



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 660**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06785512 .2**

96 Fecha de presentación : **23.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1893997**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **Ensayos cuantitativos para ras p21 en fluidos corporales.**

30 Prioridad: **23.06.2005 US 694082 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.01.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.01.2011

73 Titular/es:
SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS Inc.
511 Benedict Avenue
Tarrytown, New York 10591, US

72 Inventor/es: **Hamer, Peter, J.;**
Brown-Shimer, Sheryl;
Carney, Walter, P. y
Pierce, Karen

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 349 660 T3

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

ENSAYOS CUANTITATIVOS PARA RAS P21 EN FLUIDOS CORPORALES**DESCRIPCIÓN****CAMPO DE LA INVENCION**

5 [0001] La presente invención está en el área general de genéticas médicas y en los campos de la oncología e inmunología. Más específicamente, la invención se dirige a la detección y cuantificación de ras p21 total en fluidos corporales, particularmente cambios seriales de los niveles ras p21 totales en los fluidos corporales de un sujeto. Adicionalmente, la invención se dirige a detectar y cuantificar ras p21 total en conjunto con una o más de otras proteínas, tal como, oncoproteínas, factores angiogénicos, marcadores de tumor, inhibidores, receptores del factor de crecimiento, proteínas de metástasis, y supresores de tumor.

ANTECEDENTE

15 [0002] La familia ras de oncogenes (homólogos al virus sarcoma de rata) pertenece a la familia de la proteína G de proteínas celulares vinculadas en la transducción de señal. Los genes ras codifican proteínas que se ubican en la superficie interna de la membrana de plasma y tienen actividad GTPasa. Normalmente, cuando se activa mediante el factor de crecimiento que se une a los receptores de membrana de plasma, las proteínas ras se unen al GTP, que resulta en activación de la señal ras. La familia del gen ras tiene tres miembros principales (H-ras, K-ras, y N-ras) que están entre los oncogenes más comúnmente activados encontrados en cáncer humano. Otros miembros de la familia del gen ras incluyen las subfamilias Rho/Rac, Rab, Arf y Ran.

20 [0003] Los tres genes ras principales (H-ras, K-ras, y N-ras) codifican las proteínas de lámina alfa/beta de 21 kD de 189 aminoácidos que se encuentran en todas las células eucarióticas en la superficie interna de la membrana de plasma. Las isoformas (denotadas H-Ras, N-Ras y K-Ras) codificadas por los tres genes ras se conocen colectivamente en la técnica como "p21" o "ras p21," y presentan un alto grado de homología (>90%) así como también efectores en la dirección 3' comunes y factores de intercambio de guanina-nucleótido en la dirección 5' (GEFS). Como es cierto para los otros miembros de la familia del gen ras, el ras p21 está en una proteína G de unión GDP/GTP intracelular en transducción de señal celular, que convierte señales del receptor tirosina quinasa en la membrana celular al núcleo para regular la proliferación y diferenciación celular normal [Pruitt y Der (2002)]. Las proteínas ras p21 activadas mediante sustituciones en las posiciones de aminoácido 12, 13, o 61 pueden actuar como oncoproteínas con una capacidad de transformación incrementada. Las formas mutadas de ras p21 se aseguran en un estado constitutivamente activo al reducir la hidrólisis de GTP, que resulta en señales no controladas para crecimiento celular. Cuando se mutan o sobreexpresan, las proteínas p21 son oncogénicas. Las proteínas ras p21 se sobreexpresan en 50-60% de los cánceres de mama y se mutan en aproximadamente 30% de todos los cánceres, notablemente cáncer pancreático y cáncer de colon.

35 [0004] La activación mutacional de ras oncogenes ha sido identificada en una variedad de cánceres así como también lesiones precursoras. Los genes ras mutacionalmente activados no son comunes en tumores de estómago, esófago, ovario, próstata y mama pero se reportan en 20-40% de los carcinomas de pulmón, 30% de leucemia mielogenosa aguda, 40-50% de tumores colorectales y tumores de tiroides y > 80% de tumores pancreáticos. En general, aproximadamente 30% de todos los neoplasmas humanos se han reportado que contienen una mutación de gen ras. [Adjei (2001); Bos (1989).] Las mutaciones H-ras son comunes en carcinomas de vejiga, riñón y tiroides; las mutaciones K-ras ocurren en carcinomas de células macrocíticas, colorectales y pancreáticos; y las mutaciones N-ras se encuentran en melanoma, carcinoma hepatocelular, y malignidades hematológicas. [Adjei

(2001).] La transformación de las células mediante mutantes ras oncogénicos puede incrementar la expresión de metaloproteinasas, tal como gelatinasa y estromelina, que puede mejorar la metástasis de tumor. Adicionalmente, la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se incrementa en K-ras- y H-ras que transforma células epiteliales a través de la ruta Raf.

5 [0005] Existe alguna controversia en la técnica a cerca de la significancia del diagnóstico de ras p21 mutado versus sobreexpresado. Por ejemplo, Watson et al. [Cancer breast Res. Treat., 17(3): 161-169 (Jan-Feb 1991)] reporta que los niveles p21 elevados detectados por Western blot semicuantitativo son un indicador diagnóstico importante en pacientes con cáncer de mama temprano. En 2001, sin embargo, Karelia et al. [Int. J. Biol. Markers. 16(2): 97-104 (2001)] investiga la
10 expresión de oncoproteína ras p21 en cáncer colorectal utilizando estudios inmunohistoquímicos, y concluye que la alteración genética de ras p21, no ras p21 positivo, es importante en determinar la agresividad biológica del cáncer colorectal.

[0006] Los anticuerpos que se utilizan frecuentemente para detectar ras en tumores son anticuerpos reactivos pan, que se unen a todas las tres formas de ras p21 (H-, N- y K-ras), mutadas y
15 tipo natural. Por ejemplo, Sun et al., [Eur. J. Cancer, 27(12): 1646-1649 (1991)] utiliza el Ras 11 Mab reactivo pan en estudios inmunohistoquímicos para examinar la significancia de ras p21 en adenocarcinoma colorectal, y encuentra ras p21 positivo para correlacionarse con actividad proliferativa y por tener valor de pronóstico independiente.

[0007] Aunque están disponibles ensayos cuantitativos de ras p21 en tejidos humanos, los
20 ensayos descritos anteriormente de ras p21 en fluidos corporales humanos son semi-cuantitativos. Como el ras se expresa normalmente, sería útil tener un indicador de una ruta de oncoproteína ras activada (regulada por aumento y/o mutacionalmente estimulada), tal como un ensayo cuantitativo de cambios seriales o elevados en circular niveles ras p21, en donde los niveles elevados o cambios en niveles ras p21 se puede utilizar para detectar la oncogenia dirigida a ras o cambios en el estado de un
25 tumor dirigido a ras.

[0008] Carney, W.P., la Patente Estadounidense No. 5,443,956 (1995) describe inmunoensayos semicuantitativos de ras p21 total en plasma humano normal pero no en el suero correspondiente. La patente de Carney también describe el uso del Ras 17 Mab reactivo pan para detectar ras p21 total en ensayos ELISA de plasma humano normal. La EP 0 214 520 describe un
30 inmunoensayo intercalado para RAS p21 que es de naturaleza cuantitativa.

[0009] En el 2000, por lo menos dos investigadores han reportado la presencia de las proteína ras en el suero de pacientes con cáncer de pulmón. En 1991, Brandt-Rauf, P.W., [J. Occup. Med., 33(9): 951-955 (Sept. 1991)] detecta ras en el suero de cinco de 11 pacientes con cáncer de pulmón y dos de 21 pacientes con enfermedades de pulmón no malignas utilizando inmunotransferencias, y
35 sugiere el uso de ras como un marcador para la detección temprana del cáncer de tubo respiratorio. Anderson et al. También analiza niveles ras en el plasma de pacientes humanos con cáncer de pulmón utilizando Western blots. [Anderson et al., Mutat. Res. 349: 121-126 (1996); Anderson et al., Mutat. Res 403(1-2): 229-235 (1998); Anderson et al., Int. J. Hyg. Environ. Health. 204(1): 55-60 (Oct. 2001).] En el estudio de Anderson et al. 1996, se incrementan niveles ras en 45% de los pacientes vs.
40 6% de controles normales. En algunos de los estudios de Anderson et al., se utiliza el anticuerpo primario Ras 10, que detecta la proteína ras total (reactivo con ras normal y mutante). Los niveles ras no se cuantifican (en picogramas) en los estudios de Brandt-Rauf (1991) o Anderson et al..

[0010] Schneider et al. [Clin. Chem. Lab. Med., 38(4): 301-305 (2000)] reporta que el ras p21 no se puede detectar en suero de pacientes con cáncer de pulmón, o en suero de cualquiera de los
45 grupos de estudio, y por lo tanto el ras no se puede considerar útil como un marcador para la detección

temprana del cáncer de pulmón. Schneider et al. (2000) evalúa el suero de 65 pacientes macho con cáncer de pulmón, 29 con enfermedad de pulmón no maligno, y 44 controles, utilizando Ab-1 (Mabs de rata anti-ras p21 reactivos pan del clon Y13-259) que reacciona con H, K y N-ras, en tres diferentes métodos Western blot. Sin embargo, el no puede detectar ras en aquellas muestras de suero, aunque la

5 proteína ras de 1 ng se mide en los estándares.

[0011] Rundle et al. [Cancer Lett. 185(1): 71-78 (Nov. 8, 2002)] examina los niveles de ras p21 en plasma de pacientes con cáncer de mama, utilizando Western blots, análisis de imagen asistida por computador (unidades de píxel integradas), y un anticuerpo anti-ras reactivo pan. Rundle et al. (2002) encuentra niveles detectables de ras tipo intacto en 53% de los pacientes con cáncer de mama; los promedios del nivel en pacientes con cáncer de mama son cuantitativamente más grandes que los niveles ras tipo intacto promedio en sujetos de control positivo (27% de pacientes con enfermedad de mama benigna y 26% de controles saludables). Perera et al. [Arch. Toxicol., 64(5): 401-406 (1990)] los cambios seriales estudiados en niveles de suero de 9 productos de proteína de encogen diferentes, incluyendo ras, antes de y a través del curso de la quimioterapia. De nuevo, los ensayos de

15 determinación de ras de Rundle et al. (2002) y Perera et al. (1990) son solo semicuantitativos.

[0012] Puede ser crítico para evaluar el ras p21 mutado y sobreexpresado aún en aquellos cánceres que no se asocian con ras mutado, cuando el ras sobreexpresado también puede ser indicador de una ruta ras activada. Por ejemplo, aunque se sobreexpresa el ras en 50-60% y mutado en menos de 5% de los cánceres de mama, existe evidencia experimental considerable que el ras mutacionalmente

20 activado puede promover el crecimiento y desarrollo del cáncer de mama, posiblemente debido a la activación de HER-2/neu u otros oncogenes. [Eckert et al., Cancer Research, 64: 4585 - 4592 (2004).]

[0013] Los inventores han descubierto un inmunoensayo cuantitativo que se puede utilizar para medir los cambios seriales en los niveles ras p21 totales en fluidos corporales, cuyos cambios son útiles como un indicador de una ruta ras activada (regulada por aumento y/o mutacionalmente

25 estimulada). El inmunoensayo novedoso comprende el uso de los anticuerpos monoclonales reactivos pan (Mabs) Ras 17 y Ras 10 o Ras 10.2, cada uno de los cuales une a la proteína ras p21 total (ras p21 normal y activado por mutación). Los Mabs Ras 17 y Ras 10 se han descrito previamente [Carney, W.P., Patente Estadounidense Nos. 5,262,523, 5,443,956, 5,081,230 y 6,200,764]; sin embargo, no se ha descrito previamente el uso de la combinación de Mabs Ras 17 y Ras 10 en una

30 inmunotransferencia.

[0014] La presente invención describe ensayos cuantitativos para detectar cambios en los niveles de ras p21 totales en muestras de fluido corporal para detectar rutas ras activadas, si se sobregula o se estimula mutacionalmente. Tales ensayos solos o en combinación con los niveles de marcadores de cáncer en la dirección 5' de ras (tal como TIMP-1), o con niveles de otras proteínas, se

35 pueden utilizar para seleccionar terapias de pacientes objetivo en la ruta ras. Debido a la importancia de ras en la tumorigenesis, se han tomado varios métodos para desarrollar terapias anticáncer objetivo de ras, tal como inhibición de la expresión de proteína ras (por ejemplo, oligonucleótidos anticodificantes), prevención de localización de membrana esencial para la activación RAS (por ejemplo utilizando inhibidores de farnesilación Ras) [Kohl et al. (1995); Lerner et al. (1995)], o

40 inhibición de efectores en dirección 3' de ras (por ejemplo, quinasas serina/treonina Raf) que evitan por lo tanto la activación constitutiva de la cascada de señal MAPK. [Pruitt y Der (2002).] Un candidato promisorio para una terapia objetivo de ruta ras es la bis-aryl urea sorafenib (BAY-43-9006) [Wilhelm et al., Cancer Research, 64: 7099-7109 (Oct. 1, 2004)], que se conoce por inhibir la quinasa raf y VEGFR.

