUS se realiza tanto para la muestra tumoral como normal. La cantidad de ATP6V1C1 se normaliza frente a GUS y las cantidades se expresan en forma de ratios ATP6V1C1/GUS.

50 La tecnología de la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) es un método que permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y fiabilidad. La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de un fragmento de interés.

55 Combina el método de amplificación de la PCR desarrollado por Mullis, con la utilización de moléculas de fluorocromo para poder monitorizar paso a paso y de manera cuantificable el proceso de amplificación de un segmento específico de ADN de interés.

60 El término "sobreexpresión del gen ATP6V1C1" significa en esta invención cuando hay un 5% ó más de expresión con respecto a un tejido sano. Esta sobreexpresión puede considerarse indicativa de patología tumoral cuando la ratio ATP6V1C1/GUS en el tejido presuntamente tumoral supera 2 veces la misma ratio en el tejido normal. Si hay una clara sobreexpresión de ATP6V1C1 en el tejido tumoral, lo que se da cuando la ratio ATP6V1C1/GUS en este tejido supera 2 veces la misma ratio en el tejido normal, se considera probable que el tejido es o será tumoral y que se ha iniciado los procesos que llevarán a la diseminación.

65 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un kit para el diagnóstico precoz o pronóstico de COCE capaz de llevar a cabo los métodos descritos con anterioridad.

ES 2 292 348 B2

Este kit comprende reactivos para llevar a cabo la amplificación de los ARN mensajeros de ATP6V1C1 y del gen control a partir de la muestra problema y los reactivos para llevar a cabo la amplificación de los ARN mensajeros de ATP6V1C1 y del gen control a partir de la muestra sana. Por ejemplo primers para amplificación y sondas taqman para la detección de ATP6V1C1 y GUS.

5

En una realización preferida de la presente invención el kit comprende:

a) primers para amplificación y sondas taqman para la detección por PCR en tiempo real de los ARN mensajeros de ATP6V1C1 y GUS.

10

ATP6V1C1:

5'-SEQ ID N° 1-3'

15

5'-SEQ ID N° 2-3'

5'-6FAM- SEQ ID N° 3c -TAMRA

20

GUS:

5'- SEQ ID N° 4-3'

25

5'- SEQ ID N° 5-3'

5'-6-FAM- SEQ ID N° 6 -TAMRA.

30

b) curvas de calibrado del gen ATP6V1C1 en diluciones de 1, 10, 50, 100 y 1000 copias por microlitro de un vector plasmídico que contenga las secuencias apropiadas del gen, que son aquellas que amplifica los primers del apartado anterior).

35

En una realización más preferida las curvas de calibrado del gen GUS en diluciones de 1, 10, 50, 100 y 1000 copia de un vector plasmídico que contenga las secuencias apropiadas del gen, es decir, aquella que amplifica los primers del apartado a), aunque se puede optar por kits ya existentes de este gen control.

40

c) Se puede completar con elementos, por ejemplo tubos, para recogida de muestras de biopsias, y en una realización más preferida, provistos de inhibidores de ARNasas para una mejor preservación de la muestra y evitar así el uso de nitrógeno líquido.

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona el uso del gen ATP6V1C1 como diana terapéutica para la elaboración de inhibidores para su sobreexpresión que comprende:

45

a) construir un vector plasmídico de interferencia mediante el uso del vector pSilencer 2.1-U6 de la casa Ambion, modificado adecuadamente para que exprese un siRNA.

50

Esta modificación consiste primero en la obtención de dos oligonucleótidos complementarios que contienen una secuencia corta de 21 nucleotidos que corresponde a una región específica del ARN mensajero de ATP6V1C1 (codones 280 a 300), sin homología con otros genes conocidos, y secuencias "stem loop"; segundo en la hibridación de ambas cadenas oligonucleotídicas para generar una secuencia de doble cadena y por último el ligamiento al vector pSilencer 2.1-U6 vacío.

b) transfección de los ADN's plasmídicos construidos mediante el uso del kit LipofectAMINE de Invitrogen.

