

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional  
**WO 2020/229718 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
19 de noviembre de 2020 (19.11.2020) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación internacional de patentes:

*A61K 39/395* (2006.01) *G01N 33/573* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2010.01) *A61P 35/04* (2006.01)  
*C07K 16/40* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2020/070316

(22) Fecha de presentación internacional:

18 de mayo de 2020 (18.05.2020)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201930429 16 de mayo de 2019 (16.05.2019) ES

(71) Solicitante: **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN BIOSANITARIA PRINCIPADO DE ASTURIAS** [ES/ES]; Avenida de Roma s/n, 33011 Oviedo, Asturias (ES).

(72) Inventores: **MUÑIZ ALBAICETA, Guillermo**; FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN, BIOSANITARIA PRINCIPADO DE ASTURIAS, Avenida de Roma s/n, 33011 Oviedo, ASTURIAS (ES). **LÓPEZ ALONSO, Inés**; FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN, BIOSANITARIA PRINCIPADO DE ASTURIAS, Avenida de Roma s/n, 33011 Oviedo, ASTURIAS (ES). **AMADO RODRÍGUEZ, Laura**; FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN, BIOSANITARIA PRINCIPADO DE ASTURIAS, Avenida de Roma s/n, 33011 Oviedo, ASTURIAS (ES). **GONZÁLEZ LÓPEZ, Adrián**; FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN, BIOSANITARIA PRINCIPADO DE ASTURIAS, Avenida de Roma s/n, 33011 Oviedo, ASTURIAS (ES). **LÓPEZ MARTÍNEZ, Cecilia**; FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN, BIOSANITARIA PRINCIPADO DE ASTURIAS, Avenida de Roma s/n, 33011 Oviedo, ASTURIAS (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Rubén Darío 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,

KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: PCSK9 INHIBITORS FOR THE PREVENTION AND/OR TREATMENT OF CANCER

(54) Título: INHIBIDORES DE PCSK9 PARA LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE CÁNCER

(57) Abstract: The present invention relates to the use of a proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 or PCSK9 inhibitor for the prevention and/or treatment of metastasis in a subject who is suffering from cancer and is undergoing, or is going to undergo, mechanical ventilation.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso de un agente inhibidor de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 o PCSK9 para la prevención y/o el tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido, o va a ser sometido, a ventilación mecánica.



**WO 2020/229718 A1**

## INHIBIDORES DE PCSK9 PARA LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE CÁNCER

### DESCRIPCIÓN

La presente invención se engloba dentro del campo de la biología molecular aplicada a la medicina, la farmacología y la oncología. Específicamente, la invención se refiere al uso de un agente inhibidor de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 o PCSK9 para la prevención y/o el tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido, o va a ser sometido, a ventilación mecánica.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

La supervivencia a los tumores, más concretamente a los tumores pulmonares está determinada por diferentes factores, que incluyen tanto las características del tumor como del paciente. Uno de los eventos clave en la progresión tumoral que tiene más impacto en el pronóstico de los pacientes es la aparición de metástasis en órganos diferentes al pulmón. A pesar de que se han caracterizado con detalle diferentes mecanismos moleculares responsables de este proceso de metástasis, no hay aprobado, en el momento actual, ningún fármaco que actúe de forma específica en la inhibición de dicho proceso metastásico.

20

El tejido pulmonar está sometido constantemente a un estrés mecánico causado por los cambios en la presión intratorácica durante el ciclo respiratorio. En condiciones normales, durante la ventilación espontánea, estas presiones son bajas y se distribuyen de forma uniforme por el parénquima pulmonar, causando una deformación isotrópica del parénquima. Cuando un paciente requiere ventilación mecánica, ya sea por fallo respiratorio o por la necesidad de soporte ventilatorio durante un procedimiento (como la anestesia general con parálisis muscular), las presiones de ventilación empleadas son positivas, de mayor magnitud, y con una distribución heterogénea a lo largo del parénquima. Esta condición puede causar un aumento de la carga mecánica en diferentes zonas del pulmón, especialmente en las interfaces entre tejido aireado y no aireado.

30

Así, el estrés mecánico al que se ven sometidas las células es uno de los principales

determinantes de su comportamiento. Las células asentadas sobre una matriz extracelular rígida exhiben un comportamiento diferente de las asentadas sobre una matriz blanda. La carga mecánica se transmite al interior celular mediante un proceso de mecanotransducción, que culmina con un cambio en la expresión génica y, por tanto, en el comportamiento celular. Así, el estrés mecánico puede inducir cambios en la proliferación, migración o diferenciación celular.

Los pacientes con cáncer de pulmón se ven sometidos a ventilación mecánica durante la anestesia general requerida para la cirugía de su tumor. Las comorbilidades (i.e. la existencia de dos o más enfermedades en un mismo individuo, generalmente relacionadas) que presentan estos pacientes hacen que también pueden precisar ventilación mecánica al ser intervenidos por cualquier otra patología, o en casos de insuficiencia respiratoria. No se conoce cuál es el impacto del estrés mecánico provocado por dicha ventilación mecánica en la evolución de los tumores, en particular, en la evolución de los tumores pulmonares.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de conocer los efectos del estrés mecánico, preferiblemente como consecuencia de la ventilación mecánica, en la evolución del tumor y su metastización, y proporcionar las terapias adecuadas para el tratamiento de dichos tumores de la manera más eficaz posible.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han estudiado los efectos del estrés mecánico en el desarrollo y la evolución de los tumores, preferiblemente tumores pulmonares, encontrando que aquellos tumores que son sometidos a estrés mecánico muestran una mayor invasividad, favoreciendo así la metástasis del tumor.

Para llegar a esta conclusión, los inventores sometieron células tumorales a estrés mecánico mediante estiramientos equibiaxiales utilizando un equipo de deformación celular, y estudiaron su migración celular mediante un ensayo en matrigel. El resultado evidenció que el área del pocillo cubierto por células migrantes era mayor en el grupo de células que habían sufrido estrés mecánico (ver Figuras 1A y 1B) que en el grupo de células que no habían sufrido estrés mecánico. A continuación, los inventores

procedieron a hacer ensayos *in vivo* en ratones a los que provocaron tumores pulmonares, y observaron que los animales sometidos a ventilación mecánica mostraban una mayor proporción de metástasis cerebrales, renales y hepáticas que aquellos que se mantuvieron con respiración espontánea (Figura 2).

- 5 Asimismo, los inventores también han observado que las células tumorales que sufren estrés mecánico y que, por tanto, son más propensas a evolucionar a metástasis, presentan una alta expresión de genes relacionados con el procesamiento celular del colesterol (Figura 3A), especialmente de *PCSK9* (siglas derivadas de su nombre en inglés *proprotein convertase subtilisin/Kexin 9*), en comparación con aquellos tumores  
10 que no son sometidos a estrés mecánico (ver Figura 3B), y que la inhibición de la función de dicho enzima evita el aumento de dicha invasividad/agresividad (ver Figura 4).

- A efectos de la presente invención se entiende por ventilación mecánica el empleo de  
15 un dispositivo para generar presiones positivas cíclicas en la vía aérea o presiones negativas cíclicas en el espacio pleural con el fin de facilitar la ventilación alveolar en un sujeto, bien porque es incapaz de generar dichas presiones por sí mismo o porque éstas son insuficientes.

- 20 En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un agente inhibidor de PCSK9, de aquí en adelante "inhibidor de la invención", para usarlo en la prevención y/o el tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido, o va a estar sometido, a ventilación mecánica.

- 25 Tal como se usa en la presente invención, la expresión "agente inhibidor de PCSK9" se refiere a cualquier molécula capaz de inhibir total o parcialmente tanto la expresión del gen *PCSK9* como la actividad de la proteína codificada por dicho gen *PCSK9*, es decir, la proteína PCSK9. Por tanto, el agente inhibidor induce la supresión o la reducción de la transmisión de señales bioquímicas a través de PCSK9. Como se ha explicado  
30 anteriormente, la actividad de la proteína PCSK9 comprende promover la proliferación celular y metástasis. Por lo tanto, un inhibidor de PCSK9 se caracterizará por impedir o disminuir la proliferación celular y metástasis. La actividad y expresión de PCSK9 puede ser sometida a ensayo fácilmente mediante cualquier método conocido en el arte. Esta definición incluye también aquellos compuestos que evitan o disminuyen la transcripción

o expresión del gen, la maduración del ARNm, la traducción del ARNm y la modificación post-traduccional de la proteína. En una realización más preferida, el agente inhibidor puede ser un anticuerpo que reconozca la proteína de PCSK9, o un polinucleótido que codifica una secuencia antisentido de nucleótidos específicos frente a la secuencia de  
5 *PCSK9*, por ejemplo, utilizando ARNi, antisentido, ribozima o aptámeros. La actividad inhibidora puede someterse a ensayo mediante la medición del nivel de expresión de PCSK9, al nivel de la proteína o al nivel del ARN.

Los agentes inhibidores de la expresión y/o actividad de PCSK9 pueden identificarse  
10 usando procedimientos tales como una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como por ejemplo, una PCR a tiempo real, PCR anidada, PCR multiplex, un array de ADN o ARN, una hibridación, ensayos de transferencia de energía de fluorescencia en tiempo (TR-FRET), ensayo de transferencia mediante Western Blot, técnicas inmunohistoquímicas, ELISA, un array de proteínas, inmunoprecipitación o  
15 radioinmunoensayo, entre otros. Los protocolos y kits para llevar a cabo dichas técnicas son bien conocidos por los expertos en la materia y están disponibles comercialmente.

El gen *PCSK9* codifica una proteína enzimática presente en la sangre con actividad endoproteasa. El nombre es un acrónimo de su denominación en inglés *Proprotein*  
20 *Convertase Subtilisin Kexin 9*, es decir, proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9, o proteína PCSK9. Otros nombres por los que es conocido este gen son FH3, HCHOLA3, LDLCQ1, NARC-1, NARC1, o PC9. El gen PCSK9 está conservado en un gran número de especies, tales como, el chimpancé, los monos Rhesus, el ratón, la rata, el pollo, el pez cebra, *S. cerevisiae*, *S. pombe* y la rana, entre otros. En humanos, el gen  
25 *PCSK9* comprende una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 (NCBI, número de acceso NG\_009061.1) que al transcribirse da lugar a un ARN mensajero que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 (NCBI, número de acceso NM\_174936.3).