[0015] Hasta la presente invención, no existe la prueba de suero de rutina, cuantitativa y sensible para determinar si un paciente con cáncer tiene un tumor dirigido a ras p21. Los ensayos de esta invención proporcionan tales ensayos cuantitativos y sensibles que se pueden utilizar rutinariamente, no solo para suero, sino para plasma, y otros fluidos corporales.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

[0016] La invención se relaciona con el uso de inmunoensayos cuantitativos de acuerdo con la reivindicación 1 y 11 para medir los cambios seriales en los niveles de proteína ras p21 totales en fluidos corporales humanos. Dichos cambios seriales son particularmente útiles como un indicador del estado de activación de la ruta de transducción de señal ras, en donde se define "activación" por 10 incluir la regulación por aumento y la activación mutacional. De acuerdo con las teorías destacadas en el métodos de la invención, el incremento de la proteína ras p21 total (detectado por cambios seriales en los niveles de ras p21 totales) se considera que es un indicador de una ruta de transducción de señal ras activada, que significa la presencia de enfermedad preneoplásica/neoplásica en un sujeto humano. Los inmunoensayos de la invención se pueden utilizar clínicamente - diagnósticamente y/o 15 pronósticamente, para detectar precáncer y/o cáncer (enfermedad preneoplásica/neoplásica) y como una ayuda terapéutica para la selección de terapia de un paciente, monitorear el estado de una enfermedad preneoplásica/neoplásica en un paciente, o monitorear a un paciente con una enfermedad preneoplásica/neoplásica que responde a una terapia. Un uso preferido para los inmunoensayos de la invención es monitorear el estado de los pacientes, y para tomar decisiones a cerca del método óptimo 20 para la terapia del paciente.

[0017] Las muestras preferidas en las que se evalúan cambios seriales en ras p21 total mediante inmunoensayo son muestras de fluidos corporales humanos, que pueden incluir, entre otros fluidos corporales: sangre, suero, plasma, orina, saliva, semen, exudado de mama, fluido 25 cerebroespinal, lágrimas, esputo, mocos, plasma, citosoles, ascitis, efusiones pleurales, fluido amniótico, lavados de vejiga y lavados bronquioalveolares. Los fluidos corporales preferidos para evaluar son sangre, suero, y plasma, más preferiblemente, suero o plasma. Particularmente las muestras de fluidos corporales preferidas incluyen muestras de pretratamiento y muestras tomadas de un paciente quien no ha respondido al tratamiento.

[0018] En un aspecto, la invención se relaciona con métodos de diagnóstico/pronóstico para 30 detectar una enfermedad preneoplásica/neoplásica asociada con una ruta ras activada. Un método para detectar una enfermedad preneoplásica/neoplásica asociada con una ruta ras activada en un sujeto humano comprende las etapas de:

(d) detectar y cuantificar inmunológicamente el nivel promedio de proteína ras p21 total en muestras de un fluido corporal tomado de individuos de una población de control;

35 (e) detectar y cuantificar inmunológicamente cambios seriales en los niveles de proteína ras p21 totales en muestras equivalentes del fluido corporal tomado del sujeto durante el tiempo; y

(f) comparar los niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del sujeto con el nivel promedio de proteína ras p21 total en las muestras de control;

40 [0019] En donde un nivel de proteína ras p21 total en las muestras del sujeto que está por encima del nivel promedio de proteína ras p21 total en las muestras de control es indicador de una ruta ras activada y la presencia de enfermedad preneoplásica/neoplásica en el sujeto. Los individuos de una población de control de la etapa (a) puede ser de cualquier género, o puede ser del mismo género como el sujeto.

[0020] Dicho método para detectar una enfermedad preneoplásica/neoplásica asociada con una ruta ras activada en un sujeto humano puede ser pronóstico adicional para dicha enfermedad preneoplásica/neoplásica, en donde los niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del sujeto que se relacionan con el nivel promedio de ras p21 total en las muestras de control son indicadores de un mejor diagnóstico o diagnóstico más pobre para dicho sujeto. Preferiblemente, dicho diagnóstico es un resultado clínico seleccionado del grupo que consiste de velocidad de respuesta (RR), beneficio de respuesta clínica completa (CR), beneficio de respuesta clínica parcial (PR), beneficio de enfermedad clínica estable (SD), progresión en el tiempo (TTP), y muerte con el tiempo (TTD).

[0021] Dichos métodos son en la forma de una inmunotransferencia intercalada, preferiblemente un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima intercalada (ELISA) o un ensayo equivalente. Un formato preferido es un ELISA intercalado. De acuerdo con la invención el anticuerpo monoclonal de captura es Ras 17 que se secreta desde el hibridoma HB 10054 depositado en the American Type Culture Collection (ATCC), y el anticuerpo monoclonal detector es Ras 10 que se secreta desde el hibridoma HB 9426 depositado en el ATCC, o Ras 10.2, que se secreta desde un subclon del Ras 10 del hibridoma HB 9426. Más preferiblemente, se biotinila el anticuerpo monoclonal detector Ras 10 o Ras 10.2.

[0022] Dichos métodos pueden ser diagnósticos y/o pronósticos para enfermedades cancerosas o precancerosas, en donde dicha enfermedad se asocia con una ruta ras activada. Ejemplos de tales enfermedades precancerosas o cancerosas son aquellas seleccionadas del grupo que consiste de cáncer colorectal, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de células macrocíticas, cáncer de pulmón de célula pequeña, leucemia mielogenosa aguda, cáncer tiroide, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular y malignidades hematológicas, y precánceres que conduce a tales cánceres. Cánceres de colon, colorectal, cáncer de pulmón y cáncer de mama, y precánceres que conducen a estos, se consideran objetivos particulares para los métodos de ensayo de diagnóstico/pronóstico que detectan cambios seriales en ras p21 total en fluidos corporales humanos.

[0023] Un segundo aspecto de la invención se relaciona con el uso de un inmunoensayo cuantitativo de acuerdo con la reivindicación 1 para medir cambios seriales en los niveles de proteína ras p21 totales en fluidos corporales humanos, como un método de selección de terapia para un paciente humano con una enfermedad preneoplásica/neoplásica. Un tal método de selección de terapia comprende las etapas de:

- (a) detectar y cuantificar inmunológicamente el nivel promedio de proteína ras p21 total en muestras de un fluido corporal tomado de individuos de una población de control;
- (b) detectar y cuantificar inmunológicamente cambios seriales en los niveles de proteína ras p21 totales en muestras equivalentes del fluido corporal tomadas del paciente durante el tiempo;
- (c) comparar los niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del paciente con el nivel promedio de proteína ras p21 total en las muestras de control; y
- (d) decidir si se utiliza terapia de cáncer convencional y/o terapia de cáncer dirigida a ras para tratar el paciente con base en las diferencias entre los niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del paciente y el nivel promedio de proteína ras p21 total en las muestras de control, y en vista de los cambios seriales entre los niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del paciente. Por ejemplo, si un nivel de proteína ras p21 total en una muestra del paciente se encuentra que está por encima del nivel promedio de proteína ras p21

total en las muestras de control, y si los cambios seriales en los niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del paciente reflejan que los niveles tienen tendencia a estar por encima del nivel promedio de proteína ras p21 total en las muestras de control, se puede sacar la conclusión de que el paciente tiene una enfermedad preneoplásica/neoplásica controlada por el oncogen ras, y se puede tomar la decisión de utilizar terapia dirigida a ras para tratar el paciente, sola o en conjunto con una o más de otras terapias antineoplásicas.

[0024] Preferiblemente, dicha terapia dirigida a ras se selecciona del grupo que consiste de inhibidores de farnesiltransferasa (FTI), inhibidores de tirosina quinasa, ureas bis-arilo e inhibidores anticodificantes de ras. Más preferiblemente, dicha terapia dirigida a ras es la sorafenib bis aril-urea (BAY 43-9006).

[0025] Otro aspecto de la invención se relaciona con el uso de una inmunotransferencia de acuerdo con la reivindicación 11 como un método para monitorear el estado de una enfermedad preneoplásica/neoplásica en un paciente, y/o monitorear cómo un paciente con una enfermedad preneoplásica/neoplásica responde a una terapia, que comprende detectar inmunológicamente y cuantificar cambios seriales en los niveles de proteína ras p21 totales en muestras de un fluido corporal tomado de dicho paciente durante el tiempo; en donde los niveles incrementados de proteína ras p21 totales durante el tiempo indican progresión de la enfermedad o una respuesta negativa a dicha terapia, y en donde los niveles reducidos de proteína ras p21 totales indican remisión de enfermedad o una respuesta positiva a dicha terapia. Dicha terapia puede ser terapia anticáncer convencional, terapia anticáncer no convencional, y/o una terapia dirigida a ras. Una muestra de fluido corporal preferida, entre otros tipos de muestras, puede ser una muestra de pretratamiento, o una muestra de un paciente con cáncer quien no ha respondido al tratamiento.

[0026] Todavía otro aspecto de esta invención se relaciona con el uso de inmunoensayos cuantitativos de acuerdo con la reivindicación 1 para detectar cambios en los niveles de ras p21 totales en combinación con los niveles de una o más de otras proteínas, en los métodos de esta invención como en los métodos de diagnóstico/pronóstico, en los métodos de selección de terapia para pacientes con una enfermedad preneoplásica/neoplásica, en los métodos para monitorear el estado de una enfermedad preneoplásica/neoplásica en un paciente, y para monitorear cómo un paciente con una enfermedad preneoplásica/neoplásica responde a una terapia dirigida a ras u otra terapia. Preferiblemente, dichas otras proteínas que serían útiles para cuantificar junto con ras p21 en los ensayos de esta invención son inhibidores, oncoproteínas, receptores del factor de crecimiento, factores angiogénicos, proteínas de metástasis, marcadores de tumor y supresores de tumor. Preferiblemente, dicho inhibidor es inhibidor de tejido de metaloproteinas-1 (TIMP-1), dicha oncoproteína es HER-2/neu, dichos receptores del factor de crecimiento se seleccionan del grupo que consiste de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGFR), dicho factor angiogénico es factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), dicha proteína de metástasis es activador de plasminógeno del tipo uroquinasa (uPA), dicho marcador de tumor es antígeno carcinoembriónico (CEA), y dicho supresor de tumor es p53.

[0027] Más preferiblemente, dichas otras proteínas son proteínas que activan la ruta ras, tal como TIMP-1 y HER- 2/neu/c-erbB-2 ("HER-2/neu"). Por ejemplo, los niveles incrementados de ras p21 totales y/o HER-2/neu pueden ser indicadores de una mayor probabilidad de recurrencia temprana de un tumor o metástasis de tumor. Sería ventajoso probar pacientes con cáncer para cambios seriales en ras p21 total y tales otras proteínas, especialmente proteínas que activan la ruta ras, para agrandar la perspectiva clínica, las fuentes terapéuticas y los parámetros de diagnóstico/pronóstico para recoger las combinaciones terapéuticas óptimas para los resultados de tratamiento más promisorios.

REFERENCIAS

- [0028] • Adjei, A.A., Journal of National Cancer Institute, 93(14): 1062-1074 (Julio 18, 2001)
- Agarwal et al., Oncogene, 20(20): 2527-2536 (Mayo 3, 2001)
 - 5 • Anderson et al., Mutat Res., 445(2):167-173 (Sep. 30, 1999)
 - Anderson et al., Mutat. Res., 349 (1): 121-126 (En. 17, 1996)
 - Anderson et al., Mutat. Res., 403(1-2): 229-235 (Julio 17, 1998)
 - Anderson, D., Int. J. Hyg. Environ. Health, 204(1): 55-60 (Oct. 2001)
 - Bos, J.L., Cancer Research. 49: 4682-4689 (1989)
 - 10 • Bos, J.L., Mutation Research. 195: 255-271 (1988)
 - Brandt-Rauf, P.W., J. Occup. Med., 33(9): 951-955 (Sep. 1991)
 - Brtva et al., J Biol Chem., 270(17): 9809-9812 (Abril 28, 1995)
 - Brunner et al., Cancer Research, 63: 5656-5668 (Sep. 15, 2003)
 - Carney et al., "Monoclonal Antibodies for Detection of Normal and Oncogenic Ras p21," In Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy, Alan R. Liss, Pub., pp. 53-62 (1989)
 - 15 • Carney, W.P., The Cancer Journal, 4: 156-161 (1991)
 - Carney, W.P., Patente Estadounidense No. 4,898,932 (Feb. 6, 1990)
 - Carney, W.P., Patente Estadounidense No. 5,028,527 (Julio 2, 1991)
 - 20 • Carney, W.P., Patente Estadounidense No. 5,081,230 (En. 14, 1992)
 - Carney, W.P., Patente Estadounidense No. 5,084,380 (En. 28, 1992)
 - Carney, W.P., Patente Estadounidense No. 5,112,737 (Mayo 12, 1992)
 - Carney, W.P., Patente Estadounidense No. 5,262,523 (Nov. 16, 1993)
 - Carney, W.P., Patente Estadounidense No. 5,443,956 (Agosto 22, 1995)
 - 25 • Carney, W.P., Patente Estadounidense No. 6,200,764 B1 (Marzo 13, 2001)
 - Carney et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 83: 7485-7489 (1986)
 - Cebulska-Wasilewska A, et al., Mutat Res., 431(1): 123-131 (Dic. 16, 1999)
 - Chang et al., Leukemia. 17(7): 1263-1293 (Julio 2003)
 - Chie et al., Cancer Chemother Pharmacol, 45: 441-449 (2000)
 - 30 • Choi et al., Oncogene, 23(1): 9-20 (2004)
 - Collisson et al., Cancer Research. 63: 5669-5673 (Sep. 15, 2003)
 - Cox y Der, Cancer Biol Ther., 1(6): 599-606 (Nov-Dic 2002)
 - Dancey J. E., Curr Pharm Des., 8(25): 2259-2267 (2002)
 - Dent et al., Oncogene, 22: 5885-5896 (2003)
 - 35 • Eckert et al., Cancer Research, 64: 4585 - 4892 (Julio 1, 2004)
 - Epelbaum et al., J Clin Lab Anal., 3(4): 209-214 (1989)
 - Fischbach and Settleman, Cancer Research, 63: 4089-4094 (Julio 15, 2003)
 - Fridman et al., J Biol Chem., 269(48): 30105-30108 (Dic. 2, 1994)
 - Ghosh and Bell, J Bio Chem., 269(49): 30785-30788 (Dic. 9, 1994)
 - 40 • Gibbs et al., Breast Cancer Res Treat., 38(1): 75-83 (1996)
 - Hamer et al., Oncogene, 6(9): 1609-1615 (Sep. 1991)
 - Holten-Andersen et al. , Int J Cancer, 113(2): 198-206 (En 10, 2005)
 - Jin et al., British Journal of Cancer, 89, 185-191 (2003)
 - Jones et al., Semin Radiat Oncol., 11(4): 328-337 (Oct. 2001)
 - 45 • Karelia et al., Int. J. Biol. Markers. 16(2): 97-104 (Abril - Junio 2001)

