

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 798**

21 Número de solicitud: 201730929

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

13.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.01.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

10.04.2019

Fecha de concesión:

01.07.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.07.2019

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN HOSPITAL 12
DE OCTUBRE (60.0%)**

**Avenida de Córdoba s/n. Hospital Universitario
12 de Octubre, Centro de Actividades
Ambulatorias, 6ª Planta Bloque D**

28041 Madrid (Madrid) ES;

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (SAS) (20.0%) y

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (20.0%)**

72 Inventor/es:

PAZ-ARES RODRÍGUEZ, Luis;

QUINTANAL VILLALONGA, Álvaro;

FERRER SÁNCHEZ, Irene;

MOLINA PINELO, Sonia y

CARNERO MOYA, Amancio

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **N-CADHERINA Y FGFR1 Y/O FGFR4 PARA USO EN LA PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS PACIENTES A UN TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN Y MÉTODO Y KIT BASADOS EN DICHO USO**

ES 2 696 798 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 798**

21 Número de solicitud: 201730929

57 Resumen:

N-cadherina y FGFR1 y/o FGFR4 para uso en la predicción de la respuesta de los pacientes a un tratamiento del cáncer de pulmón y método y kit basados en dicho uso.

La presente invención describe un método para predecir la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón al tratamiento con inhibidores de FGFR. La relación de la expresión de los biomarcadores descritos con la respuesta al tratamiento, permite clasificar a los sujetos como respondedores o no-respondedores al tratamiento, lo que facilita la decisión terapéutica al responsable clínico. El presente método describe los biomarcadores N-cadherina, FGFR1 y FGFR4, cómo analizarlos y cómo interpretar los resultados obtenidos, con el fin de administrar inhibidores de FGFR únicamente a los sujetos que van a responder a dicho tratamiento, optimizando el mismo, lo que permite que los sujetos no-respondedores puedan ser tratados con terapias alternativas a la de los inhibidores de FGFR.

ES 2 696 798 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

**N-CADHERINA Y FGFR1 Y/O FGFR4 PARA USO EN LA PREDICCIÓN DE LA
RESPUESTA DE LOS PACIENTES A UN TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN Y
MÉTODO Y KIT BASADOS EN DICHO USO**

5 **SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención pertenece al sector de la medicina clínica y, más concretamente, al del tratamiento de cáncer de pulmón con fármacos anti-FGFR.

El objeto principal de la presente invención es el uso de los biomarcadores N-cadherina y FGFR1 y/o FGFR4 en el pronóstico y predicción de la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón al tratamiento con inhibidores de FGFR.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer de pulmón es un conjunto de enfermedades resultantes del crecimiento maligno de células del tracto respiratorio, en particular del tejido pulmonar y uno de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial. Debido a que la mayoría de pacientes se diagnostican en fases avanzadas de la enfermedad, la tasa de supervivencia es muy baja. El cáncer de pulmón suele originarse a partir de células epiteliales y puede derivar en metástasis e infiltración a otros tejidos del cuerpo. Aunque en ensayos clínicos se han empleado inhibidores de FGFR en el tratamiento de cáncer de pulmón, muchos de los pacientes no responden a estas terapias.

El poder determinar si un tratamiento va a ser eficiente o no para un determinado paciente antes de administrarse, va a beneficiar al propio paciente, dado que evitará que éste sufra innecesariamente los efectos secundarios de un tratamiento ineficaz, priorizando la búsqueda de tratamientos alternativos más rápidamente y ahorrando costes en el tratamiento y mejorando, además, las expectativas de una respuesta eficaz.

La identificación de nuevos biomarcadores que permitan predecir la respuesta de un paciente a un tratamiento es decisiva en el tratamiento clínico de cualquier patología. La aplicación de tecnologías de alto rendimiento en el cáncer de pulmón, ha identificado múltiples alteraciones en genes con un papel potencial en este tipo de cáncer. Muchas de estas alteraciones tienen lugar en proteínas con actividad tirosina quinasa (Quintanal-Villalonga 2016).

Los receptores de factores de crecimiento fibroblásticos (FGFRs) son receptores de membrana con actividad tirosina quinasa que se unen a miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos. La activación de los FGFRs está relacionada con la regulación de

la supervivencia, proliferación, migración y diferenciación celular. Se ha descrito que la desregulación de las vías de señalización de FGFRs está asociada con el cáncer en humanos (Wesche 2011), por lo que representan una importante diana terapéutica en cáncer. Se han identificado cinco miembros de la familia de receptores FGFR (FGFR1, FGFR2, FGFR3, 5 FGFR4 y FGFR1).

Los inhibidores de FGFR se han empleado en modelos preclínicos de diferentes tipos de cáncer de forma exitosa. Sin embargo, a nivel clínico estos inhibidores no presentan eficacia en todos los pacientes, aunque éstos hayan sido previamente seleccionados con los actuales criterios predictivos de sensibilidad a estos inhibidores. Los criterios de selección de pacientes 10 para acceder a ensayos clínicos con inhibidores de FGFR han sido generalmente dirigidos a la detección de la amplificación de algún FGFR, pero desgraciadamente estos criterios han demostrado que su capacidad predictiva de la respuesta al tratamiento no es totalmente fiable, lo que resulta en un problema en el tratamiento de los pacientes que sufren cáncer. Resultados preliminares de ensayos clínicos han mostrado que muchos de los tumores en los 15 que el gen *FGFR1* está amplificado no responden a terapia dirigida al receptor FGFR, lo que sugiere que son necesarios otros biomarcadores para estratificar correctamente los pacientes y predecir su respuesta a este tipo de terapia. La presente invención tiene como objetivo determinar si un paciente que sufre cáncer de pulmón va a responder al tratamiento con inhibidores de FGFR.

20 Se ha observado que en cáncer de pulmón, aproximadamente un 20% de los carcinomas escamosos y en un 1-3% de los adenocarcinomas, el gen *FGFR1* está amplificado. Por otra parte, se sabe que el gen *FGFR4* presenta mutaciones en algunos pacientes con adenocarcinoma y que, además, la expresión del receptor FGFR4 ha sido relacionada con una peor prognosis en cáncer de pulmón no microcítico. Estos datos, junto a diferentes 25 estudios preclínicos en esta patología, sugieren que ambos genes podrían tener gran relevancia en el cáncer de pulmón (Dutt, 2011; Jiang, 2015; Huang, 2015; Lim, 2016).

También se ha descrito el uso de inhibidores de FGFR en el tratamiento de cáncer de pulmón en pacientes con altos niveles de expresión de FGFR1 (US2015335643A1 y US8709718B1).

30 La cadherina neural (NCAD), N-cadherina o Cadherina-2 (CDH2) es una glicoproteína transmembrana responsable de la unión célula-célula codificada por el gen *CDH2*. Juega un papel importante durante el desarrollo, en las células del sistema nervioso central, músculo cardiaco, pero también en la metástasis del cáncer. Juega a su vez un papel importante en la mediación de señales neurales. La N-cadherina regula positivamente la activación de FGFR en células tumorales, incrementando la actividad invasiva de las células tumorales y

favoreciendo la progresión de la metástasis en modelos preclínicos de algunos tipos de cáncer (Qian 2014; Nguyen 2016).

Se ha comprobado en cáncer de vejiga que los niveles de ARNm de marcadores de transición epitelio-mesénquima, tales como E-cadherina y de N-cadherina, podrían usarse conjuntamente para predecir la respuesta al tratamiento con un inhibidor de FGFR (TKI-258), debido a que las líneas celulares de cáncer de vejiga de tipo mesenquimal son más respondedoras que las de tipo epitelial (Hänze 2013).

Pero lo que no se ha descrito en el estado del arte y ningún documento sugiere, es la relación entre el nivel de expresión de N-cadherina por una parte y el nivel de expresión de FGFR1 y/o FGFR4 por otra, como biomarcadores, para determinar si el tratamiento con inhibidores de FGFR es efectivo en un paciente que sufre cáncer de pulmón. La presente invención muestra por primera vez la relevancia a nivel terapéutico de N-cadherina en el papel tumorigénico de FGFR1 y de FGFR4, en cáncer de pulmón.

15 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Breve descripción de la invención

En una realización, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para predecir la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón a un tratamiento con al menos un inhibidor de FGFR, que comprende:

- 20 a) detectar en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto los niveles del biomarcador N-cadherina en combinación con la expresión de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 y/o FGFR4,
- b) comparar el nivel de expresión de los biomarcadores determinados en (a) con una muestra de referencia, en el que altos niveles de los marcadores detectados, es
25 indicativo de que el sujeto va a responder al tratamiento.

En una realización más preferida, la determinación del nivel de expresión de los biomarcadores en el método *in vitro* se realiza midiendo la cantidad de proteína de N-cadherina y la cantidad de proteína de FGFR1 y/o FGFR4 en la muestra, o midiendo la cantidad de ARNm del gen *CDH2* y la cantidad de ARNm de los genes *FGFR1* y/o *FGFR4* en
30 la muestra.

En otra realización preferida, cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico. En una realización todavía más preferida, el cáncer de pulmón no microcítico se selecciona entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso o epidermoide.

En otra realización de la invención, la muestra biológica analizada en el paso a) en el método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores se selecciona del grupo que comprende: sangre completa, suero, plasma, esputo, sudor, orina, lavado bronquioalveolar, biopsia del tejido tumoral primario o metastásico. En una realización todavía más preferida, la muestra biológica es una biopsia del tumor primario del sujeto.

En una realización preferida del método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, la detección de la cantidad de los biomarcadores se realiza mediante al menos uno de los métodos seleccionados entre: HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), LC/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, ELISA, DAS ELISA, inmunoprecipitación de proteínas, inmunoelectroforesis, Western Blot, inmunotinción de proteínas, Northern Blot, PCR con transcripción reversa (RT-PCR), PCR cuantitativa (q-PCR), RIA (radioinmunoensayo), hibridación *in situ*, ensayo de protección frente a nucleasas, secuenciación masiva, técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas microarrays de ADN genómico, microarrays de proteínas, microarrays de ARN mensajero, microarrays de ADNc, microarrays de péptidos, microarrays de tejido, microarrays celulares o de transfección, microarrays de anticuerpos, microarrays de lisados o suero, microarrays de proteínas de fase reversa, microarrays de péptidos o microarrays de genotipado, entre otros. En una realización más preferida, la detección del ARNm de los biomarcadores se realiza por PCR con transcripción reversa (RT-PCR) o PCR cuantitativa (q-PCR).

En una realización del método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, altos niveles de los biomarcadores detectados se corresponden con un nivel al menos dos veces superior al nivel del mismo marcador en una muestra de referencia.

En otra realización de método de acuerdo, el al menos un inhibidor de FGFR se selecciona de entre el grupo que comprende BGJ398, AZD4547, Debio-1347, Dovitinib, BLU9931, FIIN-2, JNJ-42756493, LY2874455, Ponatinib, BIBF1120, PD173074, PD166866, BLU554, S49076, NSC12, PHA-739358, TSU-68, BMS-540215, TKI-258, MK-2461, BMS-582664, AG 1296, SSR128129E, LY2874455 y SU5402.

Otra realización de la invención se refiere a la combinación del biomarcador N-cadherina y al menos un segundo biomarcador seleccionado entre FGFR1 y/o FGFR4, para uso en el pronóstico y/o la predicción de la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón al tratamiento con inhibidores de FGFR.

En una realización más preferida de esta realización de uso, el nivel de expresión de cada biomarcador se determina midiendo el nivel de ARNm de los genes *CDH2* y *FGFR1* y/o *FGFR4*, y/o el nivel de proteína de N-cadherina y FGFR1 y/o FGFR4.

En una realización preferida de la combinación de los biomarcadores para uso, de acuerdo con cualquiera de las dos realizaciones inmediatamente anteriores, el cáncer de pulmón es un carcinoma no microcítico seleccionado entre adenocarcinoma o carcinoma escamoso.

5 En otra realización, el al menos un inhibidor de FGFR de la combinación de biomarcadores para uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de uso anteriores se selecciona del grupo que comprende BGJ398, AZD4547, Debio-1347, Dovitinib, BLU9931, FIIN-2, JNJ-42756493, LY2874455, Ponatinib, BIBF1120, PD173074, PD166866, BLU554, S49076, NSC12, PHA-739358, TSU-68, BMS-540215, TKI-258, MK-2461, BMS-582664, AG 1296, SSR128129E, LY2874455 y SU5402.

10 Otra realización de la invención se refiere a un kit para pronosticar y/o predecir la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón a un tratamiento con inhibidores FGFR que comprende:

- 15 (a) medios para detectar en una muestra biológica obtenida del sujeto los niveles del biomarcador N-cadherina, por una parte, y la expresión de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 y/o FGFR4 por otra,
- (b) medios para comparar el nivel de expresión de los biomarcadores determinados en (a) con una muestra de referencia,
- 20 (c) instrucciones para que un profesional médico administre el tratamiento con inhibidores de FGFR únicamente a aquellos sujetos que muestren alta expresión de N-cadherina y además alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4.

En una realización preferida, la determinación de los niveles de los biomarcadores en el kit se realiza midiendo la cantidad de proteína del biomarcador N-cadherina y la cantidad de proteína de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 o FGFR4 en la muestra, o midiendo la cantidad de ARNm del gen *CDH2* y la cantidad de ARNm de al menos uno de los genes
25 *FGFR1* o *FGFR4* en la muestra.

En otra realización preferida, la muestra de cáncer de pulmón a analizar en el kit es una muestra de cáncer de pulmón no microcítico. En una realización todavía más preferida, el cáncer de pulmón no microcítico se selecciona entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso o epidermoide.

30 En una realización preferida del kit de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores de dicho kit, los medios para detectar los niveles de los biomarcadores comprenden anticuerpos que reconocen específicamente las proteínas N-cadherina y anticuerpos que reconocen específicamente las proteínas FGFR1 y/o FGFR4, o primers y/o sondas que detectan específicamente la presencia del ARNm del gen *CDH2* y además primers y/o sondas
35 que detectan específicamente la presencia del ARNm de los genes *FGFR1* y/o *FGFR4*.

En otra realización preferida del kit de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores de dicho kit, la muestra biológica se selecciona del grupo que comprende: sangre completa, suero, plasma, esputo, sudor, orina, lavado bronquioalveolar, biopsia del tejido tumoral primario o metastásico.

- 5 En una realización adicional del kit de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores de dicho kit, la detección de los biomarcadores se realiza mediante al menos uno de los métodos seleccionados entre: HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), LC/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, ELISA, DAS ELISA, inmunoprecipitación de proteínas, inmunoelectroforesis, Western Blot, inmunotinción de
- 10 proteínas, Northern Blot, PCR con transcripción reversa (RT-PCR), PCR cuantitativa (q-PCR), RIA (radioinmunoensayo), hibridación *in situ*, ensayo de protección frente a nucleasas, secuenciación masiva, técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas microarrays de ADN genómico, microarrays de proteínas, microarrays de ARN mensajero, microarrays de ADNc, microarrays de péptidos, microarrays de tejido, microarrays celulares o de transfección,
- 15 microarrays de anticuerpos, microarrays de lisados o suero, microarrays de proteínas de fase reversa, microarrays de péptidos o microarrays de genotipado, entre otros. En una realización más preferida, la detección del ARNm de los biomarcadores se realiza por PCR con transcripción reversa (RT-PCR) o PCR cuantitativa (q-PCR).

20 Descripción de las Figuras

Figura 1. Expresión proteica de FGFR1 y FGFR4 en líneas celulares de cáncer de pulmón. ADC = Adenocarcinoma, ESC = Carcinoma escamoso, I = Inmortalizadas, KRAS = KRAS mutadas, EGFR = EGFR mutadas, ALK = Portadoras de translocaciones EML4-ALK, TN = Triple negativas. Se usa tubulina como control de carga.

- 25 **Figura 2. Efecto de la sobreexpresión de FGFR4 en líneas de carcinoma epidermoide.** Curvas de crecimiento al 10% con suero fetal bovino (A), ensayo de clonabilidad (B) y ensayo de crecimiento libre de anclaje (C). Determinación de la activación de rutas de señalización oncogénicas (D) en presencia o ausencia de SFB, en las líneas de carcinoma escamoso en condiciones de sobreexpresión de FGFR4. EV= vector vacío, FGFR4 = sobreexpresión de
- 30 FGFR4, SFB=Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Figura 3. Efecto del silenciamiento de FGFR1 o FGFR4 en una línea de carcinoma epidermoide. Curvas de crecimiento al 10% de suero fetal bovino (A), clonabilidad (B) y crecimiento libre de anclaje (C). Análisis de la activación de rutas de señalización relacionadas

con FGFR (D) en presencia o ausencia de SFB. control= shRNA inespecífico, como control, shFGFR1=shRNA FGFR1, shFGFR4=shRNA FGFR4, SFB=Siero fetal bovino. Las muestras (a) y (b) se corresponden con dos shRNAs independientes para silenciar el mismo gen. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (*, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$).

5 **Figura 4. Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 y FGFR4 en líneas de ADC.** Curvas de crecimiento al 10% de SFB (A), clonabilidad (B) y crecimiento libre de anclaje (C). Estudio de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR por western blot (D) en presencia o ausencia de SFB. EV= vector vacío, FGFR1 = sobreexpresión de FGFR1, FGFR4 = sobreexpresión de FGFR4, SFB=Siero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (*, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$).

10 **Figura 5. Efecto del silenciamiento de FGFR1 o FGFR4 en una línea de adenocarcinoma no dependiente de EGFR.** Curvas de crecimiento al 10% de SFB (A), clonabilidad (B) y crecimiento libre de anclaje (C). Medida de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR (D). Control=shRNA inespecífico, shFGFR1 = silenciamiento de FGFR1, shFGFR4 = silenciamiento de FGFR4, SFB=Siero fetal bovino. Las muestras (a) y (b) se corresponden con dos shRNAs independientes para silenciar el mismo gen. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (*, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$).

15 **Figura 6. Caracterización de la expresión de E-cadherina y N-cadherina en líneas celulares de cáncer de pulmón.** ADC = Adenocarcinoma, ESC = Epidermoide, I = Inmortalizada, KRAS = KRAS mutada, EGFR = EGFR mutada, ALK = Portadora de translocación de ALK, TN = Triple negativo (ausencia de alteraciones en KRAS, EGFR o ALK).

20 **Figura 7. Efecto de la co-sobreexpresión de N-cadherina con FGFR1 o FGFR4 en líneas de adenocarcinoma.** Curvas de crecimiento al 10% de SFB (A), clonabilidad (B) y crecimiento libre de anclaje (C). Análisis de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR (D). EV1= vector vacío 1, EV2=vector vacío 2, CDH2=Sobreexpresión de N-cadherina, FGFR1=Sobreexpresión de FGFR1, FGFR4=Sobreexpresión de FGFR4, SFB=Siero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (*, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$).

25 **Figura 8. Efecto del silenciamiento de N-cadherina en una línea celular que sobreexpresa FGFR1 o FGFR4.** Curvas de crecimiento al 5% de FBS (A), ensayos de crecimiento libre de anclaje (B) y determinación de la activación de señalización oncogénica (C). (D) Crecimiento tumoral de xenoinjertos del panel de líneas estables generadas a partir de la línea de pulmón inmortalizada NL20 con diferentes combinaciones de expresión de N-cadherina, FGFR1 o FGFR4. Los p-valores se obtuvieron mediante la prueba T de Student con un intervalo de confianza del 95% y se encuentran representados por asteriscos (*,

35

p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001). EV1 = Control vector vacío 1, EV2 = Control vector vacío 2. FGFR1 = Sobreexpresión de FGFR1, FGFR4 = Sobreexpresión de FGFR4, shCDH2 = Silenciamiento de N-cadherina.

5 **Figura 9. Interacción de N-cadherina con FGFR1 o FGFR4.** (A) Ensayo de co-inmunolocalización de N-cadherina y FGFR1 o FGFR4 en la línea celular NL20 con sobreexpresión exógena de los receptores. (B) Co-inmunoprecipitación de N-cadherina con FGFR1 y FGFR4 en la línea celular H520.

10 **Figura 10. Asociación de la expresión de ARNm de N-cadherina y de FGFR1 o FGFR4 con la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (N=109).** El criterio para discernir entre baja y alta expresión es el valor de la mediana de expresión para cada gen medido en $2^{-\Delta CT}$. (A) Supervivencia libre de progresión y supervivencia global de la cohorte de pacientes en función de su expresión génica. (B) Asociación de la expresión de ARNm de N-cadherina con la supervivencia libre de progresión y supervivencia global en el subconjunto de pacientes de CPNM con alta expresión de FGFR1 o FGFR4 (N=89). CPNM =
15 Cáncer de pulmón no microcítico.

Figura 11. Asociación de la expresión de ARNm de N-cadherina y de FGFR1 y/o FGFR4 con la supervivencia en pacientes con adenocarcinoma. (A) Supervivencia libre de progresión y supervivencia global de una cohorte de pacientes con adenocarcinoma en función de su expresión génica. A la izquierda se muestran las curvas de supervivencia de los
20 pacientes con alto FGFR1 y alta o baja N-cadherina (N=245) y a la derecha se muestran las curvas de supervivencia de los pacientes con alto FGFR4 y alta o baja N-cadherina (N=366). (B) Asociación de la expresión de ARNm de N-cadherina con la supervivencia en el subconjunto de pacientes de ADC-TCGA que tienen alta expresión de FGFR1, FGFR4 o de ambos. ADC-TCGA = Cohorte de adenocarcinoma de *The Cancer Genome Atlas*.

25 **Figura 12. Asociación de la expresión de ARNm de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina con la supervivencia en una cohorte pacientes de carcinoma epidermoide de TCGA (N=504).** (A) Supervivencia libre de progresión y supervivencia global de la cohorte de pacientes en función de su expresión génica. A la izquierda se muestran las curvas de supervivencia de los
30 pacientes con alto FGFR1 y alta o baja N-cadherina (N=251) y a la derecha se muestran las curvas de supervivencia de los pacientes con alto FGFR4 y alta o baja N-cadherina (N=250). (B) Asociación de la expresión de ARNm de N-cadherina con la supervivencia en el subconjunto de pacientes de ESC-TCGA con alta expresión de FGFR1, FGFR4 o de ambos (N=373). ESC-TCGA = Cohorte de carcinoma epidermoide de *The Cancer Genome Atlas*.

35 **Figura 13. Efecto del tratamiento *in vitro* con inhibidores selectivos de FGFR en líneas con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 y niveles diferenciales de N-cadherina.** (A)

Efecto del tratamiento con inhibidores de FGFR (BGJ398 y AZD4547) en el crecimiento de líneas de adenocarcinoma y carcinoma epidermoide con expresión endógena de FGFR1 (H460), FGFR1 y FGFR4 (A549), FGFR1 y N-cadherina (H226) y FGFR1, FGFR4 y N-cadherina (H520). (B) Efecto del tratamiento con inhibidores de FGFR (BGJ398 y AZD4547) en el crecimiento de líneas de adenocarcinoma con expresión exógena de FGFR1 o FGFR4 (línea superior), o expresión exógena de N-cadherina y FGFR1 o FGFR4 (línea inferior).

Figura 14. Efecto del tratamiento *in vivo* con un inhibidor selectivo de FGFR en PDXs de pulmón con alta expresión de FGFR1 y FGFR4. (A) Western blot de la expresión de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina en los PDXs en estudio. (B) Efecto del tratamiento con AZD4547 en modelos de tumores derivados de pacientes (PDXs) baja expresión de N-cadherina. (C) Efecto del tratamiento con AZD4547 en modelos de tumores derivados de pacientes (PDXs) alta expresión de N-cadherina. (D) Gráfica que representa la variación del volumen de los tumores respecto al inicio del tratamiento, expresado en porcentajes. (E) Determinación por western blot del efecto del tratamiento en rutas de señalización relacionadas con FGFR. Los p-valores se obtuvieron mediante la prueba T de Student con un intervalo de confianza del 95% y se representan como Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). ADC = adenocarcinoma, ESC = carcinoma epidermoide.

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención muestra que la determinación del nivel de expresión de N-cadherina y la determinación del nivel de expresión de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 y/o FGFR4 mejora la selección de pacientes para una terapia anti-FGFR en el tratamiento del cáncer de pulmón. La invención muestra cómo este modelo predice la respuesta al tratamiento con inhibidores de FGFR de los pacientes, de acuerdo con una alta expresión de N-cadherina y además también una alta expresión de al menos uno de los FGFRs seleccionados entre FGFR1 y/o FGFR4. La alta expresión de los biomarcadores FGFR1 y/o FGFR4 puede ser debida a diferentes eventos que ocurran en la célula, como, por ejemplo, pero sin limitarse a ello: amplificación, inducción de la expresión a nivel transcripcional o traduccional, translocaciones génicas, etc.