55

Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona un compuesto inhibidor de la sobreexpresión del gen ATP6V1C1, en una realización preferida dicho inhibidor de ATP6V1C1 es un compuesto con capacidad para interferir con la función de dicho gen a nivel de ácido nucleico o proteína. En una realización aún mas preferida, dicho compuesto inhibidor se puede seleccionar, pero sin limitarse, entre un péptido, una proteína, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

60

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de compuestos inhibidores de la sobreexpresión del gen ATP6V1C1 para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de COCE.

65

A lo largo de las reivindicaciones y de la descripción de la presente invención, la palabra "comprende" y las variaciones de la misma, no pretenden excluir otros aditivos, componentes o pasos. Los ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no tienen el propósito de limitar la presente invención.

Exposición detallada de modos de realización

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

Ejemplo 1

Trece pacientes con COCE (ocho hombres, cinco mujeres, media de edad de 64,86 años, rango: 25-92 años) se incluyeron en este estudio. El diagnóstico de COCE fue realizado por biopsia e histopatología. Todos los pacientes fueron diagnósticos consecutivos de COCE en el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela, España.

Una muestra de biopsia fresca de tumor con su correspondiente muestra de tejido de la mucosa oral normal tomada en paralelo se obtuvo de cada paciente.

De todos los pacientes se recogió historial de consumo de tabaco, datos sobre la localización anatómica del carcinoma y estadio del tumor (Tabla 1). Todos los pacientes fueron informados sobre la naturaleza del estudio y dieron su consentimiento por escrito.

TABLA 1

Característica clínicas en 13 pacientes con carcinoma oral de células escamosas (COCE)

Pacientes	Localización anatómica del tumor	Estadio del tumor	Tabaco
1	Lengua	III	Si
2	Lengua	IV	Si
3	Paladar blando	III	Si
4	Lengua	III	Si
5	Trigonum retromolar	IV	Si
6	Lengua	I	Si
7	Paladar blando	IV	Si
8	Lengua	II	No
9	Paladar blando	IV	Si
10	Lengua	IV	No
11	Premaxila	IV	No
12	Lengua	III	Si
13	Lengua	II	Si

Se clasificaron los tumores en función del estadio tumoral en el momento del diagnóstico de la siguiente forma y según la 5ª edición del Manual de Estadaje del Cáncer del *American Joint Committee on Cancer*: I con un estadio tumoral del 12,5%, II con un estadio tumoral del 25%, III con un estadio tumoral del 37,5% y IV con un estadio tumoral del 50%.

Extracción del ARN

Muestras quirúrgicas de biopsia fresca del tumor con muestra paralela de tejido de la mucosa oral normal se obtuvieron de cada paciente, se congelaron inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su empleo. El tejido congelado fue finalmente pulverizado en un mortero bajo nitrógeno líquido, tras lo cual se añadió 0,6 mL de tampón de tisis (Rneasy mini kit, Quiagen, Hilden, Germany). Todos los pasos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del producto. La integridad del ARN se comprobó mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1%. Todo el equipamiento (eg. Homogeneizadores, mortero, tubos) fueron pretratados con ARNsas y lavados con agua tratada con diethyl pyrocarbonato antes de su uso.

Preparación de las sondas cADN fluorescentes

El cADN de doble cadena se sintetizó a partir del ARN total usando el kit SuperScript double-stranded cDNA synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ARN antisentido (aARN) se obtuvo a partir del cADN de doble cadena usando T7 MEGAscript kit (Ambion, Austin, TX); alícuotas de cada mezcla de reacción se comprobó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% para determinar el rendimiento; el aARN se purificó usando el protocolo Rneasy Mini. Finalmente, las sondas fluorescentes de cADN se obtuvieron por transcripción reversa a partir del aARN empleándose el kit CyScribe first-strand cDNA labeling (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), con cyanine 5-dCTP (Cy5) para marcar el aRNA del tumor, o cyanine 3-dCTP (Cy3) para el aRNA normal.