- Kohl et al., J Cell Biochem (Suppl.), 22: 145-150 (1995)
- Lee C.S., Eur J Sura Oncol., 23(3): 233:237 (Junio 1997)
- Leever et al., Nature. 369(6479): 411-414 (Junio 2, 1994)
- Lerner et al., J Biol Chem., 270(45): 26802-26806 (Nov. 10, 1995)
- 5 • Li et al., Development, 125(24): 4999-5008 (Dic. 1998)
- Liang et al., Mol Cancer Ther., 2(4): 353-360 (Abril 2003)
- Luo et al., J Occup Environ Med., 40(12):1053-1058 (Dic. 1998)
- Mallon et al., Anal Biochem, 294(1): 48-54 (Julio 1, 2001)
- Manzur et al., Cell Mol Neurobiol, 21(1): 39-52 (Feb. 2001)
- 10 • Marais et al., EMBO J., 14(1): 3136-3145 (Julio 3, 1995)
- Marshall, M., Mol Reprod Dev., 42(4): 493-499 (Dic. 1995)
- Meadows et al., Oncogene, 23(1): 192-200 (2004)
- Needleman et al., Pathology, 22(2): 77-81 (Abril 1990)
- Perera et al., Arch. Toxicol., 64(5): 401-406 (1990)
- 15 • Perera et al., Nature. 35: 256-258 (1992)
- Pitarque et al., Mutat Res., 440(2): 195-204 (Abril 6, 1999)
- Prior and Hancock, Journal of Cell Science, 114: 1603-1608 (2001)
- Pruitt and Der, Cancer Letters, 171: 1-10 (2002)
- Rundle et al., Cancer Lett., 185(1): 71-78 (Nov. 8, 2002)
- 20 • Schneider et al., Clin. Chem. Lab. Med., 38(4): 301-305 (Abril 2000)
- Singh et al., Cancer Res., 57(2): 253-258 (En. 15, 1997)
- Solanas and Escrich, Rev Esp Fisiol., 52(3):173-192 (Sep. 1996)
- Sommer et al., Oncogene, 22, 4266-4280 (2003)
- Sreelekha et al., J Esp Clin Cancer Res., 18 (3): 337-341 (Sep. 1999)
- 25 • Sun et al., Eur. J. Cancer. 27(12): 1646-1649 (1991)
- Takahashi et al., Clin Cancer Res., 1(10): 1071-1077 (Oct. 1995)
- Ulku et al., Mol Cancer Res.; 1(14): 1077-1088 (2003)
- Wang et al., J Cell Bio., 129(4): 1103-1114 (Mayo 1995)
- Watson, D.M., Breast Cancer Res. Treat., 17(3):161-169 (En-Feb 1991)
- 30 • Weissfeld et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 3(1): 57-62 (En-Feb 1994)
- Wilhelm et al., Cancer Research, 64: 7099-7109 (Oct. 1, 2004)
- Wittinghofer et al., FEBS Letters, 410: 63-67 (1997)
- Yan et al., Jour. Biol Chem., 273(37): 24052-24056 (Sep. 11, 1998)

Abreviaturas

- 35 [0029] Se utilizan las siguientes abreviaturas aquí:
- | | |
|----------|--|
| ATCC - | American Type Culture Collection |
| BSA- | albúmina de suero bovino |
| °C - | grados centígrados |
| CEA - | antígeno carcinoembriogénico |
| 40 CV - | coeficiente de variación |
| EDTA - | etilenodiaminatetraacetato |
| EGFR - | receptor de factor de crecimiento epidérmico |
| ELISA - | ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima |
| FTI - | inhibidor farnesiltransferasa |
| 45 GDP - | difosfato guanosina |

	GEFS -	factores de intercambio de guanina-nucleótido
	GTP -	trifosfato guanosina
	Proteína G -	proteína dependiente de nucleótido guanilo
	HRP -	peroxidasa de rábano
5	kD -	kilodalton
	M -	molar
	Mab -	anticuerpo monoclonal
	MAP -	proteína activada por mitógeno
	ml -	mililitro
10	mM -	milimolar
	N -	normal o número (dependiendo del contexto)
	ND -	no detectado
	NED -	no evidencia de enfermedad
	Ng -	nanograma
15	nm -	nanómetro
	OD -	densidad óptica
	pg -	proteoglicano
	PDGFR -	receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta
	P. Resp -	respuesta del paciente
20	Prog -	enfermedad progresiva
	Recur -	recurrencia
	DE -	Desviación estándar
	Stab -	estable
	Stg -	etapa
25	TIMP-1 -	inhibidor de tejido de metaloproteinasa-1
	TMB -	tetrametilbenzidina
	µg -	microgramo
	µl -	microlitro
	Unk -	desconocido
30	uPA -	activador de plasminógeno del tipo uroquinasa
	VEGF -	factor de crecimiento endotelial vascular
	VEGFR -	factor de crecimiento endotelial vascular receptor

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0030] La Figura 1 es una curva estándar ilustrativa construida al hacer reaccionar un estándar ras p21 recombinante tipo intacto en 6 diferentes concentraciones de 0, 40, 150, 300, 500 y 700 pg/ml en una realización preferida de los ensayos de esta invención, un ELISA ras p21, como se describe en detalle en los Materiales y Métodos, y en el Ejemplo 1, adelante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0031] La presente invención se dirige a inmunoensayos cuantitativos que miden cambios seriales en los niveles de proteína ras p21 totales en fluidos corporales humanos, cuyos ensayos son útiles diagnósticamente/pronósticamente para detectar o monitorear una enfermedad preneoplásica/neoplásica en un humano, o para seleccionar una terapia para un paciente con dicha enfermedad preneoplásica/neoplásica, en donde dicha enfermedad se asocia con una ruta ras activada. Como se utiliza aquí, una "ruta ras activada" se define como una ruta ras activada por la sobreexpresión o mutación de la proteína ras p21, y por lo tanto abarca rutas ras reguladas por

aumento y/o mutacionalmente estimuladas. Adicionalmente, como se utiliza aquí, "proteína ras p21 total" comprende la proteína p21 normal (tipo intacto) y activada por mutación (que incluye proteínas H-ras, K-ras, y N-ras).

[0032] Ejemplos de enfermedades preneoplásicas/neoplásicas asociadas con una ruta ras
 5 activada son los siguientes, así como también precánceres que conducen a los siguientes: cáncer colorectal, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de células macrocíticas, cáncer de pulmón de célula pequeña, leucemia mielogenosa aguda, cáncer tiroide, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular y malignidades hematológicas. En particular, los
 10 niveles de proteína ras p21 totales, solos o en combinación con los niveles de otras proteínas, particularmente otras oncoproteínas, se pueden utilizar para predecir el resultado clínico y/o como una ayuda en la selección de la terapia.

[0033] Los ensayos de esta invención pueden ser diagnósticos y/o pronósticos, es decir, diagnósticos/pronósticos. El término "diagnóstico/pronóstico" definido aquí abarca los siguientes
 15 procesos individualmente o acumuladamente dependiendo del contexto clínico: determinar la presencia de enfermedad, determinar la naturaleza de una enfermedad, distinguir una enfermedad de la otra, pronosticar el resultado probable de un estado de enfermedad, determinar el prospecto para la recuperación de una enfermedad según se indica por la naturaleza o los síntomas de un caso, monitorear el estado de enfermedad de un paciente, monitorear un paciente para la recurrencia de la
 20 enfermedad, y/o determinar el régimen terapéutico preferido para un paciente. Los métodos de diagnóstico/ pronóstico de esta invención son útiles, por ejemplo, para detectar poblaciones para la presencia de enfermedad neoplásica o preneoplásica, determinar el riesgo de desarrollar enfermedad neoplásica, diagnosticar la presencia de enfermedad neoplásica y/o preneoplásica, monitorear el estado de enfermedad de los pacientes con enfermedad neoplásica, y/o determinar el pronóstico del
 25 curso de la enfermedad neoplásica.

[0034] La presente invención es útil para detectar la presencia de una amplia variedad de enfermedades preneoplásicas/neoplásicas como se indicó anteriormente. Tal un ensayo se puede utilizar para detectar tumores, monitorear su crecimiento, y ayudar en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. También se pueden utilizar ensayos para detectar la presencia de metástasis de cáncer, así
 30 como también confirmar la ausencia de tejido de tumor luego de quimioterapia de cáncer y/o terapia de radicación. Se puede utilizar adicionalmente para monitorear la quimioterapia de cáncer y la reaparición del tumor.

[0035] Los métodos incluyen cuantificar la proteína ras p21 total, si cualquiera, está presente en las muestras de fluido corporal seriales tomadas de un sujeto humano diagnosticado con, o que se
 35 sospecha de tener, una enfermedad preneoplásica/neoplásica. Los niveles de proteína cuantificados de ras p21 totales se comparan con los promedios del nivel en muestras de fluido corporal tomadas de individuos de una población de control, en donde un nivel promedio anterior de la proteína ras p21 total es indicador de una ruta ras activada. Como se utiliza aquí, un nivel "promedio anterior" de proteína ras p21 total indica un nivel mayor de dos desviaciones estándar (DE) por encima del nivel
 40 medio encontrado en las muestras de control. Los individuos de la población de control pueden ser de cualquier género, o se pueden restringir a aquellos quienes son del mismo género como el sujeto.

[0036] Como se utiliza aquí, "canceroso" y "neoplásica" tienen significados equivalentes, y "precanceroso" y "preneoplásica" tienen significados equivalentes. El uso de detección de productos de expresión de gen de oncogenes como indicadores de diagnóstico/ pronóstico para enfermedad
 45 preneoplásica/neoplásicas se considera convencional por aquellos expertos en la técnica. Sin embargo,

es nueva la aplicación de tales métodos para medir cambios cuantitativamente seriales en niveles ras en fluidos corporales, particularmente al circular niveles ras, para detectar o monitorear una enfermedad preneoplásica/neoplásica, en donde dicha enfermedad se asocia con una ruta ras activada.

Muestras Seriales de Fluidos Corporales

- 5 [0037] En una realización preferida de la invención, se cuantifica la proteína ras p21 total en muestras de fluido corporal humanas retiradas en serie durante el tiempo. Tales muestras de fluido corporal pueden ser muestras de sangre, suero, plasma, orina, saliva, semen, exudado de mama, fluido cerebroespinal, lágrimas, esputo, mocos, plasma, citosoles, ascitis, efusiones pleurales, fluido amniótico, lavados de vejiga y lavados bronquioalveolares, entre otras muestras de fluido corporal.
- 10 Los fluidos corporales preferidos, por ejemplo, incluyen muestras de suero, o plasma tratadas con heparina, citrato o EDTA, entre otras muestras de fluido corporal, y pueden ser frescas o congeladas. Tales especímenes de fluido corporal pueden ser tomados del pretratamiento, durante el tratamiento, o post-tratamiento, o se pueden tomar de un paciente quien no ha respondido a la terapia. Como se utiliza aquí, "cambios seriales durante el tiempo" o "muestras seriales" denota prueba secuencial de las
- 15 muestras tomadas durante los periodos de tiempo que se puede considerar relevante para el sujeto, que depende del contexto y las circunstancias. Por ejemplo, para detección de pacientes con cáncer, las muestras seriales se pueden retirar luego de una visita inicial del paciente, después de diagnóstico, precirugía y/o postcirugía; mientras que para la detección de la población para una enfermedad preneoplásica, las muestras seriales se pueden retirar anualmente.

20 Inmunoensayos

- [0038] Un inmunoensayo preferido y de ejemplo de acuerdo con los métodos de la invención es un ELISA intercalado descrito adelante en la sección de Materiales y Métodos, y se utiliza para obtener los datos mediante los ejemplos 1 a 8. Se puede apreciar que los métodos alternos, en adición a aquellos descritos aquí, se pueden utilizar para cuantificar la proteína ras p21 total en fluidos
- 25 corporales humanos. Se pueden utilizar otros ensayos intercalados preferidos con otros medios de visualización, tal como marcas luminescentes. Otras marcas se detallan adelante bajo las etiquetas marcadas en la subsección.

- [0039] Se pueden adaptar muchos formatos para uso con los métodos de la presente invención. Se puede desarrollar detección y cuantificación de la proteína ras p21 total en los fluidos
- 30 corporales humanos, por ejemplo, mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados por enzimas, radioinmunoensayos, ensayos intercalados de anticuerpo, ensayos de aglutinación, inmunoensayos fluorescentes, microscopía de detección e inmuno electrón utilizando inmuno-oro, entre otros ensayos conocidos comúnmente en la técnica. La cuantificación de la proteína ras p21 total en tales ensayos se puede adaptar mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. En realizaciones preferidas,
- 35 los cambios seriales en circular los niveles de proteína ras p21 totales, o tales niveles en otros fluidos corporales, se detectan y cuantifican mediante un ensayo de intercalado en el que el anticuerpo de captura se ha inmovilizado, utilizando técnicas convencionales, en la superficie del soporte.