En una realización particular del inhibidor de la invención, el gen *PCSK9* comprende una secuencia de nucleótidos que tiene, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95,  
30 96, 97, 98, o 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En otra realización particular, el gen *PCSK9* comprende una secuencia de nucleótidos que tiene, un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

El término "identidad" "porcentaje de identidad" o "identidad de secuencia" entre dos

secuencias (ácidos nucleicos o proteínas), se entiende que designa un porcentaje de nucleótidos o de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se comparan, obtenido después del mejor alineamiento, siendo dicho porcentaje puramente estadístico y estando repartidas las diferencias entre las dos secuencias al azar y a lo largo de toda su longitud. Por "mejor alineamiento" o "alineamiento óptimo" se entiende que se designa el alineamiento por el cual el porcentaje de identidad determinado como se describe a continuación es el más elevado. Las comparaciones entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos tradicionalmente se llevan a cabo: comparando estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, llevándose a cabo dicha comparación por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de estas secuencias para la comparación se puede realizar, en particular con ayuda de uno de los siguientes algoritmos: el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970), el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988), los programas informáticos que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLASTP, BLASTN, BLASTX, TBLASTX, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o los servidores de internet en particular los del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (<http://www.embl.org>) y el proyecto Ensembl (<http://www.ensembl.org>)). Con el fin de obtener el alineamiento óptimo, se usa preferiblemente el programa BLAST, con la matriz BLOSUM 62. También se pueden usar las matrices PAM o PAM250, así como una matriz de identidad para las secuencias de nucleótidos.

25 Ejemplos de inhibidores de la expresión del gen *PCSK9* incluyen, sin limitarse a, un ARN de interferencia (ARNi), un oligonucleótido antisentido, una enzima de ADN, una molécula de ribozoma, un aptámero, y un CRISPR de interferencia (CRISPRi).

El término "ARNi", "ARN de interferencia" o siARN, a efectos de la presente invención significa cualquier ARN que es capaz de regular por disminución la expresión de *PCSK9*. Abarca moléculas de ARN pequeño de interferencia (ARNip), de ARN de doble cadena (ARNbc), de ARN de cadena única (ARNmc), de micro ARN (miARN), y de ARN de horquilla corta (ARNhc). Los ARNip se diseñan habitualmente contra una región 50-100 nucleótidos después del extremo 3' (*downstream*) del codón iniciador de la traducción,

mientras que la 5'UTR (región no traducida) y la 3'UTR se evitan habitualmente.

Los ARNi son agentes que son capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia de ARN. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, se puede obtener  
5 mediante transcripción *in vitro* o se puede sintetizar *in vivo* en la célula diana. Típicamente, los ARNip consisten en una cadena doble de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan mediante la degradación o el silenciamiento  
10 post-transcripcional del mensajero diana.

Los ARNip de la invención son sustancialmente homólogos al ARNm del gen *PCSK9* (SEQ ID NO: 1) o a la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2) que codifica la proteína PCSK9 (SEQ ID NO: 3). Por "sustancialmente homólogos" se entiende que tienen una  
15 secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de forma que el ARNip sea capaz de provocar la degradación de este por interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para provocar dicha interferencia incluyen, sin limitar a, ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen distintas modificaciones químicas entre las que se incluyen, sin limitar a:

- 20 - ARNip en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotionato.
- Conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo.
- Modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular el extremo  
25 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales hidroxilo en posición 2'.
- Nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alkilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribosa o 2'-O-fluorosibosa.
- Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo  
30 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanosina).

Los ARNip pueden ser usados tal cual, es decir, en forma de un ARN bicatenario con las características anteriormente mencionadas. No obstante, también es posible el uso

de vectores que contienen las secuencias de las cadenas sentido y antisentido de los ARNip bajo el control de promotores adecuados para su expresión en la célula de interés. Los vectores adecuados para la expresión de ARNip son aquellos en que las dos regiones de ADN que codifican para las dos cadenas del ARNip se encuentran  
5 dispuestas en tándem en una misma cadena de ADN separadas por una región separadora que, al transcribirse, forma un bucle y en donde un único promotor dirige la transcripción de la molécula de ADN que da lugar al ARNhc (en *short hairpin* RNA o shRNA). Los ARNip pueden ser generados intracelularmente a partir de los llamados ARNhc, caracterizados por que las cadenas antiparalelas que forman el ARNip están  
10 conectadas por una región bucle u horquilla. Los ARNhc pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus y estar bajo el control de un promotor. Promotores adecuados para la expresión de ARNhc son los promotores adecuados para su expresión en la célula de interés, tal y como se ha indicado anteriormente.

15 Los ARNip y ARNhc de la invención se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas para el experto en la técnica. La región de la secuencia de nucleótidos que se toma como base para diseñar los ARNip no es limitante y puede contener una región de la secuencia codificante (entre el codón de iniciación y el codón de terminación) o, alternativamente, puede contener secuencias de la región no traducida 5' o 3',  
20 preferentemente de entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en sentido 3' con respecto al codón de iniciación.

En una realización preferida de la invención, ARNi capaces de inhibir el gen *PCSK9* se seleccionan de la lista que consiste en: Inclisiran, M-005989-01 (Dharmacon), L-005989-  
25 00 (Dharmacon) y E-005989-00 (Dharmacon).

En la presente invención se entiende por "oligonucleótido antisentido" o "ARN antisentido" a la molécula de ácido nucleico que inhibe directamente la expresión del gen al unirse a la doble hélice de ADN mediante enlaces tipo *Hoogsteen*, formando una  
30 triple hélice que impide la transcripción mediada por ARN polimerasa II, o al emparejarse con los ARN sentido y forma moléculas bicatenarias que no pueden ser traducidas, por lo que son digeridas por la RNasa H celular. En general, estos procedimientos se refieren al rango de técnicas generalmente empleadas en la técnica e incluyen cualquier procedimiento que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son, por lo tanto, estables *in vivo*. Los ejemplos de moléculas de ácidos nucleicos para uso de las mismas como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y metilfosfonato.

Respecto a la obtención del oligonucleótido antisentido, son preferidas las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivadas de la localización de partida de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (bien ADN bien ARN) que son complementarios al ARNm que codifica la proteína diana (proteína PCSK9). Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm y prevendrán la traducción.

Tanto los oligonucleótidos que son complementarios a las regiones 5' como 3' no traducidas del ARNm funcionan de forma eficaz para inhibir la traducción. En el caso de que se diseñen oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm, éstos deberían incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces, pero también se podrían usar según la invención. Si están diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud y tener preferiblemente menos de alrededor de 100 y más preferiblemente menos de alrededor de 50, 25, 17 o 10 nucleótidos de longitud. La capacidad de los oligonucleótidos antisentido de inhibir la expresión génica puede comprobarse mediante estudios *in vitro* que son práctica de rutina para el experto en la materia. Los resultados obtenidos en dichos estudios se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido control que, preferiblemente, será aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido a ensayar y que difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación inespecífica.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser un ADN o ARN monocatenario o bicatenario o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos. El oligonucleótido se puede modificar en el grupo de la base, el grupo del azúcar (un grupo

azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero no está limitado a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa) o el esqueleto de fosfato [oligómeros ácido nucleico peptídico o ANP (en inglés *Peptide Nucleic Acid* o PNA)], por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular o la barrera hematoencefálica. Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, agente de escisión desencadenada por hibridación, etc. En el contexto de la presente invención, también es posible que el oligonucleótido antisentido sea un oligonucleótido alfa-anomérico. Mientras que se pueden usar oligonucleótidos antisentido complementarios a la región codificante de la secuencia diana de ARNm, también se pueden usar aquellos complementarios a la región transcrita no traducida. En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del oligonucleótido antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNm endógenos. Por lo tanto, a la hora de introducir en las células el oligonucleótido antisentido, éste puede ir en una construcción de ADN recombinante en la que el oligonucleótido antisentido se localiza bajo el control de un promotor fuerte. De forma alternativa, se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en las células diana en el cuerpo. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido son morfolinós antisentido.

25 Por otro lado, la invención también contempla el uso de enzimas de ADN para inhibir la actividad de la proteína PCSK9. Las enzimas de ADN son capaces de inhibir la expresión del gen que codifica la proteína PCSK9 gracias a la incorporación de la tecnología antisentido como la de las ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana del ácido nucleico en particular, parecido a un oligonucleótido antisentido, pero que además son capaces de cortar específicamente el ácido nucleico diana, es decir, además tienen capacidad catalítica.

30

Adicionalmente, la presente invención también contempla el uso de ribozimas para inhibir la expresión del gen *PCSK9*. En la presente invención se entiende por "ribozimas"

a las pequeñas moléculas de ARN con actividad catalítica diseñadas para reconocer un ARNm específico y degradarlo gracias a su actividad endonucleolítica específica. El mecanismo de acción de la ribozima implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a un ARN diana complementario, seguido por un suceso de corte endonucleolítico. La composición de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente. Las ribozimas usadas en la presente invención incluyen las ribozimas de cabeza de martillo, las ARN endorribonucleasa (a continuación en el presente documento "ribozimas de tipo Cech"). Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y se deberían distribuir a células que expresan el gen diana *in vivo*. Un procedimiento preferido de distribución implicar usar una construcción de ADN que "codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, contrariamente a otras moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular menor para su eficacia.

En el contexto de la presente invención se entiende por "aptámeros" moléculas de ácido nucleico que son capaces de unirse a otra molécula de particular interés con gran afinidad y especificad. En el contexto de la presente invención, esta molécula diana de particular interés sería PCSK9. Un aptámero se obtiene típicamente por selección *in vitro* de la unión a una molécula diana. Sin embargo, la selección *in vivo* también es posible. Tiene típicamente entre 10 y 300 nucleótidos de longitud. Más comúnmente, un aptámero debe estar entre 30 y 100 nucleótidos de longitud.