Hibridación del cADN

Se adquirieron los microarrays Atlas Glass Human 3.8 I (Clontech), que contienen oligonucleótidos largos de cADN correspondientes a 3500 genes humanos. Los portaobjetos se hibridaron con 80 μ L de las sondas de cADN marcadas con Cy5 y Cy3 en 2 mL de solución de hibridación GlassHyb (Clontech) a 50°C en una cámara Atlas Glass Hybridization. Después de 16 horas de hibridación, se realizaron los pasos de lavado recomendados en el protocolo de la casa comercial. Tras un lavado final con agua destilada, los portaobjetos se secaron por centrifugación a 1500 x g durante 5 minutos.

Escaneo y análisis de la imagen

Las señales de hibridación se leyeron empleándose un escaner fluorescente de doble laser Affymetrix 418 (GMS 418). Las imágenes escaneadas se inspeccionaron visualmente para detectar posibles artefactos que pudieran dar falsos positivos, y luego fueron analizadas con el software Imagen 4.1 (Biodiscovery, El Segundo, CA). La intensidad del cada punto en el array se calculó tras sustraer el ruido de fondo. Por cada punto en el array, las señales de hibridación del análisis de imágenes rinde valores para el fluorocromo Cy5 (tejido tumoral) y Cy3 (tejido normal). La normalización de los datos y el análisis estadístico se realizó empleando el sistema SOLAR (ALMA Bioinformatics SL, Madrid). Para ajustar la intensidad media de los puntos de cada imagen a un valor común, todas las señales de los puntos en cada canal se multiplicaron por un factor de escala. El valor común escogido fue la media de todas las intensidades de los puntos sobre todas las réplicas.

Las intensidades de señal para los canales de Cy3 y Cy5 se normalizaron por el método *lowess* y se calcularon las ratios de los datos frente a canales control. El cálculo de la curva *lowess* es útil para corregir la desviación de la ratio de los valores de la presunción estadística de que la mayoría de los puntos no tienen expresión diferencial. Los valores de expresión diferencial normalizada (log ratio) se ordenaron por su probabilidad de ser diferentes de 0, según el valor absoluto del estadístico t. El método de los z-scores se empleó para estimar cuán diferente es el valor de la expresión diferencial normalizada de 0. El z-score local mide el número de desviaciones estándar que el dato de un punto particular se desvía de la media. Los z-scores se calculan dentro de una ventana alrededor de cada dato puntual (se emplea la estructura local del conjunto de datos). Altos valores de z-score y bajos valores de p pueden ser una buena combinación para detectar genes diferencialmente expresados.

Validación de la expresión génica relativa por RT-PCR cinética

La cuantificación mediante PCR ligada a la transcripción reversa en tiempo real (rtRT-PCR) se realizó en el equipo CHROMO4 System (MJ Research) a partir del ARN de 8 parejas de muestras (tumor y tejido normal). Las amplificaciones por PCR se realizaron empleando los productos de expresión Assays-on-Demand Gene (Applied Biosystems). La expresión del gen GUS sirvió como un control interno. Se obtuvieron los datos y se generaron curvas de amplificación mediante el software del CHROMO4 System. Todas las amplificaciones se realizaron por duplicado y el dato de ciclo umbral (Ct) fue promediado para los cálculos subsiguientes de valores de expresión relativos. La cuantificación de los datos de rtRT-PCR se realizó como sigue: El valor Ct para los genes de interés para cada muestra se normalizó contra el valor Ct del correspondiente gen control endógeno (GUS): $\Delta C_t = C_{t \text{ Target gene}} - C_{t \text{ GUS}}$.