- [0040] Los soportes adecuados utilizados en los ensayos incluyen entre otros soportes, soportes de polímero sintéticos, tal como polipropileno, poliestireno, poliestireno sustituido,
- 40 poliacrilamidas (tal como poliamidas y polivinilcloruro), glóbulos de cristal, agarosa, y nitrocelulosa, entre otros soportes.

Inmunoensayo de Ejemplo

- [0041] Un inmunoensayo intercalado ELISA preferido y de ejemplo se describe en la sección de Materiales y Métodos y en los Ejemplos 1-8. El ELISA de ejemplo utiliza Mab Ras 17 como el
- 45 anticuerpo de captura y Mab 10.2 biotinilado (producido por un subclon del hibridoma Ras 10) como

el anticuerpo detector. El Mab Ras 17 de captura se inmoviliza en pozos de placa de microtítulo; muestras de suero/plasma humano diluidas o estándares ras p21 (proteína H-ras tipo intacto recombinante) se incuban durante tres horas a 37°C en los pozos para permitir la unión de antígeno ras p21 total mediante Mab 17. Después del lavado de los pozos, el antígeno ras p21 inmovilizado se expone a un anticuerpo detector biotinilado Mab Ras 10.2 durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-27°C), después de que se lavan de nuevo los pozos. Luego se agrega un conjugado de peroxidasa de rábano estreptavidina (30 minutos a temperatura ambiente). Después de un lavado final, se agrega el Sustrato Azul TMB a los pozos (y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente) para detectar actividad de peroxidasa vinculada. La reacción se detiene mediante la adición de 2.5N de ácido sulfúrico, y se mide la absorbancia a 450 nm. Correlacionar los valores de absorbancia de las muestras con los estándares ras permite la determinación de un valor cuantitativo de ras p21 total en pg/ml de suero o plasma.

Ensayos de Combinación: Niveles Ras y Otras Proteínas

[0042] Se puede apreciar que otras proteínas, tal como inhibidores, oncoproteínas, receptores del factor de crecimiento, factores angiogénicos, proteínas de metástasis, marcadores de tumor, y supresores de tumor, particularmente aquellos asociados con la ruta ras, pueden ser adecuadas para detección y cuantificación junto con ras p21, dependiendo de la enfermedad preneoplásica/neoplásica del sujeto. Otras proteínas preferidas y de ejemplo adecuadas para prueba junto con ras p21 incluyen inhibidor de tejido de metaloproteinasas- 1 (TIMP-1), HER-2/neu, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGFR), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), activador de plasminógeno del tipo uroquinasa (uPA), antígeno carcinoembriónico (CEA), y p53. Se conocen ensayos para detectar otras proteínas preferidas adecuadas para los métodos de la invención por un experto en la técnica. Por ejemplo, los inmunoensayos para la cuantificación de HER-2/neu y TIMP-1 en fluidos corporales humanos están disponibles comercialmente, tal como el ELISA TIMP-1 Oncogene Science [Oncogene Science, Cambridge, MA (USA), www.oncogene.com], que puede determinar los valores ng/ml de los niveles TIMP-1 en suero o plasma humano. Como se describe en el Ejemplo 8, las muestras de suero de cáncer colorectal seriales y las muestras de suero normal se evalúan para los niveles ras p21 total y TIMP-1.

30 Pronóstico

[0043] Monitorear los niveles de ras p21 y/o otras proteínas puede ser indicador de los resultados clínicos para enfermedades preneoplásicas/neoplásicas. Un método preferido para evaluar un resultado clínico es uno basado en la velocidad de respuesta (RR), beneficio clínico [incluyendo respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), y enfermedad estable (SD)], progresión en el tiempo (TTP), y muerte con el tiempo (TTD). Se conocen en la técnica y se pueden utilizar otros métodos para evaluar el pronóstico.

Anticuerpos

[0044] Los anticuerpos utilizados en el inmunoensayo de la invención son los anticuerpos Ras 17 y Ras 10, o anticuerpos producidos por subclones de los hibridomas Ras 17 y Ras 10 (tal como el Ras 10.2 Mab de un subclón del hibridoma Ras 10 padre), cuando ellos exhiben la actividad biológica deseada.

[0045] Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la unión a antígeno o su dominio variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, dianticuerpos, anticuerpos lineales, y

moléculas de anticuerpo de cadena única, así como también anticuerpos multiespecíficos, que incluyen anticuerpos biespecíficos, formados de fragmentos de anticuerpo.

[0046] El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para mutaciones posiblemente de ocurrencia natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales que son altamente específicos, se dirigen contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, en contraste a preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonal) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo cuando se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se construye cuando se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser utilizados de acuerdo con la presente invención se pueden hacer mediante el método de hibridoma descrito primero por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), o se puede hacer mediante métodos de ADN recombinantes (ver, por ejemplo, Pat. Estadounidense No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las colecciones de anticuerpo de fago utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*. 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

[0047] Los anticuerpos monoclonales específicamente incluyen aquí anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en las que una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica con o homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de tales anticuerpos, cuando ellos exhiben la actividad biológica deseada [Pat. Estadounidense No. 4,816,567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81: 6851-6855 (1984)].

[0048] Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de la región hipervariable del receptor se reemplazan por los residuos de la región hipervariable de especies no humanas (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Se hacen tales modificaciones para refinar adicionalmente el desarrollo del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a aquellas de inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FR son aquellos de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente que de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver Jones et al., *Nature*. 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

[0049] Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL, en donde están presentes estos dominios en una cadena única de polipéptido.

Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un ligador de polipéptido entre los dominios VH y VL que permiten el sFv para formar la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una revisión de sFv ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer- Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

- 5 [0050] El término "dianticuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Al utilizar un ligador que tan corto para permitir la formación de pares entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a formar pares con los dominios de complementariedad de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Se describen dianticuerpos más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90: 6444-6448 (1993).

- 15 [0051] La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 (1995). En resumen, tales anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd tandem (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

- [0052] Los anticuerpos monoclonales representativos útiles de acuerdo con esta invención incluyen Mabs Ras 17 y Ras 10 descrito en las patentes de Carney et al. Más tempranas [Pat. Estadounidense No. 5,081,230; Pat. Estadounidense No 5,443,956; Pat. Estadounidense No.6,200,764]. Los anticuerpos monoclonales útiles de acuerdo con esta invención sirven para identificar proteínas ras p21 total en varias pruebas de pronóstico de laboratorio, por ejemplo, en muestras clínicas.

- [0053] Los textos en general describen técnicas biológicas moleculares adicionales útiles aquí, que incluyen la preparación de anticuerpos incluyendo Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Vol. 152, Academic Press, Inc., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.; 1989) Vol. 1-3; *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausabel et al. [Eds.], *Current Protocols*, a joint venture between Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (complementado en 2000), Harlow et al., *Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988), Paul [Ed.]; *Fundamental Immunology*, Lippincott Williams & Wilkins (1998), y Harlow et al., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998).

Marcas

- 35 [0054] Los anticuerpos útiles de acuerdo con esta invención para identificar proteínas ras p21 totales se pueden marcar en cualquier forma convencional. Una marca preferida, de acuerdo con esta invención es peroxidasa de rábano, y un método preferido de marcar los anticuerpos es al utilizar complejos de biotina-estreptavidina.

- [0055] Según sea apropiado, los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos de esta invención que se utilizan como trazadores se pueden marcar en cualquier forma, directamente o indirectamente, que resulta en una señal que es visible o se puede hacer visible. Las sustancias de marcador detectables incluyen radionúclidos, tal como ³H, ¹²⁵I, y ¹³¹I; fluorescentes, tal como, isotiocinonato fluoresceína y otros fluorocromos, ficobiliproteínas, dicroeritina, quelatos de tierras raras, rojo Texas, dansil y rodamina; reactivos colorimétricos (cromógenos); materiales opacos de electrón, tal como dorado coloidal; bioluminiscentes; quimioluminiscentes; tintes; enzimas, tal como, peroxidasa de rábano, fosfatasas alcalinas, oxidasa glucosa, deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato,

acetilcolinesterasa, alfa -, beta-galactosidasa, entre otros; coenzimas; sustratos de enzima; cofactores de enzima; inhibidores de enzima; subunidades de enzima; iones de metal; radicales libres; o cualquier otra sustancia inerte o inmunológicamente activa que proporciona un medio para detectar o medir la presencia o la cantidad de inmunocomplejo formado. Ejemplos de combinaciones de sustrato de enzima son peroxidasa de rábano y benzidina tetrametilo (TMB), y fosfatasas alcalinas y fosfato paranitrofenilo (pNPP).

[0056] Otros sistemas de cuantificación, detección o detección preferida de acuerdo con esta invención producen señales luminescentes, bioluminiscentes (BL) o quimioluminiscentes (CL). En ensayos quimioluminiscentes (CL) o bioluminiscentes (BL), se mide la intensidad o la emisión de luz total y se relaciona con la concentración del analito desconocido. Se puede medir la luz cuantitativamente utilizando un luminómetro (tubo fotomultiplicador como el detector) o dispositivo acoplado a carga, o cuantitativamente por medio de película de rayos X o fotográfica. Las ventajas principales de utilizar tales ensayos son su simplicidad y sensibilidad analítica, permitiendo la detección y/o cuantificación de cantidades muy pequeñas de analito.

[0057] Las marcas luminescentes de ejemplo son ésteres acridinio, carboxamidas sulfonil acridinio, luminol, umbeliferona, derivados isoluminol, fotoproteínas, tal como aecuerin, y luciferasas de luciérnagas, bacterias marinas, Vargulla y Renilla. Se puede utilizar luminol opcionalmente con una molécula mejoradora, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste de ácido 4-yodofenol o 4-hidroxi-cinámico. Los ésteres acridinio son de uno de los tipos preferidos de las marcas CL de acuerdo con esta invención. Típicamente, se genera una señal CL mediante tratamiento con un oxidante bajo condiciones básicas.

[0058] También los sistemas de detección luminescentes preferidos son aquellos en donde se produce la señal (marcador detectable) por una reacción enzimática luego de un sustrato. Los esquemas de detección CL y BL se han desarrollado para evaluar fosfatasas alcalinas (AP), oxidasa de glucosa, deshidrogenada de 6-fosfato glucosa, peroxidasa de rábano (HRP), y marcas de xantina-oxidasa, entre otros. El AP y HRP son dos marcas de enzima preferidas que se pueden cuantificar mediante un rango de reacciones CL y BL. Por ejemplo, el AP se puede utilizar con un sustrato, tal como un sustrato aril fosfato 1,2-dioxetano adamantilo (por ejemplo AMPPD o CSPD; [Kricka, L.J., "Chemiluminescence and Bioluminescence, Analysis by," at p. 167, Molecular Biology y Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (ed. R.A. Meyers) (VCH Publishers; N.Y., N.Y.; 1995)]; preferiblemente una sal disodio de 4-metoxi-4-(3-fosfatefenil) spiro [1,2-dioxetano-3,2'-adamantano], con o sin una molécula mejoradora, preferiblemente, bicloruro de 1-(trioctilfosfonio metil)-4- (tributylfosfonio metil) benceno. El HRP se utiliza preferiblemente con sustratos, tal como, 2',3',6'- trifluorofenil 3-metoxi-10-metilacridan- 9-carboxilato.

[0059] Las reacciones CL y BL se pueden adaptar para análisis no solo de enzimas, sino también de otros sustratos, cofactores, inhibidores, iones de metal y similares. Por ejemplo, luminol, luciferasa de luciérnaga, y reacciones de luciferasa bacteriana marina son reacciones indicadoras para la producción o consumo de peróxido, ATP, y NADPH, respectivamente. Ellos se pueden acoplar con otras reacciones que involucran oxidasas, quinasas, y deshidrogenasas, y se pueden utilizar para medir cualquier componente de la reacción acoplada (enzima, sustrato, cofactor).

[0060] El marcador detectable se puede unir directamente o indirectamente a un anticuerpo utilizado en un ensayo de esta invención. Ejemplos de un ligado indirecto de la marca detectable es el uso de un par de unión entre un anticuerpo y un marcador o el uso de un sistema de amplificación de señal.

[0061] Ejemplos de pares de unión que se pueden utilizar para los ligar los ensayos de anticuerpo de esta invención para marcadores detectables son biotina/avidina, estreptavidina, o anti-biotina; avidina/anti-avidina; tiroxina/globulina unida a tiroxina; antígeno/anticuerpo; anticuerpo/ anti-anticuerpo; carbohidrato/lectinas; hapteno/anti-anticuerpo hapteno; tintes y moléculas hidrófobas /sitios de unión de proteína hidrófoba; inhibidor de enzima, coenzima o cofactor/enzima; secuencia de ácido polinucleico/ácido polinucleico homólogo; fluoresceína/anti- fluoresceína; dinitrofenol/anti-dinitrofenol; vitamina B12/ factor intrínseco; cortisona, cortisol/ proteína de unión a cortisol; y ligandos para proteína receptora específica/proteínas de receptor específico asociadas a membrana. Los pares de unión preferidos de acuerdo con esta invención son biotina/avidina o estreptavidina, más preferiblemente biotina/estreptavidina.

[0062] Se conocen en la técnica varios medios para marcas de ligado directamente o indirectamente a anticuerpos. Por ejemplo, las marcas se pueden unir covalentemente o no covalentemente. Se describe métodos de conjugación de anticuerpo en: Avarmeas et al., Scan. J. Immunol., 8 (Suppl. 7): 7 (1978); Bayer et al., Meth. Enzymol., 62: 308 (1979); Chandler et al., J. Immunol. Meth., 53: 187 (1982); Ekeke and Abuknesha, J. Steroid Biochem., 11: 1579 (1979); Engvall y Perlmann, J. Immunol., 109: 129 (1972); Geoghegan et al., Immunol. Comm., 7: 1 (1978); y Wilson and Nakane, Immunofluorescence and Related Techniques, p. 215 [Elsevier/North Holland Biomedical Press; Amsterdam (1978)].