En una realización preferida, también es posible utilizar tecnologías ZFNs, TALENs y CRISPRs como métodos para la edición genómica, preferiblemente para la inhibición del gen *PCSK9*. De este modo, un agente capaz de alterar de forma inducida la expresión o actividad de *PCSK9* puede comprender: una nucleasa capaz de modificar el gen *PCSK9* endógeno, tal como para regular por disminución o abolir la expresión de *PCSK9*, o una proteína represora heteróloga capaz de reprimir la transcripción del gen *PCSK9* endógeno, tal como la proteína represora heteróloga. El agente puede

comprender más de una nucleasa. En determinadas realizaciones, el agente comprende más de una proteína TALE o dedo de zinc, por lo que una TALE o dedo de zinc establece como diana a *PCSK9*. En otras realizaciones, el agente comprende más de dos nucleasas, capaces de establecer como diana múltiples genes. En determinadas realizaciones, se utiliza un sistema CRISPR-Cas y se utilizan múltiples ARN guía para dirigir la enzima CRISPR a múltiples dianas génicas.

A efectos de la presente invención, los "CRISPRi", análogos a los ARNi, tienen la capacidad de suprimir la transcripción génica, en un modo reversible al ser específicos, pero sin hacer cortes.

Así, en una realización particular, el agente inhibidor de la expresión del gen *PCSK9* es un ARNi seleccionado de la lista que consiste en: moléculas de ARNip, ARNbc, ARNmc, miARN, ARNhC, o cualquier combinación de las mismas, un oligonucleótido antisentido, una enzima de ADN, una ribozima, un aptámero o un CRISPRi. En una realización más preferida, ARNi capaces de inhibir el gen *PCSK9* se seleccionan de la lista que consiste en: Inclisiran, M-005989-01 (Dharmacon), L-005989-00 (Dharmacon) y E-005989-00 (Dharmacon).

Adicionalmente, la inhibición total o parcial de la actividad de la proteína codificada por dicho gen *PCSK9*, es decir, la proteína PCSK9, puede llevarse a cabo mediante el empleo de agentes que se unen de forma específica a, y bloquean, la proteína PCSK9. En humanos, la proteína PCSK9 comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 (NCBI, número de acceso NP\_777596.2). La proteína PCSK9 tiene un papel muy importante en la regulación del metabolismo del colesterol.

Dentro del contexto de la presente invención, también se incluyen variantes funcionalmente equivalentes de la proteína PCSK9. Se entiende por "variante funcionalmente equivalente de la proteína PCSK9" a aquella proteína que (i) comprende una secuencia en la que uno o más aminoácidos están sustituidos por un residuo de aminoácidos conservado o no conservado (preferentemente un aminoácido conservado), o (ii) comprende una secuencia que comprende una inserción o una delección de uno o más aminoácidos, y que tiene la misma función que la proteína PCSK9, es decir, regular el metabolismo del colesterol.

PCSK9 es una serin-proteasa que juega un papel muy importante durante el metabolismo de LDL (lipoproteínas de baja densidad, del inglés "*low density lipoproteins*"), inhibiendo el reciclaje del receptor de LDL. Fisiológicamente las partículas de LDL circulantes se unen a los receptores de LDL (LDLR) que se encuentran en la superficie celular. Una vez formado el complejo LDL-LDLR, se produce la internalización del mismo. En el interior celular la partícula de LDL se disocia del receptor y es eliminada por los lisosomas permitiendo el reciclaje del receptor que vuelve a la superficie celular. La unión de PCSK9 al receptor LDLR evita el reciclaje del mismo. El complejo PCSK9-LDLR es conducido a los lisosomas para su degradación. Se produce una reducción de la expresión del receptor en la superficie celular y esto se traduce en una capacidad disminuida de eliminar las partículas de LDL circulantes.

Por lo tanto, en otra realización particular, la proteína PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 3. En otra realización particular, la proteína PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene, un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 3.

Ejemplos de agentes inhibidores de la proteína PCSK9 incluyen, sin limitarse a, una molécula que reconoce de forma específica y se une a la proteína PCSK9, o a un fragmento de dicha proteína, o una variante funcionalmente equivalente de dicha proteína tal como se ha definido previamente, y bloquea su acción enzimática sobre el receptor de LDL-R. Así, en una realización particular, el agente inhibidor es una molécula que reconoce de forma específica la proteína PCSK9. En otra realización todavía más particular, la molécula que reconoce de forma específica la proteína codificada por el gen *PCSK9* es un anticuerpo que se une específicamente a PCSK9, preferiblemente, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a PCSK9.

En la presente invención se entiende por "anticuerpos específicos de la proteína PCSK9" a aquellos anticuerpos o péptidos con capacidad de unión que reconocen de forma específica la proteína PCSK9, uniéndose a ella e impidiendo que realice una o más de sus funciones. En el contexto de la presente invención, el anticuerpo impide que la proteína PCSK9 pueda promover la proliferación celular y metástasis.

Se entiende por "anticuerpo" a una glicoproteína del tipo gamma globulina que forma parte del sistema inmunitario humoral que se une de forma específica a un antígeno. El término anticuerpo tal como aquí se utiliza incluye sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. Los anticuerpos pueden ser preparados empleando cualquiera de los procedimientos que son conocidos por el experto en la materia. Las técnicas para preparar y utilizar diversos constructos y fragmentos basados en anticuerpos se conocen bien en el estado de la técnica. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos también son conocidos en el estado de la técnica. Una vez identificados los anticuerpos con capacidad de unión a la proteína PCSK9, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de esta proteína usando un ensayo de identificación de ensayos inhibidores. En una realización particular, el anticuerpo con capacidad de inhibir la proteína PCSK9 es un anticuerpo monoclonal. Más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal se selecciona de la lista que consiste en: Evolocumab (Amgen, USA), Alirocumab (Sanofi, USA), Bococizumab (Pfizer, USA), 1D05-IgG2 (Merck, USA), RG-7652 (Genentech, USA) y LY3015014 (Eli Lilly, USA).

Ensayos para identificar si un compuesto dado es un inhibidor de la proteína PCSK9 incluyen, sin limitar a: inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, ensayo de transferencia mediante Western, ensayo inmunofluorescente, inmunoensayo enzimático, ensayo quimioluminiscente, ensayo inmunohistoquímico, y ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Además, los inmunoensayos anteriores se pueden utilizar combinados, tales como inmunoprecipitación seguido de transferencia mediante Western. Dichos ensayos pueden ser inmunoensayos directos, indirectos, competitivos, o no competitivos tal como se describen por la técnica.

En la presente invención se entiende por "cáncer" una amplia gama de condiciones causadas por una proliferación excesiva de células malignas (también conocidas como cancerígenas o cancerosas), con rasgos típicos de comportamiento y crecimiento descontrolado (crecimiento y división más allá de los límites normales, invasión del tejido circundante y, a veces, metástasis). Comprende cualquier enfermedad de un órgano o tejido en un mamífero, preferiblemente el hombre, caracterizado por una multiplicación pobremente controlada, o descontrolada, de células normales o anormales en dicho

tejido, y su efecto en la totalidad del cuerpo. El término cáncer, dentro de esta definición, incluye las neoplasias benignas, displasias, hiperplasias, así como neoplasias que muestran metástasis, o cualquier otra transformación como por ejemplo, leucoplasias que a menudo preceden al brote del cáncer. Las células y los tejidos son cancerosos cuando crecen y se replican más rápidamente de lo normal, desplazándose o dispersándose en el tejido sano circundante o cualquier otro tejido del cuerpo, lo que se conoce como metástasis, asume formas y tamaños anormales, muestra cambios en su ratio nucleocitoplasmático, policromasia nuclear, y finalmente cesa. Células y tejidos cancerosos pueden afectar al cuerpo como un todo causando síndromes paraneoplásicos, o si el cáncer ocurre en un órgano o tejido vital, siendo interrumpida o dañada su función normal, con posibles resultados fatales. El resultado final de la evolución de un cáncer que involucra un órgano vital, ya sea primario o metastático, es la muerte del mamífero afectado. El cáncer tiende a extenderse, y su grado de extensión se relaciona normalmente con cambios en la supervivencia a la enfermedad.

15

Generalmente se dice que el cáncer se encuentra en uno de tres estados de crecimiento: temprano o localizado, cuando el tumor aún se encuentra confinado en el tejido de origen, o en su localización primaria; extensión directa, cuando las células cancerígenas del tumor han invadido el tejido adyacente o se ha extendido únicamente a los nódulos linfáticos regionales; o metástasis, cuando las células cancerosas han migrado a partes distantes del cuerpo desde la localización primaria, por medio del sistema circulatorio o linfático, y se ha establecido en localizaciones secundarias.

Se dice que un cáncer es maligno por su tendencia a causar la muerte si no es tratado. Los tumores benignos, usualmente no causan la muerte, aunque pueden hacerlo si interfieren con la función normal del cuerpo por sus características o localización, tamaño o efectos paraneoplásicos. Aquí los tumores malignos caen dentro de la definición de cáncer dentro del ámbito de esta definición también. En general, las células cancerosas se dividen a una tasa mayor que las células normales, pero la distinción entre el crecimiento de los tejidos cancerosos y normales no es tanto que la división celular sea mucho más rápido, como la pérdida parcial o completa de detener su crecimiento y de diferenciarse en un tejido útil y limitado, del tipo que caracteriza el equilibrio funcional de crecimiento del tejido normal. En una realización preferida de este aspecto de la invención, cáncer se selecciona de la lista que consiste en: Este término

incluye, sin limitación, cáncer de pulmón, mama, corazón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos, hepatobiliar e hígado; así como tumores tales como, sin limitación, adenoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hemangioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, cáncer hepatobiliar, osteosarcoma, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma y teratoma. Asimismo, este término incluye melanoma acrolentiginoso, adenocarcinoma actínico queratosis, carcinoma adenoide quístico, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de Bartholin, carcinoma de células basales, carcinoma de glándulas bronquiales, carcinoide capilar, carcinoma, carcinosarcoma, colangiocarcinoma, cistadenoma, tumor endodérmico del seno, hiperplasia endometrial, sarcoma endometrial estromal, adenocarcinoma endometriode, sarcoma ependimal, sarcoma de Swing, hiperplasia nodular focal, tumores de células germinales, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastoma, hemangioendotelioma, hemangioma, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, cáncer hepatobiliar, insulinoma, neoplasia intraepitelial, neoplasia interepitelial de células escamosas, carcinoma invasivo de células escamosas, carcinoma de células grandes, leiomiosarcoma, melanoma, melanoma maligno, tumor mesotelial maligno, meduloblastoma, meduloepitelioma, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, osteosarcoma, adenocarcinoma papilar seroso, tumores de la hipófisis, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma microcítico, carcinoma de tejido blando, tumor que secreta somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma indiferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrugoso, vipoma, tumor de Wilm, cáncer intracerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer rectal, astrocitoma, glioblastoma, cáncer microcítico y cáncer no microcítico, melanoma metastásico, cáncer de próstata metastásico independiente de andrógenos, cáncer de próstata metastásico dependiente de andrógenos y cáncer de mama. En una realización particular de la presente invención, el cáncer es un cáncer de pulmón, mama, colon o renal. En otra realización más preferida aún, el cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón primario o un cáncer de pulmón metastático.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto", "individuo" o "paciente", utilizados indistintamente a lo largo del presente documento, se refiere a un mamífero, e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

A efectos de la presente invención, se entiende que un sujeto está sometido a ventilación mecánica, cuando precisa de anestesia general durante cualquier procedimiento de cirugía, así como en casos de insuficiencia respiratoria.