Los criterios empleados actualmente a la hora de incluir pacientes en ensayos clínicos con inhibidores de FGFR son la amplificación de un FGFR específico, o la presencia de mutaciones o translocaciones en un FGFR concreto. Sin embargo, las únicas alteraciones que se asocian con buena respuesta a estos inhibidores son las mutaciones activadoras o translocaciones, las cuáles constituyen un porcentaje muy bajo de los pacientes. La

amplificación de FGFR1 ha sido el criterio más extendido de inclusión de pacientes de cáncer de pulmón en ensayos clínicos con inhibidores de FGFR. A pesar de la prevalencia inicialmente descrita de esta alteración en alrededor del 20% de los carcinomas epidermoides, en la práctica, solo el 5-10% de estos pacientes presentan esta alteración, reduciendo el número de pacientes a incluir en ensayos clínicos con estos inhibidores. Además, este criterio ha sido ampliamente criticado debido a los pobres resultados obtenidos en estos ensayos, con un porcentaje muy bajo de respuestas parciales. Los resultados descritos en la presente invención muestran que, aunque un tumor tenga amplificación y/o alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4, si no tiene alta expresión de N-cadherina, no va a responder a inhibidores de FGFR. De esta forma, determinar la expresión de N-cadherina en pacientes con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 definirá el grupo de pacientes que se beneficiarán de una terapia con inhibidores FGFR, lo que evitará tratar innecesariamente a pacientes que no van a responder al tratamiento, identificando el grupo de pacientes que responderán a la terapia y que, con los criterios actuales de selección de pacientes (amplificación de FGFR1) no son candidatos para el tratamiento.

Definiciones:

Biomarcador: Cualquier parámetro biológico que permite medir objetivamente la presencia de una actividad biológica. Por ejemplo, permite determinar si un tratamiento farmacológico va a ser eficaz o evaluar la tolerancia a un medicamento.

Cáncer de pulmón: Conjunto de enfermedades resultantes del crecimiento maligno de células del tracto respiratorio, en particular del tejido pulmonar. El cáncer de pulmón suele originarse a partir de células epiteliales, y puede derivar en metástasis e infiltración a otros tejidos del cuerpo. Los tipos de cáncer de pulmón se dividen en dos tipos:

- Carcinomas de células pequeñas o microcíticos: Se corresponde aproximadamente con un 20% de los cánceres de pulmón. Se localizan preferentemente en la zona central de los pulmones, pudiendo comprimir vasos u órganos localizados en ese nivel. Se caracterizan por su alta agresividad y crecimiento rápido.
- Carcinomas no microcíticos (CPNM): representan el 80% restante de los cánceres de pulmón. Los tipos más frecuentes son:
 - a) Carcinoma escamoso o epidermoide: Es la variedad de cáncer broncopulmonar más frecuente en España, representando el 40% de los carcinomas no microcíticos.
 - b) Adenocarcinoma: Representa el 30% de los carcinomas no microcíticos. Es el menos relacionado con el consumo de tabaco, pero, aun así, es más frecuente en fumadores.

- c) Carcinoma de células grandes: Se denomina así por el tamaño de las células que lo componen. Es el tipo menos frecuente de los carcinomas broncopulmonares, representando el 10% de ellos.

Expresión (o nivel de expresión): A efectos de la presente invención, se entiende como expresión a la presencia, detectable por las técnicas estándar conocidas en el estado del arte, de una proteína o un ARN mensajero.

Alta expresión: A efectos de la presente invención, se entiende como alta expresión a la presencia, detectable por las técnicas estándar conocidas en el estado del arte, de una proteína o un ARN mensajero, por encima de un valor de referencia, en comparación con una muestra de referencia, o respecto a la mediana de una población de referencia. Para que se considere que hay alta expresión de un biomarcador, ésta debe ser a menos 2 veces superior a la expresión de dicho marcador en la muestra de referencia.

Muestra de referencia: A efectos de la presente invención, se considera que la muestra de referencia con la que se compara la cantidad de proteína o ARN mensajero de un biomarcador analizado es aquella que tiene baja o nula expresión de dicho biomarcador. En la presente invención, pero sin por ello limitar el alcance de la invención, la muestra de referencia de un biomarcador determinado, consiste en la media aritmética de la cuantificación de la expresión de dicho biomarcador en al menos tres líneas celulares descritas previamente en el estado del arte porque no expresan dicho biomarcador, o porque lo hacen a un nivel que no tiene efecto en la célula. La muestra de referencia también puede obtenerse también a partir de muestras de uno o más individuos que presentan cáncer de pulmón no microcítico y no responden al tratamiento con inhibidores de FGFR, pueden ser líneas celulares, "pool" de células, se pueden obtener comercialmente, de un biobanco de tejidos o sangre, de estudios clínicos publicados para cohorte de individuos, o de muestras de referencia reconocidas en el sector como son las de la cohorte TCGA (*The Cancer Genome Atlas del National Cancer Institute y National Human Genome Research Institute*). En este caso en vez de la media aritmética se emplearía la mediana. Se Se considera "valor de referencia" al nivel de expresión de un biomarcador de la invención en la muestra de referencia.

Sobreexpresión: A efectos de la presente invención, se entiende como sobreexpresión a la expresión inducida de un gen en una línea celular, mediante la transfección con un plásmido que expresa el gen de interés. La sobreexpresión puede determinarse como un incremento en el ARNm que codifica una proteína determinada o un incremento en la cantidad de proteína.

Activación de un receptor: A efectos de la presente invención, se entiende que un receptor está activado cuando es capaz de ejercer su actividad tirosina quinasa, desencadenando las

5 cascadas de señalización celular específicas. La activación se produce en condiciones fisiológicas al unirse al receptor un ligando o agonista. Condiciones como las mutaciones en el receptor, o la sobreexpresión de éste, pero no limitándose a estas, pueden dar lugar a una activación constitutiva independiente de ligando, lo que da lugar a la activación de las cascadas de señalización celular aguas abajo del receptor, incrementando el efecto de las rutas en la célula. La activación constitutiva de receptores está relacionada con la aparición de enfermedades. Los inhibidores de un receptor disminuyen o eliminan su activación por lo que son comúnmente utilizados como fármacos en el tratamiento de enfermedades. Se han descrito mutaciones activantes en los genes *FGFR1* y *FGFR4* que podrían estar implicadas en la tumorigénesis del cáncer de pulmón. Sin embargo, se ha comprobado que pacientes que portan dichas mutaciones no necesariamente responden a un tratamiento con inhibidores de FGFR.

15 A efectos de la presente invención, las expresiones “anti-FGFR” e “inhibidor de FGFR” se consideran equivalentes por dirigirse a terapias cuyo efecto es el de disminuir o eliminar la activación de receptores FGFR.

A efectos de la presente invención, las expresiones “individuos” y “sujetos” se consideran sinónimos y se refieren a cualquier ser vivo animal. En una realización preferente, los “individuos” o “sujetos” en la presente invención se refieren a seres humanos.

20 En una realización, el presente documento describe un método *in vitro* para predecir la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón a un tratamiento con al menos un inhibidor de FGFR, que comprende:

- a) detectar en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto la expresión del biomarcador N-cadherina y además la expresión de al menos uno de los biomarcadores FGFR-1 y/o FGFR-4,
- 25 b) comparar el nivel de expresión de los biomarcadores determinados en (a) con una muestra de referencia,
- c) administrar al menos un inhibidor de FGFR a los sujetos que tienen expresión de los biomarcadores detectados superior a la expresión de los mismos biomarcadores en la muestra de referencia.

30 En una realización más preferida, el nivel de expresión de los biomarcadores N-cadherina y FGFR1 y/o FGFR4 se determina midiendo la cantidad de proteína de cada uno de ellos, o midiendo la cantidad de ARNm de los genes que codifican respectivamente dichas proteínas en la muestra. En una realización más preferida, las secuencias de los biomarcadores se pueden encontrar en las bases de datos de acceso público, con las que un experto medio en la materia está familiarizado. A modo de ejemplo, y sin por ello limitar el alcance de la presente

35

invención, la secuencia de la proteína N-cadherina, también conocida como Cadherina-2, se corresponde con el código P19022 (UniProtKB) o Secuencia de referencia NCBI NP_001783.2 (*National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine*). A modo de ejemplo, y sin por ello limitar la invención, la secuencia del ARN mensajero de N-cadherina se corresponde con la secuencia de referencia de NCBI NM_001792.4, la secuencia SEQ ID NO:1, o cualquiera que tenga un grado de identidad con ellas de al menos un 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a dicha secuencia. A modo de ejemplo, y sin por ello limitar el alcance de la presente invención, la secuencia de la proteína FGFR1, se corresponde con el código P11362 de UniProtKB o la Secuencia de referencia NCBI NP_075598.2. A modo de ejemplo, y sin por ello limitar la invención, la secuencia del ARN mensajero de *FGFR1* se corresponde con la secuencia de referencia de NCBI NM_023110.2, la secuencia SEQ ID NO:2, o cualquiera que tenga un grado de identidad con ellas de al menos un 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a dicha secuencia. A modo de ejemplo, y sin por ello limitar el alcance de la presente invención, la secuencia de la proteína FGFR4, se corresponde con el código P22455 de UniProtKB o con la Secuencia de referencia NCBI NP_002002.3. A modo de ejemplo, y sin por ello limitar la invención, la secuencia del ARN mensajero de *FGFR4* se corresponde con la secuencia de referencia de NCBI NM_002011.3, la secuencia SEQ ID NO:3 o cualquiera que tenga un grado de identidad con ellas de al menos un 80%, preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto a dicha secuencia. El grado de identidad entre dos secuencias se puede determinar por métodos convencionales, como, por ejemplo, BLAST (Altschul SF 1999).

En una realización de la invención el cáncer de pulmón es un carcinoma de pulmón no microcítico. En una realización más preferida, el carcinoma de pulmón no microcítico se selecciona entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso o epidermoide.

En una realización de la invención, la muestra analizada se selecciona entre sangre completa, plasma, suero, orina, esputo, sudor, lavado broncoalveolar, biopsia del tejido tumoral primario o metastásico. En una realización todavía más preferida, la muestra biológica es una biopsia del tumor primario del sujeto. A efectos de la presente invención, la sangre completa se define como aquella que contiene todos sus componentes, es decir, el plasma sanguíneo y todos los elementos formes (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas). El plasma se define como el componente líquido de la sangre, sin la fracción celular. El suero se define como el líquido obtenido después de la coagulación de la sangre y eliminación del coágulo. Difiere del plasma en la ausencia de factores de coagulación. La orina es una secreción líquida de color amarillo

que es secretada por los riñones como resultado de la depuración y el filtrado de la sangre; se acumula en la vejiga y se expulsa por la uretra. El esputo es la secreción procedente de la nariz, la garganta o los bronquios que se escupe de una vez por la boca en una expectoración. El sudor es el líquido transparente que expulsan las glándulas sudoríparas de la piel de los mamíferos y que se expulsa a través de los poros. El lavado broncoalveolar (LBA) se define como la instilación y posterior aspiración de líquido en uno o varios segmentos o subsegmentos pulmonares. Se estima que con la realización del LBA se toma muestra de alrededor de un millón de alvéolos (1% de la superficie pulmonar), obteniéndose aproximadamente 1 ml de secreciones reales pulmonares en el total del líquido recuperado.

5 La biopsia es un trozo de tejido o una parte de líquido orgánico que se extrae de un ser vivo, con fines diagnósticos o pronósticos. La biopsia de tejido tumoral primario es una biopsia del tumor en el lugar en el que se origina el cáncer, en este caso el pulmón. La biopsia de tejido tumoral metastásico se refiere a una biopsia de nódulos ganglionares obtenida mediante aguja o punción-aspiración de una muestra de tejido a partir de un nódulo en un ganglio, o una

10 biopsia del tumor en una parte del cuerpo distinta a la que originalmente se formó un cáncer. La muestra puede usarse fresca (directamente obtenida del sujeto), criopreservada, o fijada en formalina o conservada en parafina.

En una realización de la invención, la detección de los biomarcadores puede hacerse con cualquier método que refleje su presencia, como la detección del biomarcador en su forma

20 proteica o la detección del ARN mensajero que codifica dicha proteína (o fragmentos de los mismos). Son conocidos extensamente en el estado del arte métodos para la detección de este tipo de moléculas. A modo de ejemplo, pero no por ello limitando el alcance de la presente invención, la detección de los biomarcadores se puede realizar por cualquiera de los siguientes métodos: HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), LC/MS (cromatografía

25 líquida acoplada a espectrometría de masas, ELISA, DAS ELISA (ELISA tipo sándwich con doble anticuerpo), inmunoprecipitación de proteínas, inmunoelectroforesis, Western Blot, inmunotinción de proteínas, Northern Blot, PCR con transcripción reversa (RT-PCR), PCR cuantitativa (q-PCR), RIA (radioinmunoensayo), hibridación *in situ* o ensayo de protección frente a nucleasas, técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas o cualquier técnica

30 de “big data” (análisis masivo de datos basado en biochips o microarrays) tales como microarrays de ADN genómico, microarrays de proteínas, microarrays de ARN mensajero, microarrays de ADNc, microarrays de péptidos, microarrays de tejido, microarrays celulares o de transfección, microarrays de anticuerpos, microarrays de lisados o suero, microarrays de proteínas de fase reversa, microarrays de péptidos, microarrays de genotipado, entre otros.

35 En una realización más preferida, la detección del ARN mensajero de los biomarcadores se realiza por PCR con transcripción reversa (RT-PCR) o PCR cuantitativa (q-PCR). En una

realización de la invención, se considera que un biomarcador se encuentra altamente expresado en una muestra y sirve para la predicción de la respuesta del sujeto al tratamiento, si el nivel de los biomarcadores detectados en la muestra es al menos dos veces superior al nivel del mismo marcador en una muestra de referencia. En una realización más preferida, la expresión del biomarcador debe ser al menos 5 veces superior a la de la muestra de referencia. En una realización todavía más preferida, la expresión del biomarcador debe ser al menos 10 veces superior a la de la muestra de referencia.

En una realización de la invención, el sujeto que sufre cáncer de pulmón es un ser humano.

En otra realización de la invención, el inhibidor de FGFR empleado en el tratamiento del cáncer de pulmón se selecciona del grupo que comprende, sin limitar por ello el alcance de la invención: BGJ398, AZD4547, Debio-1347, Dovitinib, BLU9931, FIIN-2, JNJ-42756493, LY2874455, Ponatinib, BIBF1120, PD173074, PD166866, BLU554, S49076, NSC12, PHA-739358, TSU-68, BMS-540215, TKI-258, MK-2461, BMS-582664, AG 1296, SSR128129E, LY2874455 y SU5402.

La presente invención también describe la combinación del biomarcador N-cadherina y al menos un segundo biomarcador seleccionado entre FGFR1 y/o FGFR4 para uso en la predicción de la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón al tratamiento con inhibidores de FGFR. En una realización particular, el nivel de expresión los biomarcadores se seleccionan entre el nivel de ARNm y/o el nivel de proteína de N-cadherina y FGFR1 y/o FGFR4.

En una realización preferida del uso anterior, el cáncer de pulmón se selecciona entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso o epidermoide.

En una realización del uso anterior, los inhibidores de FGFR se seleccionan entre el grupo que comprende, sin limitar por ello el alcance de la invención: BGJ398, AZD4547, Debio-1347, Dovitinib, BLU9931, FIIN-2, JNJ-42756493, LY2874455, Ponatinib, BIBF1120, PD173074, PD166866, BLU554, S49076, NSC12, PHA-739358, TSU-68, BMS-540215, TKI-258, MK-2461, BMS-582664, AG 1296, SSR128129E, LY2874455 y SU5402.

La presente invención también describe un método para predecir si un sujeto que sufre cáncer de pulmón va a responder a un tratamiento con inhibidores de FGFR que comprende el uso del biomarcador N-cadherina, y además el uso de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 y/o FGFR4.

En una realización más preferida del método de predicción anterior, los niveles de expresión del biomarcador N-cadherina y además al menos otro biomarcador seleccionado entre FGFR1 y/o FGFR4 es indicativa de que el sujeto es respondedor al tratamiento.

5 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un kit para pronosticar y/o predecir la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón a un tratamiento con inhibidores FGFR que comprende:

- (a) medios para detectar en una muestra biológica obtenida del sujeto la expresión del biomarcador N-cadherina, por una parte, y la expresión de al menos uno de los biomarcadores FGFR-1 y/o FGFR-4 por otra,
- 10 (b) medios para comparar el nivel de expresión de los biomarcadores determinados en (a) con una muestra de referencia,
- (c) instrucciones para que un profesional médico administre el tratamiento con inhibidores de FGFR únicamente a aquellos sujetos que muestren alta expresión de N-cadherina y además alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4.

15 En una realización preferida de kit, los medios para detectar expresión de los biomarcadores se seleccionan del grupo que comprende anticuerpos para detectar las proteínas o sondas específicas para detectar el ARN mensajero de N-cadherina y FGFR1 y/o FGFR4 y reactivos para llevar a cabo la detección, tales como, por ejemplo, sondas y primers que reconocen específicamente dicho ARN mensajero. En una realización, las sondas para la detección del
20 ARN mensajero de los genes *CDH2*, *FGFR1* y/o *FGFR4* se seleccionan entre cualquier secuencia que hibride específicamente con el ARN de estos genes. A modo de ejemplo, se pueden usar ensayos tipo TaqMan específicos, como los descritos en la Tabla 1 (Thermo Fisher). En una realización preferida, el kit comprende primers para amplificar por PCR al menos parte de la secuencia del ARN mensajero que codifica la proteína N-cadherina y
25 además primers para amplificar por PCR al menos parte de las secuencias de ARN mensajero que codifican las proteínas FGFR1 y/o FGFR4. Las secuencias de los biomarcadores de la invención (ARN mensajero y proteína) son conocidas en el estado del arte y cualquier experto medio podría diseñar primers, sondas y anticuerpos para su detección.

En otra realización de la invención, referida al kit, los anticuerpos empleados para la detección
30 de las proteínas N-cadherina, FGFR1 y FGFR4 se seleccionan entre cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal que reconozca específicamente estas proteínas. A modo de ejemplo, los anticuerpos que reconocen los biomarcadores son los que se describen en la Tabla 2 de la presente memoria. En una realización preferida, el kit comprende anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen específicamente la proteína N-cadherina y además anticuerpos
35 monoclonales o policlonales que reconocen específicamente las proteínas FGFR1 y/o

FGFR4. Dichos anticuerpos pueden estar, o no, marcados con isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc.

5 En una realización de la invención referida al kit, los medios para comparar el nivel de expresión de los biomarcadores determinados con una muestra de referencia, se realiza mediante la cuantificación de los niveles de expresión de los biomarcadores previamente detectados en la muestra biológica y en la muestra de referencia. Los niveles de expresión pueden ser cuantificados mediante cualquier método convencional del estado del arte. A modo ilustrativo, pero no por ello limitando la invención, los niveles de los biomarcadores se
10 pueden cuantificar, por ejemplo, mediante programas específicos de cuantificación acoplados a los sistemas de detección previamente indicados.

En una realización de la invención referida al kit, las instrucciones para que un profesional médico administre el tratamiento con inhibidores de FGFR se refieren a un documento o programa de ordenador que, a partir de una tabla de valores y/o de un procesamiento de
15 datos, indique a partir de los mismos, si dicho tratamiento debe administrarse a un determinado paciente, cuya muestra biológica analizada en dicho kit, ha proporcionado los susodichos valores y/o datos.

En otra realización, la presente invención se refiere a un dispositivo para diagnosticar y/o pronosticar la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón a un tratamiento con
20 inhibidores de FGFR, que comprende los elementos necesarios para analizar:

- a) el nivel de expresión de N-cadherina y
- b) el nivel de expresión de FGFR1 y/o FGFR4

en una muestra biológica obtenida del sujeto que sufre cáncer de pulmón.

En una realización preferida el kit o el dispositivo de la invención puede contener
25 oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm y/o capaces de hibridar con la secuencia del gen *CDH2*, y además los genes *FGFR1* y/o *FGFR4* para la posterior amplificación por PCR.

Preferiblemente, el kit o dispositivo de la invención comprende al menos:

- a) un anticuerpo anti-N-cadherina y
- 30 b) un anticuerpo anti-FGFR1 y/o un anticuerpo anti-FGFR4

En una realización preferida de dicho kit o del dispositivo, el anticuerpo reconoce la proteína humana y puede ser humanizado o no humanizado, producido en ratón, o en conejo o en cualquier otra especie o sintético. En otra realización más preferida, el anticuerpo es monoclonal. En otra realización más preferida, el anticuerpo se encuentra marcado con un

fluorocromo. Más preferiblemente, el fluorocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, alofococianina, o cualquiera de sus combinaciones.

5 Más preferiblemente, el kit y el dispositivo de la presente invención comprende los medios necesarios para comparar el nivel de expresión detectado con una muestra de referencia.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de
10 los métodos descritos anteriormente.

En otra realización, la presente invención describe un método de tratamiento de un sujeto que sufre de cáncer de pulmón que comprende:

- (a) determinar la presencia del biomarcador N-cadherina en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto,
 - 15 (b) determinar la presencia de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 y/o FGFR4 en la misma muestra,
 - (c) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor de FGFR si el sujeto tiene expresión alta del biomarcador N-cadherina y además tiene expresión alta de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 y/o FGFR4, al compararlos con una muestra
20 de referencia,
- en la que la determinación de la presencia de los biomarcadores en las etapas (a) y (b) puede realizarse simultánea o secuencialmente.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón a un tratamiento con
25 inhibidores de FGFR que comprende determinar, en una muestra del sujeto, la expresión del biomarcador N-cadherina y además determinar la expresión de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 y/o FGFR4, comparar dicha expresión con una muestra de referencia, en el que la alta expresión de N-cadherina y además la alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 es indicativa de que el sujeto que sufre cáncer de pulmón va a responder al tratamiento.

30 En otra realización, la presente invención se refiere al uso de los biomarcadores N-cadherina, FGFR1 y FGFR4 para predecir si un sujeto que sufre cáncer de pulmón va a responder a un tratamiento con inhibidores de FGFR.

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado a los habitualmente entendidos por una persona experta en el campo de la invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos
10 pueden ser usados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes, no tienen carácter limitativo y por lo tanto no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. El término "comprende", además, incluye el término "consiste".

La presente invención demuestra por primera vez que la función pro-oncogénica de los genes
15 *FGFR1* y *FGFR4* en el cáncer de pulmón depende de la expresión de la proteína N-cadherina. En ausencia de ésta, ambos genes presentan generalmente un papel supresor tumoral. Una alta expresión de *FGFR1* en modelos de xenoinjertos derivados de pacientes de cáncer pulmonar muestra que la eficacia de un inhibidor selectivo de FGFR únicamente es constatable en pacientes con alta expresión de N-cadherina. En todas las realizaciones
20 anteriores de la invención o grupo de invenciones relacionadas entre sí, debe interpretarse que la "alta expresión de N-cadherina", "alta expresión de FGFR1" y "alta expresión de FGFR4" se refieren a que dicha expresión es, al menos, 2 veces superior a la expresión de los mismos biomarcadores en una muestra de referencia.

25 **EJEMPLOS**

Materiales y métodos

Análisis de la expresión génica

Extracción de ARN

30 Para la extracción del ARN de las líneas celulares se usó el reactivo Trizol (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el ARN se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 75% y fue resuspendido en agua DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato).

Para la extracción de ARN total de tejido fijado con formalina y conservado en parafina se desparafinaron las láminas de tejido tumoral mediante el uso de Xilol. El ARN total se extrajo usando el kit de extracción RecoverAll (Life Technologies), usando las instrucciones del fabricante para la extracción de ARN de tejido biológico.

- 5 Una vez extraído el ARN, su concentración se cuantificó por medio del equipo NanoDrop (ThermoScientific) y se conservó a -80°C para su posterior uso.

Retrotranscripción de ARN

Se retrotranscribieron las muestras de ARN usando el kit de retrotranscripción TaqMan Reverse Transcription (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada
10 reacción se utilizaron 1000 ng de RNA en 10 μL , con 10 μL de master mix, en un volumen final de 20 μL . Las reacciones fueron sometidas al protocolo de termociclación 10 minutos a 25°C , 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C .

Preamplificación del ADNc

El ARN extraído del tejido parafinado se preamplificó usando el kit TaqMan Preamp Master
15 Mix kit (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la reacción de amplificación fue de 10 μL y añadimos 100 ng de cDNA totales por reacción. Empleamos el protocolo de preamplificación de 14 ciclos descrito en las instrucciones del fabricante (10 minutos a 95°C , 14 ciclos de: 15 segundos a 95°C y 4 minutos a 60°C). Tras la preamplificación, las muestras se diluyeron 1:20 previamente a la realización de la PCR
20 cuantitativa.