[0063] Dependiendo de la naturaleza de la marca, se pueden emplear varias técnicas para detectar y cuantificar la marca. Para fluorescentes, están disponibles una gran cantidad de fluorómetros. Para quimioluminiscentes, están disponibles luminómetros o películas. Con enzimas, un producto fluorescente, quimioluminiscente, o de color se puede determinar o medir fluorométricamente, luminométricamente, e espectrofotométricamente o visualmente.

[0064] Varios tipos de compuestos quimioluminiscentes que tienen un tipo acridinio, benzacridinio, o acridano de sistemas de anillo heterocíclicos son marcas preferidas. Los ésteres acridinio y benzacridinio son actualmente los compuestos quimioluminiscentes más preferidos, con ésteres acridio preferidos que incluyen aquellos compuestos que tienen anillos heterocíclicos o sistemas de anillo que contienen el heteroátomo en un estado de oxidación positivo que incluye tales sistemas de anillo como acridinio, benz [a]acridinio, benz[b]acridinio, benz[c]acridinio, un catión benzimidazol, quinolinio, isoquinolinio, quinolizinio, un quinolinio sustituido cíclico, fenantridinio, y quinoxalino, como se conocen bien en la técnica.

[0065] El trazador se puede prepara al adherir al anticuerpo seleccionado directamente o indirectamente un grupo funcional reactivo presente en el éster acridinio o benzacridinio, como se conoce bien por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo Weeks et al., Clinical Chemistry, 29(8), 1474-1479, (1983). Particularmente los compuestos preferidos son ésteres acridinio y benzacridinio con un grupo saliente de anillo arilo y el grupo funcional reactivo presente en la posición para o la posición meta del anillo arilo. Ver, Patente Estadounidense No. 4,745,181 y WO 94/21823.]

Terapias Dirigidas a Ras

[0066] Como se utiliza aquí, "terapias dirigidas a ras" incluyen cualesquier terapias que se objetivan a la ruta ras, que incluyen la inhibición de la expresión de la proteína ras (por ejemplo, oligonucleótidos anticodificantes), prevención de localización de membrana esencial para la activación RAS (inhibidores de farnesilación ras), o inhibición de efectores en dirección 3' de ras (por ejemplo, quinasas serina/treonina Raf). Las terapias dirigidas a ras preferidas incluyen inhibidores farnesiltransferasa (FTI), inhibidores tirosina quinasa, o ureas bis-arilo. Los FTI de ejemplo son BMS-214662 [un no peptidomimético que contiene imidazol FTI; Cortes et al., J. Clin. Oncol. 23 (12):

- 2805-2812 (Abril 20, 2005); Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ (USA)], FTI-2153 y FTI-277 [EMD Biosciences, www.emdbiosciences.com (Cat. No. 3444555); Lerner et al. (1995); Sun et al., *Cancer Res.*, 59: 4919-4926 (1999)], R115777 [metilquinolone; Janssen Research Foundation, Titusville, NJ (USA)], y Sch66336 [Sarasar® o Lonafernib®; un benzocicloheptapiridil FTI; Taveras et al., *Curr. Topics Med. Chem.*, 3(10): 1103-1114 (Junio 2003); Schering Plough, Kenilworth, NJ (USA)].

[0067] Un inhibidor tirosina quinasa de ejemplo es AZD3049 [inhibidor prenil transferasa; AstraZeneca, www.astrazeneca.com]. Un inhibidor anticodificante de ejemplo de ras es ISIS 2503 [ISIS Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, CA (USA)]. [Ver también, por ejemplo, <http://www.webtie.org/sots/html/LungAgents.htm>, para otras terapias dirigidas a ras objetivadas a ras o en efectores relevantes en dirección 3' de ras.]

[0068] Una terapia dirigida a ras preferida de acuerdo con la invención es la bis-aril urea sorafenib (BAY 43-9006) [Onyx Pharmaceuticals, Richmond, CA (USA), y Bayer Corporation, West Haven, CT (USA); Lyons et al., *Endocrine-Related Cancer*, 8:219-225 (2001) y Wilhelm et al. (2004)], una molécula pequeña que inhibe la enzima quinasa raf. El Sorafenib objetiva la quinasa RAF/MEK/ERK [MEK: MAP/ERK; ERK: quinasa relacionada con la señal extracelular] ruta de señalización para inhibir la proliferación celular, y la ruta de señalización VEGFR-2/PDGFR-β para inhibir la angiogenia de tumor. El Sorafenib entonces sería una terapia anticáncer particularmente preferida para un paciente que se encuentra que tiene una ruta ras activada y una ruta de señalización VEGFR-2/PDGFR-β activada.

20 EJEMPLOS

[0069] Los siguientes ejemplos son solo para propósitos de ilustración y no significa que limiten la invención en ninguna forma.

Materiales y Métodos

ELISA de Microtítulo Intercalado de Fase Sólida para Suero y Plasma Humano

25 Preparación de la Muestra

[0070] Las muestras adecuadas para análisis por el ELISA ras p21 incluyen plasma humano tratado con heparina, citrato, o EDTA, y suero humano. Debido a posibles factores que interfieren, se debe tener especial cuidado en la preparación y evaluación del suero y plasma humano. Cualquier material floculante se debe remover de las muestras mediante microcentrifugación antes de dilución.

30 La concentración inicial del espécimen de suero o plasma a ser examinado no debe exceder una concentración de 50% (una dilución 1:2 del espécimen en el diluyente de muestra). Por ejemplo, se puede diluir 0.150 ml de la muestra en 0.150 ml de diluyente de muestra, y se agrega 100 µl a los pozos de microplaca.

Procedimiento de Ensayo de Ejemplo

35 [0071] Los Mabs Ras 17 purificados [secretados del hibridoma Ras 17 depositado en el ATCC bajo HB 10054] se diluyen en 1 µg/ml en amortiguador de recubrimiento (0.03 M carbonato de sodio anhidro y 0.07 M de bicarbonato de sodio, pH 9.6) y se adsorben en los pozos (a 100 µl por pozo) de microplacas de 96 pozos [Nunc MaxiSorp™ F8 Immuno Module, Part#1001; Nalge Nunc International Corp., Naperville, IL (USA)]. Se lleva a cabo adsorción durante la noche (por lo menos

40 12 horas) a temperatura ambiente (20°-27°C). Al final del periodo de incubación, se agrega solución de bloqueo a los pozos (0.002M fosfato de sodio monobásico, 0.008M heptahidrato de fosfato de sodio dibásico, 0.15M cloruro de sodio, 0.29M beta D-lactosa y 2% grado de reactivo BSA; pH 7.45) y se aspira utilizando un Recubrimiento de Microplaca Oyster Bay (Modelo MPC3-3) [Oyster Bay Pump Works, Hicksville, N.Y. (USA)]. Las microplacas recubiertas se secan utilizando un Secador-

45 Congelador LyoStar® [FTS Systems, Stone Ridge, N.Y. (USA)] a 22°C y se almacenan a 2-8°C.

- [0072] Las muestras de suero humano y los estándares ras p21 [Invitrogen Corporation, Catálogo # P2138; Carlsbad, CA (USA)] se diluyen serialmente con diluyente de muestra [4% BSA Proteasa Libre (Producto Serológico #82-045; www.serologicals.com), 10 µg/ml de IgG de Ratón Purificado (Scantibody Laboratories Product #3BM222; Santel, CA, USA) y 0.09% azida de sodio].
- 5 Se pueden utilizar muestras de plasma tratadas con heparina, citrato o EDTA en lugar de suero. Luego se agregan muestras diluidas a los pozos de microplaca (100 µl por pozo) y las placas selladas incubadas durante 3 horas a 37°C. Cada pozo se lava seis veces con 300 µL por pozo de placa lavada, pH 7.4 [0.137M cloruro de sodio, 2.7 mM cloruro de potasio, 1.45 mM fosfato de potasio monobásico, 0.08 M heptahidrato de fosfato de sodio dibásico, y 0.05% Tween 20]. A cada pozo
- 10 luego se agrega 100 µl de Mabs Ras 10.2 biotiniliados [cuyo hibridoma Ras 10 padre está en un depósito en el ATCC bajo HB 9426] diluido en el diluyente detector [0.4% caseína, 1.7 mM fosfato de sodio monobásico, 8.1 mM heptahidrato de fosfato de sodio dibásico, 0.15M cloruro de sodio, y 0.1 % azida de sodio, pH 7.15_0.1] (concentración final Mab 0.5-3.5 µg/ml; concentración óptima determinada mediante la titulación y la prueba funcional del detector Mab).
- 15 [0073] Las placas se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cada pozo se lava seis veces como anteriormente, y se agrega a cada pozo 100 µl de estreptavidina-HRP [Zymed Laboratories, Inc., Catálogo # 43-8323; www.zymed.com] diluido con 1 µg/mL o menos en diluyente conjugado [1.7 mM fosfato de sodio monobásico, 8.1 mM heptahidrato de fosfato de sodio dibásico, 0.145M cloruro de sodio, 0.1% 2-cloroacetamida, 1% BSA Proteasa Libre, y 0.05% Tween 20; pH
- 20 7.3]. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada pozo se lava de nuevo seis veces como anteriormente, y se agrega 100 µl de una solución de sustrato que produce color [Sustrato Azul TMB, DakoCytomation, Catálogo # S1601; www.dakocytomation.com] a cada pozo para detectar actividad peroxidasa vinculada. Las placas se incuban 30 minutos a temperatura ambiente, y la reacción se detiene mediante la adición de 100 µl de 2.5N ácido sulfúrico. La
- 25 absorbancia se mide en 450 nm utilizando un lector de placa espectrofotométrica de Molecular Devices (Modelo #Vmax; www.moleculardevices.com) y se analiza utilizando un programa de software Softmax Pro™ (Molecular Devices Corporation; www.moleculardevices.com).

Muestras de Suero y Plasma Humano

- [0074] Se obtienen muestras de plasma y suero congeladas de pacientes humanos con cáncer
- 30 y normales de Bioclinical Partners, Inc. [Franklin, MA (USA); ahora Zeptometrix (www.zeptometrix.com)].

Ejemplo 1

Curva Estándar Ras

- [0075] Se hacen análisis cuantitativos al construir una curva estándar utilizando ras p21 Ha
- 35 [ras p 21 tipo intacto recombinante de Invitrogen Corporation, Catálogo # P2138]. La Figura 1 presenta la curva estándar que se construye al hacer reaccionar varias concentraciones de la proteína Ha-ras p21 con anticuerpo Ras 17 monoclonal reactivo anti-p21 pan inmovilizado y se detecta la proteína ras p21 capturada utilizando anti-anticuerpo Ras 10.2 monoclonal p21 total biotinilado. El procedimiento de inmunoensayo es como se describió anteriormente en Materiales y Métodos.

- 40 Ejemplo 2

Suero humano Normal

- [0076] Se recubren pozos de microplaca con anticuerpo de captura anti-ras p21 (Mab Ras 17), como se describió anteriormente. Un total de 82 sueros humanos normales (42 femeninos, 40 masculinos; obtenidos de Bioclinical Partners, Inc.) se prueban individualmente en las microplacas
- 45 recubiertas mediante ELISA, y ras p21 presente en el suero se detecta utilizando anticuerpo Ras 10.2

monoclonal biotinilado. El índice de absorbancia a 450 nm se utiliza para determinar el nivel de ras p21 total en muestras de suero. Los resultados muestran que, en general, se encuentran niveles mayores de proteína ras p21 totales en mujeres normales que en hombres normales (promedio de 122.4 pg/ml en mujeres vs. 33.1 pg/ml en hombres).

5

Tabla 1: Muestras de Suero de Punto Único de Humanos Normales

Mujeres Normales		Hombres Normales	
Muestras de Suero		Muestras de Suero	
Muestra	Ras p21 (pg/mL)	Muestra	Ras p21 (pg/mL)
3666	204.4	3552	54.3
3668	148.4	3553	54.5
3669	119.7	3554	73.9
3670	137.5	3555	40.6
3671	235.6	3556	36.2
3672	134.8	3557	46.3
3673	223.0	3558	41.9
3674	146.8	3559	37.0
3675	91.6	3560	2.2
3676	75.2	3561	7.0
3677	100.7	3562	5.0
3678	337.9	3563	5.6
3679	99.7	3564	0.8
3680	303.8	3565	1.5
3681	136.5	3566	5.4
3682	76.1	3567	2.0
3683	64.6	3568	4.6
3684	80.6	3569	6.4
3685	168.1	3570	4.0
3686	85.9	3571	10.3
3687	120.2	3572	1.1
3688	138.9	3573	98.8
3689	127.0	3574	3.7
3690	57.6	3575	4.8
3691	68.0	3576	35.9
3692	49.4	3577	37.6
3693	183.1	3578	5.4
3694	50.1	3579	10.8

Mujeres Normales		Hombres Normales	
Muestras de Suero		Muestras de Suero	
Muestra	Ras p21 (pg/mL)	Muestra	Ras p21 (pg/mL)
3695	62.5	3580	5.0
3696	49.2	3581	5.1
3697	48.6	3582	4.7
3698	59.1	3583	3.5
3699	68.8	3584	4.4
3700	63.6	3585	8.9
3701	395.1	3586	10.6
3702	49.7	3587	16.5
3703	47.6	3588	6.6
3704	60.8	3589	19.3
3705	56.4	3590	453.1
3706	62.8	3591	150.5
3707	228.0		

Tabla 1 Resumen

Niveles RAS en Suero Humano Normal (pg/ml)					
Género	N	Rango	Media	Media + 2 DE	95% Cae debajo:
Masculino	40	ND - 453.1	33.1	182.5	101.4
Femenino	41	ND - 395.1	122.4	289.7	303.8

Ejemplo 3

5 Plasma vs. Suero

[0077] Se evalúan dieciséis coincidencias de muestras de plasma y suero humano normales para niveles de proteína de ras p21 totales mediante ELISA, como se describió anteriormente en Materiales y Métodos. Niveles de plasma promediados aproximadamente 24% mayores que los niveles de suero, como se demuestra en la Tabla 2 adelante.