Los pacientes con cáncer de pulmón se ven sometidos a ventilación mecánica durante la anestesia general requerida para la cirugía de su tumor. Las comorbilidades (i.e. la existencia de dos o más enfermedades en un mismo individuo, generalmente relacionadas) que presentan estos pacientes hacen que también pueden precisar ventilación mecánica al ser intervenidos por cualquier otra patología, o en casos de insuficiencia respiratoria. No se conoce cuál es el impacto del estrés mecánico provocado por dicha ventilación mecánica en la evolución de los tumores, en particular, en la evolución de los tumores pulmonares

El término "tratamiento", tal como se utiliza en la presente invención, hace referencia a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un humano) incluyendo:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir detener el desarrollo de la misma;
- (ii) aliviar la enfermedad o condición patológica, es decir causar la regresión de la enfermedad o condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o condición patológica.

El término "prevención", tal como se utiliza en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar la enfermedad o condición patológica en un sujeto (preferiblemente un mamífero y, más preferiblemente, un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene una predisposición a la condición patológica pero

no se ha diagnosticado aún.

En otra realización particular, el agente inhibidor de la expresión de PCSK9 para su uso según se describe en el presente documento, está comprendido dentro de una  
5 composición farmacéutica. En otra realización más particular aún, el inhibidor de la expresión de PCSK9 se encuentra en una cantidad terapéuticamente efectiva, y opcionalmente dicha composición farmacéutica comprende además, un vehículo, adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En el sentido utilizado en la descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" hace referencia a la cantidad de inhibidor de la expresión y/o actividad de PCSK9 de acuerdo con la presente invención, calculada para producir el efecto requerido y, en general, será determinada, entre otros factores, por las propiedades  
15 inherentes de los compuestos y de los sujetos a tratar, incluyendo edad, condición del paciente, gravedad de la alteración o trastorno, y la vía y frecuencia de administración.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los expertos en la técnica y utilizados comúnmente en la producción de composiciones terapéuticas. El  
20 término "vehículo farmacéuticamente aceptable" es una sustancia utilizada en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en la misma hasta un determinado volumen o peso. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción idéntica a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la  
25 incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o proporcionar a la composición consistencia y forma. Adicionalmente, la composición farmacéutica de la invención puede comprender uno o más adyuvantes y/o excipientes. El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o  
30 ayuda a la preparación de la composición en el sentido de proporcionarle consistencia o proveerla de sabores que la hagan más agradable. Por tanto, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes enlazados entre sí, tal como por ejemplo en el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de dar color, la función de proteger la composición, tal como por ejemplo, aislarla del aire y/o

la humedad, la función de rellenar un comprimido, cápsula o cualquier otra forma de presentación, una función disgregante para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otros tipos de excipientes no mencionados en este párrafo.

5

Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de los mismos, en lo que se refiere a composiciones, soportes, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente e indican que los materiales son susceptibles de ser administrados a un sujeto sin la producción de efectos fisiológicos indeseables.

10  
15

En una realización particular, dicha composición farmacéutica se prepara en forma sólida o en suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición provista por la presente invención puede ser administrada a través de cualquier vía de administración apropiada, por lo que dicha composición será formulada en la forma farmacéutica adecuada para la vía de administración seleccionada. En una realización en particular, la administración de la composición provista por la invención se realiza por vía parenteral, oral, intraperitoneal, subcutánea, intracraneal, etc. Una revisión de las diferentes formas farmacéuticas de administración de fármacos y los excipientes requeridos para obtenerlos puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulii Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

20  
25

En otra realización preferida, la composición farmacéutica para su uso según se describe aquí puede comprender además otros fármacos o agentes, preferiblemente quimioterapéuticos, utilizados en el tratamiento de cáncer, más concretamente en el tratamiento de cáncer de pulmón, con vistas a actuar de manera complementaria o como refuerzo. En otra realización más particular aún, los agentes quimioterápicos se seleccionan de la lista que consiste en: cisplatino, carboplatino, docetaxel, gemcitabina, paclitaxel, vinorelbina, etopósido, vinblastina, pemetrexed e irinotecán.

30

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un sujeto que padece cáncer y que está, o va a estar sometido a ventilación mecánica, que comprende

- 5 a) cuantificar el nivel de expresión y/o actividad de PCSK9 en una muestra biológica aislada del sujeto, y
- b) comparar el nivel de expresión y/o actividad obtenido en la etapa (a) con el valor de expresión y/o actividad de PCSK9 en una muestra control,

10 en donde si el valor de expresión y/o actividad obtenido en la etapa (a) es mayor que el valor de expresión y/o actividad de la muestra control, entonces la terapia comprende la administración al sujeto de un agente inhibidor de PCSK9, según se ha descrito a lo largo del presente documento.

15 A efectos de la presente invención, el término "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, como sangre, suero, orina, saliva, fluido cerebroespinal, o a una muestra sólida o semisólida, como tejidos, heces, y similar, o alternativamente, un tejido sólido tales como aquellos usados habitualmente en diagnóstico histológico, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. En una realización más preferida, la muestra  
20 biológica aislada es una muestra de tejido tumoral.

"Muestra de tejido tumoral" se refiere a una muestra de tejido procedente del tumor, ya sea del tumor primario o del tumor metastásico, en particular de cáncer de mama, de cáncer de colon, de cáncer de pulmón, de cáncer de riñón o de cáncer de tiroides, más  
25 en particular de cáncer de pulmón primario o cáncer de pulmón metastásico. Dicha muestra se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, biopsia, utilizando métodos bien conocidos para los expertos en las técnicas médicas relacionadas. Los métodos para obtener una muestra de la biopsia incluyen partición en trozos grandes de un tumor, o microdissección u otros métodos de separación de células  
30 conocidos en la técnica. Las células tumorales se pueden obtener de forma adicional mediante citología por aspiración con una aguja fina. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, estas se pueden fijar en formalina y embeber en parafina o congelar primero y después embeber en un medio criosolidificable, tal como compuesto OCT, mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permite la congelación

rápida. La muestra de acuerdo a la presente invención también comprende cualquier biofluido corporal que contiene tejido procedente del tumor, RNA procedente del tumor, DNA procedente del tumor o proteína procedente del tumor incluyendo, sin quedar limitado a, plasma o suero, tal como plasma o suero con presencia de exosomas o de  
5 DNA de origen tumoral.

La determinación de los niveles de expresión y/o actividad de PCSK9 necesita ser correlacionada con valores de una muestra control o muestra de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que está siendo objeto de análisis, la naturaleza exacta  
10 de la muestra control puede variar. Así, en el caso de que se trate de diseñar una terapia personalizada, entonces la muestra de referencia es una muestra biológica de un sujeto con cáncer de pulmón que va a ser sometido, o ya ha sido sometido a ventilación mecánica, o que corresponden al valor mediana de los niveles de expresión y/o actividad de PCSK9 medidos en una colección de tejidos tumorales en muestras de biopsias, o  
15 muestras de fluidos biológicos tales como sangre o plasma, de sujetos con cáncer de pulmón que no han sido sometidos a ventilación mecánica.

La colección de muestras de las que deriva el nivel de referencia estará preferiblemente constituida por sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto de  
20 estudio.

Así, la expresión "muestra control" se refiere a una muestra biológica aislada, según se ha definido previamente, procedente de un sujeto sano o de un sujeto que padece cáncer, preferiblemente cáncer de pulmón, pero con la característica particular de que  
25 no ha sido, o no va a ser sometido, a ventilación mecánica.

La expresión "valor de referencia" se refiere a un valor de laboratorio utilizado como referencia para los valores/datos obtenidos mediante a partir de muestras obtenidas de los pacientes. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto,  
30 un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, una serie de valores, un valor promedio, una mediana, un valor medio, o un valor expresado por referencia a un valor de control o de referencia. Un valor de referencia puede estar basado en el valor obtenido a partir de una muestra individual, como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del paciente objeto de estudio pero obtenido en un punto anterior en el

tiempo. El valor de referencia puede estar basado en un elevado número de muestras, tales como los valores obtenidos en una población de los sujetos del grupo de edad cronológica coincidente con la del paciente objeto de estudio o basado en un conjunto de muestras de inclusión o exclusión de la muestra a analizar.

5

En otra realización particular, el método *in vitro* de la invención se caracteriza por que la cuantificación del nivel de expresión del gen *PCSK9* se lleva a cabo mediante la cuantificación del ADNc, ARNm o de la proteína codificada por el gen *PCSK9* o de un fragmento de dicha proteína. Más preferiblemente, la cuantificación del ADNc o del  
10 ARNm, se lleva a cabo mediante cualquier técnica para la cuantificación de dichos compuestos, que sea conocida por el experto en la materia. Más preferiblemente, dicha cuantificación se lleva a cabo mediante cualquiera de las técnicas seleccionadas de la lista que consiste en: una reacción en cadena de la polimerasa, un array de ADN o ARN, o una hibridación.

15

En otra realización particular, el método *in vitro* de la invención se caracteriza por que la cuantificación de la proteína PCSK9 se lleva a cabo mediante cualquier técnica útil para la cuantificación proteica conocida por el experto en la materia. Más preferiblemente, la cuantificación proteica se lleva a cabo mediante cualquiera de las  
20 técnicas seleccionadas de la lista que consiste en: Western Blot, técnicas inmunohistoquímicas, ELISA o un array de proteínas.