PCR cuantitativa a tiempo real

Cada reacción de PCR a tiempo real se realizó por triplicado, según el protocolo indicado por el fabricante para las sondas Taqman (ThermoFisher) y la master mix de TaqMan para qPCR
25 (ThermoFisher). El volumen final de cada reacción fue de 10 μL , que contenían 5 μL de la master mix, 2,5 μL de la sonda TaqMan del gen en estudio y 2,5 μL de muestra de cDNA. La concentración de las muestras de cDNA fue de 25 ng/ μL en el caso de las muestras no preamplificadas. En las muestras previamente preamplificadas se usaron 2,5 μL de la dilución 1:20 de la reacción de preamplificación. Además, para cada sonda se llevó un control negativo sin muestra de cDNA, para descartar contaminaciones en el agua, en la master mix o en la
30 sonda. Se siguió un protocolo de termociclación de 40 ciclos (10 minutos a 95°C , 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C).

La cuantificación relativa de la expresión de ARNm se determina a partir de los valores Ct obtenidos en la reacción, definiendo Ct como el número del ciclo en el que se detecta señal

de amplificación del gen diana por encima de un umbral predeterminado, que permite discernir entre una señal de amplificación real y ruido. Para cada muestra se calculó la media de tres replicados técnicos para cada gen, y este valor medio de Ct se normalizó con el Ct del gen endógeno de control de carga (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, GAPDH, para extractos de líneas celulares y Beta-2-microglobulina, B2M, para extractos de tumores), obteniéndose el valor ΔCt . Los niveles de expresión se representaron en la forma $2^{-\Delta Ct}$ que es más intuitiva debido a que valores más altos de $2^{-\Delta Ct}$ indican mayor expresión del gen.

En el caso de la determinación de expresión de ARNm en extractos procedentes de líneas celulares, se calculó la media y desviación estándar de los valores de $2^{-\Delta Ct}$ procedentes de tres replicados biológicos independientes. Los ensayos empleados en la preamplificación y en la determinación de la expresión de ARNm están descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Ensayos usados para la determinación de la expresión de ARNm de los genes de interés.

Gen diana	Referencia	Proveedor
FGFR1	Hs00917379_m1	Life technologies
FGFR4	Hs01106908_m1	Life technologies
N-cadherina	Hs00983056_m1	Life technologies
E-cadherina	Hs01023894_m1	Life technologies
B2M	Hs99999907_m1	Life technologies
GAPDH	Hs99999905_m1	Life technologies

15 Análisis de proteínas

Para determinar la expresión de proteínas de las muestras, en primer lugar, se extrajeron las proteínas totales. Las células de las líneas celulares se lavaron con PBS dos veces y se añadió tampón de lisis (RIPA (Sigma), suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini EDTA-free, Roche) y un cóctel de inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP EASYpack, Roche) a la concentración recomendada por el fabricante. Los lisados celulares se recogieron mediante raspado, en hielo, y se añadieron a un tubo. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15.000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante (extracto proteico) se guardó en alícuotas a -80°C. La cuantificación de los extractos proteicos se realizó usando el método Bradford modificado (BioRad), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control concentraciones conocidas de albumina sérica (BSA).

Las proteínas totales de los tumores procedentes de xenoinjertos se obtuvieron añadiendo el tampón de lisis sobre el fragmento de tejido previamente pulverizado en un mortero pre-

enfriado con nitrógeno líquido para evitar la descongelación del fragmento, se incubó en hielo durante 2 horas, agitando cada 10 minutos, y se recogió el volumen en tubos de 2ml que se centrifugaron a 15.000 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos de tejido sin disgregar y el sobrenadante se guardó a -80°C. El buffer de extracción y el método de
5 cuantificación usados fueron los mismos que en el caso de la extracción proteica de líneas celulares.

Western blot

Se añadió a las muestras tampón de carga 5X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,0025% (Sigma)) y se desnaturalizaron
10 durante 5 minutos a 95°C. Entonces se procedió a su carga en el gel de electroforesis para realizar el western blot, o se almacenaron a -20°C.

La inmunodetección de proteínas se realizó de acuerdo a un protocolo estándar sobre membranas de PDVF (GE Healthcare). Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS utilizando un tampón de electroforesis 1X Tris HCl 0,13 M, glicina 0,95 M, SDS 0,5% y
15 se transfirieron a membranas de PDVF utilizando un equipo Trans-Blot Turbo (BioRad). La transferencia se realizó a 400 mA durante 3 horas en tampón de transferencia (TrisHCl 0,025 M, glicina 0,2 M, 20% metanol). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en agitación con el tampón de bloqueo (TBS, 0,1% Tween20 y 1% de BSA). Posteriormente las membranas se incubaron con la dilución adecuada de anticuerpo primario durante 16 horas a
20 4°C. Tras esta incubación, las membranas se lavaron con buffer de lavado (TBS 0,1% Tween-20) y se incubaron con una dilución 1:5.000 del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa apropiado, durante una hora a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante una reacción quimioluminiscente (ECL Clarity, Biorad) y la visualización mediante un equipo de detección de luminiscencia (ChemiDoc, BioRad).

25 Los anticuerpos empleados en los ensayos aquí descritos se indican en la Tabla 2.

Para cuantificar las bandas detectadas en los ensayos de western blot, se utilizó el software incluido en el equipo de detección de quimioluminiscencia (ImageLab, BioRad). Se cuantificó el volumen de la banda de la proteína de interés y éste fue normalizado con el volumen de la banda correspondiente al gen de expresión constitutiva, que sirvió como control de carga (alfa
30 tubulina, también llamado tubulina).

El valor de referencia de un biomarcador en una muestra de referenciase calcula a partir del valor de la cuantificación de su expresión en tres líneas celulares que no expresan o tienen un nivel de expresión que no tiene efecto en la célula. Los valores de esta cuantificación se normalizan como se ha indicado anteriormente y se calcula la media aritmética de la expresión

normalizada del biomarcador en las tres líneas celulares. En el caso de los biomarcadores FGFR1 y de FGFR4, la expresión de la muestra de referencia se ha calculado a partir de las líneas celulares H2009, H358 y H1650. En el caso de N-cadherina, la muestra de referencia se ha calculado a partir de la expresión del biomarcador en las líneas celulares A459, H460 y H2009.

Tabla 2: Anticuerpos empleados para determinar la expresión proteica de las proteínas de interés

Proteína diana	Tipo anticuerpo	Peso mol.	Ref.	Proveedor	Diluc. western blot	Diluc. inmunofl
FGFR1	Mon. conejo	150 kDa	9740	CST	1:1000	1:100
FGFR4	Mon. conejo	100 kDa	8562	CST	1:1000	1:100
pFGFR1 (Tyr653/654)	Pol. conejo	150 kDa	06-1433	Millipore	1:2000	-
pFGFR4 (Tyr642)	Pol. conejo	100 KDa	MBS856043	MyBiosource	1:2000	-
AKT	Pol. conejo	60 KDa	9272	CST	1:1000	-
pAKT (Ser473)	Pol. conejo	60 KDa	9271	CST	1:1000	-
p42/p44 (ERK1/2)	Pol. conejo	42/44 kDa	9102	CST	1:1000	-
p-p42/p44 (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Pol. conejo	42/44 kDa	9101	CST	1:1000	-
STAT3	Mon. ratón	80 kDa	9139	CST	1:1000	-
pSTAT3 (Tyr705)	Pol. conejo	80 kDa	9145	CST	1:1000	-
N-cadherina	Mon. conejo	135 kDa	13116	CST	1:1000	-
N-cadherina		135 kDa		ThermoFisher	-	1:100
E-cadherina	Mon. conejo	125 kDa	3195	CST	1:1000	-
α -Tubulina	Mon. ratón	55 kDa	T9206	Sigma	1:5000	-
Sec. anti-conejo (HRP)	Pol. cabra		7074	CST	1:5000	-
Secundario anti-ratón (HRP)	Pol. caballo		7076	CST	1:5000	-
Sec. anti-conejo (Alexa Fluor 488)	Pol. cabra		R37116	ThermoFisher	-	1:250
Sec. anti-ratón (Alexa Fluor 555)	Pol. burro		A-31570	ThermoFisher	-	1:250

Mon = Anticuerpo monoclonal. Pol = anticuerpo policlonal. Peso mol = peso molecular. Ref = referencia. Diluc = Dilución. Inmunofl = inmunofluorecencia. HRP = peroxidasa de rábano.

10

Biología celular

Se utilizó un panel de líneas celulares que contiene dos líneas celulares de pulmón inmortalizadas, cuatro líneas de carcinoma epidermoide de pulmón y trece líneas de adenocarcinoma, cuyas características se recogen en la Tabla 3.

15

Tabla 3: Líneas celulares de pulmón

Línea celular	Tipo histológico	Mutación conductora descrita	Ref.	Medio de cultivo
A549	ADC	KRAS p.G12S	Helfrich 2006	DMEM suplementado con piruvato de sodio, HEPES y aminoácidos no esenciales
H460	ADC	KRAS p.Q61H	Helfrich 2006	RPMI 1640
H2009	ADC	KRAS p.G12A	COSMIC	RPMI 1640
H358	ADC	KRAS p.G12C	Helfrich 2006	RPMI 1640
H1650	ADC	EGFR E746-E750 del	Blanco 2009	RPMI 1640
H1975	ADC	EGFR L858R/T790M	COSMIC	RPMI 1640
HCC827	ADC	EGFR E746-E750 del	Helfrich 2006	RPMI 1640
H3122	ADC	Translocación EML4-ALK v1	COSMIC	RPMI 1640
H2228	ADC	Translocación EML4-ALK v3	COSMIC	RPMI 1640
H1781	ADC			
H1437	ADC			
Calu-3	ADC	TN	Helfrich 2006	DMEM
Calu-1	ESC	KRAS p.G12C	COSMIC	McCoy's 5a
HTB59	ESC	KRAS p-G12V	COSMIC	McCoy's 5a
H520	ESC	TN	COSMIC, Helfrich 2006	RPMI 1640
H226	ESC	TN	COSMIC, Helfrich 2006	RPMI 1640
NL20	I	TN	COSMIC	F12 suplementado siguiendo las indicaciones de la ATCC
NuLi-1	I	TN	COSMIC	LHC9

ADC = Adenocarcinoma, ESC = Carcinoma epidermoide, TN = Triple negativo (nomenclatura referida a líneas celulares sin alteraciones en KRAS, EGFR o ALK), I = Inmortalizada

Cultivo de las líneas celulares

- 5 Las líneas celulares se cultivaron siguiendo las indicaciones de la ATCC, con excepción de A549, suplementando además todos los medios con 40u/mL de penicilina (Sigma), 40 µg/mL de esteptomicina (Sigma) y 1 µg/mL de anfotericina B (Sigma), y con glutamina (Sigma) en el caso de los medios que no incluían en su composición glutamina estable. A549 se cultivó en medio DMEM suplementado con HEPES 0,01M (Sigma), piruvato de sodio 1mM (Sigma) y aminoácidos no esenciales 1X (Sigma), además de los suplementos anteriormente descritos.
- 10 Las células se cultivaron en placas de 10 cm y se subcultivaron 1:4 cada 2-3 días mediante

tratamiento con tripsina. La manipulación de las líneas celulares se realizó en una cabina de flujo laminar de tipo II-Bio-II-A (nivel de bioseguridad 2) y su cultivo se realizó en incubadores (ThermoScientific, Series 8000 Water-Jacketed CO₂ Incubators) al 95% de humedad relativa y al 5% de CO₂.

- 5 Los ensayos en los que se estimularon las líneas celulares con suero fetal bovino (SFB) se sembraron y al alcanzar un 60-70% de confluencia se incubaron durante 5 horas con medio sin SFB. Entonces, por un lado, se obtuvieron extractos proteicos correspondientes al estado basal, y por otro lado se procedió a la estimulación con SFB al 10%. Las células se estimularon durante 15 minutos y se procedió a la extracción proteica (explicada anteriormente).

10 *Transfección celular*

Las líneas celulares se transfectaron con los plásmidos descritos en la Tabla 4. Para ello se empleó el reactivo de transfección TransIT-X2 (Mirus), siguiendo las instrucciones del fabricante. 24 horas antes de la transfección se sembraron las células en placas de 6 pocillos, buscando aproximadamente un 40% de confluencia en cada pocillo para el día de la transfección. Antes de la transfección, se cambió el medio a las células añadiendo 2,5 mL de medio. A continuación, se añadieron las partículas de transfección con el ADN y las células se incubaron con éstas durante 72 horas. Tras este tiempo, las células se pasaron a placas de 10 cm y, una vez adheridas a la placa (tras unas 24 horas), se añadió medio fresco con el antibiótico de selección a la concentración adecuada. Como control negativo de la transfección se utilizó una placa con la línea celular sin transfectar también expuesta al medio de selección. Durante el proceso de selección de las células transfectadas (3 o 4 semanas), el medio de cultivo con antibiótico se fue renovando 3 veces por semana. Tras este periodo, se comprobó que en el control negativo ninguna célula sobreviviera. Las colonias generadas se tripsinizaron y se resembraron en una nueva placa, estableciendo un *pool* de los diferentes clones transfectados, con el que se constituyó una línea celular transfectada estable. En la línea generada se confirmó la sobre-expresión o el silenciamiento realizado de acuerdo con los ejemplos descritos a continuación y se criopreservó. Durante el cultivo de las líneas generadas se mantuvo en presencia de antibiótico de selección a la mitad de concentración de la utilizada durante la selección. En cada transfección se utilizó el antibiótico apropiado según el plásmido transfectado a la concentración adecuada según la línea celular (Tabla 5): puromicina (Calbiochem), blastomicina (Sigma) o G418 (Santa Cruz). En el caso de las transfecciones con plásmidos con un gen reportero (GFP) se amplificaron las células y posteriormente se separaron las transfectadas mediante un separador celular por citometría de flujo usando el equipo BD LSRFortessa (BD).

En el caso de las transfecciones de RNAs de interferencia (“short hairpin shRNAs”, shRNAs), se generaron dos líneas celulares estables con silenciamiento de la expresión del gen de interés, utilizando en cada una un shRNA diferente, a fin de asegurar que los efectos observados no derivaban del silenciamiento inespecífico de la expresión de un gen diferente.

- 5 La transfección se llevó a cabo utilizando los plásmidos pRS (puromicina) o pB-RS (blastomicina) de acuerdo con la Tabla 4.

10 En el caso de las co-transfecciones de más de un plásmido en una misma línea celular, las transfecciones se realizaron de forma independiente y subsecuente. Los antibióticos de selección de los plásmidos transfectados se mantuvieron en el medio a la concentración de mantenimiento para mantener una presión selectiva, combinando dos o tres antibióticos. El único momento en que el/los antibióticos de selección no estuvieron presentes fueron durante el periodo de incubación de las células con el reactivo de transfección (72 horas), ya que éstos podrían interferir con la transfección, disminuyendo su eficiencia.

Tabla 4. Plásmidos empleados en los ensayos

Nombre	Vector	Método de selección	Ref.	Proveedor	Uso
pCMV6	pCMV6	G418	PS100001	Origene	Control sobreexpresión de FGFR1 y FGFR4
pCMV6-FGFR1	pCMV6	G418	RC202080	Origene	Sobreexpresión de FGFR1
pCMV6-FGFR4	pCMV6	G418	RG204230	Origene	Sobreexpresión de FGFR4
pRS scramble shRNA	pRS	Puromicina	TR20003	Origene	Control del silenciamiento de FGFR1 y FGFR4
pRS-shRNA-FGR1	pRS	Puromicina	TR320354	Origene	Silenciamiento por shRNA de FGFR1
pRS-shRNA-FGFR4	pRS	Puromicina	TR320356	Origene	Silenciamiento por shRNA de FGFR4
PL-SIN-PGK-EGFP	PL-SIN-PGK	GFP	#21316	Addgene	Control de la sobreexpresión de N-cadherina
pCCL-c-MNDU3c-PGK-EGFP-N-cadherin	pCCL-c-MNDU3c-PG	GFP	#38153	Addgene	Sobreexpresión de N-cadherina
pB-RS	pB-RS	Blasticidina	TR30024	Origene	Control del silenciamiento de N-cadherina y E-cadherina
pB-RS shRNA N-cadherin	pB-RS	Blasticidina	HC138304	Origene	Silenciamiento de N-cadherina
pB-RS shRNA E-cadherin	pB-RS	Blasticidina	HC138277	Origene	Silenciamiento de E-cadherina

15

Los vectores control se corresponden con los vectores vacíos.

Tabla 5: Concentraciones de antibióticos empleadas.

Línea celular	G418	Puromicina	Blasticidina
A549		2 ug/mL	
H460	2 mg/mL		
H2009	1 mg/mL		3 ug/mL
H1650	1 mg/mL		
H1975	1 mg/mL		
HCC827	1 mg/mL		
H3122	2 mg/mL		3 ug/mL
Calu-3		2 ug/mL	
Calu-1	1 mg/mL		
H520		2 ug/mL	2 ug/mL
H226	1 mg/mL		
NL20	1 mg/mL	1 ug/mL	2 ug/mL

Ensayos de tumorigenicidad

Los ensayos de tumorigenicidad se repitieron un mínimo de tres veces a fin de confirmar los resultados. Además, dentro de cada repetición del experimento, cada condición se sembró por triplicado.

a) Curva de crecimiento

Se sembraron 3500 células por pocillo en placas de 12 pocillos. A las 24 horas (día 0) se fijaron las células del primer punto de la curva, y cada 24-48 horas se fijó un nuevo punto de la curva y se cambió el medio al resto. Las placas fijadas se conservaron con las células en PBS a 4°C hasta que todos los puntos de la curva estuvieron fijados. A continuación, se tiñeron las placas con cristal violeta durante 20 minutos, las placas se lavaron y se dejaron secar. Una vez secas, se añadió ácido acético al 20% en cada pocillo para diluir el cristal violeta y se midió la absorbancia a 595 nm en un equipo de lectura óptica VICTOR (PerkinElmer). Todas las absorbancias se normalizaron con respecto a la absorbancia del día 0 de cada condición experimental. Por último, se representó este valor normalizado (crecimiento relativo al día 0 en el eje Y) con respecto al tiempo (días, eje X).

b) Ensayo de clonabilidad

Se sembró un número de células de entre 1.000 y 5.000 células, según la línea celular, en placas de 10 cm. El medio se renovó una vez a la semana durante 2 o 3 semanas dependiendo de la línea celular. Tras este tiempo, las células se fijaron con una solución de glutaraldehído en PBS al 0,5% durante 20-30 minutos y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% en agua. Tras lavar y secar las placas, se cuantificó el número de colonias.

c) Crecimiento libre de anclaje (Ensayo de agar blando)

Se resuspendieron 100.000 células/pocillo en medio con agarosa al 0,35%, que se sembraron sobre una base de medio con agarosa al 0,7% previamente solidificado en placas de 6 pocillos. Tras 24 horas se añadieron 3 mL de medio completo a cada pocillo, que se renovó
5 dos veces por semana. Tras uno o dos meses, dependiendo de la línea en ensayo, se tomaron fotos de las colonias por medio de un microscopio (#IX2-SLP, Olympus) con cámara integrada (#U-CMAD3, Olympus). En estas fotos se cuantificó el número de colonias y se determinó su tamaño. El resultado se representa en una gráfica que muestra el número de colonias relativo (respecto al tiempo 0) de las células que sobreexpresan o inhiben la expresión de un gen
10 comparado con las células control, transfectadas con el vector vacío. Se determinó si la diferencia en el número relativo de colonias respecto al control es estadísticamente significativa (*p-valores menores de 0,05, ** p-valores menores de 0,01, y *** p-valores menores de 0,001).

Co-inmunolocalización

15 Se sembraron las células en cubreobjetos estériles y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos. Tras dos lavados con PBS, las células se impermeabilizan con una solución al 0,1% de Tritón X-100 en PBS durante 5 minutos. A continuación, se incuban durante una hora en solución de bloqueo (PBS, 0,1% Tritón X-100, 1% SAB) a temperatura ambiente. Posteriormente, se incuban con la dilución apropiada en
20 solución de bloqueo de anticuerpo primario, durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS 0,1% Tritón X-100 de 5 minutos de duración y en agitación, se incubaron las células con el anticuerpo secundario a la dilución apropiada, en solución de bloqueo, 1 hora a temperatura ambiente. En un microscopio confocal (SP5-WLL), se realizan fotos de al menos 20 células por condición experimental en las distintas réplicas del experimento para
25 analizar la co-localización de las proteínas en estudio.

Co-Inmunoprecipitación de proteínas de membrana

Se extrajeron las proteínas totales tal y como se ha descrito anteriormente, pero usando un tampón de extracción 50 mM HEPES, 150 mM NaCl y al 1% de n-octilglucósido, suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini EDTA-free, Roche) y de fosfatasa
30 (PhosSTOP EASYpack, Roche). Se cuantificó la concentración de proteínas totales de los extractos como se indica previamente y se prepararon alícuotas de 2 mg. En estas alícuotas, se realizó un pre-aclareamiento proteico mediante una incubación con 10 µL de resina EZ View Red Protein G Affinity Gel (Sigma), que se utilizó como sustrato de inmunoprecipitación durante 2 horas a 4°C en agitación suave. A continuación, se retiró la resina mediante

centrifugación a 6000 g a 4°C durante 1 minuto. En paralelo al pre-aclaramiento, se conjugó la resina con el anticuerpo primario contra la proteína a inmunoprecipitar (anti-N-cadherina, descrito en la Tabla 2), incubando 10 µL de resina con 2 µg de anticuerpo por cada mg de proteína en la muestra en tampón de lisis al 3% de seroalbúmina bovina (SAB), durante 2 horas en agitación suave a 4°C. Como control negativo de la inmunoprecipitación, se utilizó una alícuota de la muestra proteica incubada con partículas conjugadas a un anticuerpo inespecífico del mismo isotipo que el anticuerpo contra la proteína de interés, a la misma concentración que éste. A continuación, se realizaron tres lavados de la resina conjugada con el anticuerpo con tampón de lisis, centrifugando entre lavados 1 minuto a 6000 g a 4°C para retirar el tampón usado y añadir nuevo. Posteriormente, se incubó la resina conjugada con el anticuerpo con la muestra durante 16 horas en agitación suave a 4°C. A continuación, se realizaron 5 lavados de la resina con el inmunoprecipitado resuspendiéndolo en tampón de lisis y posterior centrifugando 1 minuto a 6000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 20-30 µL de tampón de lisis y se añadió tampón de carga 5X, como indicado anteriormente. Se hirvieron las muestras 5 minutos a 95°C y se centrifugaron a 12000 g durante 3 minutos. El sobrenadante se usó para realizar un western blot, tal como se ha descrito anteriormente, con el objetivo de detectar con anticuerpos específicos anti-N-cadherina, anti-FGFR1 y anti-FGFR4 la presencia de los biomarcadores en cada etapa de la inmunoprecipitación. De esta forma, se detecta si hay biomarcadores que co-inmunoprecipiten con N-cadherina, indicando una unión en la membrana celular. Como controles de la inmunoprecipitación, se conservaron dos alícuotas del extracto proteico, una anterior y otra posterior a la inmunoprecipitación.

Técnicas de experimentación animal

Todos los procedimientos realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Protección Animal de la Comunidad autónoma de Madrid (PROEX134/16).

a) Xenoinjertos con líneas celulares en ratones inmunodeprimidos

Se contaron las células de la línea celular a xenoinjertar y se preparó a una concentración final de 2 millones de células en 100 µL de PBS. A continuación, se añadió solución de Matrigel (BD, #356234) a la suspensión celular, a razón de 1:1, y se inyectaron subcutáneamente 200 µL en ambos flancos de ratones desnudos inmunodeprimidos de 5-6 semanas de edad, bajo anestesia por inhalación de isoflurano.

b) Xenoinjertos de tumores derivados de pacientes (PDXs)

Los tumores, provenientes de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, se implantan cubiertos de Matrigel (BD, #356234) en el flanco de ratones desnudos inmunodeprimidos de 5-6 semanas de edad, bajo anestesia por inhalación de isofluorano y bajo analgesia por buprenorfina. Para realizar el implante, se realiza un pequeño corte en el flanco del ratón bajo anestesia y analgesia y se introduce el fragmento tumoral, de unos 100-150 mm³ de volumen.

c) Determinación del crecimiento tumoral de los xenoinjertos

El tamaño de los tumores generados por los xenoinjertos se midió semanalmente mediante un calibre de medición. Se midió la longitud más corta y la más larga de cada tumor y el volumen tumoral se calculó con la fórmula: 0,5 x (dimensión más larga) x (dimensión más corta)².