10

Tabla 2

Coincidencia Suero/Plasma Humano Normal (pg/ml)			
Muestra#	Plasma	Suero	% de Diferencia
1602	166.659	146.964	11.8
1603	131.963	121.974	7.6
1604	111.289	87.124	21.7
1605	116.629	87.124	25.3
1606	171.328	102.398	40.2
1607	167.74	102.398	39.0
1608	178.863	106.667	40.4

Coincidencia Suero/Plasma Humano Normal (pg/ml)			
Muestra#	Plasma	Suero	% de Diferencia
1609	477.954	147.325	69.2
1610	147.328	140.53	4.6
1611	149.834	85.351	43.0
1612	154.124	127.678	17.2
1613	73.658	79.324	-7.7
1614	116.634	110.937	4.9
1615	125.182	117.341	6.3
4029	256.486	160.924	37.3
4031	132.319	98.486	25.6
Mean	167.37	113.91	24.14
SD	91.9	25.0	19.8

Ejemplo 4

Características del Ensayo

[0078] La sensibilidad, especificidad, precisión y paralelismo del ensayo ELISA para ras p21 total en suero o plasma se caracteriza (en todos los casos, utilizando Mab Ras 17 como el anticuerpo de captura y Mab Ras 10.2 como el anticuerpo detector).

1. Sensibilidad Analítica

[0079] Se determina una concentración detectable mínima del analito mediante la medición repetida de una muestra de dosis cero (Nivel Estándar 1) y el cálculo de desviaciones estándar media + 2. El ensayo ELISA ras detectará 4.6 picogramas/ml de proteína ras p21 total.

2. Especificidad

[0080] Reactividad cruzada: el Rab 3A, Rac-1, y Ran son otros miembros de la familia de proteína G. Se expone el ELISA RAS p21 de Oncogene Science con altos niveles de cada analito. Solo el Rab-3A muestra alguna reactividad cruzada en un mínimo de 1.22%.

3. Precisión

[0081] Precisión Interensayo: La reproducibilidad de la prueba ELISA para determinar la proteína ras p21 total en muestras humanas se confirma al repetir la prueba del mismo suero en diferentes ocasiones (Tabla 3). El plasma y suero humano normal se añaden con ras p21 tipo intacto recombinante [Invitrogen] en tres diferentes concentraciones y se prueba en 8 ensayos con 8 replicados por punto de prueba. La variabilidad entre el ensayo es menos de o igual a 10.0%.

Tabla 3

Precisión Interensayo			
	Alto	Medio	Bajo
n	64	64	64
Suero Medio (pg/ml)	472.9	320.0	115.7
Plasma Medio (pg/ml)	371.3	167.8	71.5
Suero de Interensayo % CV	7.1	8.6	10.0
n	64	64	64
Plasma de Interensayo % CV	8.7	7.5	8.0

[0082] Precisión Interensayo: El suero y plasma humano normal se añaden con proteína ras p21 en tres diferentes concentraciones y se prueba en 8 ensayos con 8 replicados por punto de prueba. La variabilidad intraensayo medio es menor de 7% (Tabla 4).

Precisión Interensayo			
	Alto	Medio	Bajo
n	64	64	64
Suero Medio (pg/ml)	472.9	320.0	115.7
Plasma Medio (pg/ml)	371.3	167.8	71.5
Suero de Interensayo % CV	5.8	6.6	6.9
Plasma de Interensayo % CV	6.5	6.0	6.6

5

4. Paralelismo

[0083] Se diluyen inicialmente muestras de suero y plasma añadidas 1:2, se hacen diluciones de 2 veces posteriores, y se prueban todas las diluciones en el ELISA ras p21. Se calculan recuperaciones (pg/ml) para cada dilución al corregir con el factor de dilución apropiado. Los resultados muestran que las muestras de suero y plasma añadidas diluidas en el diluyente de muestra resultan en recuperación exacta de la proteína ras p21 (Tabla 5).

10

Tabla 5

Paralelismo				
	Plasma (EDTA)		Suero	
Dilución	OD	pg/ml	OD	pg/ml
1:2	1.516	485.909	1.707	549.869
1:4	0.869	538.608	0.937	554.674
1:8	0.496	577.219	0.470	564.503
1:16	0.264	534.753	0.237	524.047
	Plasma (Citrato)		Plasma (Heparina)	
Dilución	OD	pg/ml	OD	pg/ml
1:2	1.728	556.734	1.689	543.841
1:4	0.932	580.448	0.883	547.645
1:8	0.475	549.780	0.455	522.341
1:16	0.279	573.564	0.262	529.400

Ejemplo 5

Niveles Ras en Muestras Seriales de Suero Normal

- [0084] Se evalúan muestras seriales de suero de quince humanos normales (trece hombres, dos mujeres) mediante ELISA para los niveles de ras p21 totales como se describió anteriormente bajo
- 5 Materiales y Métodos. En general, las muestras se retiran por lo menos tres semanas aparte.

Tabla 6

Muestras Seriales de Individuos Normales (Niveles Ras)			
Muestra	Ras p21 (pg/mL)	Fecha Bosquejo	Género
3651-1	159.0	5/20/2001	Masculino
3651-2	221.1	6/12/2001	
3651-3	141.3	7/14/2001	
3652-1	50.6	3/20/2001	Masculino
3652-2	56.0	5/8/2001	
3652-3	58.8	6/19/2001	
3653-1	246.7	1/12/2001	Masculino
3653-2	560.0	4/4/2001	
3653-3	244.4	9/17/2001	
3654-1	113.9	1/5/2001	Masculino
3654-2	127.9	1/31/2001	
3654-3	170.2	2/21/2001	
3654-4	126.7	9/6/2001	
3655-1	101.0	3/22/2001	Masculino
3655-2	99.6	5/9/2001	
3655-3	132.3	6/7/2001	
3656-1	150.3	5/30/2001	Masculino
3656-2	109.4	8/29/2001	
3656-3	109.7	9/12/2001	
3657-1	153.8	5/7/2001	Masculino
3657-2	122.3	6/6/2001	
3657-3	100.7	7/10/2001	
3658-1	75.8	4/17/2001	Masculino
3658-2	74.0	5/18/2001	

Muestras Seriales de Individuos Normales (Niveles Ras)			
Muestra	Ras p21 (pg/mL)	Fecha Bosquejo	Género
3658-3	70.8	6/21/2001	
3658-4	79.0	9/13/2001	
3659-1	82.7	7/6/2001	Masculino
3659-2	109.2	8/19/2001	
3659-3	99.7	9/24/2001	
3660-1	96.3	9/23/2001	Masculino
3660-2	146.3	10/16/2001	
3660-3	115.0	11/21/2001	
3661-1	172.0	8/7/2001	Masculino
3661-2	179.1	8/30/2001	
3661-3	149.5	10/10/2001	
3662-1	130.6	9/11/2001	Masculino
3662-2	116.7	10/1/2001	
3662-3	154.3	12/3/2001	
3663-1	75.5	8/22/2001	Masculino
3663-2	167.4	9/20/2001	
3663-3	124.2	10/24/2001	
3664-1	67.6	5/9/2000	Femenino
3664-2	69.7	7/11/2000	
3664-3	40.2	8/9/2000	
3664-4	105.5	7/11/2001	
3665-1	86.4	3/13/2001	Femenino
3665-2	121.4	4/25/2001	
3665-3	86.1	6/20/2001	

Ejemplo 6

Punto Único y Niveles Seriales Ras en Pacientes con Cáncer de colon

- [0085] El Ras se muta en aproximadamente 20% de todos los cánceres, particularmente en
- 5 cáncer de colon y cáncer pancreático. Con base en la hipótesis de la invención, que una ruta ras activada mediante mutación o sobreexpresión puede resultar en niveles elevados de proteína ras p21

total, se evalúan 48 sueros de pacientes con cáncer de colon para los niveles de ras p21 totales (Tabla 7). Los últimos cuatro sueros de pacientes con cáncer de colon (muestras # 2004, #2065, #2784 y #2785) muestran niveles ras p21 totales extremadamente altos.

Tabla 7

Muestras de Suero de Pacientes con Cáncer Colorectal de Punto Unico (Niveles Ras)				
Muestra	Etapas	Grado	Muestra	Ras p21 (pg/mL)
2000	C2	G3	Prog	135.09
2001	C1	3	Stab	62.86
2002	D	G4	Recur	57.86
2003	C1	3	Prog	75.80
2004	C2	G2	Recur	1147.18
2005	B2	G1	NED	24.00
2006	B2	G1	Prog	38.39
2007	C1	4	P. Resp	39.44
2008	C2	G3	Prog	121.38
2010	C2	3	Prog	65.14
2011	C2	3	Prog	105.74
2012	C2	3	Stab	40.04
2013	D	4	Prog	118.44
2014	C1	4	P. Resp	57.85
2015	C2	3	P. Resp	98.02
2016	D	G3	Prog	53.02
2017	D	4	Prog	113.46
2019	C2	3	Prog	61.04
2020	C1	G1	Prog	49.69
2021	D	G3	Prog	43.51
2022	C1	G1	Prog	84.97
2025	D	G4	Prog	96.02
2026	C2	G2	P. Resp	54.98
2027	D	G3	Recur	47.42
2028	B2	G2	Stab	73.05
2030	C1	G1	P. Resp	70.46
2034	D	G3	P. Resp	76.25
2035	C1	G1	Prog	64.53
2036	III	2	NED	38.24
2038	III	2	NED	38.24
2052	III	2	NED	69.24
2054	IV	2	Prog	150.49
2055	IV	3	Stab	56.65
2056	III	2	NED	158.35
2057	III	2	Prog	137.91
2058	IV	3	Prog	90.18

Muestras de Suero de Pacientes con Cáncer Colorectal de Punto Único (Niveles Ras)				
Muestra	Etapas	Grado	Muestra	Ras p21 (pg/mL)
2059	IV	3	Stab	48.03
2061	IV	Unk	Stab	198.64
2064	IV	4	Prog	107.74
2065	IV	4	Prog	319.91
2066	IV	4	Prog	138.55
2772	III	Unk	Unk	62.2
2773	III	Unk	Unk	157.8
2778	III	Unk	Unk	92.8
2781	III	Unk	Unk	209.4
2784	III	Unk	Unk	664.9
2785	III	Unk	Unk	1032.2
2786	III	Unk	Unk	137.5

[0086] Sin embargo, los cambios seriales en la proteína ras p21 total puede ser un indicador más útil de enfermedad preneoplásica/neoplásica que un ensayo de único punto. Los niveles incrementados de ras p21 pueden ser indicadores de recurrencia o progresión de recurrencia de cáncer colorectal e identificar pacientes quienes deben ser tratados con terapias convencionales o terapias objetivo de la ruta ras. Se pueden utilizar niveles incrementados de oncoproteína ras en conjunto con otras pruebas de oncología, tal como antígeno carcinoembriogénico (CEA).

[0087] Como se muestra en la Tabla 8, las muestras de suero seriales de siete pacientes con cáncer de colon se evalúan para los niveles de ras p21 totales utilizando el formato de inmunoensayo ELISA descrito en Materiales y Métodos. En un paciente particular con cáncer de colon en etapa IV, los inventores hacen las siguientes observaciones: el nivel ras permanece inicialmente relativamente estable (Tabla 8, muestras #3766-2 a #3766-4), pero como el cáncer progresa los niveles ras incrementados a 69 pg/ml y luego a 124 pg/ml. Aquel paciente muestra cáncer progresivo en terapia convencional. El inmunoensayo de la invención se puede utilizar por lo tanto para identificar un paciente que no responde a la terapia convencional quien puede responder a las terapias específicamente objetivadas por inhibir la ruta de oncogen ras o componentes de la ruta. Los inmunoensayos de la invención también se pueden utilizar para monitorear la respuesta o carencia de respuesta para las terapias objetivo de ruta ras.

[0088] Otro ejemplo es aquel de un paciente con cáncer de colon en etapa II, cuyo nivel ras p21 permanece inicialmente relativamente estable (Tabla 8, muestras #3767-1 a #3767-4). Cuando el cáncer progresa, sin embargo (muestras #3767-5 y #3767-6), el nivel ras se incrementa a 142 pg/ml y permanece elevado a 95 pg/ml, aunque el nivel CEA del paciente se reduce a 1.8 ng/ml normal. Como se muestra en este caso de paciente, el CEA se reduce al frente de la enfermedad progresiva, mientras se incremental los niveles ras, un patrón que es consistente con enfermedad progresiva. Los niveles elevados de ras se pueden utilizar por lo tanto para identificar pacientes elegibles para terapias de inhibidor RAS, o un paciente que no responde a terapia convencional que puede responder a terapias específicamente objetivadas por inhibir la ruta encogen ras.