En la presente invención se entiende que "nivel de expresión incrementado" o "nivel de expresión mayor" es el nivel de expresión cuando se refiere a niveles del gen y/o  
25 proteína PCSK9 mayores a los que aparecen en una muestra de referencia o muestra control. En particular, se puede considerar que una muestra presenta niveles altos de expresión y/o actividad de PCSK9 cuando los niveles de expresión y/o actividad en la muestra de referencia son de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces  
30 o incluso más con respecto a la muestra aislada del paciente.

En otra realización particular, el método *in vitro* de la invención se caracteriza por que el inhibidor de PCSK9 está comprendido dentro de una composición farmacéutica.

Los términos y expresiones "sujeto", "muestra aislada" "cáncer", "metástasis", "agente inhibidor", "determinación de los niveles de expresión", "gen PCSK9", "proteína PCSK9", "niveles de expresión incrementados", "composición farmacéutica" y "muestra control" han sido descritos en detalle anteriormente y son igualmente aplicables de aquí en adelante al presente aspecto de la invención, así como al resto de aspectos que se describan a continuación.

Otro aspecto de la presente intención se refiere al uso de PCSK9 como una diana farmacológica para el cribado, ensayo y/o validación de agentes, preferiblemente agentes inhibidores de PCSK9 útiles en la prevención y/o tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido, o va a estar sometido, a ventilación mecánica.

El término "diana farmacológica", tal como se utiliza en la presente invención, hace referencia al gen PCSK9 y/o a la proteína codificada por el mismo, que sea de utilidad para estudiar el efecto bioquímico de moléculas capaces de unirse al mismo. Estas moléculas pueden ser, sin limitación, compuestos, moduladores, o agentes que se seleccionan mediante métodos de cribado, en donde se analiza la inhibición de la expresión y/o la actividad del gen PCSK9 y/o la proteína codificada por el mismo.

Otro aspecto de la invención hace referencia a un método *in vitro* para el cribado y la identificación de agentes inhibidores de PCSK9, en donde el método comprende:

- a) poner en contacto un agente con el gen *PCSK9* y/o la proteína codificada por el mismo,
- b) analizar la interacción entre el agente y el gen *PCSK9* y/o la proteína codificada por el mismo, y
- c) seleccionar el agente del paso (a) capaz de inhibir la expresión y/o actividad del gen *PCSK9* y/o la proteína codificada por el mismo.

Otro aspecto de la invención hace referencia a un método *in vitro* para el cribado y la identificación de agentes útiles en la prevención y/o el tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido, o va a ser sometido, a ventilación mecánica, en donde el método comprende:

- a) poner en contacto un compuesto, agente con el gen *PCSK9* y/o la proteína codificada por el mismo,
- b) analizar la interacción entre el agente y el gen *PCSK9* y/o la proteína codificada por el mismo, y
- 5 c) seleccionar el agente del paso (a) que tenga la capacidad de inhibir la expresión y/o actividad del gen *PCSK9* y/o la proteína codificada por el mismo.

En general, los métodos de cribado mencionados anteriormente, además de las moléculas de fármacos potenciales (p. ej., agentes, moduladores, antagonistas, 10 agonistas) identificadas a partir de los mismos tienen aplicabilidad en relación a la prevención y/o tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido, o va a ser sometido, a ventilación mecánica.

En otra realización, la presente invención proporciona agentes inhibidores de PCSK9, 15 de acuerdo con la presente invención, obtenibles mediante el método de cribado divulgado en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención hace referencia a un método de prevención y/o tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido, o va a ser 20 sometido, a ventilación mecánica, que comprende administrar en una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva un agente inhibidor de PCSK9, o de la composición farmacéutica que lo comprende, según se describen en el presente documento, a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de aquí en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para 25 analizar los niveles de expresión y/o actividad de PCSK9, para la prevención y/o tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido, o va a estar sometido, a ventilación mecánica o para diseñar una terapia personalizada a un sujeto 30 que padece cáncer y que está sometido, o va a estar sometido, a ventilación mecánica.

Por "kit" tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un producto que contiene los distintos reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención empaquetados para permitir su transporte y almacenamiento. El kit además puede

incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Materiales adecuados para el empaquetado de los componentes del kit incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares.

5 Adicionalmente, los kits de la invención pueden contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los distintos componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de forma que puedan ser

10 leídas por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónicos (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternatively, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionen dichas instrucciones.

Preferiblemente, el kit o dispositivo de la invención comprende un agente inhibidor de

15 PCSK9, según se ha descrito previamente en el presente documento.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* del kit descrito anteriormente para la prevención y/o tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido, o va a estar sometido, a ventilación mecánica, o para diseñar

20 una terapia personalizada a un sujeto que padece cáncer y que está sometido, o va a estar sometido, a ventilación mecánica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para

25 los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### 30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es una gráfica que muestra la invasividad de células tumorales de las líneas B16F10luc (A) y A549 (B), expresada como área cubierta por células tras la migración a través de matrigel, en función de que las células hayan sido sometidas previamente a

estiramiento durante 24 horas o no, y que hayan sido cultivadas en un medio condicionado (procedente del cultivo de células sometidas a estiramiento) o medio convencional.

- 5 La **Figura 2** es una gráfica que muestra la proporción de animales con tumores pulmonares que mostraron metástasis en diferentes órganos 15 días después de la aplicación de ventilación mecánica (VM), comparado con aquellos animales que se mantuvieron en ventilación espontánea (Esp).
- 10 La **Figura 3** muestra un panel (A) donde se observan las rutas moleculares sobrerrepresentadas en un experimento de secuenciación de RNA, comparando células B16F10luc cultivadas en condiciones de estiramiento y células cultivadas en condiciones estáticas. El tamaño de los círculos es proporcional al número de genes en cada ruta molecular con diferencias significativas entre ambos grupos. (B) La gráfica
- 15 muestra la cuantificación de la expresión de *PCSK9* mediante reacción en cadena de la polimerasa en células cultivadas en condiciones de estiramiento y células cultivadas en condiciones estáticas.

- La **Figura 4** es una gráfica que muestra la invasividad de células tumorales de las líneas
- 20 B16F10luc (A) y A549 (B), expresada como área cubierta por células tras la migración a través de matrigel, en función de que las células hayan sido sometidas previamente a estiramiento durante 24 horas o no, y que hayan sido tratadas con el anticuerpo monoclonal Alirocumab. Las barras de color gris claro representan las células control tratadas con una IgG y las barras de color gris oscuro representan las células tratadas
- 25 con Alirocumab.

## EJEMPLOS

- A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los
- 30 inventores, que ponen de manifiesto la utilidad de la materia reivindicada.

## I - MATERIAL Y MÉTODOS

### *Líneas celulares.*

Para el desarrollo de los experimentos in vitro se utilizó la línea celular B16F10luc2, (línea de melanoma de *Mus musculus* con una inserción estable del gen de luciferasa bajo el promotor de Ubiquitina C humano) y la línea A549 (adenocarcinoma de pulmón humano). Los cultivos se realizaron en medio DMEM suplementado con un 10% de suero bobino fetal (FBS). Tanto el cultivo de las células como los experimentos de estrés mecánico y los ensayos de invasión se realizaron en incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### ***Cultivo celular en condiciones de estrés mecánico.***

Los estudios de estrés mecánico sobre las líneas anteriormente citadas se realizaron en placas de 6 pocillos de Flexcell®, sembrando una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pocillo. Tras 24 horas de incubación las placas se aleatorizaron a condiciones estáticas, o bien condiciones de estiramiento equibiaxial utilizando un equipo de deformación celular ajustando la presión para producir una deformación de un 15%. La frecuencia de estiramiento utilizada fue 15 ciclos/minuto con un ratio 1:1 estrés:relajación durante 24 horas.

#### ***Ensayo de migración celular a través de matrigel.***

Una vez finalizadas las 24 horas de estiramiento o el correspondiente tiempo en condiciones estáticas, las células fueron despegadas de las placas de flexcell utilizando EDTA 1 mM. Se sembraron  $5 \times 10^4$  células en cada *transwell* de matrigel en un volumen de 500µL de medio sin FBS. En la cámara inferior se pusieron 750µL de medio con 10% FBS como quimioatrayente. Tras 24 horas se aspiró el medio de todos los pocillos, se tiñó con cristal violeta (0,1% cristal violeta en 100% metanol), dejando fijar hasta 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado se retiró el matrigel del *transwell* y se realizaron 5 fotos de su cara inferior y se cuantificó el área teñida utilizando el programa Image J (NIH, USA).

#### ***Modelo animal.***

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías establecidas por el comité ético de la Universidad de Oviedo. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y acceso *ad libitum* tanto a comida como a agua.

Para la generación de metástasis se utilizó la línea celular B16F10luc2. Esta línea lleva

integrada en su genoma el gen de la luciferasa, lo que permitió realizar un seguimiento de la evolución del tumor mediante bioluminiscencia, inyectando luciferina a los ratones por vía intraperitoneal. Para la inducción de metástasis pulmonares se inyectaron 15.000 células a través de la vena yugular a ratones C57BL/6, lo que resultó en tumores  
5 macroscópicos a las dos semanas. Estos procedimientos se realizaron en animales anestesiados (ketamina y xilacina), siguiendo las guías de cuidado animal. 15 días después de la inyección de las células de melanoma los animales portadores de tumores y sus controles fueron aleatorizados a respiración espontánea o ventilación mecánica. Los ratones fueron intubados utilizando un angiocatéter 22G y se conectaron a un  
10 ventilador mecánico (Evita 2 Dura-Neoflow, Dräger; Germany) durante 2 horas con los siguientes parámetros: Ventilación controlada por presión, presión pico inspiratoria 15 cmH<sub>2</sub>O, PEEP 2 cmH<sub>2</sub>O, tasa de respiración 100 respiraciones/minuto, relación inspiración: expiración 1:1, FiO<sub>2</sub> 21%.

15 Al término del protocolo de ventilación los animales fueron extubados y se les realizó un seguimiento durante 15 días para determinar la incidencia de metástasis. Tras este periodo los ratones fueron sacrificados y los tejidos (cerebro, pulmón, hígado, bazo y riñón) extraídos y almacenados.