*Ejemplo 2**Análisis de los microarrays*

Dado que el proceso de desregulación del pH relacionada con la carcinogénesis y proliferación no ha sido estudiado en el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral, se analizaron cinco pacientes con COCE. Para detectar genes regulados diferencialmente relacionados con el mecanismo regulador del pH citosólico y la acidez tumoral, hemos realizado un perfil de expresión mediante arrays de cADN empleando células normales de la mucosa bucal pertenecientes al mismo paciente como muestra control. El objetivo es evitar efectos espúreos debidos a variaciones interindividuales o temporales. Como se muestra en la Tabla 2, identificamos 6 de 12 genes con niveles de expresión significativamente alterados.

TABLA 2

Genes diferencialmente expresados relacionados con el mecanismos regulados del pH citosólico y la acidez tumoral identificados por el microarrays de expresión (tejidos con COCE vs tejidos normales) a partir de 5 experimentos independientes

Señal	Cambio (tantas veces de incremento)	z-score	Valor de p	Gene	Accession Nº
45.7	5.91	2.20	0.02523	ATP6V0E	<u>NM_003945</u>
45.5	5.68	2.13	0.03125	ATP6V1C1	<u>NM_001695</u>
127.2	2.40	1.68	0.00262	ATP6V1G1	<u>NM_004888</u>
2934.9	1.71	1.28	0.00409	ATP6V0C	<u>NM_001694</u>
531.5	1.65	1.22	0.02735	ATP6V1B1	<u>NM_001692</u>
61.2	2.15	0.96	0.02840	ATP6V1A1	NM_001690
19.7	-1.07	-0.15	0.93334	ATP6V1B2	NM_001693
80.2	-1.88	-1.14	0.54560	ATP6V1E1	NM_001696
1022.8	1.23	0.55	0.08708	ATP6V1F	NM_004231
75.1	2.01	0.95	0.04979	ATP6V0A1	NM_005177
42.9	2.32	0.97	0.14130	ATP6V0B	NM_004047
106.1	1.69	0.96	0.06754	ATP6S1	NM_001183

El gen con un mayor z-score fue ATPV1E1, seguido de ATPV1C1. Es de destacar que la mayoría de los genes sobreexpresados se relación con el complejo VI de la ATPasa. Más aún, el nivel de sobreexpresión y la presencia o ausencia de la sobreexpresión misma varía entre genes, pese a que para funcionar la H⁺-V-ATPasa debe formar un complejo único. Es conocido que ATPV1C1 juega un papel regulador de la actividad pH. Se ha decripto que ATPV1E1 es necesario para el ensamblaje de las subunidades V0 y V1 y la actividad de la H⁺-V-ATPasa, al menos en levadura. El interés se volcó en comprobar el posible papel central de ATPV1C1 en la regulación de la actividad ATPasa.

Ejemplo 3

Análisis por PCR en tiempo real

Se validaron los cambios observados en ensayos con microarrays por medio del empleo de PCR en tiempo real. Para ello se reclutaron 8 pacientes con COCE y se seleccionaron dos transcritos génicos (ATPV1C1 y ATPV0E). Igualmente se compararon las muestras tumorales contra su propio tejido normal. Los resultados obtenidos con la PCR en tiempo real en ambos transcritos se muestran en la Tabla 3. Los resultados corroboraron la sobre-regulación observada mediante microarrays y confirmaron el incremento persistente de expresión de ATPV1C1 en COCE comparado con las células control. Se observa sin embargo una mayor variabilidad respecto a ATPV0E, sobreexpresándose únicamente en 3 de las 8 muestras analizadas.