Se representó la media de los volúmenes tumorales normalizados con respecto al tiempo. Ésta se calculó normalizando el volumen tumoral de cada medida a la primera medida realizada (7 días tras la implantación). El error medio se calculó con la fórmula: desviación estándar/ \sqrt{n} , donde n es el número de tumores en cada grupo.

Una vez que los tumores alcanzaron los 1000 mm³ de volumen, los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos. Las muestras tumorales fueron troceadas y se congelaron rápidamente en criotubos, para su conservación a -80°C y posterior extracción de ARN o proteína.

d) Tratamientos de PDXs

Se realizaron tratamientos el inhibidor selectivo de FGFR AZD4547 para comprobar su efecto en el crecimiento de los tumores (PDXs). Para esto, se implantó el modelo de interés en 4-6 ratones por grupo de tratamiento a realizar como se indica anteriormente y se monitorizó el crecimiento de los tumores generados. Al alcanzar éstos un volumen de entre 100 y 150 mm³, los ratones se distribuyeron en los diferentes grupos de tratamiento, incluyendo en cada grupo aquéllos cuyo tamaño tumoral tiene una media y desviación estándar similar, y dejando un grupo control tratado con el vehículo, como referencia. Tras el establecimiento de los grupos, se comenzaron los tratamientos, de entre 3 y 5 semanas de duración, dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada modelo y del fármaco o fármacos utilizados.

La concentración de AZD4547 utilizada fue de 7,5 mg/kg/día administrado de lunes a viernes. La vía de administración del fármaco fue oral. Al final del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los tumores procesados y almacenados tal como se ha indicado anteriormente.

El crecimiento de los tumores se muestra mediante gráficas de crecimiento tumoral frente al tiempo, donde se relativiza cada medida del volumen tumoral a la inicial tras comenzar el tratamiento, y se representa la media y el error medio para cada grupo de tratamiento. La variación de volumen tumoral se representa mediante gráficos de barras, que muestran el incremento (o decrecimiento), expresado en porcentaje, del volumen de cada tumor con respecto al volumen inicial, en cada grupo de tratamiento.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete de software estadístico SPSS (IBM), usando los test estadísticos que se detallan a continuación para obtener los p-valores. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos por debajo de 0,05, y estos valores se representaron gráficamente como * para p-valores < 0,05, ** para p-valores < 0,01 y *** para valores < 0,001.

a) Análisis de los experimentos in vitro e in vivo

Para analizar si las diferencias encontradas entre las diferentes condiciones testadas en los experimentos *in vitro* son estadísticamente significativas, se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, en los valores correspondientes a las réplicas biológicas independientes de los experimentos.

Para analizar si las diferencias de crecimiento de los tumores de las diferentes condiciones experimentales en los ensayos *in vivo* alcanzaban la significancia estadística, se realizó el mismo test en los valores correspondientes a los valores normalizados de los tamaños tumorales.

b) Análisis de las cohortes clínicas

Respecto a los datos clínicos, se usó el método de Kaplan Meier para el análisis de la supervivencia, usando el modelo de Log-Rank y el modelo de Cox de riesgos proporcionales para ajustar a las variables explicativas y obtener los p-valores. La supervivencia global se definió como el periodo de tiempo entre el diagnóstico y la última revisión clínica o fallecimiento, y la supervivencia libre de progresión se definió como el periodo de tiempo entre el diagnóstico inicial y el diagnóstico de recidiva.

30

Ejemplo 1. Efecto de la expresión de los genes FGFR1 y FGFR4 en tumorigénesis en carcinoma escamoso de pulmón

Para comprobar el efecto de FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón, se analizó el efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de estos genes en diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón.

5 En primer lugar, se analizó la expresión endógena de FGFR1 y FGFR4 en las 18 líneas celulares diferentes descritas en la Tabla 3. 16 líneas celulares son de cáncer pulmonar no microcítico provenientes de las dos histologías más representativas de esta patología, adenocarcinoma y carcinoma escamoso o epidermoide. Se seleccionaron líneas celulares con las diferentes alteraciones moleculares de mayor relevancia terapéutica en cáncer de pulmón (mutación en KRAS, mutación en EGFR, translocación EML4-ALK, o líneas sin ninguna de las alteraciones citadas, a las que denominaremos “triple negativa”), y dos líneas celulares de 10 pulmón inmortalizadas.

Se determinó la expresión de FGFR1 y FGFR4 a nivel proteico. Para ello se extrajeron las proteínas totales de las líneas celulares, se desnaturalizaron y se detectó la presencia de FGFR1 y FGFR4 mediante western blot utilizando los anticuerpos monoclonales anti-FGFR1 y anti-FGFR4 descritos en la Tabla 2. Como control de carga se utilizó tubulina. 15

Como se observa en la **Figura 1**, la expresión proteica de FGFR1 en las líneas celulares de adenocarcinoma (ADC) es baja en comparación con las líneas de carcinoma epidermoide (ESC). La expresión proteica de FGFR4 es menos frecuente y no es representativa de ninguno de los tipos histológicos en estudio.

20 A continuación, se cuantificaron las bandas detectadas en el ensayo de western blot tal y como se ha descrito en los materiales y métodos de la presente memoria. Como muestra de referencia para evaluar la expresión de FGFR1 y de FGFR4, se usó la media de la expresión de estos receptores normalizada con tubulina en las líneas celulares H2009, H358 y H1650. En el caso de N-cadherina, la muestra de referencia fue la media de la expresión del 25 biomarcador normalizada con tubulina en las líneas celulares A459, H460 y H2009.

Tabla 6. Cuantificación de la expresión de los biomarcadores en las muestras de referencia

	Línea celular	Expresión normalizada con tubulina	Desviación estándar	Valor de referencia
FGFR1	H2009	0,13	0,16	0,557
	H358	0,22	0,11	
	H1650	1,32	0,35	
FGFR4	H2009	0,23	0,21	0,163
	H358	0,17	0,09	
	H1650	0,09	0,05	
N-cadherina	A549	3,37	1,45	1,25
	H460	0,22	0,14	
	H2009	0,16	0,11	

Para determinar el papel de FGFR4 en las líneas celulares de carcinoma epidermoide se seleccionaron las líneas celulares de carcinoma epidermoide H226 (Triple negativa) y Calu-1 (KRAS mutada) para sobreexpresar en ellas el gen FGFR4. La sobreexpresión del gen FGFR4 se llevó a cabo trasfectando las líneas celulares con el plásmido pCMV6-FGFR4 descrito en la Tabla 4. A continuación, las células se cultivaron y se analizaron las características tumorigénicas de las muestras mediante curvas de crecimiento, ensayos en agar blando y análisis de la expresión de las rutas de señalización pro-oncogénicas.

La **Figura 2** muestra el crecimiento relativo de las líneas celulares de carcinoma epidermoide de pulmón H226 (parte superior) y Calu-1 (parte inferior) a lo largo del tiempo. Se observa cómo las muestras que sobreexpresan FGFR4 tienen mayor crecimiento celular (**Figura 2A**), clonabilidad (**Figura 2B**) y capacidad de generar colonias en crecimiento libre de anclaje (**Figura 2C**) que las líneas control (transfectadas con el vector vacío (EV)). La sobreexpresión de este gen induce su propia sobreactivación, además de la de diferentes rutas de señalización pro-oncogénicas, tal y como lo demuestra la expresión de las proteínas pSTAT3, pAKT y p-p42/p44 (**Figura 2D**). Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las colonias de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. Los p-valores se obtuvieron mediante la prueba T de Student con un intervalo de confianza del 95% y se representan como * los p-valores menores de 0,05, como ** los p-valores menores de 0,01, y como *** los p-valores menores de 0,001.

Con el fin de ahondar en el efecto pro-oncogénico de FGFR1 y FGFR4 en las propiedades tumorigénicas de las líneas celulares de carcinoma epidermoide, se silenció la expresión de FGFR1 y FGFR4 de forma independiente en una línea con alta expresión endógena de ambos genes, la H520 (**Figura 1**). El silenciamiento de los genes se realizó tal y como se he descrito en los Materiales y métodos presentes en esta memoria, empleando el vector pRS scramble shRNA como control, y los vectores pRS-shRNA-FGFR1 y pRS-shRNA-FGFR4 para el silenciamiento de los genes FGFR1 y FGFR4 respectivamente.

La **Figura 3A** muestra el crecimiento relativo de la línea H520 con el gen FGFR1 silenciado (parte superior) y con el gen FGFR4 silenciado (parte inferior) a lo largo del tiempo en medio con SFB 10%. Se observa que el crecimiento de las líneas celulares con alguno de los FGFRs silenciado es menor que las células control. Este efecto es especialmente acusado en el caso del silenciamiento de FGFR4. En los ensayos de crecimiento libre de anclaje (**Figura 3C**) y de clonabilidad (**Figura 3B**) se observa igualmente una menor capacidad tumorigénica de las líneas con alguno de los FGFR silenciados, en comparación con la línea control. En cuanto a la activación de rutas de señalización oncogénicas en estudio, se observó que el silenciamiento de cualquiera de los dos genes produce una disminución de la activación del receptor FGFR silenciado, así como de las rutas de STAT3, AKT y p42/p44 (**Figura 3D**). Las muestras (a) y (b) de los experimentos de la Figura 3 se corresponden con dos shRNAs independientes para silenciar el mismo gen, con el fin de evitar que el efecto observado sea derivado de silenciar inespecíficamente un gen diferente. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las colonias de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. Los p-valores se obtuvieron mediante la prueba T de Student con un intervalo de confianza del 95% y se representan como * los p-valores menores de 0,05, como ** los p-valores menores de 0,01, y como *** los p-valores menores de 0,001.

Estos datos confirman el papel oncogénico descrito para FGFR1 en carcinoma epidermoide de pulmón y sugieren un papel similar para FGFR4 en esta patología, algo no demostrado hasta el momento. Los datos presentados indican que la expresión de FGFR4 y/o FGFR1 en líneas celulares de carcinoma escamoso produce un incremento de las características tumorigénicas de las muestras, así como la activación de las rutas de señalización pro-oncogénicas.

Ejemplo 2. Efecto de la expresión de los genes FGFR1 y FGFR4 en tumorigénesis en adenocarcinoma de pulmón

Con el fin de comprobar el efecto de FGFR1 y FGFR4 en las propiedades oncogénicas de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, se seleccionaron líneas celulares con diferentes alteraciones moleculares tumorigénicas, con el fin de comprobar si su efecto es dependiente del contexto molecular. Para ello, se seleccionaron líneas celulares con alteraciones relevantes en adenocarcinoma y con baja expresión de ambos receptores, para poder expresarlos de forma independiente.

El procedimiento fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 1. Se seleccionaron las líneas celulares H2009 (con mutación en KRAS) y H3122 (portadora de la translocación EML4-ALK) y se procedió a sobreexpresar en cada una de ellas los receptores de forma independiente transfectando las líneas con el plásmido apropiado de acuerdo con la Tabla 4.

Sorprendentemente, y al contrario de lo que ocurre en carcinoma epidermoide de pulmón, la sobreexpresión de cada uno de los receptores provocó una disminución de las características tumorigénicas de las dos muestras, tal y como se observa en los ensayos de proliferación celular (**Figura 4A**), clonabilidad (**Figura 4B**) y de ensayo de crecimiento libre de anclaje (**Figura 4C**), respecto a sus respectivas líneas controles transfectadas con el vector vacío (EV).

A continuación, se midió la activación de varias rutas de señalización pro-oncogénicas relacionadas con FGFR (**Figura 4D**). Se observó una menor activación de STAT3 y AKT bajo las condiciones de sobreexpresión de FGFR1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. EV= vector vacío, FGFR1 = sobreexpresión de FGFR1, SFB=Suolo fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Cabe destacar que la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 en estas líneas no induce la sobreactivación del receptor sobreexpresado como en el caso de las líneas de epidermoide (Ver Figura 3D Vs Figura 4D).

Una de las líneas de adenocarcinoma, la A549 con mutación en KRAS, expresa niveles altos de FGFR1 y FGFR4. Para comprobar el efecto de ambos genes en las características tumorigénicas de esta línea, se silenciaron ambos FGFRs de forma individual usando ARN de

interferencia (shRNA). La nomenclatura de los shRNAs (a) y (b) se corresponden con dos shRNAs independientes para silenciar el mismo gen, con el fin de evitar que el efecto observado sea derivado de silenciar inespecíficamente un gen diferente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. Control=shRNA inespecífico, shFGFR1 = silenciamiento de FGFR1, shFGFR4 = silenciamiento de FGFR4, SFB=Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente, el silenciamiento de la expresión de cualquiera de los dos genes, causa un aumento de la proliferación celular (**Figura 5A**), un aumento en la generación de colonias en el ensayo de crecimiento libre de anclaje y en el tamaño de estas colonias con respecto a la línea control (**Figura 5C**). En los ensayos de clonabilidad, sin embargo, no se observaron diferencias en el número de colonias generadas en ninguno de los casos (**Figura 5B**). Cuando se midió la activación de STAT3 y AKT, se observó mayor activación de estas rutas en condiciones de silenciamiento de FGFR1 o FGFR4 con respecto a la línea control y lo mismo ocurre en el caso de p42/p44, si bien con un aumento de su activación menos marcado (**Figura 5D**).

Todos estos resultados en conjunto sugieren un papel supresor tumoral de ambos FGFRs en adenocarcinoma pulmonar y un papel oncogénico en carcinoma escamoso.

Ejemplo 3. Identificación de N-cadherina como responsable del diferente comportamiento de FGFR1 y FGFR4 en adenocarcinoma pulmonar y carcinoma escamoso

Con el fin de dar explicación al efecto diferencial de FGFR1 y FGFR4 en la tumorigénesis de cáncer de pulmón no microcítico identificado en los Ejemplos 1 y 2, se buscaron genes candidatos que pudieran ser los responsables de este comportamiento.

Para ello se comprobó si las características mesenquimales o epiteliales de las líneas celulares podrían determinar el papel de los diferentes FGFR en el cáncer de pulmón. Para ello, se analizó la expresión de N-cadherina (marcador mesenquimal) y de E-cadherina (marcador epitelial) (Gheldof 2013) en la colección de líneas celulares de cáncer de pulmón descritas en la Figura 1.

La **Figura 6** muestra cómo ambas proteínas se expresan diferencialmente en los dos tipos histológicos analizados (adenocarcinoma, ADC y carcinoma escamoso o epidermoide, ESC). E-cadherina se expresa en casi la totalidad de las líneas de adenocarcinoma, pero en ninguna de carcinoma epidermoide, mientras que N-cadherina muestra el resultado opuesto.

- 5 Para comprobar si N-cadherina es la responsable de los efectos pro-tumorigénicos de FGFR1 y FGFR4, se sobreexpresó N-cadherina en dos líneas de adenocarcinoma (H2009 y H3122) transfectándolas con el plásmido de sobreexpresión de N-cadherina (Tabla 4) en combinación o no con plásmidos de sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4.

Tal y como se muestra en el Ejemplo 2, la sobreexpresión de estos FGFRs tiene un efecto
10 supresor tumoral. Sin embargo, cuando se sobreexpresa N-cadherina y cada uno de los receptores (CDH2-FGFR1 o CDH2-FGFR4), ambos FGFRs no solo dejan de ejercer un efecto supresor tumoral, sino que ejercen un efecto pro-oncogénico, aumentando las características oncogénicas de ambas líneas, por encima de las líneas control y de las células que sobreexpresan únicamente N-cadherina, tal y como se observa en las **Figuras 7A-7C** (Curvas
15 de crecimiento al 10% de SFB (7A), clonabilidad (7B) y crecimiento libre de anclaje (7C)). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra
20 además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. EV1= vector vacío 1, EV2=vector vacío 2, CDH2=Sobreexpresión de N-cadherina, FGFR1=Sobreexpresión de FGFR1, FGFR4=Sobreexpresión de FGFR4, SFB=Siero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Además, al estudiar la activación de las rutas de señalización pro-oncogénica en estas líneas, se observa
25 una disminución de la activación de las rutas de señalización pro-oncogénicas cuando se sobreexpresa cualquiera de los dos FGFRs en ausencia de N-cadherina, con respecto al control, y el efecto contrario cuando se co-sobreexpresan los FGFRs con N-cadherina (**Figura 7D**).

De este experimento se deduce que la expresión de N-cadherina es la responsable del efecto
30 oncogénico de FGFR1 y FGFR4, lo que explicaría las diferencias en el comportamiento de ambos genes entre adenocarcinoma y carcinoma epidermoide.

A continuación, se realizó el experimento contrario en una línea celular inmortalizada de pulmón con alta expresión endógena de N-cadherina (NL20), pero sin expresión endógena de FGFR1 ni FGFR4 (Figura 1). En este experimento, se silenció N-cadherina, tal y como se ha
35 descrito anteriormente, y se combinó con la sobreexpresión de cada FGFR (shCDH2-FGFR1

o shCDH2-FGFR4). Las **Figura 8A** y **Figura 8B** muestran el resultado de los ensayos de tumorigenicidad en las curvas de crecimiento y el ensayo en agar blando, respectivamente. Los resultados indican que expresión de FGFR1 o FGFR4 tiene un efecto supresor tumoral en ausencia o en presencia de niveles bajos de N-cadherina, (shCDH2-EV1-FGFR1 y shCDH2-EV1-FGFR4), y un efecto pro-tumorigénico en presencia de alta expresión de N-cadherina (EV1-EV2-FGFR1 y EV1-EV2-FGFR4).

La **Figura 8C** muestra el estudio de la activación de las rutas de señalización oncogénicas. Los resultados obtenidos fueron concordantes, mostrando un aumento de la tumorigenicidad y de la activación de las rutas en estudio cuando se sobreexpresa cualquiera de los FGFRs en presencia de N-cadherina endógena, y el efecto contrario cuando se sobreexpresan los FGFRs en presencia de niveles reducidos de N-cadherina.

De este experimento se deduce que la responsable del efecto tumorigénico de FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) es la expresión de N-cadherina.

Además, para comprobar los efectos observados se reproducen *in vivo*, se realizaron xenoinjertos de las líneas celulares mencionadas en ratones desnudos inmunodeprimidos y se determinó el crecimiento de los tumores generados a partir de los xenoinjertos.

La **Figura 8D** muestra que el crecimiento de los tumores generados por las diferentes líneas correlaciona con los resultados obtenidos *in vitro*, observándose que los tumores que co-expresan N-cadherina y FGFR1 o FGFR4 tienen un crecimiento significativamente mayor que aquéllos que únicamente expresan N-cadherina, o que no expresan ninguno de los genes, mientras que los tumores que únicamente expresan FGFR1 o FGFR4 muestran un crecimiento tumoral más lento, tal y como se ha demostrado en los ejemplos anteriores.

Todos estos datos confirman que la responsable del efecto tumorigénico de FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón no microcítico es la co-expresión de N-cadherina con cualquiera de estos dos genes.

Por último, para estudiar si el efecto tumorigénico de la combinación de N-cadherina y FGFR1 o FGFR4 puede ser debido a una interacción física entre las proteínas, se realizaron experimentos de co-inmunofluorescencia para comprobar si las proteínas co-localizan en la membrana de la célula.

Para ello se utilizó la línea celular NL20, que tiene alta expresión endógena de N-cadherina, con sobreexpresión exógena de FGFR1 o FGFR4. La **Figura 9A** muestra que hay co-localización parcial de N-cadherina con FGFR1 y FGFR4, en algunas regiones de la membrana celular. Estos resultados sugieren que la interacción entre las proteínas podría ser física. Para comprobar esta hipótesis se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación.

Se seleccionó una línea celular con alta expresión endógena de las tres proteínas (H520). Se realizó la inmunoprecipitación de N-cadherina, y se determinó la presencia de FGFR1 o FGFR4 en el inmunoprecipitado, tal como está descrito en los materiales y métodos de esta memoria.

- 5 La **Figura 9B** muestra que tanto FGFR1 como FGFR4 co-inmunoprecipitan con N-cadherina, lo que apoya la existencia de una interacción física entre ambos tipos de receptores.

Ejemplo 4. Función de N-cadherina en el papel pronóstico de FGFR1 y FGFR4 en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico

- 10 Para comprobar la importancia de N-cadherina en el papel pronóstico de FGFR1 y FGFR4 en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y validar los resultados anteriores, se emplearon dos cohortes de estudio: una cohorte de descubrimiento y una cohorte de validación.

- Se utilizó una cohorte de descubrimiento de 109 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) en estadio temprano (I-III) y tratados con cirugía radical, del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla) (NSCLC_{N=109}). La Tabla 7 muestra las características de la cohorte. El proyecto de investigación fue valorado y aprobado por el comité ético del hospital (2012PI/241). Los pacientes firmaron el preceptivo consentimiento informado del biobanco del hospital. Todo el proyecto se atuvo a los principios éticos universales recogidos en la declaración de Helsinki.
- 15
20

- Se analizaron las muestras de tejido tumoral incluidas en parafina de todos los casos tras realizarse el diagnóstico anatomopatológico. En estas muestras se extrajo el ARNm tal y como se ha descrito anteriormente, aunque también es posible detectar y cuantificar la expresión de los genes de interés mediante inmunohistoquímica directamente en las biopsias. Se analizó la supervivencia global (OS) y la supervivencia libre de progresión (PFS), es decir, el tiempo transcurrido durante y después del tratamiento en el que el cáncer no crece ni se disemina aún más, frente al tiempo (meses). Los p-valores se calcularon mediante un análisis de Log Rank.
- 25

- La **Figura 10A** muestra las curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia de acuerdo con la expresión génica en la cohorte de estudio. Se observa que el grupo con alta expresión de N-cadherina y FGFR1 tiene peores datos de supervivencia libre de progresión (PFS) y global OS), mientras que el grupo con alta expresión de FGFR1 y baja expresión de N-cadherina muestra los mejores datos para ambos tipos de supervivencia. Es destacable que en el grupo de baja expresión de N-cadherina y alta de FGFR1, más de un 70% de los pacientes continúan
- 30

con vida, contrastando con el 30-40% en los otros grupos. De forma análoga, las muestras con baja N-cadherina y alta expresión de FGFR4 tienen una supervivencia mejor (tanto PFS como OS) que las muestras que tienen alta expresión de ambos genes.

Tabla 7. Características de nuestra cohorte de cáncer de pulmón no microcítico.

Número de pacientes	109
Sexo	
Masculino	100 (92%)
Femenino	9 (8%)
Mediana de edad (años)	65.0 [54.0-78.0]
Hábito tabáquico	
Fumador	56 (51.3%)
Ex-fumador	48 (44.1%)
No fumador	5 (4.6%)
Carcinoma epidermoide	58 (53.2%)
Estadio I-II	43 (74.1%)
Estadio III	15 (25.9%)
Adenocarcinoma	36 (33%)
Estadio I-II	30 (83.3%)
Estadio III	6 (16.6%)
Otras histologías	15 (13.7%)

5

La **Figura 10B** muestra las curvas de supervivencia de pacientes con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 en función de la expresión de N-cadherina. Como se esperaba, los pacientes con alta expresión de uno o de los dos FGFRs y baja expresión de N-cadherina muestran una mejor supervivencia libre de progresión y global que el subconjunto con alta expresión de ambos genes (cociente de riesgo 2,06 [1,01-4,23], $p=0,045$ y cociente de riesgo 1,89 [1,02-3,49] $p=0,039$; respectivamente) Estas curvas de supervivencia muestran claramente el potencial de la N-cadherina como modulador del papel de FGFR1 y FGFR4 en la oncogénesis del cáncer de pulmón.

Para validar el papel pronóstico de N-cadherina y FGFR1 o FGFR4, se realizaron los mismos análisis en dos bases de datos clínicas disponibles públicamente en The Cancer Genome Atlas (TCGA), una de pacientes de adenocarcinoma (N=522) y otra de carcinoma epidermoide (N=504) (Tabla 8) (<http://cancergenome.nih.gov/>).

20

Tabla 8. Características de las cohortes de adenocarcinoma y carcinoma epidermoide del TCGA.

Histología	Adenocarcinoma	Carcinoma epidermoide
Número de pacientes	522	504
Sexo		
Masculino	219 (37.9%)	314 (42.4%)
Femenino	253 (43.8%)	108 (21.2%)
Desconocido	106 (18.3%)	83 (16.4%)
Mediana de edad (años)	66.9 [59.6-73.4]	68.6 [62.3-73.8]
Hábito tabáquico		
Fumador	111 (19.2%)	113 (22.2%)
Ex-fumador	276 (47.8%)	284 (56.3%)
No fumador	71 (12.3%)	17 (3.4%)
Desconocido	120 (20.7%)	91 (18.1%)
Estadio		
I	252 (43.6%)	212 (41.4%)
II	115 (24.4%)	124 (24.3%)
III	79 (13.7%)	77 (15.2%)
IV	25 (4.3%)	6 (1.2%)
Desconocido	107 (18.5%)	86 (17,1%)

5 Las variables categóricas están representadas como número de pacientes (porcentaje del total) y las cuantitativas como mediana [rango intercuartílico].