Tabla 8

Muestras Suero Serial de Pacientes con Cáncer Colon (niveles Ras p21)		
<u>Muestra</u>	<u>Ras p21(pg/mL)</u>	<u>CEA (ng/mL)</u>
3766-2	59.4	
3766-3	43.7	
3766-4	52.8	
3766-5	69.3	
3766-6	124.8	
3767-1	39.1	9.1

Muestras Suero Serial de Pacientes con Cáncer Colon (niveles Ras p21)		
Muestra	Ras p21(pg/mL)	CEA (ng/mL)
3767-2	46.5	6.5
3767-3	51.2	8.7
3767-4	38.5	6.4
3767-5	142.1	1.8
3767-6	95.6	1.8
3768-1	50.1	3.8
3768-2	76.8	4.5
3768-3	53.4	2.9
3768-4	62.7	2.5
3768-5	63.3	2.7
3768-6	103.3	2.8
3769-1	133.3	
3769-2	100.1	< 0.7
3769-3	83.4	< 0.7
3769-4	81.6	0.8
3769-5	75.4	
3769-6	87.1	< 0.7
3770-1	81.6	6.8
3770-2	97.5	7.4
3770-3	92.7	7.5
3770-4	61.5	9.2
3770-5	93.1	10.0
3770-6	117.0	10.0
3771-1	43.5	26.7
3771-2	70.8	50.1
3771-3	50.9	81.0
3771-4	44.5	171.6
3771-5	41.3	368.7
3771-6	94.7	699.6
3772-1	74.0	1.8
3772-2	50.8	5.8
3772-3	154.8	7.1

Muestras Suero Serial de Pacientes con Cáncer Colon (niveles Ras p21)		
Muestra	Ras p21 (pg/mL)	CEA (ng/mL)
3772-4	50.2	
3772-5	83.4	
3772-6	158.0	20.0

Ejemplo 7

Niveles de Suero Ras p21 en Cáncer de Mama Etapa I/Etapa II

[0089] El Ras p21 se sobreexpresa en 50-60% de los cánceres de mama. Los niveles de pretratamiento elevados de la oncoproteína ras circulante en pacientes con cáncer de mama metastásicos (MBC) pueden indicar aquellos pacientes elegibles para terapias anti-ras objetivo o convencionales.

[0090] Adicionalmente, los niveles reducidos o reducidos de ras p21 solo, o en conjunto con niveles de HER-2/neu, en pacientes con cáncer de mama pueden ser un indicador temprano de cáncer de mama recurrente. Los niveles circulantes elevados de pretratamiento de oncoproteínas ras o HER-2/neu en pacientes con cáncer de mama metastásico (MBC) pueden indicar aquellos pacientes elegibles para terapias anti-ras y/o anti-HER-2/neu, terapias convencionales u objetivo.

[0091] La Tabla 9 muestra los niveles de ras p21 totales encontrados por el inmunoensayo (como se describe bajo Materiales y Métodos) de muestras de suero únicas de pacientes con cáncer de mama en etapa I o etapa II. Los pacientes con cáncer de mama individuales muestran altos niveles de ras p21 totales comparado con niveles normal en el rango 100-200 pg/ml. Varios pacientes muestran niveles ras p21 extremadamente altos en el rango 2600-2800 pg/ml (ver, por ejemplo, muestras #1323, #1357 y #1432).

Tabla 9

Muestras Suero de Pacientes con Cáncer Mama Etapa I/II Punto Único (niveles Ras p21)			
Etapa I Sueros de Cáncer de Mama		Etapa II Sueros de Cáncer de Mama	
Muestra	Ras p21 (pg/mL)	Muestra	Ras p21 (pg/mL)
1318	312.9	1406	99.6
1320	471.8	1407	113.3
1321	2642.0	1408	171.0
1322	53.0	1409	82.6
1323	2646.0	1410	76.2
1324	2648.0	1411	140.2
1325	45.2	1412	53.5
1326	60.0	1413	83.6
1327	45.2	1414	207.6
1328	324.6	1415	76.7
1330	2660.0	1416	291.3
1332	66.9	1417	0.0
1333	74.5	1418	50.5
1334	106.8	1419	114.7
1335	89.6	1420	2840.0
1336	2672.0	1421	2842.0
1337	2674.0	1422	59.2

Muestras Suero de Pacientes con Cáncer Mama Etapa I/II Punto Único (niveles Ras p21)			
Etapa I Sueros de Cáncer de Mama		Etapa II Sueros de Cáncer de Mama	
Muestra	Ras p21 (pg/mL)	Muestra	Ras p21 (pg/mL)
1338	90.4	1423	59.0
1339	56.3	1424	106.3
1340	97.7	1425	110.4
1341	66.9	1426	51.0
1342	54.2	1427	51.0
1343	50.3	1428	2856.0
1344	65.1	1429	138.5
1345	295.9	1430	52.9
1346	77.2	1431	2862.0
1348	61.5	1432	2864.0
1349	261.6	1433	44.9
1350	40.3	1434	63.0
1351	2702.0	1435	159.4
1352	62.8	1436	111.7
1353	56.8	1437	52.8
1354	2708.0	1438	77.5
1355	50.5	1439	74.5
1356	44.3		
1357	2714.0		
1358	2716.0		
1359	2718.0		
1362	101.6		
1365	232.4		
1366	181.0		
1367	85.1		

Ejemplo 8

Coexpresión de Ras y TIMP-1 en Suero Humano

[0092] Medir los niveles ras p21 en combinación con otras proteínas asociadas a tumor puede
 5 ayudar en la selección de terapias para cánceres específicos. Por ejemplo, al medir los niveles de ras y proteínas en la dirección 5' de ras, uno puede determinar la terapia más apropiada para una enfermedad neoplásica asociada con una ruta ras activada.

[0093] Una tal proteína en la dirección 5' es TIMP-1 (inhibidor de tejido de
 metaloproteinasas-1). El TIMP-1 es una proteína multifuncional que se encuentra en la mayoría de
 10 tejidos y fluidos corporales; esta inhibe la actividad proteolítica de metaloproteasas de matriz y evita por lo tanto la invasión de cáncer. Sin embargo, el TIMP-1 también posee otras funciones tal como inhibición de apoptosis, inducción de transformación maligna n y estimulación de crecimiento celular, y activa evidentemente el ras. El TIMP-1 se eleva en la sangre de pacientes con cáncer colorectal, y altos niveles de TIMP-1 predicen pobre pronóstico [38]. Monitorear los niveles de ras y TIMP-1
 15 proporcionaría información valiosa para la selección de terapia de un paciente con cáncer, respuesta o carencia de respuesta a la terapia, así como también determinar si ocurre la progresión del tumor.

[0094] Las muestras seriales de ras p21 y TIMP-1 en pacientes con cáncer colorectal pueden ser útiles para rededir o monitorear la respuesta a terapias objetivo (a ras y/o TIMP-1). Puede existir una utilidad en medir ras y TIMP-1 para predecir la respuesta a terapias anti-cáncer tradicionales.

20 [0095] Se pueden utilizar niveles ras p21 y TIMP-1 elevados de pretratamiento para seleccionar pacientes para tratamiento por medio de fármacos para inhibir las proteínas ras y/o TIMP-1, o para predecir la respuesta del paciente al tratamiento con tales fármacos. Tal tratamiento incluye fármacos que inhiben varios componentes de la ruta de oncogen ras, tal como, la quinasa raf, y se

aplicaría a los fármacos inhibidores de quinasa raf o a inhibidores farnesiltransferasa (FTI). Tal tratamiento también incluye terapias convencionales utilizadas contra tumores que conducen ras, o por medio de fármacos que inhiben la función TIMP-1.

Niveles de Ras y TIMP-1 en Muestras Seriales Normales

- 5 [0096] Se evalúan muestras de suero seriales de quince controles humanos normales (trece hombres, dos mujeres) mediante ELISA para ras niveles de p21 total y TIMP-1 como se describió anteriormente bajo Materiales y Métodos (mostrado en la Tabla 10). En general, las muestras se retiran por lo menos tres semanas aparte. En el suero normal, los niveles de ras p21 totales varían entre 50.6 pg/ml y 560 pg/ml; los niveles normales de TIMP-1 varían entre 167.8 ng/ml y 614.4
- 10 ng/ml.

Tabla 10

Muestras de suero normal serial evaluadas para niveles ras p21 y TIMP-1					
Muestras Normales Seriales					
	Ras p21 (pg/mL)	TIMP-1 (ng/mL)		Ras p21	TIMP-1
Muestra			Muestra	(pg/mL)	(ng/mL)
3651-1	159.0	342.9	3659-1	82.7	218.7
3651-2	221.1	368.5	3659-2	109.2	167.8
3651-3	141.3	214.4	3659-3	99.7	247.4
3652-1	50.6	330.7	3660-1	96.3	563.5
3652-2	56.0	395.0	3660-2	146.3	532.1
3652-3	58.8	279.8	3660-3	115.0	614.4
3653-1	246.7	201.4	3661-1	172.0	481.5
3653-2	560.0	192.9	3661-2	179.1	349.5
3653-3	244.4	269.0	3661-3	149.5	309.7
3654-1	113.9	354.7	3662-1	130.6	258.5
3654-2	127.9	324.1	3662-2	116.7	446.4
3654-3	170.2	399.2	3662-3	154.3	261.8
3654-4	126.7	471.9			
3655-1	101.0	465.0	3663-1	75.5	219.6
3655-2	99.6	445.9	3663-2	167.4	195.7
3655-3	132.3	430.8	3663-3	124.2	343.2
3656-1	150.3	368.6	3664-1	67.6	270.3
3656-2	109.4	398.3	3664-2	69.7	279.3
3656-3	109.7	336.2	3664-3	40.2	239.4

Muestras de suero normal serial evaluadas para niveles ras p21 y TIMP-1					
Muestras Normales Seriales					
	Ras p21 (pg/mL)	TIMP-1 (ng/mL)		Ras p21	TIMP-1
Muestra			Muestra	(pg/mL)	(ng/mL)
			3664-4	105.5	326.3
3657-1	153.8	351.5			
3657-2	122.3	375.3	3665-1	86.4	318.8
3657-3	100.7	238.4	3665-2	121.4	357.0
			3665-3	86.1	411.1
3658-1	75.8	282.3	3665-4		369.5
3658-2	74.0	390.5			
3658-3	70.8	348.0			
3658-4	79.0	346.9			

Niveles Ras p21, TIMP-1 y CEA en Muestras Seriales de Cáncer de Colon

[0097] Como se muestra en la Tabla 11, se evalúa el suero retirado serialmente de siete
 5 pacientes con cáncer de colon mediante ELISA para niveles de ras p21 total y TIMP-1 como se
 describió anteriormente bajo Materiales y Métodos. El suero de seis de aquellos pacientes también se
 evalúa para CEA.

[0098] En un paciente con cáncer colorectal en etapa IV particular (Tabla 11, paciente
 #3766), el nivel ras incrementado de 59 pg/ml a 125 pg/ml, mientras se incrementa el nivel TIMP-1 de
 263 a 703 ng/ml. El paciente muestra enfermedad progresiva mientras recibe terapia convencional.
 10 Estos datos sugieren que se puede utilizar los niveles ras p21 totales y TIMP-1 en el manejo de tales
 pacientes con cáncer colorectal.

Tabla 11

Muestras de Suero de Cáncer Colorectal Serial Evaluadas para niveles ras p21 y TIMP-1						
Muestra	Ras p21 (pg/mL)	CEA (ng/mL)	TIMP-1 (ng/mL)	Etapas	Grado	Estado
3766-2	59.4		263.2	IV	3	Prog
3766-3	43.7		258.6	IV	3	Prog
3766-4	52.8		323.3	IV	3	Prog
3766-5	69.3		439.1	IV	3	Prog
3766-6	124.8		702.7	IV	3	Prog
3767-1	39.1	9.1	383.4	II	1	Prog
3767-2	46.5	6.5	415.3	II	1	Prog
3767-3	51.2	8.7	423.6	II	1	Prog
3767-4	38.5	6.4	438.2	II	1	Prog
3767-5	142.1	1.8	430.1	II	1	Prog
3767-6	95.6	1.8	534.5	II	1	Prog
3768-1	50.1	3.8	390.2	III	2	Stab
3768-2	76.8	4.5	311.8	III	2	Stab

Muestras de Suero de Cáncer Colorectal Serial Evaluadas para niveles ras p21 y TIMP-1						
Muestra	Ras p21 (pg/mL)	CEA (ng/mL)	TIMP-1 (ng/mL)	Etapas	Grado	Estado
3768-3	53.4	2.9	409.5	III	2	Stab
3768-4	62.7	2.5	262.7	III	2	Stab
3768-5	63.3	2.7	302.1	III	2	Stab
3768-6	103.3	2.8	290.0	III	2	Stab
3769-1	133.3		212.7	III	1	Stab
3769-2	100.1	< 0.7	197.6	III	1	Stab
3769-3	83.4	< 0.7	219.6	III	1	Stab
3769-4	81.6	0.8	181.5	III	1	Stab
3769-5	75.4		181.8	III	1	Stab
3769-6	87.1	< 0.7	188.6	III	1	Stab
3770-1	81.6	6.8	488.4	III	3	Prog
3770-2	97.5	7.4	527.7	III	3	Prog
3770-3	92.7	7.5	609.9	III	3	Prog
3770-4	61.5	9.2	724.9	III	3	Prog
3770-5	93.1	10.0	1210.8	III	3	Prog
3770-6	117.0	10.0	959.9	III	3	Prog
3771-1	43.5	26.7	208.7	III	3	Prog
3771-2	70.8	50.1	282.2	III	3	Prog
3771-3	50.9	81.0	261.5	III	3	Prog
3771-4	44.5	171.6	322.6	III	3	Prog
3771-5	41.3	368.7	415.3	III	3	Prog
3771-6	94.7	699.6	468.8	III	3	Prog
3772-1	74.0	1.8	265.8	III	2	Prog
3772-2	50.8	5.8	323.5	III	2	Prog
3772-3	154.8	7.1	471.1	III	2	Prog
3772-4	50.2		460.5	III	2	Prog
3772-5	83.4		491.5	III	2	Prog
3772-6	158.0	20.0	490.2	III	2	Prog

Depósito de Estirpes Celulares de Hibridoma

- [0099] Depósitos ATCC. El material listado adelante se deposita con the American Type Culture Collection (ATCC) ahora en 10801 University Boulevard, Manassas, Va., 20110-2209 (USA).
- 5 Se hacen depósitos bajo las consideraciones del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional de Microorganismos Depositados para los Propósitos de Procedimiento de Patente y Regulaciones bajo esto (Tratado de Budapest). El mantenimiento de un cultivo viable se asegura durante treinta años desde la fecha de depósito. Se harán hibridomas y plásmidos disponibles por el ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y el objeto para un acuerdo entre los Solicitantes y
- 10 el ATCC que asegura disponibilidad no restringida de los hibridomas depositados y su progenia para el público luego de la presentación de una Patente Estadounidense pertinente.