ES 2 292 348 B2

TABLA 3

Validación con tiempo real (pacientes 6 a 13 en la tabla 1)

	<i>ATP6V1C1</i>		<i>GUS</i>		
	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	
5					
10	Muestra				
	1	164.537	79.5055	208.982	203.538 +101,56%
	2	102.587	36.6777	122.712	73.5124 +67,56%
	3	137.711	50.33	159.895	64.9069 +11,07%
15	4	163.902	63.3701	191.165	102.255 +38,35%
	5	63.4133	12.6141	92.187	21.5749 +17,65%
	6	82.5592	42.6461	129.859	71.3896 +6,43%
20	7	54.4144	66.0234	63.4856	106.058 +37,69%
	8	128.344	24.1935	151.239	37.5852 +31,84%
		<i>ATP6V0E</i>		<i>GUS</i>	
25					
	Muestra	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>	<i>Tumor</i>	<i>Normal</i>
	1	429.158	310.357	208.982	203.538 +34,68%
30	2	167.398	105.19	122.712	73.5124 -4,67%
	3	196.9	157.373	159.895	64.9069 -49,21%
	4	279.508	130.393	191.165	102.255 +14,66%
35	5	104.446	36.1395	92.187	21.5749 -32,36%
	6	126.697	82.822	129.859	71.3896 -15,9%
	7	100.349	116.211	63.4856	106.058 +44,26%
40	8	190.732	61.7532	151.239	37.5852 -23,24%

Hemos encontrado un incremento en los niveles de ARN mensajero de ATPVOC en varias muestras con COCE, pero ese incremento era moderado respecto al tejido normal, pese a que casi todos los tumores eran de grado II a IV. ATPVOC es una proteína del canal V0, y aunque se ha descrito que puede unirse a papiloma E5 oncoproteínas y otros factores que regulan proliferación, su inhibición no parece que altere de forma significativamente diferente a otras proteínas estructurales e igualmente fundamentales de ambos complejos. Por lo tanto, ATPV1C1 es una pieza reguladora clave, anterior en cuanto a proceso de metastatización y fundamental en el mismo y por tanto una mejor diana para silenciamiento.

Los resultados del estudio describen por primera vez en COCE la regulación del pH activada por la bomba de protones v-ATPasa y que se encuentra involucrada en la transformación celular. Estas bombas de protones v-ATPasas pueden estar relacionadas con la adquisición de la capacidad de crecimiento y expansión por parte de las células tumorales COCE y ATPC1V1 puede jugar un papel clave en dicho proceso.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para el diagnóstico precoz o pronóstico de COCE mediante la evaluación de la sobreexpresión del gen ATP6V1C1.
- 10 2. Método según la reivindicación anterior, que comprende:
- a. obtener una muestra tumoral biológica aislada y una muestra de tejido homólogo sano del mismo paciente y
 - b. evaluar la sobreexpresión del gen comparando el ratio ATP6C1V1/gen control de la muestra problema con la de su tejido homólogo sano.
- 15 3. Método según la reivindicación anterior que además comprende los siguientes pasos intermedios:
- a. hacer reaccionar la muestra con una pareja de primers y sonda tipo taqman complementarias a una secuencia del gen ATP6V1C1;
 - b. normalizar la señal de ATP6V1C1 con la obtenida en la reacción con una pareja de primers y sonda tipo taqman que son complementarias a una secuencia de un gen control (ratio ATP6V1C1/gen control).
- 20 4. Método según la reivindicación 3, donde los primers y sondas para ATP6V1C1 y gen control son los siguientes:
- 25 a. para ATP6V1C1:
 - 1. SEQ ID N°1
 - 30 2. SEQ ID N° 2
 - 3. 6FAM- SEQ ID N° 3 -TAMRA
 - b. para GUS:
 - 35 1. SEQ ID N° 4
 - 2. SEQ ID N°5
 - 40 3. 6FAM- SEQ ID N° 6 -TAMRA.
- 45 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, donde el gen control es GUS.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la evaluación de la sobreexpresión del gen ATP6V1C1 comprende:
- a. determinar el nivel de los productos de transcripción (ARN mensajero) correspondientes a dicho gen,
 - 50 b. normalizarlo contra un gen control y
 - c. comparar esta ratio con la obtenida para la muestra sana del mismo paciente.
- 55 7. Método según la reivindicación 1, donde la evaluación de la sobreexpresión se realiza mediante análisis Northern blot, mapeo con la nucleasa S1, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena ligasa (RT-LCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), PCR multiplex, PCR tiempo real con doble lectura, microarrays, técnicas basadas en el empleo de anticuerpos, técnicas basadas en el diagnóstico por imagen *in vivo*, citometría de flujo o proteómica.
- 60 8. Método según la reivindicación anterior, donde la evaluación de la sobreexpresión se realiza mediante retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).
- 65 9. Kit para el diagnóstico precoz o pronóstico de COCE, capaz de llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en las reivindicaciones 1 a 6.