En estas cohortes, se dividió a los pacientes en función de la expresión de ARNm de FGFR1 y N-cadherina, o de FGFR4 y N-cadherina y se analizó la supervivencia. El punto de corte entre alta y baja expresión en el caso de la cohorte de pacientes de adenocarcinoma se definió como la mediana, para el caso de FGFR1 y FGFR4, y como el primer cuartil para el caso de FGFR4. En el caso de la cohorte de carcinoma epidermoide, el punto de corte fue la mediana de expresión para cada uno de los genes.

La **Figura 11A** muestra los resultados de la cohorte de referencia para adenocarcinoma. Se observa, de forma similar a los resultados anteriores, que los pacientes que tienen alta expresión de FGFR1 y baja expresión de N-cadherina, tienen mejor pronóstico de supervivencia en comparación con las muestras con alta expresión de N-cadherina y alta expresión de FGFR1 (Cociente de riesgo de 2,38 [1,15 - 4,94], $p=0,016$ para la supervivencia libre de progresión, y de 1,63 [0,90 - 2,95], $p=0,101$ para la supervivencia global. En cuanto a FGFR4, se obtuvieron resultados similares, con un cociente de riesgo de 1,61 [1,01 - 2,59],

p= 0,046 para la supervivencia libre de progresión y de 1,79 [1,06 - 2,51], p= 0,024 para la supervivencia global.

Además, se seleccionó en la cohorte a los pacientes con alta expresión de uno o de ambos FGFRs y se dividió este subconjunto de pacientes en función del nivel de expresión de N-cadherina. La **Figura 11B** muestra una clara tendencia en la que, en este subconjunto de

- 5 pacientes, los altos niveles de expresión de N-cadherina se asocian a una peor supervivencia (Cociente de riesgo de 1,46 [0,98 – 2,17], p= 0,059 para la supervivencia libre de progresión, y de 1.63 [1.11-2.38], p=0.011 para la supervivencia global, reproduciendo así los resultados obtenidos en la cohorte de descubrimiento.
- 10 En la cohorte de carcinoma epidermoide los datos fueron muy similares para FGFR1, observándose que en los pacientes con alta expresión de FGFR1, aquellos con alta expresión de N-cadherina presentan peor pronóstico (cociente de riesgo de 1,88 [1,25 – 2,79], p= 0,017 para la supervivencia libre de progresión, y de 1,34 [0,89 – 1,99], p= 0,087 para la supervivencia global). Sin embargo, en el caso de FGFR4 no parecen observarse diferencias
- 15 en cuanto a pronóstico en esta cohorte (**Figura 12A**), ni tampoco al tener en cuentas ambos receptores (**Figura 12B**). Estos datos apoyan el papel de la N-cadherina como modulador del papel anti- o pro-oncogénico de FGFR1 y FGFR4.

De estos resultados se concluye que la expresión de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina está relacionada con la prognosis en cáncer de pulmón. Lo que, por un lado, demuestra el papel

20 de N-cadherina como responsable del efecto pro-oncogénico de FGFR1 y FGFR4, y además demuestra la validez del uso de estos genes como biomarcadores del pronóstico de la enfermedad.

Ejemplo 5. Relación entre la expresión de N-cadherina, FGFR1 y FGFR4 y el uso de

25 **inhibidores de FGFR en el tratamiento de cáncer de pulmón**

Los resultados anteriores demuestran el papel de N-cadherina como responsable de efecto pro-oncogénico de FGFR1 y FGFR4. En la actualidad, se están empleando agentes inhibidores de FGFR en ensayos clínicos como tratamiento terapéutico del cáncer de pulmón. Sin embargo, se sabe que este tipo de tratamiento, en ensayos clínicos, no es eficaz en todos

30 los pacientes, lo que ocasiona efectos secundarios en los enfermos sin que remita la enfermedad, y el retraso en la administración de un tratamiento mejor. Hasta la fecha se desconoce el motivo de la falta de efectividad de este tipo de fármacos.

A partir de los resultados mostrados en los ejemplos anteriores, se decidió comprobar si las diferencias en la expresión de N-cadherina y FGFR1 y/o FGFR4 y su relación con los efectos

pro-tumorigénicos en líneas celulares de cáncer de pulmón, están además relacionadas con la actividad de inhibidores selectivos de FGFR descritos para el tratamiento de cáncer de pulmón.

a) *N-cadherina como factor predictivo de la terapia anti-FGFR in vitro*

5 Para comprobar si la expresión de N-cadherina es decisiva para determinar la eficacia de la inhibición de FGFR en el tratamiento de cáncer de pulmón, se probó la eficacia, en términos de inhibición del crecimiento, de dos inhibidores selectivos de FGFR. Para ello, se seleccionaron líneas celulares con alta expresión endógena de FGFR1 y/o FGFR4 además y con baja expresión de N-cadherina (A549 y H460), o con alta expresión endógena de FGFR1
10 y/o FGFR4 y alta expresión de N-cadherina (H520 y H226). En estas líneas, se analizó el efecto en la proliferación celular de dos inhibidores selectivos de FGFR: BGJ398 y AZD4547 (SELLECKCHEM, Ref. S2183 y S2801 respectivamente) en función del tiempo.

En la **Figura 13A** se muestra el resultado de la proliferación celular (crecimiento relativo en función del tiempo) de las líneas celulares sin tratamiento o tratadas con BGJ398 0.5 μ M,
15 BGJ398 1 μ M, AZD4547 0.5 μ M o AZD4547 1 μ M. Se observa que ambos inhibidores reducen el crecimiento únicamente en las líneas con alta expresión de N-cadherina, pero no ejercían un efecto significativo en aquellas líneas con baja o nula expresión de N-cadherina a las concentraciones testadas. Estos resultados apoyan el papel predictivo de la N-cadherina en relación a las terapias inhibitorias de FGFR.

20 La **Figura 13B** muestra el efecto de dos inhibidores selectivos de FGFR en la proliferación de líneas celulares con expresión exógena de FGFR1 o FGFR4, en combinación o no con sobreexpresión exógena de N-cadherina (CDH2). Se observa que los inhibidores no tienen efecto en el crecimiento de las líneas celulares sin expresión de N-cadherina exógena, pero sí cuando ésta se expresa (fila inferior).

25 b) *N-cadherina como factor predictivo de la terapia anti-FGFR in vivo*

Para comprobar si este papel predictivo tiene relevancia *in vivo*, se probó la eficacia del inhibidor que mostró mejor eficacia en los experimentos *in vitro*, AZD4547, en diferentes tumores derivados de pacientes xenoinjertados en ratones inmunodeprimidos ("*Patient-derived xenografts*", PDXs, ver materiales y métodos).

30 Se seleccionaron dos modelos de adenocarcinoma con expresión similar de FGFR1, uno con alta expresión de N-cadherina (TP91) y otro con baja expresión de esta proteína (TP60). También se seleccionaron dos modelos de carcinoma epidermoide con expresión comparable de FGFR1, con alta y baja expresión de N-cadherina (TP114 y TP13, respectivamente).

Además, se seleccionó un modelo de carcinoma epidermoide con alta expresión de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina (TP96) (**Figura 14A**).

La **Figura 14B** muestra cómo el tratamiento con AZD4547 no produjo efecto alguno en el crecimiento tumoral de los modelos con baja expresión de N-cadherina (TP60 y TP13), independientemente de su histología. Sin embargo, en los modelos tumorales con alta expresión de N-cadherina (TP91, TP114 y TP96, **Figura 14C**) el tratamiento con este inhibidor selectivo de FGFR causó una considerable reducción del crecimiento, con una reducción mediana de volumen del 14.4%, 25.5% y 1.4% con respecto a la condición control, respectivamente.

Cabe destacar que el tratamiento con AZD4547 causó una regresión tumoral completa en 1/5, 2/5 y 2/5 de los tumores tratados, respectivamente en cada modelo. En el modelo TP96, además, se alcanzó la respuesta parcial al tratamiento, definida ésta como una reducción mediana de volumen tumoral del 50% o superior con respecto al volumen al comienzo del tratamiento (**Figura 14D**).

Al analizar el efecto del inhibidor en las rutas de señalización relacionadas con FGFR en dos de los modelos tratados (TP60 y TP91), observamos que el tratamiento no altera la activación de las rutas estudiadas en el modelo con baja expresión de N-cadherina (TP60), mientras que en el modelo con alta expresión de N-cadherina, TP91, AZD4547 causó una disminución en los niveles de pSTAT3, pAKT y una modesta reducción de la activación p-p42/p44 (**Figura 14E**). Todos estos resultados apoyan el papel predictivo de la N-cadherina a la terapia dirigida frente a FGFR, independientemente de la histología.

Estos resultados muestran que la expresión de estos genes biomarcadores (N-cadherina en combinación con FGFR1 y/o FGFR4) en una muestra de cáncer de pulmón de un paciente, es indicativa de la efectividad de un fármaco anti-FGFR. Mediante un simple análisis de la expresión de los biomarcadores N-cadherina y FGFR1 y/o FGFR4 es posible determinar si un fármaco anti-FGFR va a ser eficiente en el tratamiento de un sujeto. Los resultados demuestran que la efectividad en el tratamiento depende de la expresión de N-cadherina en combinación con la expresión de FGFR1 y/o FGFR4. No hay descrito en el estado del arte el análisis de la expresión de N-cadherina para predecir la respuesta a un tratamiento con inhibidores de FGFR, por lo que no sería obvio para un experto en la materia determinar la expresión de estos biomarcadores específicos para saber si un sujeto va a ser resistente o sensible al tratamiento con fármacos inhibidores de FGFR.

Todos los datos presentados en esta memoria apoyan el papel altamente predictivo del biomarcador N-cadherina en la terapia anti-FGFR para el tratamiento de tumores con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul SF *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* (1990); 215(3): 403-10.
- Blanco R *et al.* A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Human mutation* (2009); 30:1199-206.
- 5 Dutt A *et al.* Inhibitor-sensitive FGFR1 amplification in human non-small cell lung cancer. *PloS one* 2011; 6(6):e20351.
- Gheldof A y Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci* (2013); 116:317-36.
- Helfrich BA, *et al.* Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* (2006); 12:7117-25.
- 10 Huang HP *et al.* The prognostic significance of fibroblast growth factor receptor 4 in non-small-cell lung cancer. *OncoTargets and therapy* (2015); 8:1157-64.
- 15 Jiang T *et al.* FGFR1 amplification in lung squamous cell carcinoma: a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer* 2015; 87(1):1-7.
- Lim SH *et al.* Efficacy and safety of dovitinib in pretreated patients with advanced squamous non-small cell lung cancer with FGFR1 amplification: A single-arm, phase 2 study. *Cancer* (2016); 122(19): 3024-31.
- 20 Nguyen T y Mège RM. N-cadherin and Fibroblast Growth Factor Receptors crosstalk in the control of developmental and cancer cell migrations. *Eur J Cell Biol* (2016); 95(11):415-26.
- Qian X *et al.* N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. *Oncogene* (2014); 33(26):3411-21.
- Quintanal-Villalonga A *et al.* Tyrosine Kinase Receptor Landscape in Lung Cancer: Therapeutical Implications. *Disease markers* 2016 1-14.
- 25 Hänze J *et al.* Epithelial mesenchymal transition status is associated with anti-cancer responses toward receptor tyrosine-kinase inhibition by dovitinib in human bladder cancer cells. *BMC Cancer* (2013); 11(13):589.
- Wesche *et al.* Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* (2011); 30 437:199-213.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para predecir la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón a un tratamiento con al menos un inhibidor de FGFR, que comprende:
- a) detectar en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto los niveles del biomarcador N-cadherina en combinación con la expresión de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 y/o FGFR4,
- 10 b) comparar el nivel de expresión de los biomarcadores determinados en a) con una muestra de referencia, en el que altos niveles de los marcadores detectados, es indicativa de que el sujeto va a responder al tratamiento.
2. Método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la determinación del nivel de expresión de los biomarcadores se realiza midiendo la cantidad de proteína de N-cadherina y la cantidad de proteína de FGFR1 y/o FGFR4 en la muestra, o midiendo la
- 15 cantidad de ARNm del gen *CDH2* y la cantidad de ARNm de los genes *FGFR1* y/o *FGFR4* en la muestra.
3. Método *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.
4. Método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el cáncer de pulmón no
- 20 microcítico se selecciona entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso o epidermoide.
5. Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra biológica analizada en el paso a) se selecciona del grupo que comprende: sangre completa, suero, plasma, esputo, sudor, orina, lavado bronquioalveolar, biopsia de tejido tumoral primario o metastásico del sujeto.
- 25 6. Método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la muestra biológica es una biopsia de tejido tumoral primario del sujeto.
7. Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la detección de la cantidad de los biomarcadores se realiza mediante al menos uno de los métodos seleccionados entre: HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), LC/MS
- 30 (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, ELISA, DAS ELISA, inmunoprecipitación de proteínas, inmunoelectroforesis, Western Blot, inmunotinción de proteínas, Northern Blot, PCR con transcripción reversa (RT-PCR), PCR cuantitativa (q-PCR), RIA (radioinmunoensayo), hibridación *in situ*, ensayo de protección frente a nucleasas, secuenciación masiva, técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas

- microarrays de ADN genómico, microarrays de proteínas, microarrays de ARN mensajero, microarrays de ADNc, microarrays de péptidos, microarrays de tejido, microarrays celulares o de transfección, microarrays de anticuerpos, microarrays de lisados o suero, microarrays de proteínas de fase reversa, microarrays de péptidos o
- 5 microarrays de genotipado.
8. Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que altos niveles de los biomarcadores detectados se corresponden con un nivel al menos dos veces superior al nivel del mismo marcador en una muestra de referencia.
9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el al menos un inhibidor de FGFR se selecciona de entre el grupo que comprende BGJ398, AZD4547, Debio-1347, Dovitinib, BLU9931, FIIN-2, JNJ-42756493, LY2874455, Ponatinib, BIBF1120, PD173074, PD166866, BLU554, S49076, NSC12, PHA-739358, TSU-68, BMS-540215, TKI-258, MK-2461, BMS-582664, AG 1296, SSR128129E, LY2874455 y SU5402.
- 10 10. Combinación de los biomarcadores N-cadherina y al menos un segundo biomarcador seleccionado entre FGFR1 y FGFR4, para uso en el pronóstico y/o la predicción de la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón al tratamiento con inhibidores de FGFR.
11. Combinación de los biomarcadores para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el nivel de expresión de cada biomarcador se determina midiendo el nivel de ARNm de los genes *CDH2* y *FGFR1* y/o *FGFR4*, y/o el nivel de proteína de N-cadherina y FGFR1 y/o FGFR4.
- 20 12. Combinación de biomarcadores para uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, en el que el que el cáncer de pulmón es un carcinoma no microcítico seleccionado entre adenocarcinoma o carcinoma escamoso.
- 25 13. Combinación de los biomarcadores para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el al menos un inhibidor de FGFR se selecciona entre el grupo que comprende BGJ398, AZD4547, Debio-1347, Dovitinib, BLU9931, FIIN-2, JNJ-42756493, LY2874455, Ponatinib, BIBF1120, PD173074, PD166866, BLU554, S49076, NSC12, PHA-739358, TSU-68, BMS-540215, TKI-258, MK-2461, BMS-582664, AG 1296, SSR128129E, LY2874455 y SU5402.
- 30 14. Kit para pronosticar y/o predecir la respuesta de un sujeto que sufre cáncer de pulmón a un tratamiento con inhibidores FGFR que comprende:

- 5
- a) medios para detectar en una muestra biológica obtenida del sujeto los niveles del biomarcador N-cadherina, por una parte, y la expresión de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 y/o FGFR4 por otra,
 - b) medios para comparar el nivel de expresión de los biomarcadores determinados en a) con una muestra de referencia,
 - c) instrucciones para que un profesional médico administre el tratamiento con inhibidores de FGFR únicamente a aquellos sujetos que muestren alta expresión de N-cadherina y además alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4.
- 10
15. Kit de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la determinación de los niveles de los biomarcadores se realiza midiendo la cantidad de proteína del biomarcador N-cadherina y la cantidad de proteína de al menos uno de los biomarcadores FGFR1 o FGFR4 en la muestra, o midiendo la cantidad de ARNm del gen *CDH2* y la cantidad de ARNm de al menos uno de los genes *FGFR1* o *FGFR4* en la muestra.
- 15
16. Kit de acuerdo con las reivindicaciones 14 o 15, en el que el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.
17. Kit de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el cáncer de pulmón no microcítico se selecciona entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso o epidermoide.
- 20
18. Kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que los medios para detectar los niveles de los biomarcadores comprenden anticuerpos que reconocen específicamente las proteínas N-cadherina y anticuerpos que reconocen específicamente las proteínas FGFR1 y/o FGFR4, o primers y/o sondas que detectan específicamente la presencia del ARNm del gen *CDH2* y además primers y/o sondas que detectan específicamente la presencia del ARNm de los genes *FGFR1* y/o *FGFR4*.
- 25
19. Kit de acuerdo con las reivindicaciones 14 a 18, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que comprende: sangre completa, suero, plasma, esputo, sudor, orina, lavado bronquioalveolar, biopsia de tejido tumoral primario o metastásico.
- 30
20. Kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el que la detección de los biomarcadores se realiza mediante al menos uno de los métodos seleccionados entre: HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), LC/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, ELISA, DAS ELISA, inmunoprecipitación de proteínas, inmunoelectroforesis, Western Blot, inmunotinción de proteínas, Northern Blot, PCR con transcripción reversa (RT-PCR), PCR cuantitativa (q-PCR), RIA (radioinmunoensayo), hibridación *in situ*, ensayo de protección frente a nucleasas, secuenciación masiva, técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas

microarrays de ADN genómico, microarrays de proteínas, microarrays de ARN mensajero, microarrays de ADNc, microarrays de péptidos, microarrays de tejido, microarrays celulares o de transfección, microarrays de anticuerpos, microarrays de lisados o suero, microarrays de proteínas de fase reversa, microarrays de péptidos o microarrays de genotipado.

5

FIGURA 1

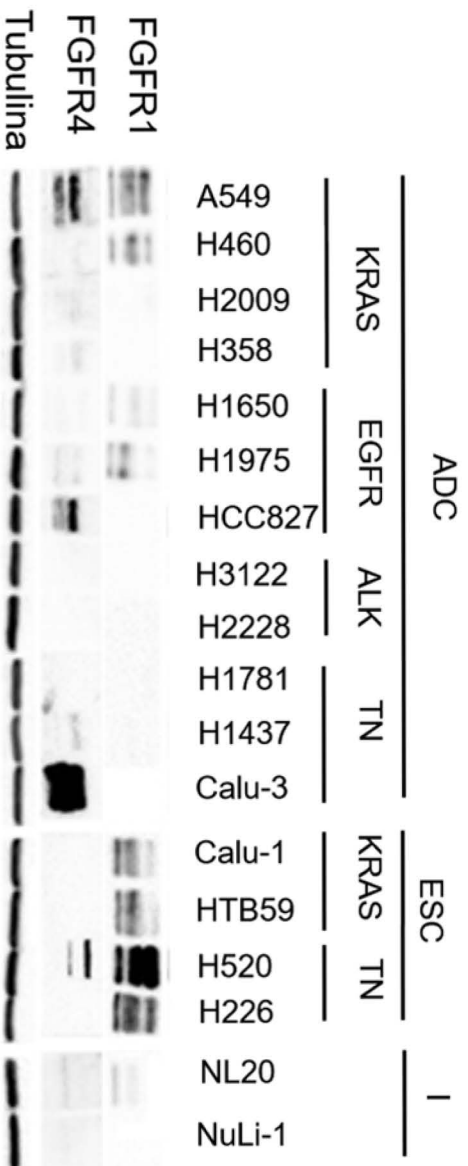
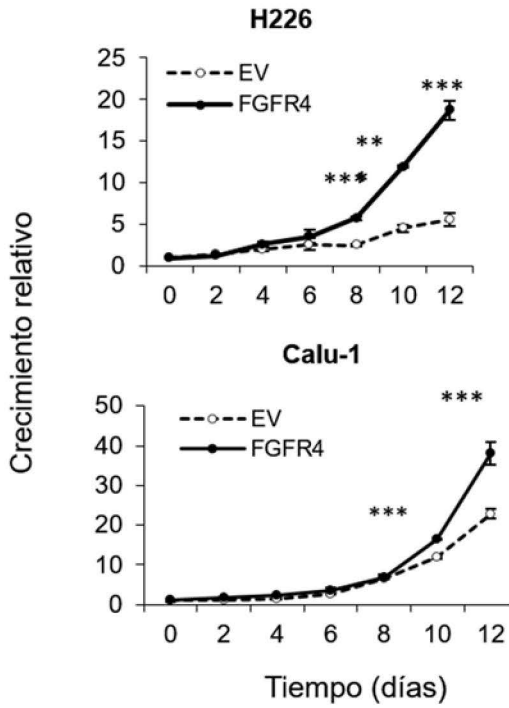


FIGURA 2

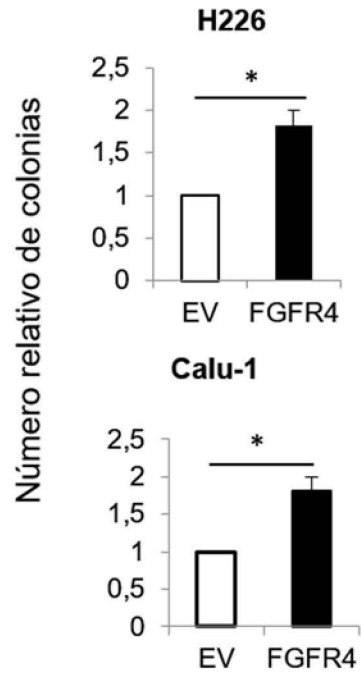
A

Curvas de crecimiento 10% SFB

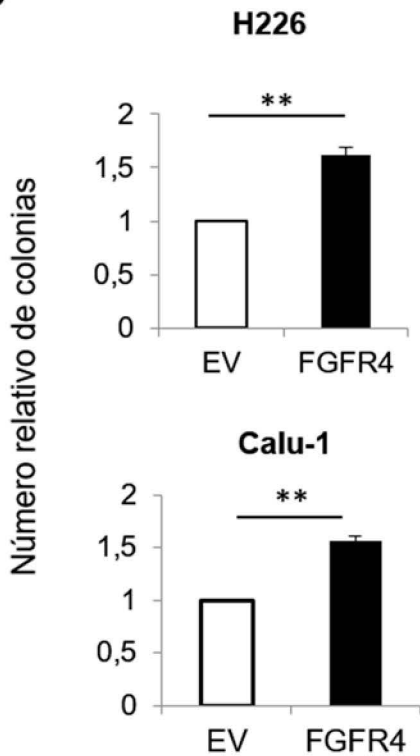


B

Clonabilidad



C



D

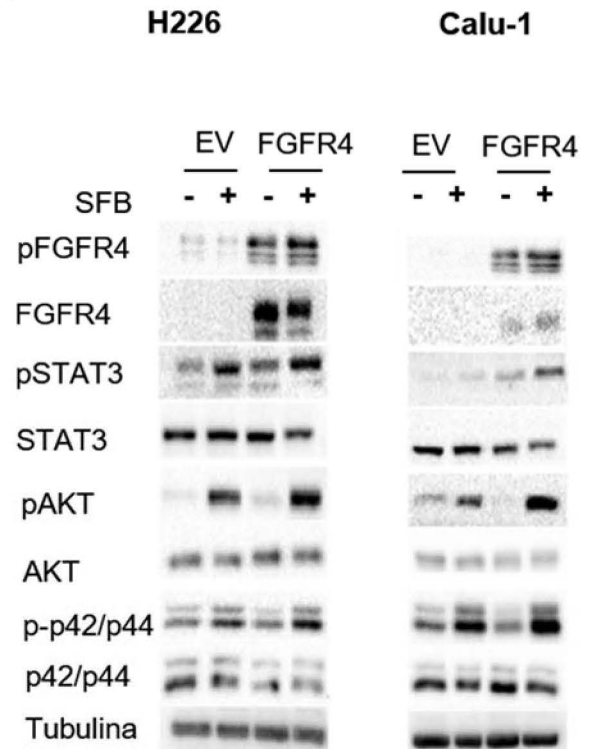
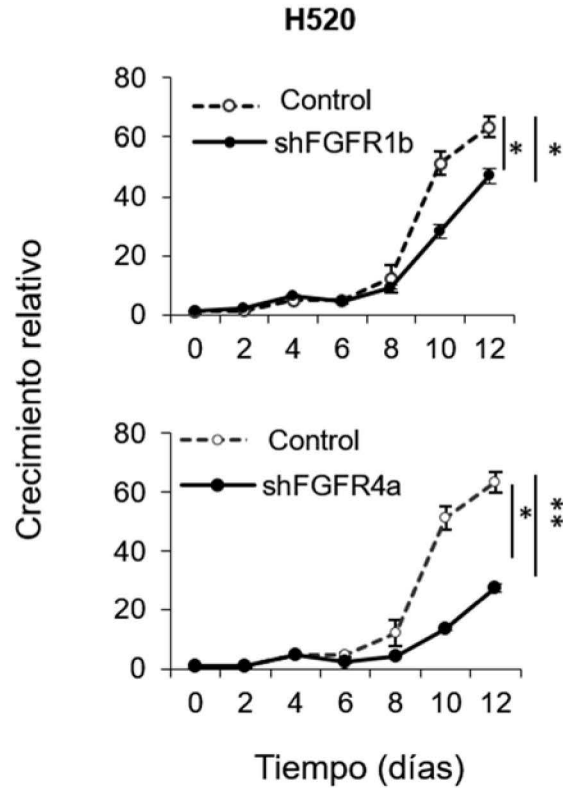


FIGURA 3

A

Curvas de crecimiento 10% SFB



B

Clonabilidad

H520

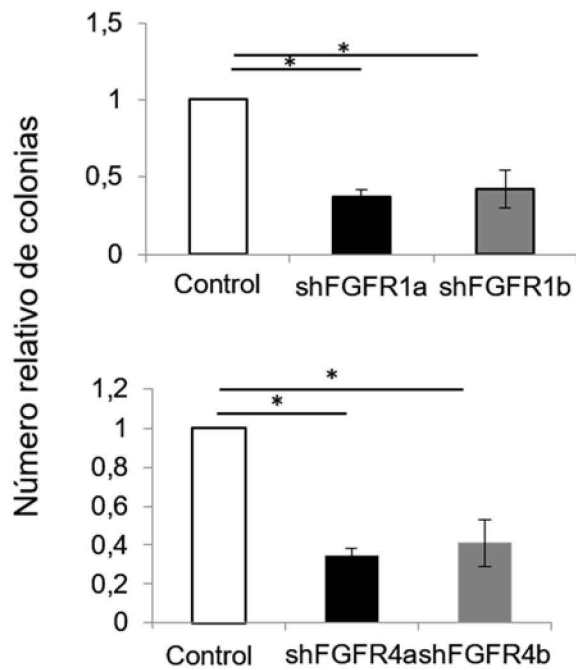
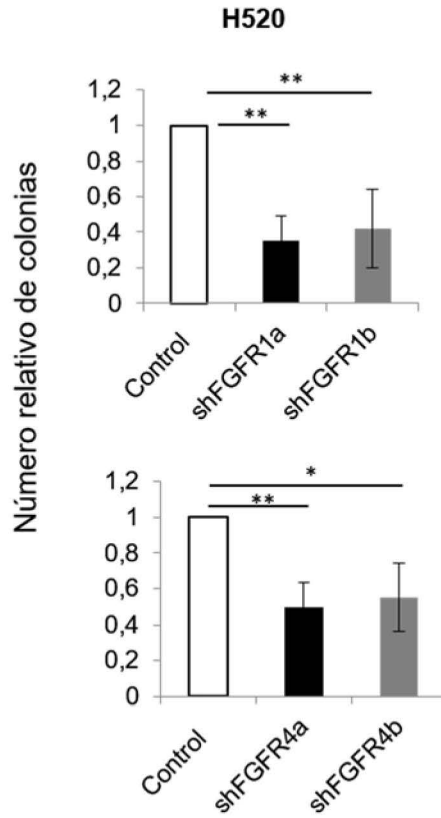


FIGURA 3 (Cont.)