[0100] El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en el depósito debe morir o se pierde o se destruye cuando se cultiva bajo condiciones adecuadas, reemplace el material(s) prontamente luego de notificación con otro de los mismos.

	i. <u>Hibridoma</u>	<u>Fecha de Depósito</u>	<u>#ATCC</u>
5	ii. Ras 10	Mayo 12, 1987	HB 9426
	iii. Ras 17	Mayo 29, 1989	HB 10054

[0101] Se ha presentado la descripción de las anteriores realizaciones de la invención para propósitos de ilustración y descripción. No está destinada a ser exhaustivo o a limitar la invención con la forma precisa descrita, y obviamente son posibles muchas modificaciones y variaciones en claridad de las enseñanzas anteriores. Las realizaciones se seleccionan y describen con el fin de explicar los principios de la invención y su aplicación práctica para permitir utilizar la invención en varias realizaciones por otros expertos en la técnica y con varias modificaciones cuando son adecuadas para el uso particular contemplado.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una enfermedad preneoplásica/neoplásica asociada con una ruta ras activada en un sujeto humano que comprende:
 - (a) detectar y cuantificar inmunológicamente el nivel promedio de proteína ras p21 total que comprende ras activado de mutación y normal en muestras de un fluido corporal tomado de individuos de una población de control;
 - (b) detectar inmunológicamente y cuantificar cambios seriales en los niveles de proteína ras p21 totales que comprende ras activado de mutación y normal en muestras equivalentes del fluido corporal tomado del sujeto durante el tiempo; y
 - (c) comparar los niveles de la proteína ras p21 totales en las muestras del sujeto con el nivel promedio de proteína ras p21 total en las muestras de control; en donde un nivel de proteína ras p21 total en las muestras del sujeto que está por encima del nivel promedio de proteína ras p21 total en las muestras de control es indicador de una ruta ras activada y la presencia de enfermedad preneoplásica/neoplásica en el sujeto, y en donde dicha detección inmunológica y cuantificación de las etapas (a) y (b) es mediante una inmunotransferencia en la forma de una inmunotransferencia intercalada utilizando una combinación de el Ras 17 de anticuerpo monoclonal que se secreta desde el hibridoma HB 10054 depositado en the American Type Culture Collection (ATCC), y el Ras 10 de anticuerpo monoclonal que se secreta desde el hibridoma HB 9426 depositado en el ATCC.
2. El método de la reivindicación 1 que es diagnóstico adicional para dicha enfermedad preneoplásica/neoplásica, en donde dichos niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del sujeto que se relacionan con el nivel promedio de ras p21 total en las muestras de control, son indicadores de un mejor diagnóstico o diagnóstico más pobre para dicho sujeto.
3. El método de la reivindicación 1 para uso en selección de terapia para un paciente humano con una enfermedad preneoplásica/neoplásica que comprende adicionalmente:
 - (d) decidir si se utiliza terapia de cáncer convencional y/o terapia de cáncer dirigida a ras para tratar el paciente con base en las diferencias entre los niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del paciente y el nivel promedio de proteína ras p21 total en las muestras de control, y en vista de los cambios seriales entre los niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del paciente.
4. El método de la reivindicación 3, en donde si un nivel de proteína ras p21 total en una muestra del paciente se encuentra que está por encima del nivel promedio de proteína ras p21 total en las muestras de control, y si los cambios seriales en los niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del paciente reflejan que los niveles tienen tendencia a estar por encima del nivel promedio de proteína ras p21 total en las muestras de control, que concluyen que el paciente tiene una enfermedad preneoplásica/neoplásica controlada por oncogen ras, y decide utilizar una terapia dirigida a ras para tratar el paciente.
5. El método de la reivindicación 3 que es diagnóstico adicional para dicha enfermedad preneoplásica/neoplásica, en donde dichos niveles de la proteína ras p21 total en las muestras del sujeto que se relacionan con el nivel promedio de ras p21 total en las muestras de control son indicadores de un mejor diagnóstico o diagnóstico más pobre

para dicho sujeto, y en donde dicha decisión en la etapa (d) se basa en dicho diagnóstico.

- 5 6. El método de la reivindicación 3, en donde dicha terapia dirigida a ras se selecciona del grupo que consiste de inhibidores farnesiltransferasa (FTI), inhibidores tirosina quinasa, ureas bis-arilo, e inhibidores anticodificantes de ras.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dicha terapia dirigida a ras es la sorafenib bis aril-urea (BAY 43-9006).
8. El método de la reivindicación 1, en donde dichos individuos de la población de control de la etapa (a) son del mismo género como el sujeto.
- 10 9. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal detector Ras 10 se biotinila.
10. El método de la reivindicación 3, en donde las muestras de fluido corporal son de un paciente con cáncer quien no ha respondido al tratamiento.
- 15 11. Un método para monitorear el estado de una enfermedad preneoplásica/neoplásica en un paciente, y/o monitorear a un paciente con una enfermedad preneoplásica/neoplásica responde a una terapia, que comprende detectar y cuantificar inmunológicamente cambios seriales en los niveles de proteína ras p21 totales que comprende ras activado de mutación y normal en muestras de un fluido corporal tomado de dicho paciente durante el tiempo;
- 20 en donde los niveles incrementados de proteína ras p21 total durante el tiempo indican progresión de la enfermedad una respuesta negativa a dicha terapia, y en donde los niveles reducidos de la proteína ras p21 total indican remisión de enfermedad o una respuesta positiva a dicha terapia,
- 25 en donde dicha detección inmunológica y cuantificación de las etapas es mediante una inmunotransferencia en la forma de una inmunotransferencia intercalada utilizando una combinación del Ras 17 de anticuerpo monoclonal que se secreta desde el hibridoma HB 10054 depositado en the American Type Culture Collection (ATCC), y el Ras 10 de anticuerpo monoclonal que se secreta desde el hibridoma HB 9426 depositado en el ATCC.
- 30 12. El método de la reivindicación 11, en donde dicha terapia es una terapia dirigida a ras.
13. El método de la reivindicación 11 que es diagnóstico adicional para dicha enfermedad preneoplásica/neoplásica, en donde dichos niveles de proteína ras p21 totales en las muestras del sujeto son indicadores de un mejor diagnóstico o diagnóstico más pobre para dicho sujeto.
- 35 14. El método de las reivindicaciones 2, 5 y 13, en donde dicho diagnóstico es un resultado clínico seleccionado del grupo que consiste de velocidad de respuesta (RR), beneficio de respuesta clínica completa (CR), beneficio de respuesta clínica parcial (PR), beneficio de enfermedad clínica estable (SO), progresión en el tiempo (TTP), y muerte con el tiempo (TTO).
- 40 15. El método de las reivindicaciones 2, 3 y 11, en donde dichas muestras tomadas de dicho sujeto o de dicho paciente son muestras de pretratamiento.
16. El método de las reivindicaciones 1, 3 y 11, que comprende adicionalmente el uso de una inmunotransferencia para detectar o detectar y los niveles cuantificados de una o más de otras proteínas en las muestras del paciente.

17. El método de la reivindicación 16, en donde dicha otra proteína es o dichas otras proteínas se seleccionan del grupo que consiste de inhibidores, oncoproteínas, receptores del factor de crecimiento, factores angiogénicos, proteínas de metástasis, marcadores de tumor, y supresores de tumor.
- 5 18. El método de la reivindicación 17, en donde dicho inhibidor es inhibidor de tejido de metaloproteinas-1 (TIMP-1), dicha oncoproteína es HER-2/neu, dichos receptores del factor de crecimiento se seleccionan del grupo que consiste de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta (POGFR), dicho factor angiogénico es factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), dicha proteína de metástasis es activador de plasminógeno del tipo uroquinasa (uPA), dicho marcador de tumor es antígeno carcinoembriónico (CEA), y dicho supresor de tumor es p53.
- 10 19. El método de la reivindicación 11, en donde las muestras de fluido corporal son de un paciente con cáncer quien no ha respondido al tratamiento.
- 15 20. El método de la reivindicación 19, en donde los niveles incrementados de ras p21 total y/o HER-2/neu son indicadores de una mayor probabilidad de recurrencia temprana o metástasis.
- 20 21. El método de las reivindicaciones 1, 3 y 11, en donde dicho fluido corporal se selecciona del grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, saliva, semen, exudado de mama, fluido cerebroespinal, lágrimas, esputo, mocos, plasma, citosoles, ascitis, efusiones pleurales, fluido amniótico, lavados de vejiga y lavados bronquioalveolares.
- 25 22. El método de las reivindicaciones 1, 3 y 11, en donde dicho fluido corporal es suero o plasma.
- 30 23. El método de las reivindicaciones 1, 3 y 11, en donde dicha enfermedad preneoplásica/neoplásica asociada con una ruta ras activada se selecciona del grupo que consiste de cáncer colorectal, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de células macrocíticas, cáncer de pulmón de célula pequeña, leucemia mielogenosa aguda, cáncer tiroide, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular y malignidad hematológica.

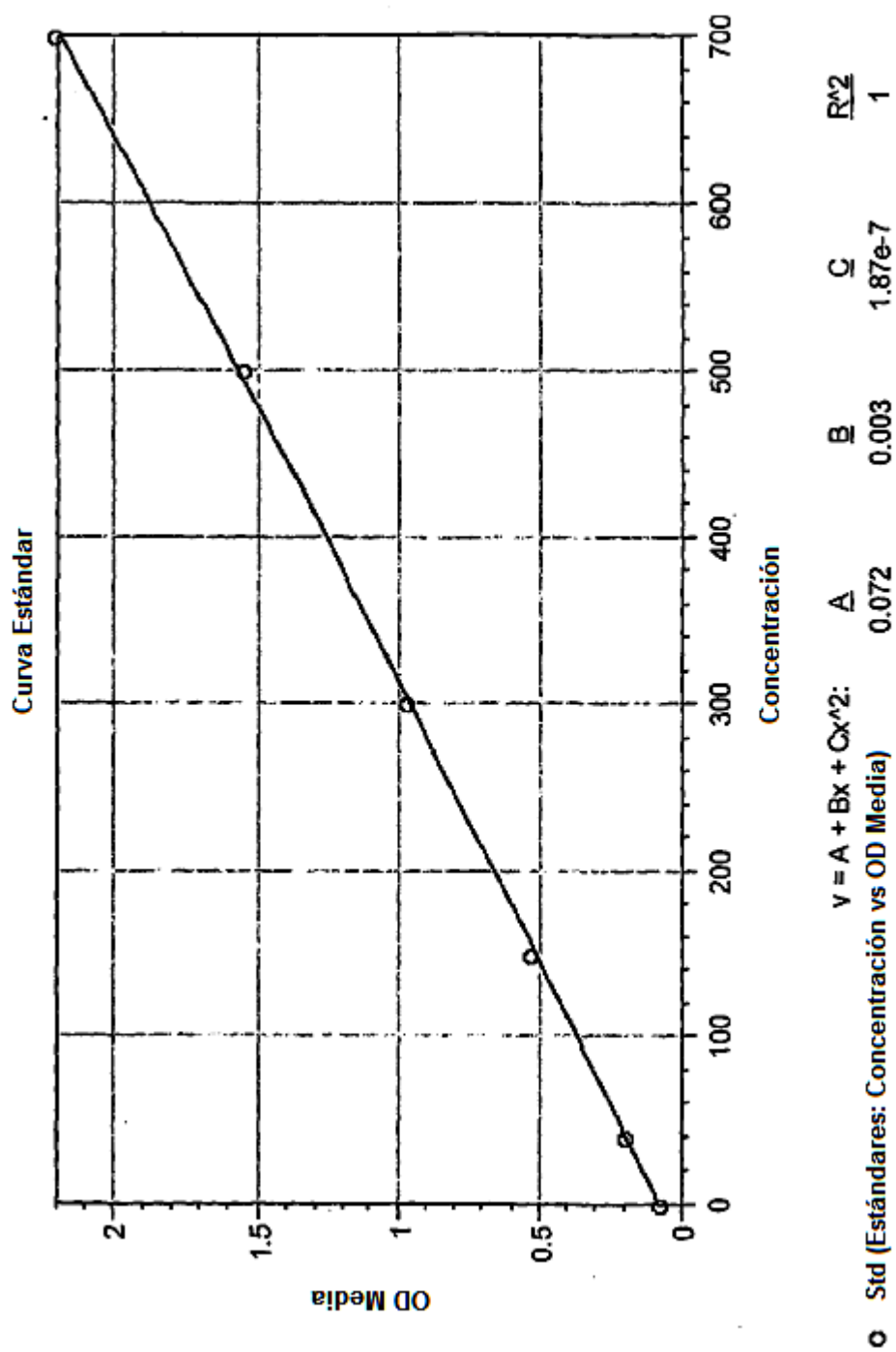


Figura 1