ES 2 292 348 B2

10. Kit según reivindicación anterior que comprende:

- a. reactivos para llevar a cabo la amplificación de los ARN mensajeros de ATP6V1C1 y del gen control a partir de la muestra problema y
- b. reactivos para llevar a cabo la amplificación de los ARN mensajeros de ATP6V1C1 y del gen control a partir de la muestra sana.

11. Kit según las reivindicaciones 9 y 10, donde el gen control es el gen GUS.

12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde la detección de los ARNm es mediante PCR en tiempo real.

13. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que además comprende elementos para recogida de muestras de biopsias.

14. Kit según la reivindicación anterior, donde los tubos de recogidas de muestras incluyen inhibidores de ARNasas.

15. Uso del gen ATP6V1C1 como diana terapéutica para la elaboración de inhibidores para su sobreexpresión.

ES 2 292 348 B2

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Universidade de Santiago de Compostela	
5	<120> Método y Kit de diagnóstico precoz y/o pronóstico del carcinoma oral de células escamosas (COCE)	
	<130> ES1596.3	
10	<160> 6	
	<170> PatentIn versión 3.4	
15	<210> 1	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Primer tipo Taqman	
20	<220>	
	<221> primer_bind	
	<222> (1)..(17)	
25	<223> Primer tipo Taqman	
	<400> 1	
30	gggagaaaac ctgtcag	17
	<210> 2	
35	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Primer tipo Taqman	
40	<220>	
	<221> primer_bind	
	<222> (1)..(20)	
	<223> Primer tipo taqman	
45	<400> 2	
	ccattagcca acagattetc	20
50	<210> 3	
	<211> 25	
	<212> DNA	
55	<213> Primer tipo Taqman	
	<220>	
	<221> primer_bind	
60	<222> (1)..(25)	
	<223> Primer tipo taqman	
	<400> 3	
65	ttggaagata gcaaagacaa agttc	25

ES 2 292 348 B2

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
5 <213> Primer tipo Taqman

<220>
<221> primer_bind
10 <222> (1)..(26)
<223> Primer tipo Taqman

<400> 4
15 gaaaatatgt ggttgagag ctcatt 26

<210> 5
20 <211> 22
<212> DNA
<213> Primer tipo Taqman

25 <220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(22)
30 <223> Primer tipo taqman

<400> 5
35 ccgagtgaag atccccttt ta 22

<210> 6
<211> 29
40 <212> DNA
<213> Primer tipo Taqman

<220>
45 <221> primer_bind
<222> (1)..(29)
<223> Primer tipo taqman

50 <400> 6

ccagcactct cgtcgtcggg gactgttca 29

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 292 348

② Nº de solicitud: 200601549

③ Fecha de presentación de la solicitud: 08.06.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CARINCI F. et al. Genetic Portrait of mild and severe lingual dysplasia. Oral Oncology. Abril 2005, Vol 41(4), páginas 365-374, todo el documento.	1-15
A	ALA-EDDIN AM. et al. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. Oncogene. 2002, Vol 21, páginas 2634-2640, todo el documento.	1-15
A	JP 2006094733 A (SASAKI ISANORI; MATSUO KAZUMI) 28.09.2004, traducción PJ, párrafos 10,11,18; reivindicación 9.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

07.02.2008

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)