C

Crecimiento libre de anclaje



D

H520

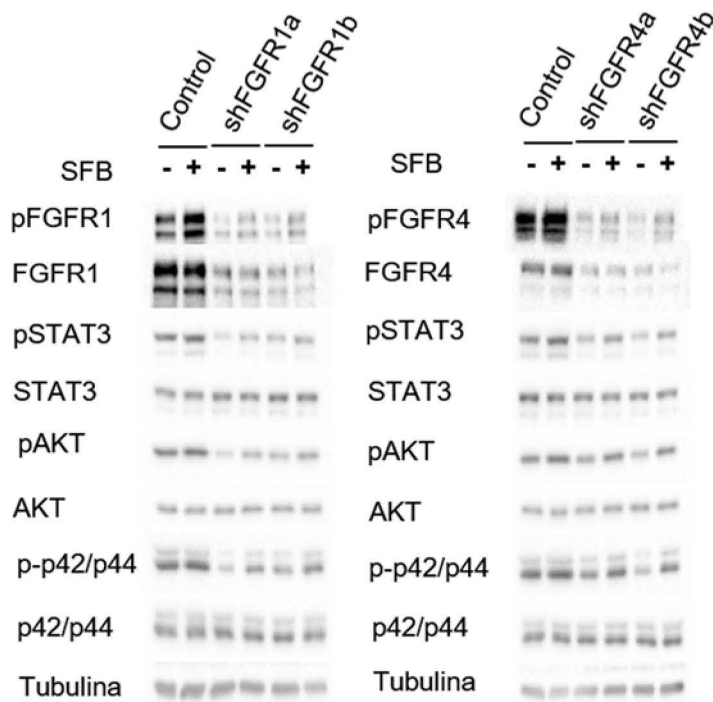


FIGURA 4

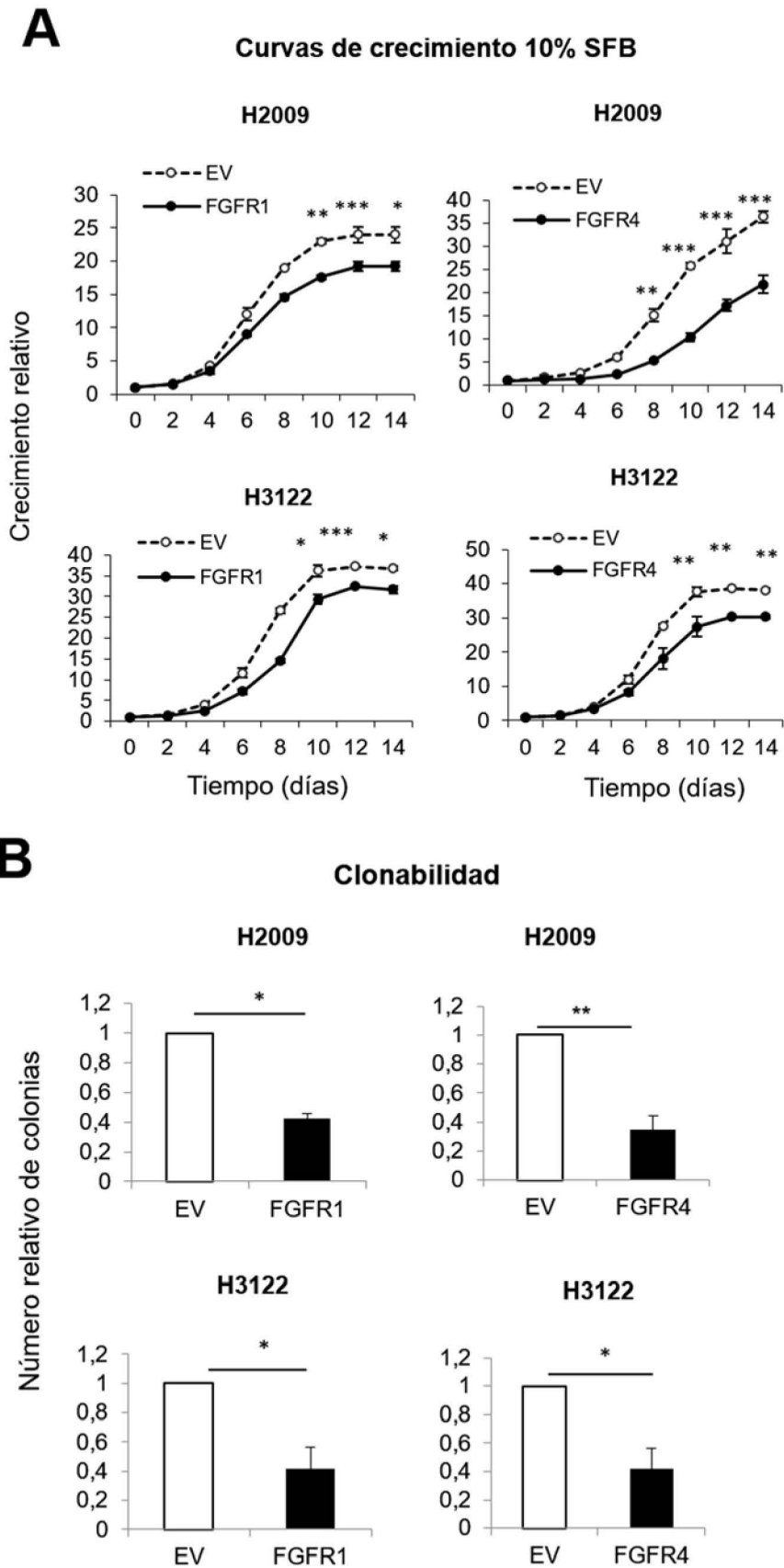
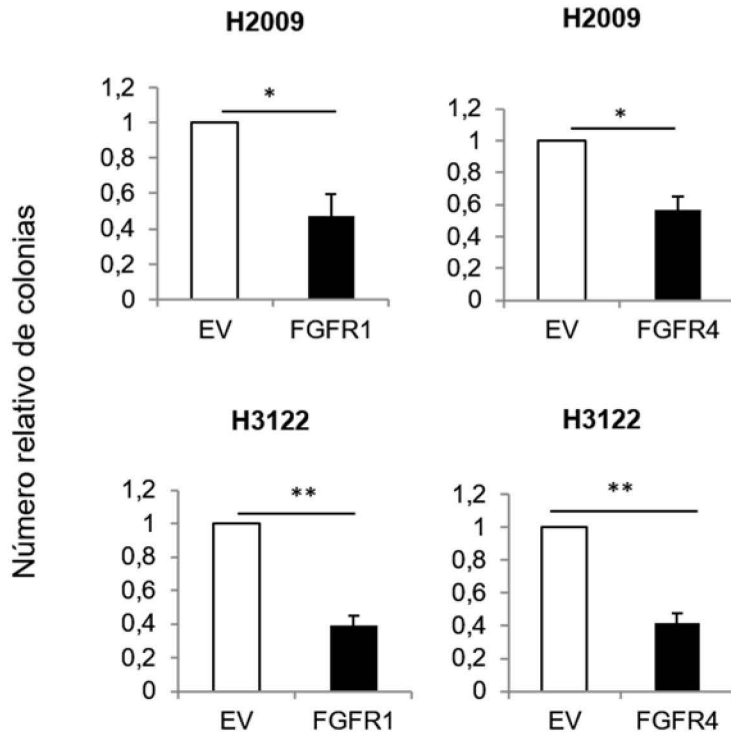


FIGURA 4 (Cont.)

C

Crecimiento libre de anclaje



D

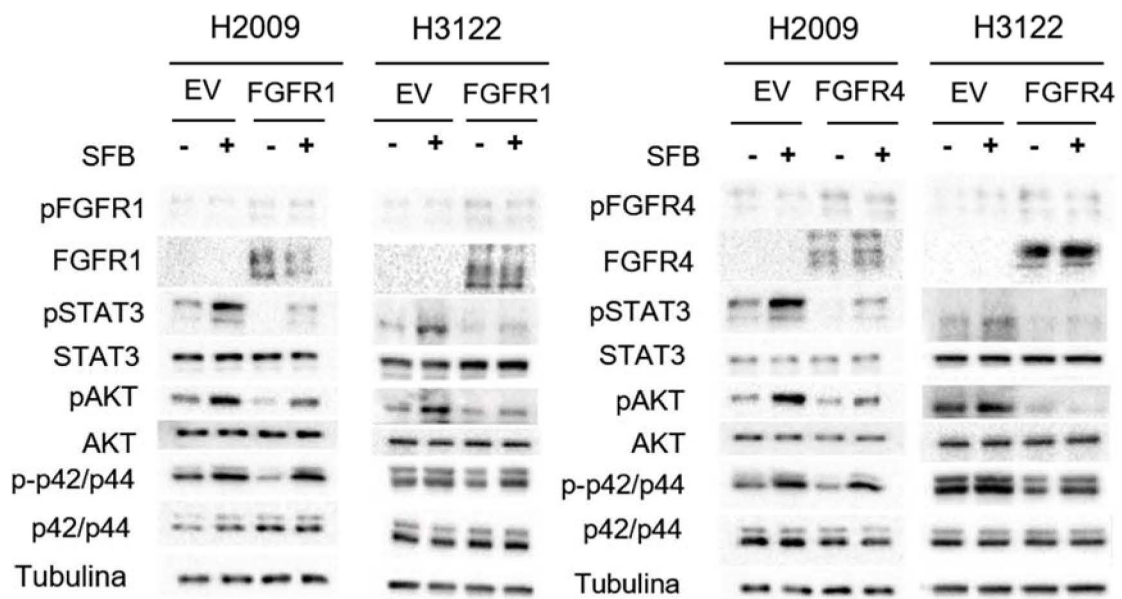
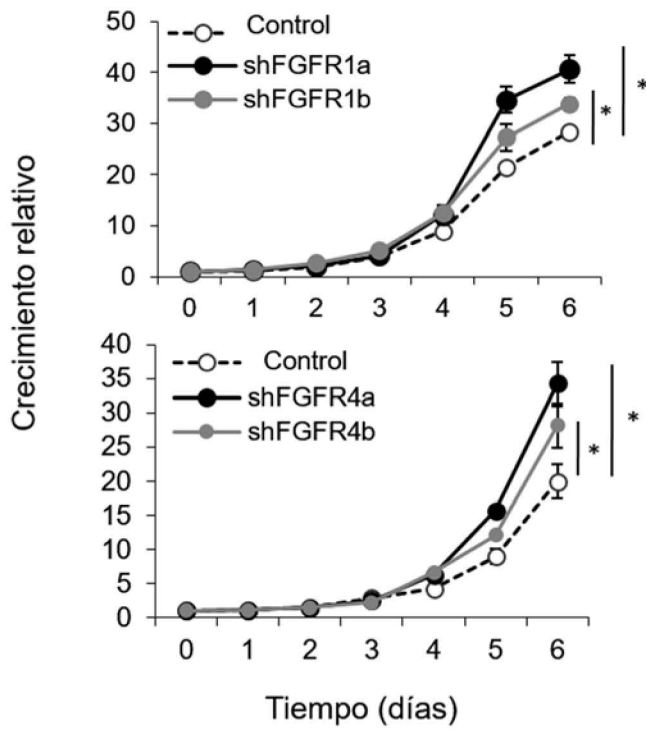


FIGURA 5

A

Curvas de crecimiento 10% SFB

A549



B

Clonabilidad

A549

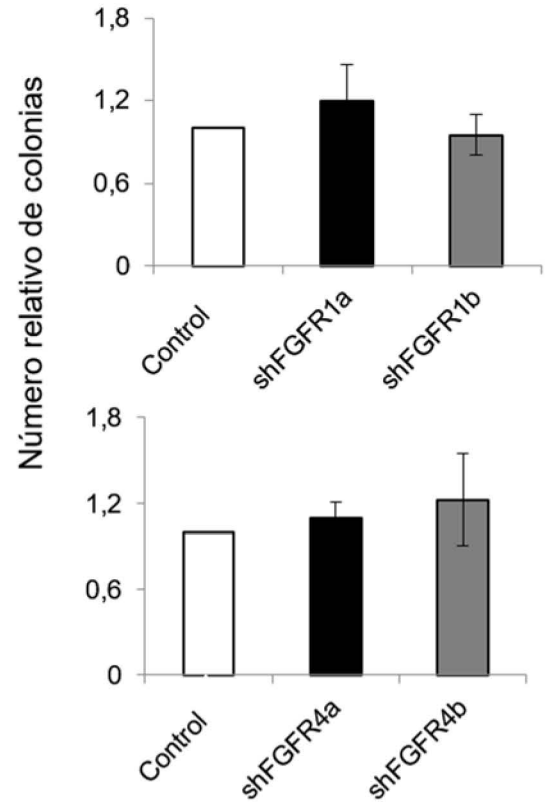
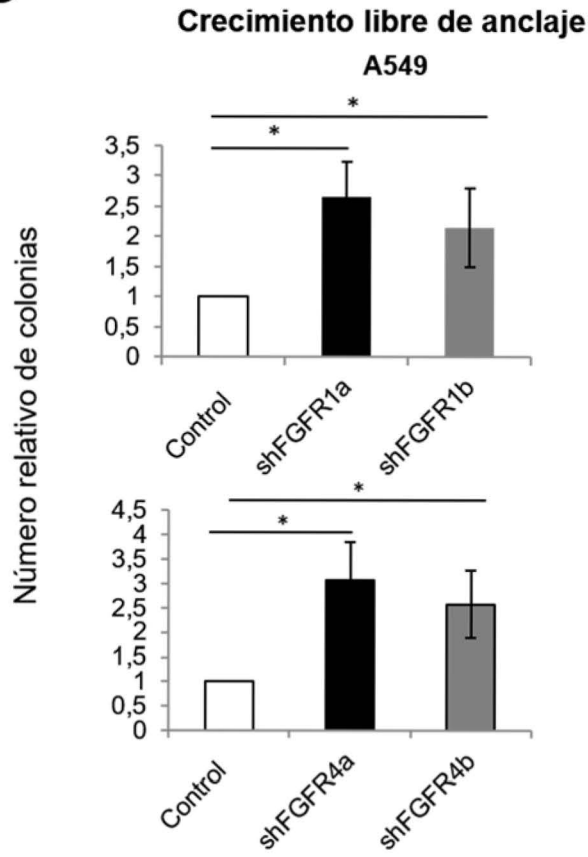


FIGURA 5 (Cont.)

C



D

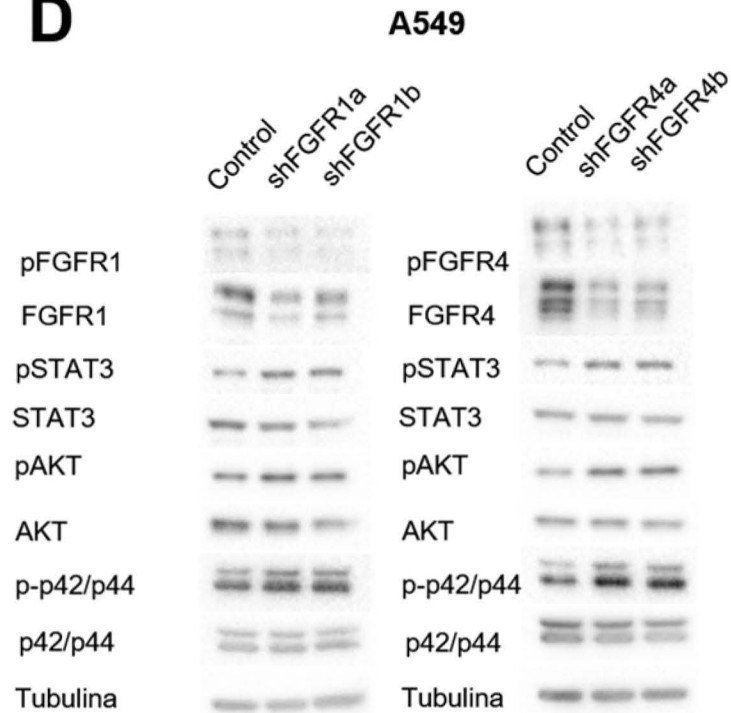


FIGURA 6

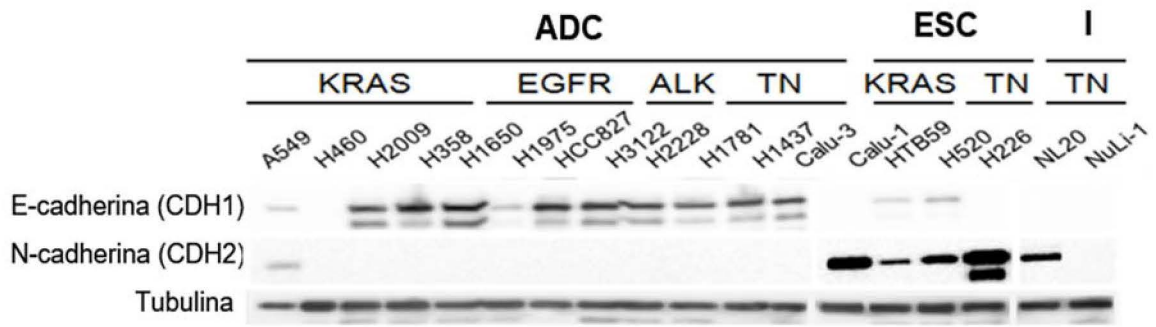
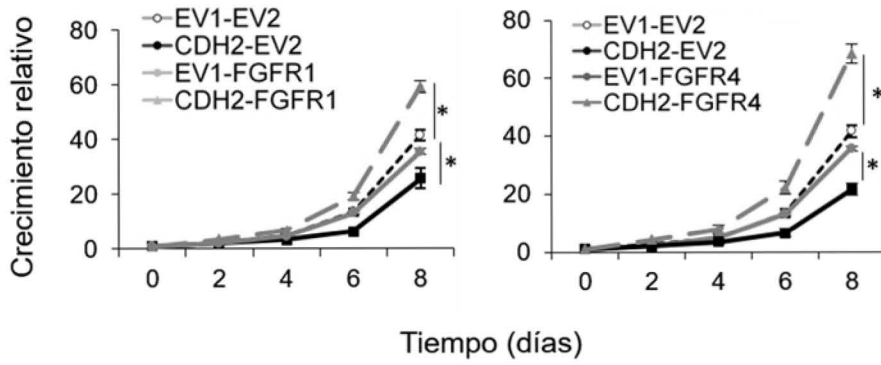


FIGURA 7

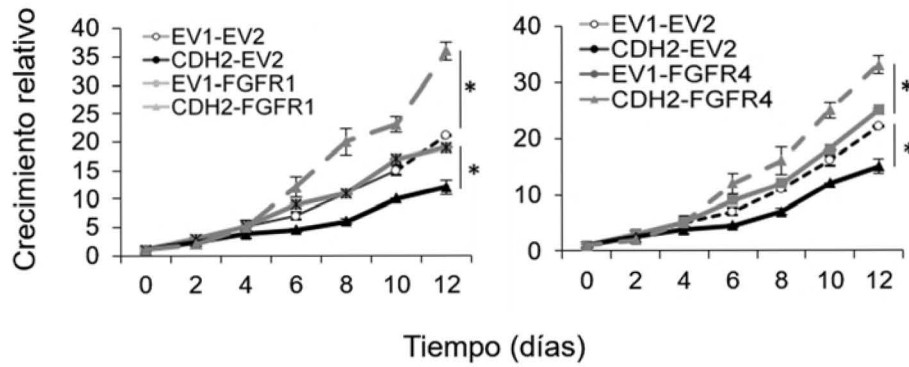
A

Curvas de crecimiento 10% SFB

H2009



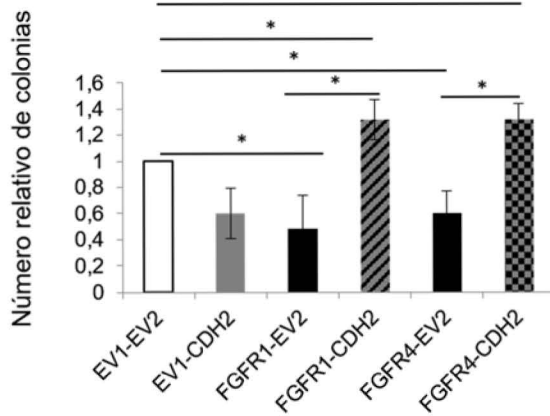
H3122



B

Clonabilidad

H2009



H3122

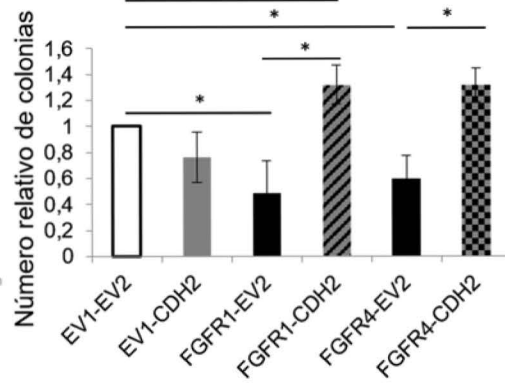


FIGURA 7 (Cont.)