#### 20 ***PCR cuantitativa.***

El ARN se extrajo de las muestras de células estiradas y sin estirar en Trizol® (Sigma, Poole, UK) y se precipitó por adición de isopropanol. Tras centrifugar y lavar con etanol, el pellet de ARN se resuspendió en agua. El ADN complementario se sintetizó a partir de 1µg de ARN total usando un kit de RT-PCR (*Enhanced avian HS RT-PCR kit*, Sigma-  
25 Aldrich, USA). La PCR cuantitativa se llevó a cabo por triplicado para cada muestra utilizando 40 ng de ADNc. Se utilizó SYBR Green PCR master mix y primers específicos para Luc2 (directo: 5'-AAACGCTTCCACCTACCAGG-3' (SEQ ID NO: 4); reverso 5'-CCTTAGCCTCGAAGAAGGGC-3' (SEQ ID NO: 5)) a una concentración 10uM.

#### 30 ***Secuenciación de ARN.***

La expresión génica fue analizada mediante secuenciación de ARN a partir de ARN extraído de las células B16F10 luc2 tras los experimentos de estrés mecánico. La extracción de ARN para este análisis se realizó utilizando el RNeasy Mini Kit de Quiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, tras recoger las

muestras con Trizol® se añade cloroformo y la fase acuosa resultante, donde se encontrará el ARN, se introduce en una de las columnas del kit. Después de tratar con ADNasa y tras una serie de lavados y centrifugaciones con distintos buffers, el ARN extraído se recoge en agua libre de ARNasa. Tras eliminar del ARN ribosomal, el ARN mensajero fue fragmentado para la síntesis de ADN complementario de doble cadena mediante cebadores aleatorios. Tras la unión de adaptadores a los extremos de las cadenas obtenidas, se procedió a su secuenciación en un equipo Illumina, generando lecturas de un único extremo de 50 nucleótidos de longitud. Se obtuvo una media de 30.376.066 lecturas por muestra. Todas las muestras superaron el control de calidad previamente establecido.

Las secuencias obtenidas fueron cuantificadas mediante pseudo-mapeo, utilizando como referencia el transcryptoma de ratón en su versión mm9, mediante el software SALMON. La expresión diferencial de genes fue realizada mediante el módulo DESEQ2 para el entorno de desarrollo estadístico R. Brevemente, las lecturas para cada gen fueron modelizadas de acuerdo a una distribución binomial negativa y la expresión diferencial estimada. Los genes con un valor de p ajustado según el método de Benjamini-Hochberg por debajo de 0,05 se consideraron con expresión diferencial. Aquellos genes con un cambio en la expresión superior a 0,5 logaritmos, se introdujeron en el software Ingenuity Pathway Analysis (Quiagen Inc) para la identificación de las rutas celulares implicadas.

#### ***Tratamiento en cultivos celulares con alirocumab.***

Se sembraron placas de flexcell a una densidad de 200.000 células/pocillo en medio DMEM+10%FBS. Tras 4 horas de cultivo se cambia el medio y se le añade alirocumab (concentración final de 7,5µg/mL) o el respectivo control utilizando una IgG inespecífica (concentración final de 7,5µg/mL). El medio se refrescó cada 24 horas durante las siguientes 72 horas, tras lo cual las placas se aleatorizaron a condiciones estáticas o bien estiramiento equibiaxial durante 24 horas, deformación del 15%, frecuencia de 15 ciclos/minuto y un ratio 1:1 estrés:relajación.

#### ***Análisis estadístico.***

Los resultados se presentan como media y error estándar. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un análisis de la varianza, incluyendo grupo y tratamiento

como factores. Los valores de p se ajustaron para comparaciones múltiples utilizando la técnica HSD de Tukey. Las proporciones se compararon mediante la prueba exacta de Fisher. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## 5 II – RESULTADOS

### ***El estrés mecánico aumenta la invasividad de células tumorales.***

Se realizó en primer lugar un experimento utilizando la línea de melanoma murino B16F10luc2. Estas células fueron sembradas y sometidas a una deformación equibiaxial del 15% durante 24 horas. Como grupo control se utilizaron las mismas células, cultivadas en condiciones estáticas. Tras ese tiempo,  $5 \times 10^4$  células se sembraron en cámaras para el estudio de la migración celular a través de matrigel. A las 24 horas se retiraron las cámaras y se midió el área del pocillo cubierta por células que han migrado. El área fue significativamente mayor en el grupo de células cultivadas en condiciones de estrés mecánico independientemente del medio de cultivo utilizado (medio de cultivo condicionado procedente del cultivo de células sometidas a estiramiento o medio de cultivo convencional), tal y como se muestra en la **Figura 1A**. El experimento se repitió utilizando células de adenocarcinoma de pulmón de la línea A549, obteniéndose un resultado similar (**Figura 1B**).

Para confirmar la relevancia de este resultado, se realizó un estudio *in vivo*. Se inyectaron células de melanoma B16F10luc2 en la vena yugular de ratones macho de la línea C57Bl/6. La línea celular inyectada contiene en su genoma una construcción estable de luciferasa bajo un promotor constitutivo. Dos semanas después de la inyección se confirmó la presencia de tumores pulmonares mediante luminiscencia *in vivo* tras la inyección de luciferina. Los animales fueron entonces aleatorizados a recibir ventilación mecánica o mantenidos en respiración espontánea. Pasado este tiempo, los ratones fueron devueltos a sus jaulas y observados durante dos semanas más. Pasado ese tiempo, fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de tejido cerebral, renal, hepático y esplénico. La expresión de luciferasa en estos tejidos se estudió mediante PCR cuantitativa, considerando un resultado positivo como indicativo de la presencia de metástasis. Los animales sometidos a ventilación mecánica mostraron una mayor proporción de metástasis cerebrales, renales y hepáticas que aquellos que se mantuvieron en respiración espontánea (**Figura 2**).

Estos resultados demuestran que el estrés mecánico aumenta la invasividad de las células tumorales, tanto *in vivo* como *in vitro*.

#### 5 ***El estrés mecánico aumenta la expresión de PCSK9.***

Para identificar los mecanismos responsables del aumento de la invasividad, se extrajo ARN de las células de melanoma B16F10luc2 sometidas a estrés mecánico o cultivadas en condiciones estáticas. El ARN fue purificado y secuenciado, y la expresión génica cuantificada. Se observaron diferencias en la expresión de 5107 genes. Los procesos biológicos en los que dichos genes están implicados se identificaron mediante la herramienta Ingenuity Pathway Analysis. Los procesos más significativos se muestran en la **Figura 3A**. Como puede observarse, varios procesos implicados en la síntesis y metabolismo del colesterol alcanzaron la mayor significación estadística. Dado que PCSK9 juega un papel central en el procesamiento del colesterol, se confirmaron las diferencias en su expresión mediante PCR cuantitativa. En línea con el resultado de la secuenciación de ARN, la expresión de PCSK9 aumentó con el estrés mecánico (**Figura 3B**).

#### 20 ***La inhibición de PCSK9 evita el aumento de la invasividad mediado por estrés mecánico.***

Para confirmar el papel de PCSK9 en el aumento de la invasividad inducido por estrés mecánico, se cultivaron células B16F10luc2 y A549 en condiciones de estiramiento equibiaxial en presencia de un anticuerpo monoclonal contra PCSK9, el alirocumab (PRALUENT, Sanofi-Aventis) o de una IgG humana inespecífica, durante 24 horas. Pasado ese tiempo, las células fueron transferidas a cámaras de migración con Matrigel. La migración pasadas 24 horas se cuantificó mediante el área cubierta por células migradas. El tratamiento con alirocumab evitó el aumento en la invasividad causado por el estiramiento, tal y como se muestra en la **Figura 4**, tanto en las células murinas B16F10luc2 (**Figura 4A**) como en las células humanas A549 (**Figura 4B**).

30

### **III – CONCLUSIÓN**

Los resultados mostrados en el presente documento demuestran que el estrés mecánico, tanto en un modelo *in vitro* como *in vivo* en animales sometidos a ventilación mecánica, produce un aumento de la invasividad de células tumorales. Este cambio en

la invasividad está mediado por un aumento de la expresión de la proteín-convertasa PCSK9. La inhibición de este enzima mediante el anticuerpo monoclonal alirocumab bloquea completamente el incremento en la invasividad causado por el estrés mecánico. Por lo tanto, el tratamiento con un inhibidor de PCSK9 en pacientes que padecen cáncer

5 de pulmón y que están sometidos, o que se van a someter a ventilación mecánica, disminuye el riesgo de metástasis en dichos sujetos.

### REIVINDICACIONES

1. Un agente inhibidor de PCSK9 para usarlo en la prevención y/o el tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido o va a ser sometido a ventilación mecánica.  
5
2. Agente inhibidor para usarlo según la reivindicación 1, en donde el cáncer es cáncer de pulmón.
- 10 3. Agente inhibidor para usarlo según la reivindicación 1 o 2, en donde el sujeto es un humano.
4. Agente inhibidor para usarlo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde PCSK9 comprende una secuencia de nucleótidos que presenta, al menos, un 70,  
15 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 o 2.
5. Agente inhibidor para usarlo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la  
20 secuencia SEQ ID NO: 3.
6. Agente inhibidor para usarlo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el agente inhibidor se selecciona de la lista que consiste en: un ARNi, un oligonucleótido antisentido, una enzima de ADN, una ribozima, un aptámero, un  
25 CRISPRi, un anticuerpo y una molécula que reconoce de forma específica la proteína PCSK9 o un fragmento de la misma.
7. Agente inhibidor para usarlo según la reivindicación 6, en donde el agente inhibidor es un anticuerpo.  
30
8. Agente inhibidor para usarlo según la reivindicación 7 donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal se selecciona de la lista que consiste en: Evolocumab, Alirocumab, Bococizumab, 1D05-IgG2, RG-7652 y LY3015014.

9. Agente inhibidor para usarlo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el agente inhibidor está comprendido dentro de una composición farmacéutica que comprende además, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5
10. Agente inhibidor para usarlo según la reivindicación 9, en donde la composición comprende, además, un agente quimioterapéutico.
11. Método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un sujeto que padece
- 10 cáncer y que está, o va a estar sometido a ventilación mecánica, que comprende:
- a) cuantificar el nivel de expresión y/o actividad de PCSK9 en una muestra aislada del sujeto, y
  - b) comparar el nivel de expresión y/o actividad obtenido en la etapa (a) con el valor de expresión de PCSK9 en una muestra control,
- 15 en donde si el nivel de expresión y/o actividad obtenido en la etapa (a) es mayor que el valor de expresión de la muestra control, entonces la terapia comprende la administración al sujeto de un agente inhibidor de PCSK9.
12. Método según la reivindicación 11, en donde el cáncer es cáncer de pulmón.
- 20
13. Método según la reivindicación 11 o 12, en donde el sujeto es un ser humano.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la muestra aislada del sujeto es una muestra de un fluido biológico o una muestra de tejido
- 25 tumoral.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde PCSK9 comprende una secuencia de nucleótidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 o 2
- 30
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 3.