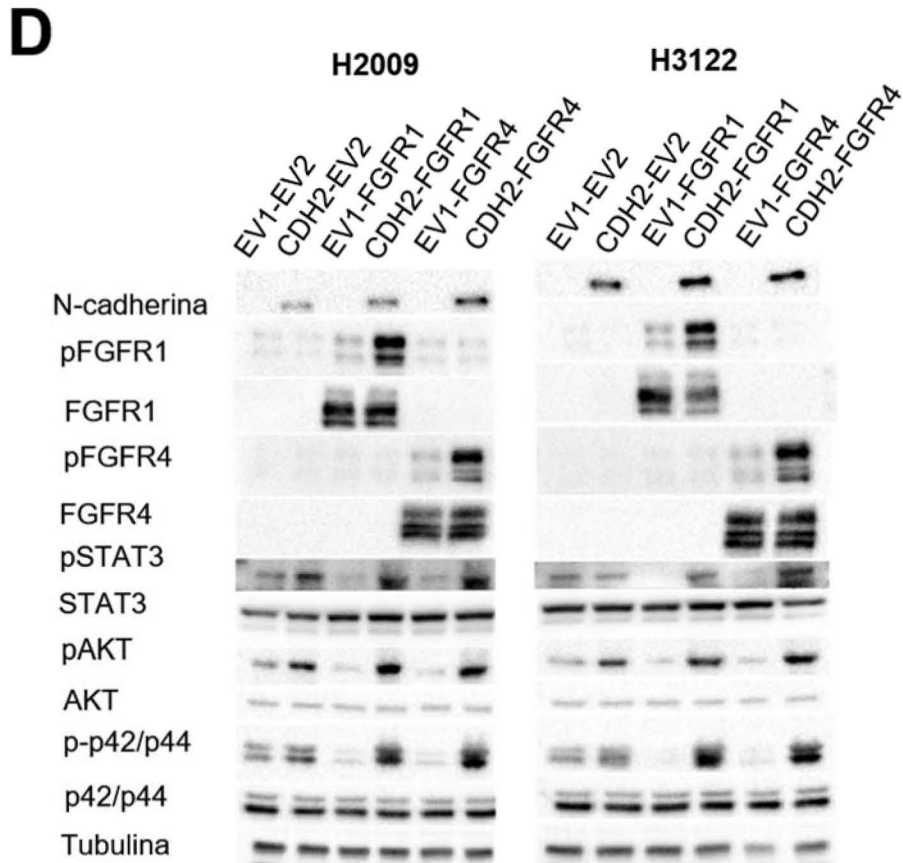
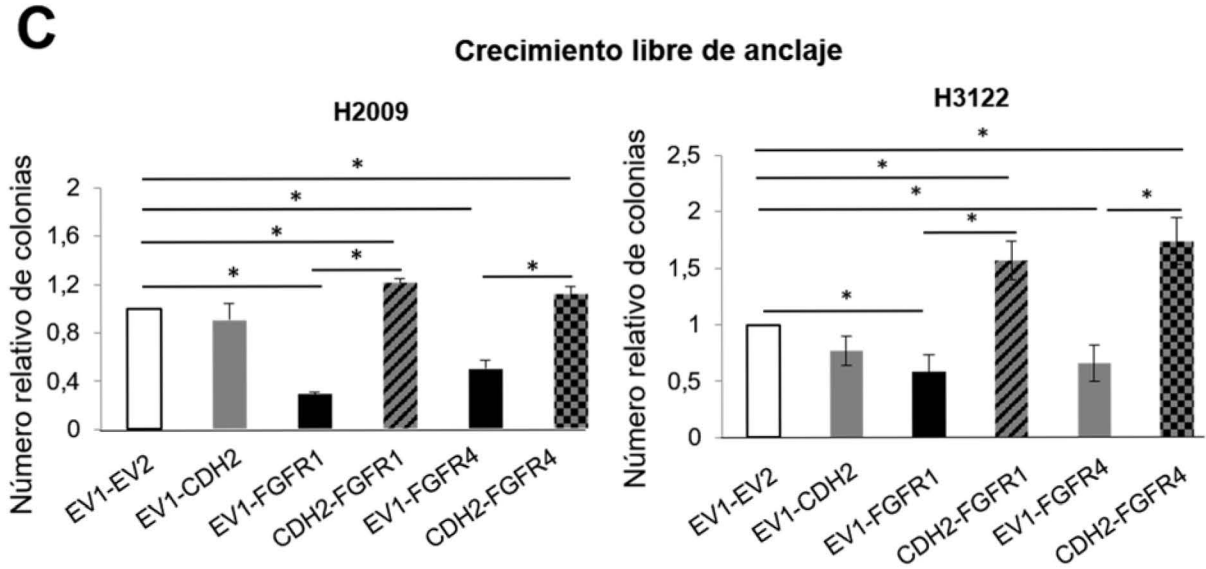
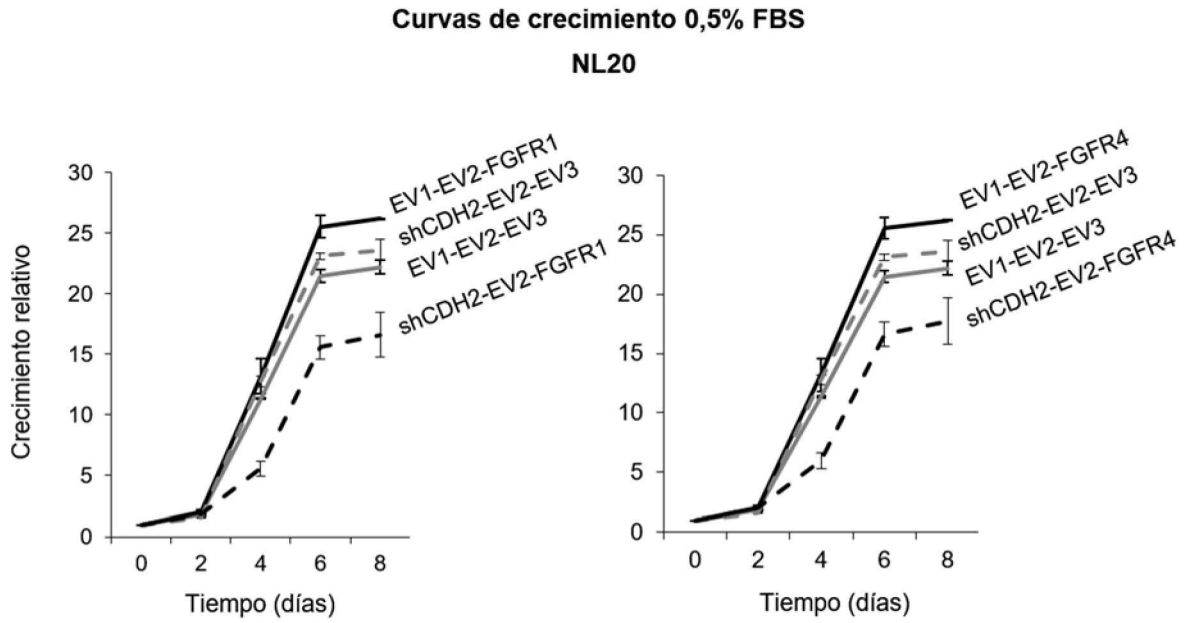


FIGURA 8

A



B

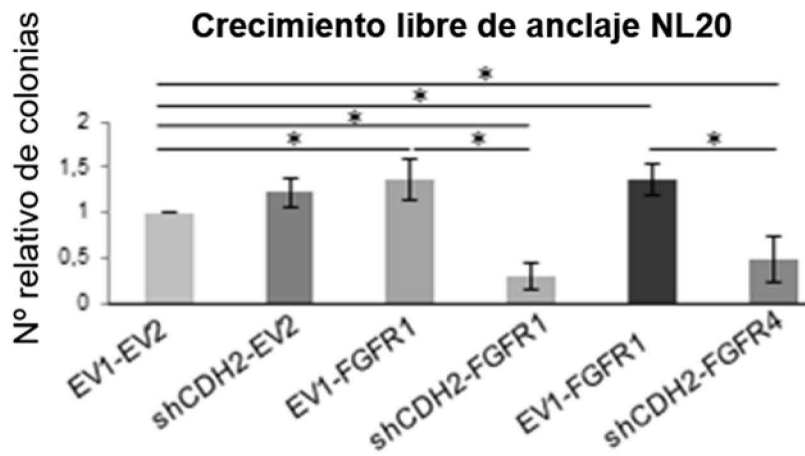
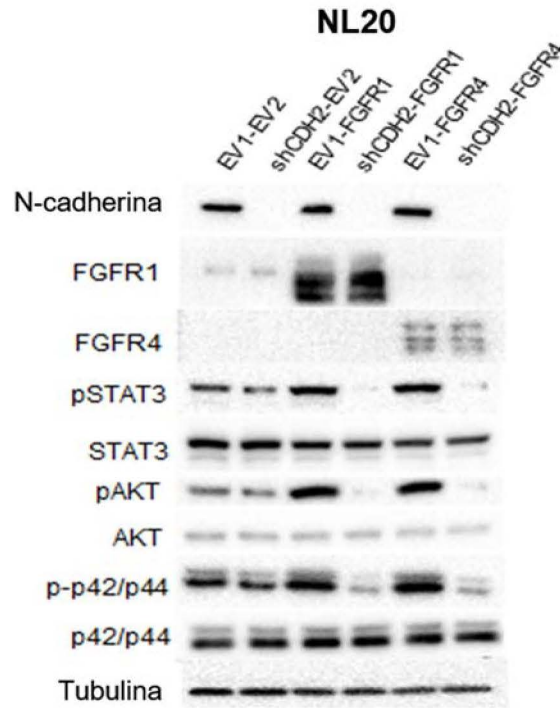


FIGURA 8 (Cont.)

C



D

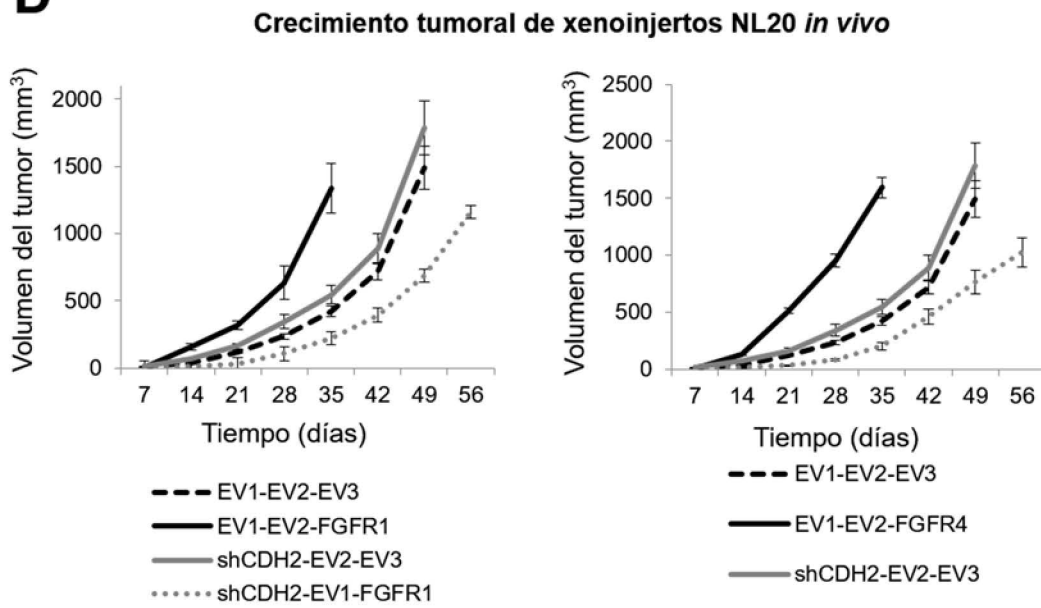
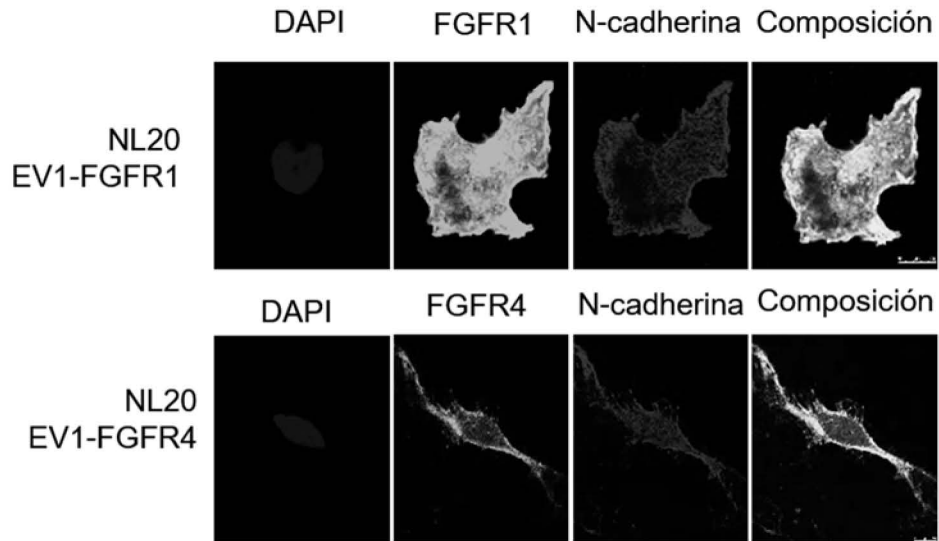


FIGURA 9

A



B

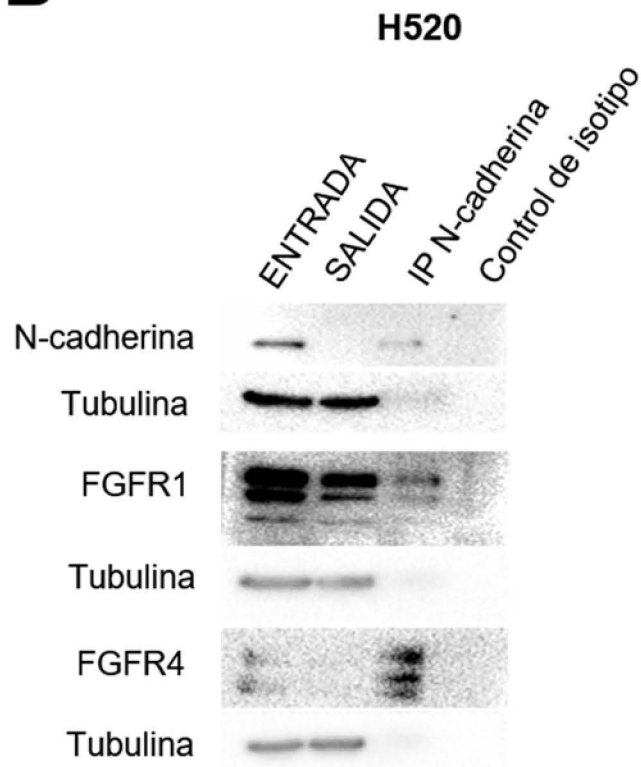


FIGURA 10

A

CPNM N=109

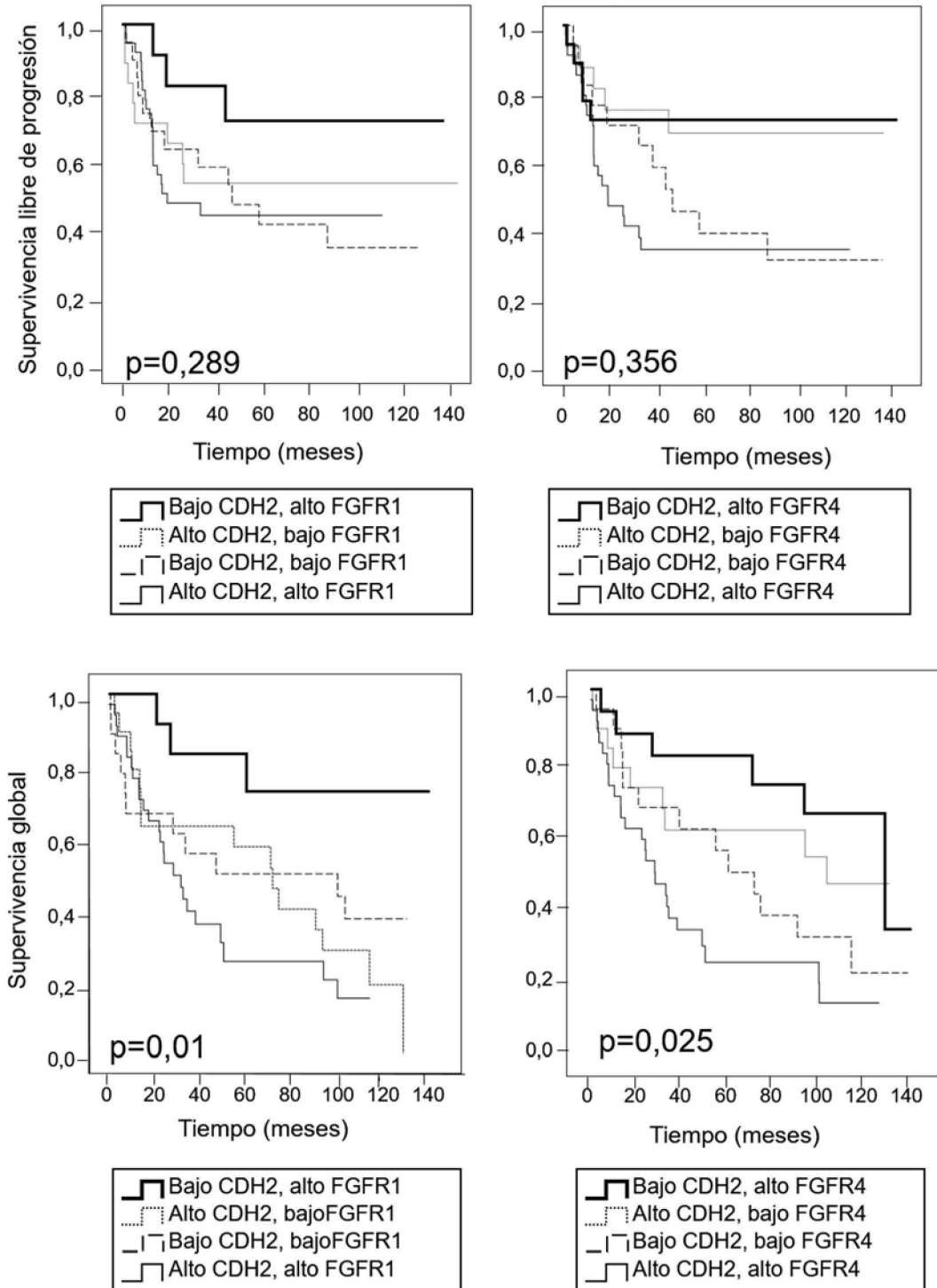


FIGURA 10 (Cont.)

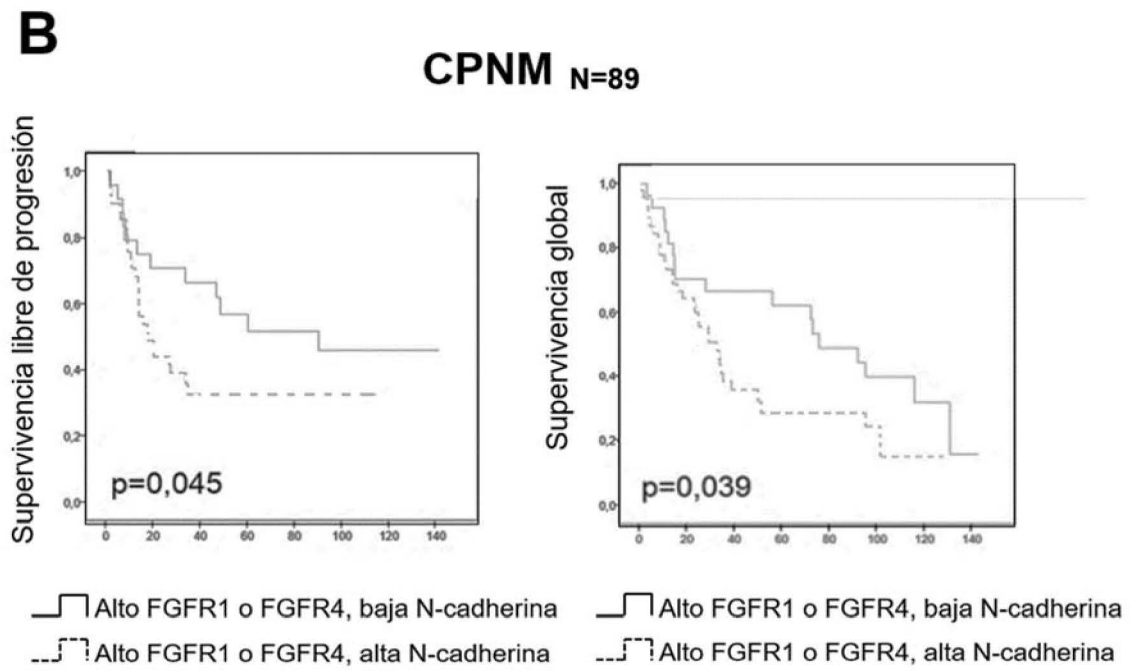


FIGURA 11

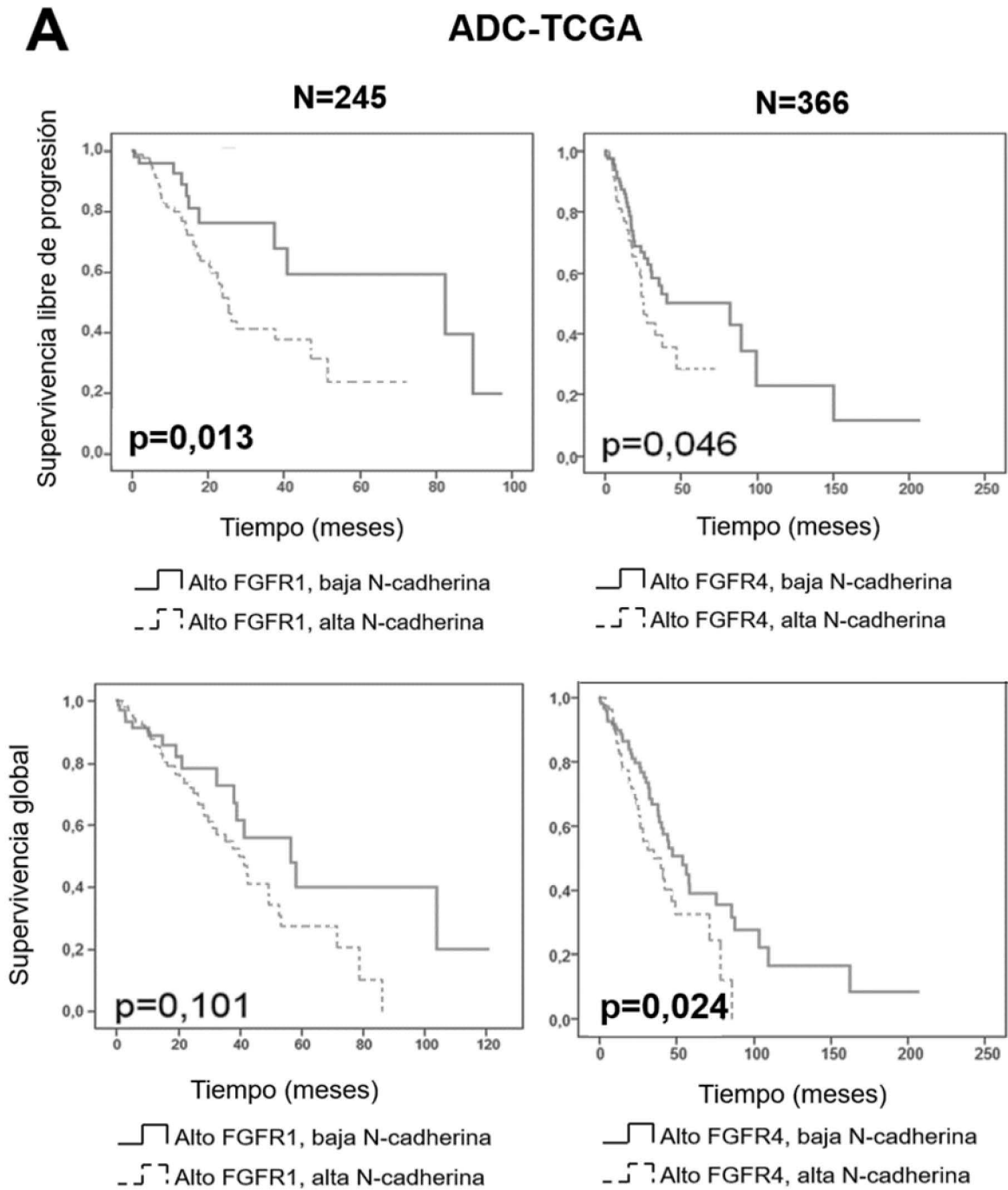


FIGURA 11 (Cont.)

B

ADC-TCGA N=478

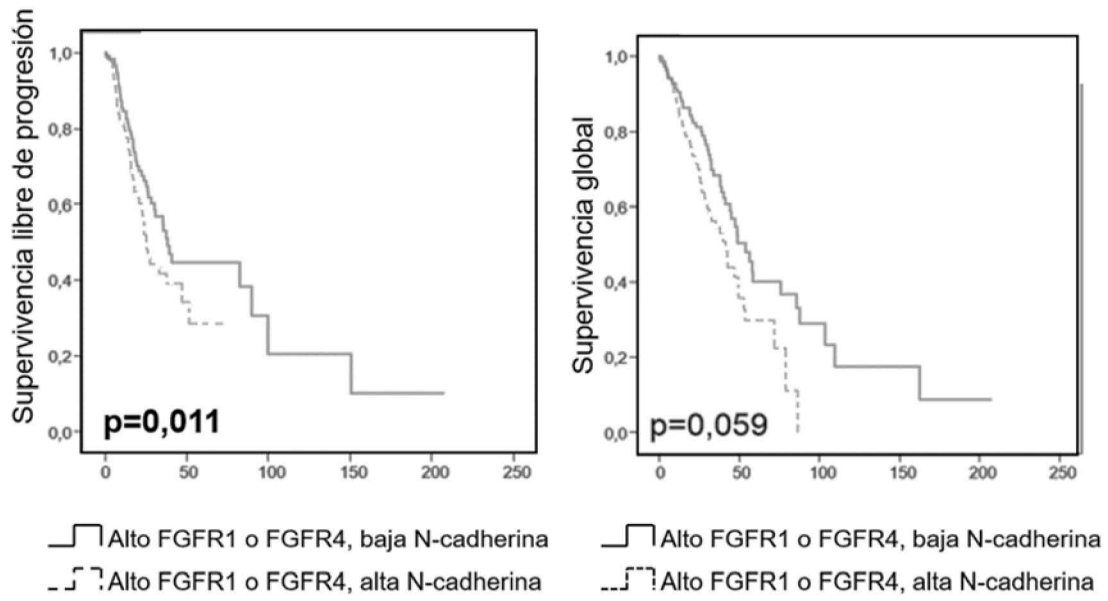


FIGURA 12

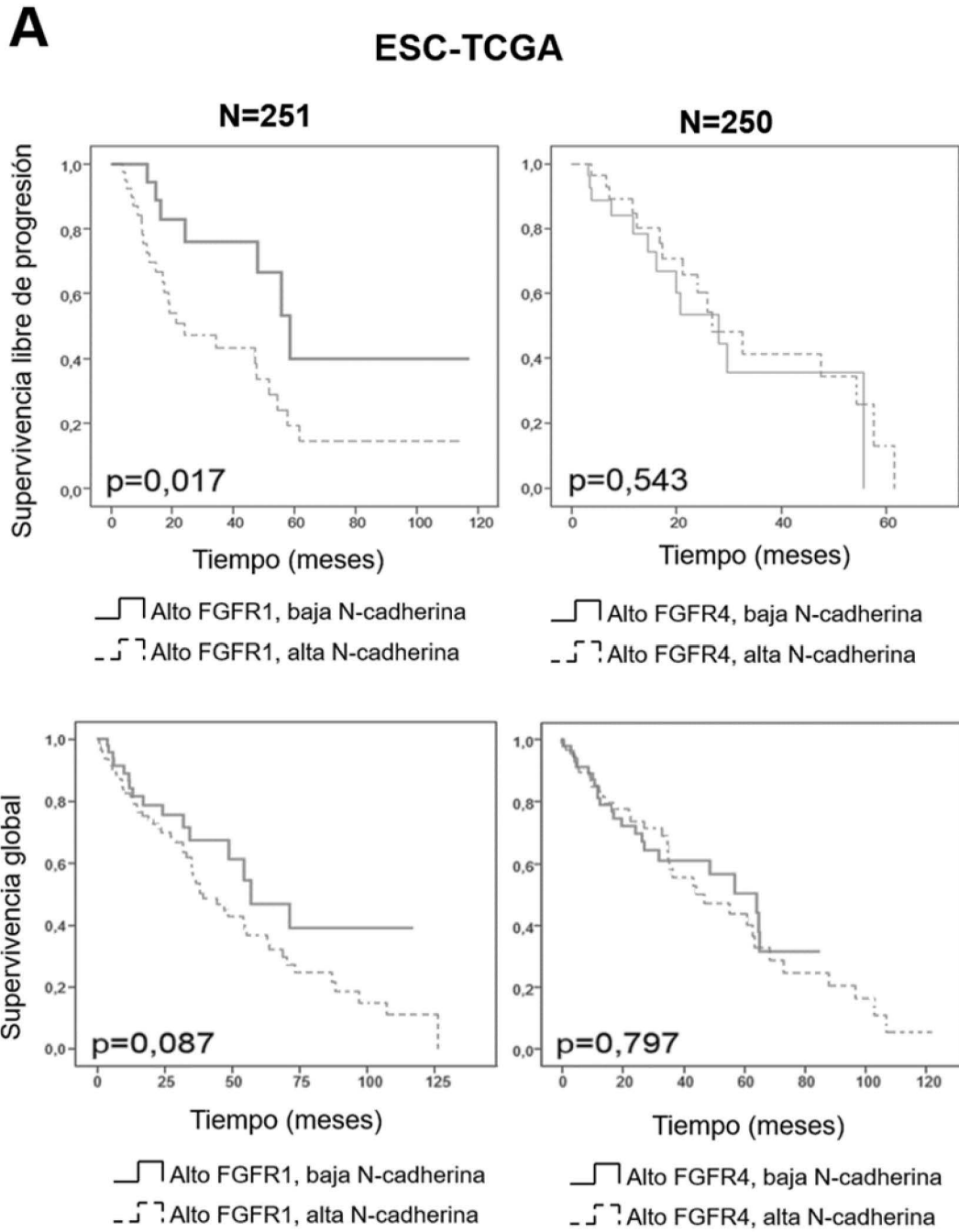


FIGURA 12 (Cont.)

B

ESC-TCGA N=373

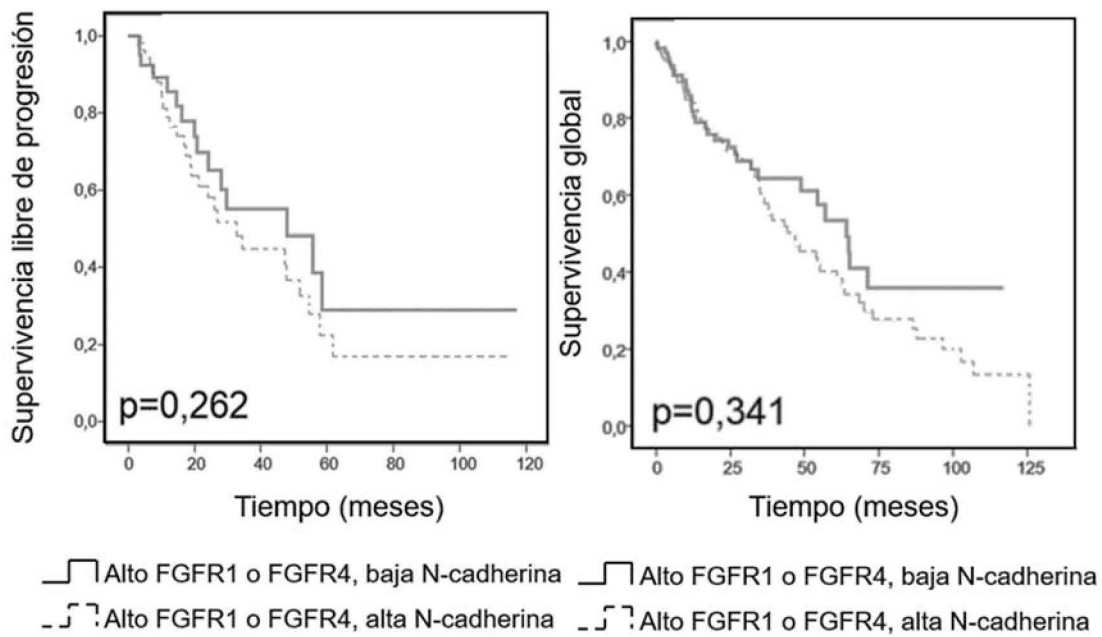
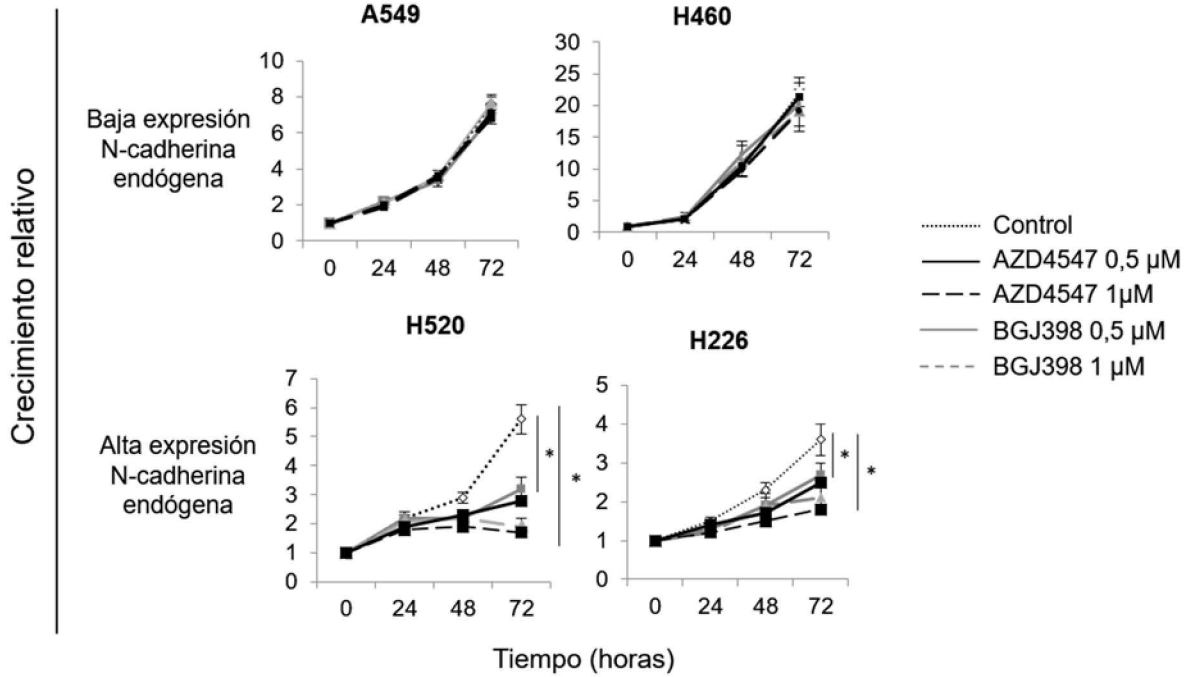


FIGURA 13

A



B

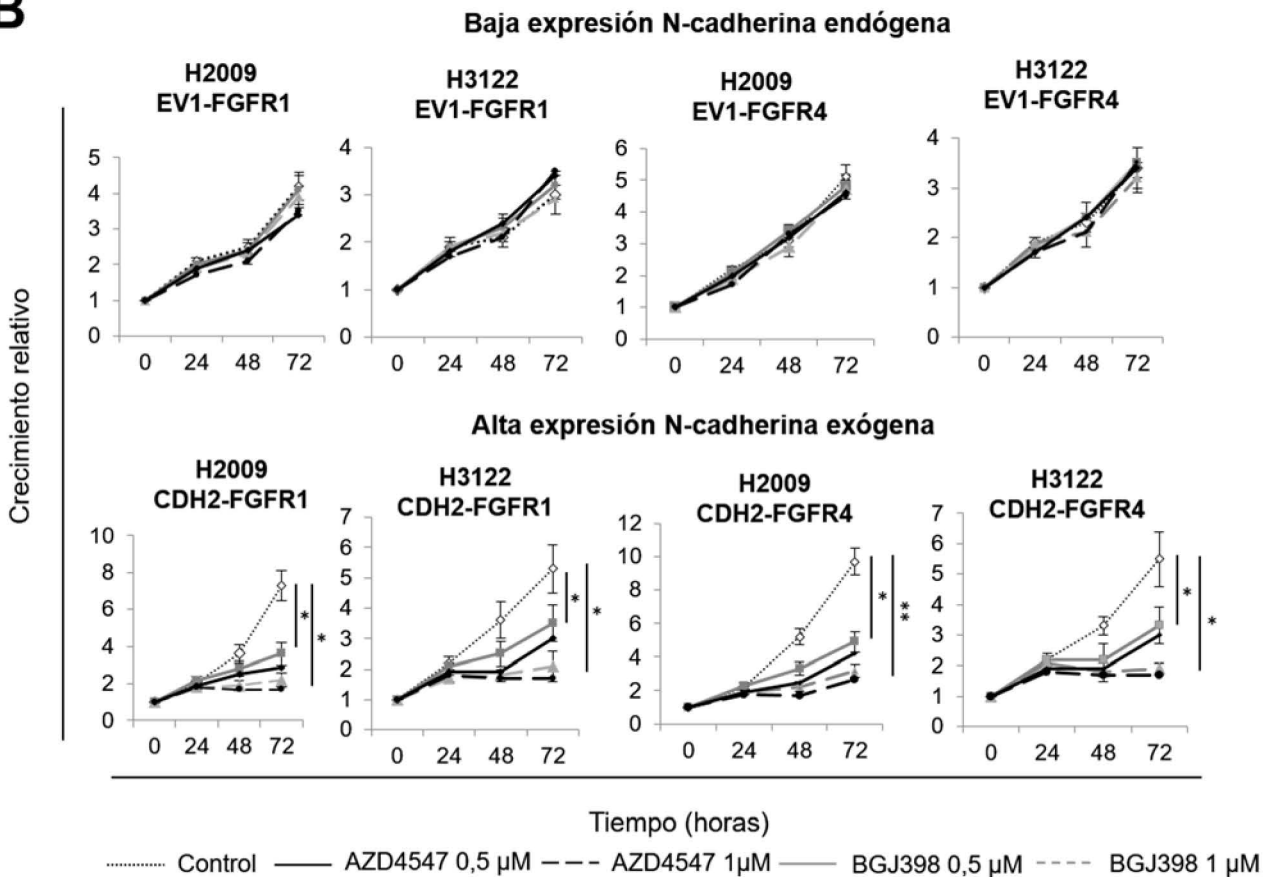


FIGURA 14

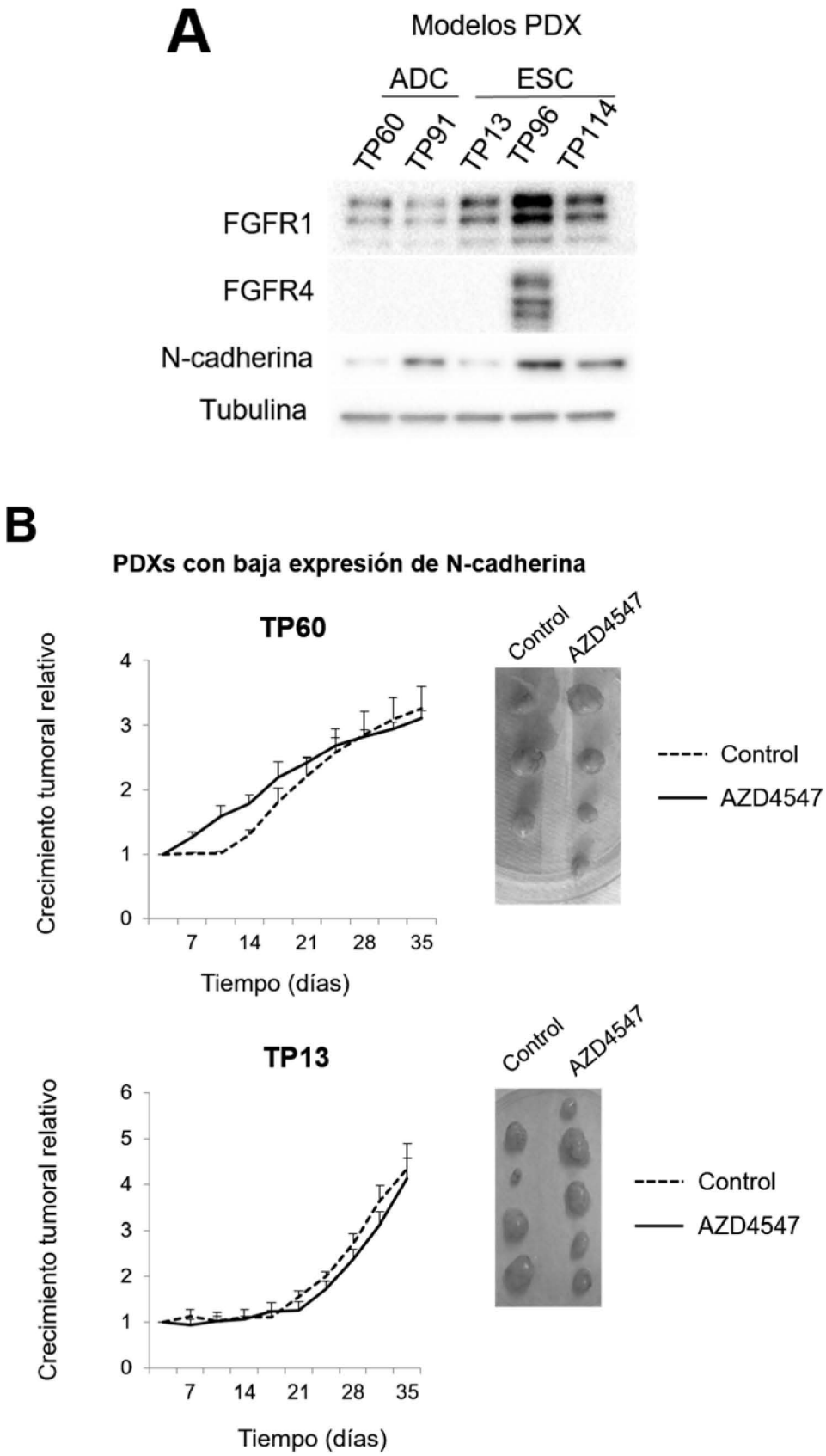


FIGURA 14 (Cont.)

C

PDXs con alta expresión de N-cadherina

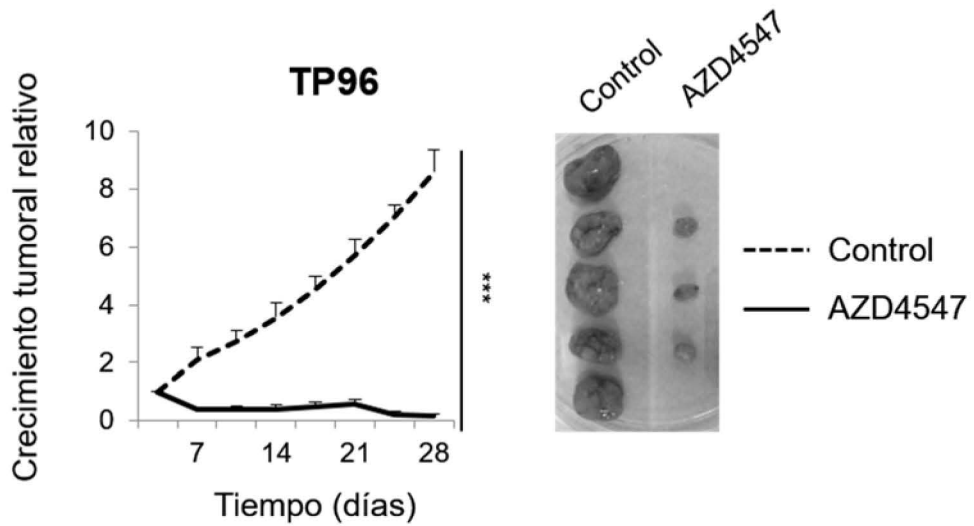
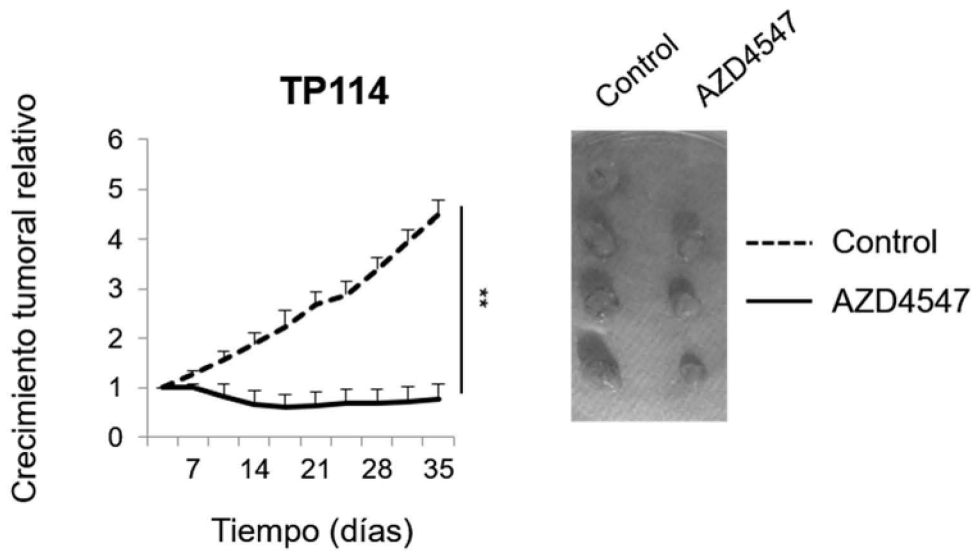
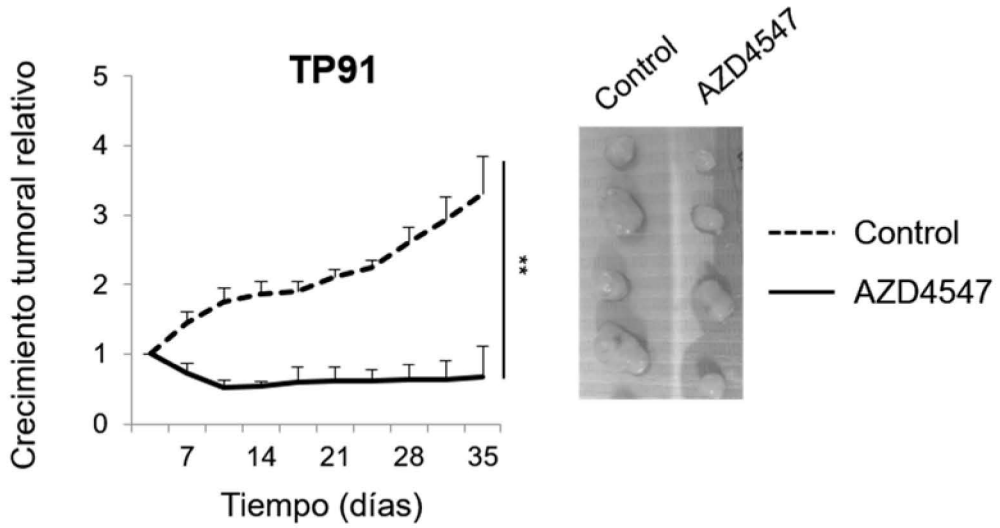
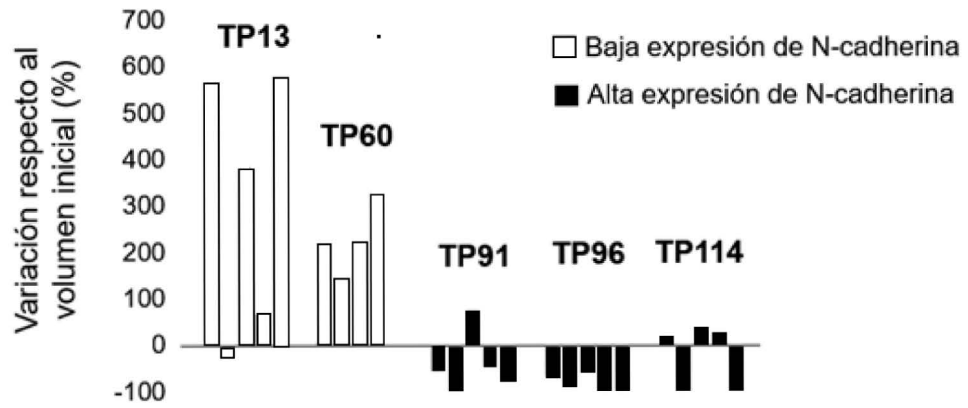


FIGURA 14 (Cont.)

D



E