17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en donde el agente inhibidor de PCSK9 se selecciona de la lista que consiste en: un ARNi, un oligonucleótido antisentido, una enzima de ADN, una ribozima, un aptámero, un  
5 CRISPRi, un anticuerpo y una molécula que reconoce de forma específica la proteína PCSK9 o un fragmento de la misma.
18. Método según la reivindicación 17, en donde el agente inhibidor es un anticuerpo.
- 10 19. Método según la reivindicación 18, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se selecciona de la lista que consiste en: Evolocumab, Alirocumab, Bococizumab, 1D05-IgG2, RG-7652 y LY3015014.
- 15 20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en donde el agente inhibidor está comprendido dentro de una composición farmacéutica que comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20, en donde la cuantificación del nivel de expresión del gen *PCSK9* se lleva a cabo mediante la cuantificación del ADNc, ARNm o de la proteína codificada por el gen *PCSK9* o de un fragmento de dicha proteína.
- 25 22. Método según la reivindicación 21, en donde la cuantificación del ADNc o del ARNm, se lleva cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa, un array de ADN o ARN, o una hibridación.
- 30 23. Método según la reivindicación 21, en donde la cuantificación de la proteína codificada por el gen *PCSK9*, o un fragmento de dicha proteína, se lleva a cabo mediante Western Blot, técnicas inmunohistoquímicas, ELISA, array de proteínas, inmunoprecipitación o radioinmunoensayo.
24. Método *in vitro* de cribado, ensayo o validación de agentes útiles en la prevención y/o el tratamiento de metástasis en un sujeto que padece cáncer y está sometido, o va a estar sometido, a ventilación mecánica, que comprende:

- a) Poner en contacto un agente con PCSK9,
- b) Analizar la interacción entre el agente y PCSK9, y
- c) Seleccionar el agente del paso (a) con capacidad de unirse PCSK9 para disminuir o inhibir su expresión y/o actividad.

5

25. Método según la reivindicación 24, en donde el cáncer es cáncer de pulmón.

26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 o 25, en donde el sujeto es un ser humano.

10

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, donde PCSK9 comprende una secuencia de nucleótidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 o 2.

15 28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en donde PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 3

20 29. Uso *in vitro* de un kit que comprende un agente inhibidor de PCSK9 que se selecciona de la lista que consiste en: un ARNi, un oligonucleótido antisentido, una enzima de ADN, una ribozima, un aptámero, un CRISPRi, un anticuerpo y una molécula que reconoce de forma específica la proteína PCSK9 o un fragmento de la misma, para la prevención y/o el tratamiento de metástasis en un sujeto que padece  
25 cáncer y está, o va a estar, sometido a ventilación mecánica, o para diseñar una terapia personalizada a un sujeto que padece cáncer y que está, o va a estar, sometido a ventilación mecánica.

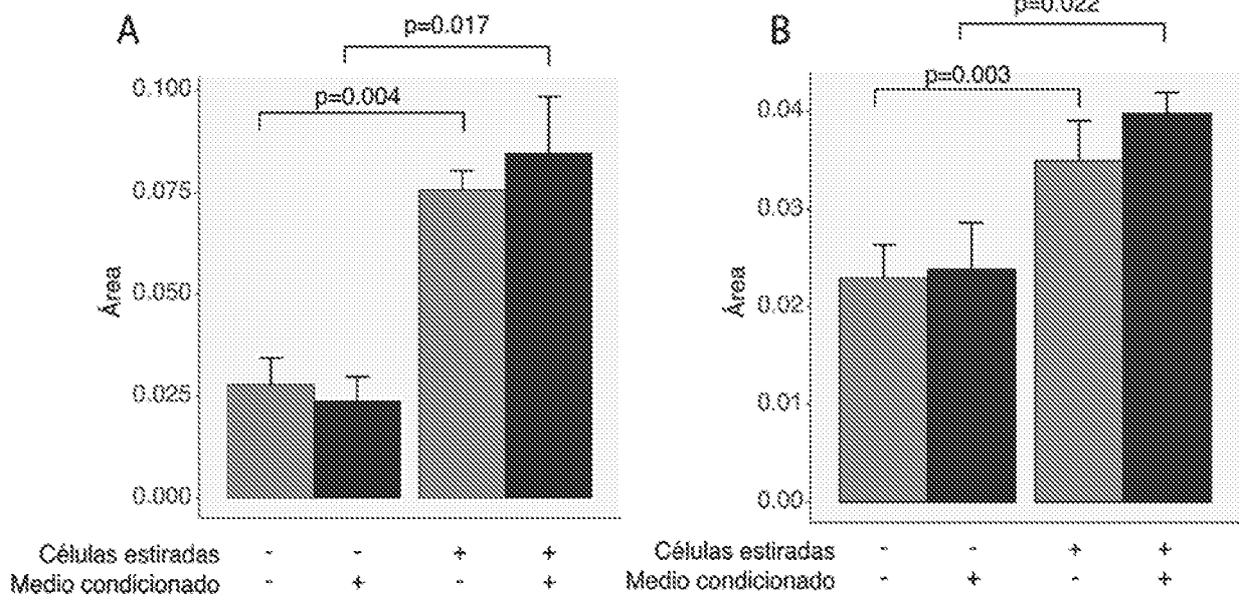


FIG. 1

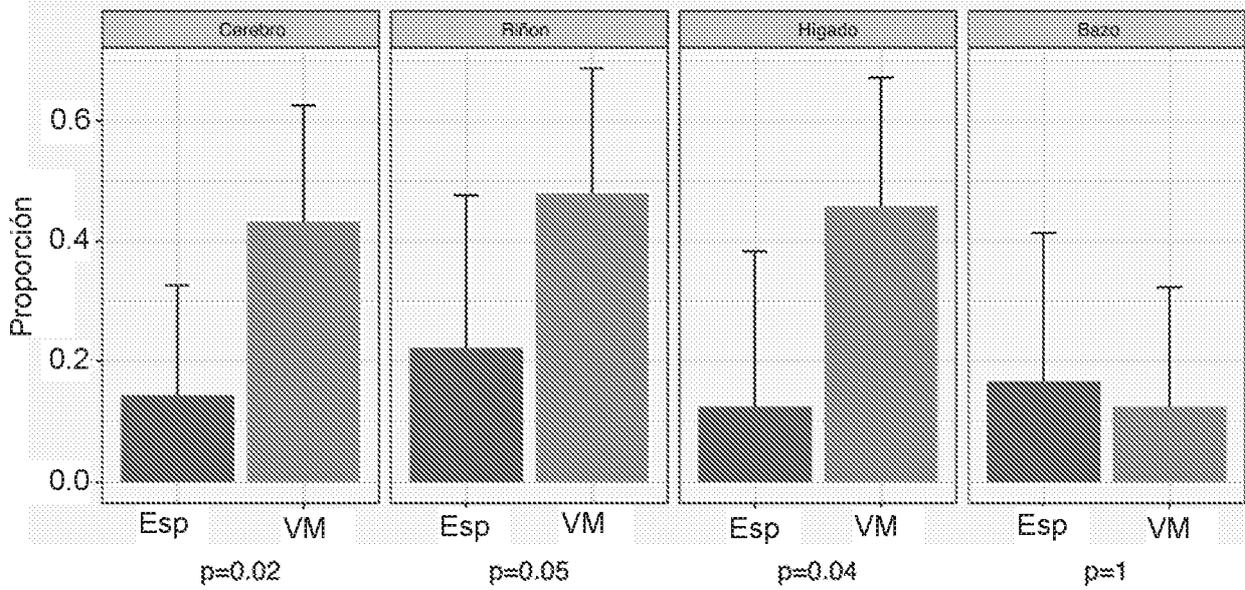
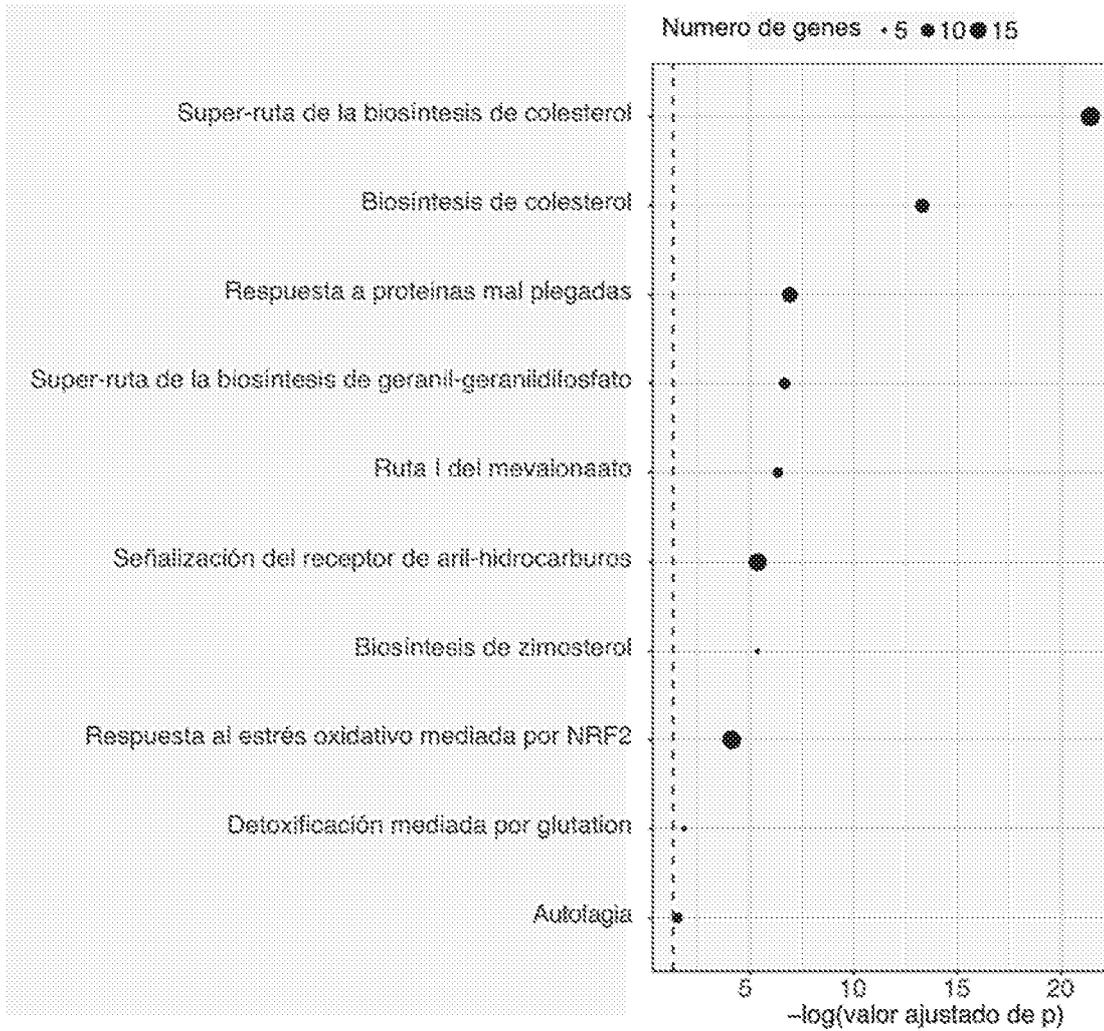


FIG. 2

A



B

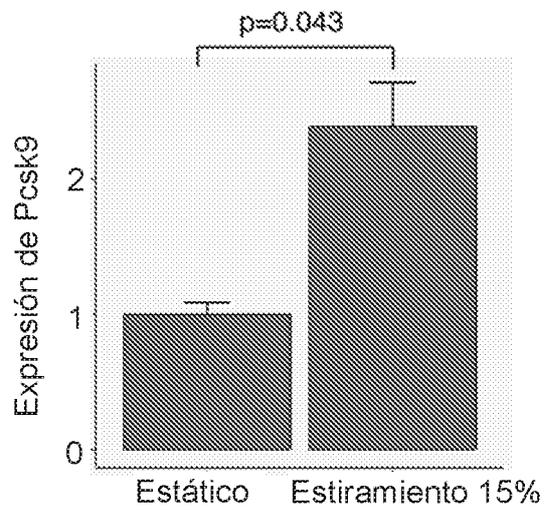


FIG. 3

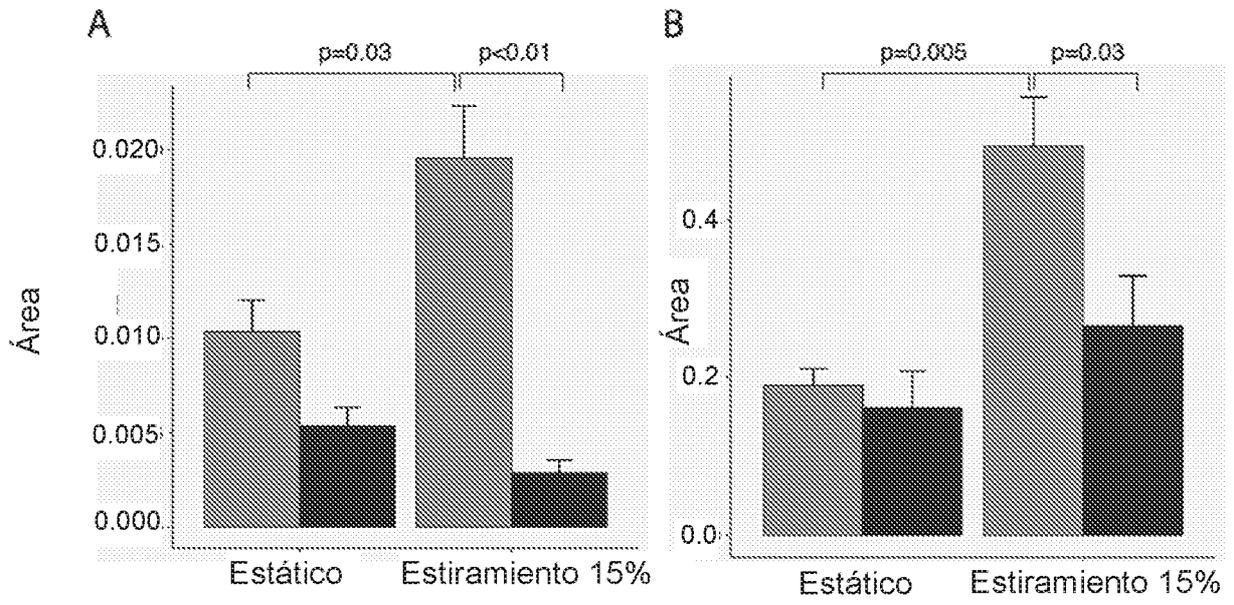


FIG. 4

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2020/070316

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. A61K39/395 C12N15/113 C07K16/40 G01N33/573  
 ADD. A61P35/04

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N C07K G01N A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	LOPEZ-MARTINEZ C ET AL: "Targeting the mechanically-induced metabolic changes in lung cancer cells decreases their metastatic potential", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 199, no. 9, 1 de mayo de 2019 (2019-05-01), página A3955, XP009522808, ISSN: 1535-4970 todo el documento	1-29
X	----- WO 2018/087391 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; UNIV NANTES [FR] ET AL.) 17 de mayo de 2018 (2018-05-17)	24-29
Y	todo el documento ----- -/--	1-29

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
**10 de septiembre de 2020**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional  
**22/09/2020**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado  
**Andres, Serge**  
 N° de teléfono

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional N°

PCT/ES2020/070316

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	<p>LE BRAS MAELLE ET AL: "Plasma PCSK9 Is a Late Biomarker of Severity in Patients With Severe Trauma Injury", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY &amp; METABOLISM, vol. 98, no. 4, de abril de 2013 (2013-04), páginas E732-E736, XP055728999, todo el documento</p>	1-29
A	<p>-----</p> <p>YINGLAI HUANG ET AL: "Mechanical ventilation promotes lung metastasis in experimental 4T1 breast cancer lung-metastasized models", CANCER MANAGEMENT AND RESEARCH, vol. 10, 1 de marzo de 2018 (2018-03-01), páginas 545-555, XP055720251, DOI: 10.2147/CMAR.S142650 todo el documento</p>	1-29
A	<p>-----</p> <p>XIAOHUI XU ET AL: "PCSK9 regulates apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells via endoplasmic reticulum stress and mitochondrial signaling pathways", EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE, vol. 13, no. 5, 10 de marzo de 2017 (2017-03-10), páginas 1993-1999, XP055720250, GR ISSN: 1792-0981, DOI: 10.3892/etm.2017.4218 todo el documento</p>	1-29
A	<p>-----</p> <p>XIAOWEI SUN ET AL: "Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Deficiency Reduces Melanoma Metastasis in Liver", NEOPLASIA, vol. 14, no. 12, 1 de diciembre de 2012 (2012-12-01), páginas 1122-1131, XP055368013, US ISSN: 1476-5586, DOI: 10.1593/neo.121252 todo el documento</p>	1-29
A	<p>-----</p> <p>CN 108 392 633 A (DONGFANG HEPATOBILLIARY HOSPITAL AFFILIATED TO THE SECOND MILITARY MED) 14 de agosto de 2018 (2018-08-14) todo el documento</p> <p>-----</p>	1-29

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2020/070316

WO 2018087391	A1	17-05-2018	EP	3538140	A1	18-09-2019
			US	2019345500	A1	14-11-2019
			WO	2018087391	A1	17-05-2018

-----  
CN 108392633    A    14-08-2018    NINGUNA  
-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/ES2020/070316

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 INV. A61K39/395 C12N15/113 C07K16/40 G01N33/573  
 ADD. A61P35/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C12N C07K G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LOPEZ-MARTINEZ C ET AL: "Targeting the mechanically-induced metabolic changes in lung cancer cells decreases their metastatic potential", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 199, no. 9, 1 May 2019 (2019-05-01), page A3955, XP009522808, ISSN: 1535-4970 the whole document	1-29
X	WO 2018/087391 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; UNIV NANTES [FR] ET AL.) 17 May 2018 (2018-05-17)	24-29
Y	the whole document	1-29
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  10 September 2020	Date of mailing of the international search report  22/09/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Andres, Serge

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/ES2020/070316

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LE BRAS MAELLE ET AL: "Plasma PCSK9 Is a Late Biomarker of Severity in Patients With Severe Trauma Injury", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, vol. 98, no. 4, April 2013 (2013-04), pages E732-E736, XP055728999, the whole document	1-29
A	----- YINGLAI HUANG ET AL: "Mechanical ventilation promotes lung metastasis in experimental 4T1 breast cancer lung-metastasized models", CANCER MANAGEMENT AND RESEARCH, vol. 10, 1 March 2018 (2018-03-01), pages 545-555, XP055720251, DOI: 10.2147/CMAR.S142650 the whole document	1-29
A	----- XIAOHUI XU ET AL: "PCSK9 regulates apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells via endoplasmic reticulum stress and mitochondrial signaling pathways", EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE, vol. 13, no. 5, 10 March 2017 (2017-03-10), pages 1993-1999, XP055720250, GR ISSN: 1792-0981, DOI: 10.3892/etm.2017.4218 the whole document	1-29
A	----- XIAOWEI SUN ET AL: "Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Deficiency Reduces Melanoma Metastasis in Liver", NEOPLASIA, vol. 14, no. 12, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 1122-1131, XP055368013, US ISSN: 1476-5586, DOI: 10.1593/neo.121252 the whole document	1-29
A	----- CN 108 392 633 A (DONGFANG HEPATOBILLIARY HOSPITAL AFFILIATED TO THE SECOND MILITARY MED) 14 August 2018 (2018-08-14) the whole document	1-29
	-----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2020/070316

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018087391	A1	17-05-2018	
		EP 3538140 A1	18-09-2019
		US 2019345500 A1	14-11-2019
		WO 2018087391 A1	17-05-2018
-----			
CN 108392633	A	14-08-2018	NONE
-----			