



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 354 181**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **07757161 .0**

⑨6 Fecha de presentación : **16.02.2007**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1984735**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2008**

⑤4 Título: **Reactivos y métodos para el pronóstico y estadificación patológica del cáncer.**

③0 Prioridad: **16.02.2006 US 774563 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.03.2011

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.03.2011

⑦3 Titular/es: **VENTANA MEDICAL SYSTEMS, Inc.**
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US

⑦2 Inventor/es: **Pestano, Gary, Anthony y**
Samadzadeh, Linda, Kay

⑦4 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

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).

REACTIVOS Y MÉTODOS PARA EL PRONÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN PATOLÓGICA DEL CÁNCER

5 DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a métodos para evaluar la progresión del cáncer colorrectal en un individuo. Más en particular, la invención proporciona dichos métodos para determinar o diagnosticar la progresión o la estadificación patológica de un cáncer con el fin de adaptar de manera más precisa la terapia a un individuo. La invención se refiere también a métodos para monitorizar y analizar muestras biológicas con el fin de cuantificar la expresión y activación de dos o más biomarcadores de la vía del EGFR, incluyendo EGFR, PTEN, pHER1, pAKT, pERK, pMEK y Ki67.

Un objetivo esencial de la terapia del cáncer es eliminar o inhibir selectivamente el crecimiento incontrolado de células malignas sin que se vean afectadas negativamente las células normales. Los medicamentos quimioterapéuticos tradicionales son agentes altamente citotóxicos que preferentemente tienen una mayor afinidad por las células malignas que por las células normales, o que afectan al menos preferentemente a las células malignas en base a su alta velocidad de crecimiento celular y actividad metabólica. Sin embargo, estos agentes no han llegado a ser “balas mágicas” y a menudo dañan tanto las células normales como las cancerosas; paradójicamente, ciertos cánceres desarrollan resistencia a tales agentes quimioterapéuticos, que no desarrollan las células normales. Las terapias de tratamiento del cáncer que pueden dirigirse a las células malignas y salvar las células normales, denominadas terapias “diana”, representan una nueva clase de productos quimioterapéuticos contra el cáncer. Dichas nuevas propuestas son particularmente relevantes para tratar cánceres tumorales sólidos, que siguen siendo condiciones crónicas que necesitan tratamientos adaptables y con capacidad de respuesta con menos efectos secundarios, y es necesario investigar su desarrollo.

En general, las terapias dirigidas contra el cáncer intentan bloquear el crecimiento y la propagación de las células cancerosas obstaculizando las moléculas o vías intracelulares que son específicas de la carcinogénesis,

salvando por tanto las células no cancerosas. Estos agentes trabajan en oposición a los agentes quimioterapéuticos o quimiopreventivos tradicionales, que se utilizan para poner freno al crecimiento, producir diferenciación terminal y muerte celular de las células cancerosas o precancerosas, pero que también
5 pueden interrumpir el desarrollo de las células normales. Sin embargo, ha resultado difícil desarrollar fuertes biomarcadores candidatos a diagnóstico para terapias dirigidas, debido en parte a la diversidad de ligandos y receptores expresados por células tanto normales como cancerosas y a las consecuencias variables resultantes procedentes de la señalización de los receptores.

10 Han surgido varias vías de señalización como dianas importantes para entender y tratar la oncogénesis; éstas incluyen las vías de transducción de señales del factor de crecimiento. Las vías del factor de crecimiento regulan el crecimiento celular y el metabolismo en respuesta a indicios intracelulares y ambientales. Con frecuencia, estas vías de señalización se alteran o desregulan
15 en el cáncer, resultando en un fenotipo de crecimiento incontrolado e invasión del tejido circundante.

Un determinante clave del crecimiento celular y un objetivo de la investigación activa en el diagnóstico y tratamiento del cáncer es el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR). El EGF es un factor de
20 crecimiento que activa la actividad del receptor de la proteína tirosina-quinasa (RTK) para iniciar una cascada de transducción de señales que resulta en cambios en el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular. El EGF y sus dianas aguas abajo (ilustradas en la Figura 1), incluidas ras/raf, mek y erk, son conocidas por estar implicadas en la patogénesis y progresión de distintos
25 cánceres. Esta vía y sus moléculas de señalización proporcionan dianas atractivas para la intervención terapéutica y tales propuestas están en desarrollo (Stadler, 2005, *Cancer*, 104: 2323-33; Normanno, y col., 2006, *Gene*, 366:2-16).

Los agentes que se dirigen al EGF y su receptor incluyen bevacizumab, PTK787, SU011248 y BAY 43-9006. Se ha demostrado que el BAY 43-9006
30 inhibe también las dianas aguas abajo en la vía del EGF, incluidas raf, mek y erk (Stadler, 2005, *Cancer. Id.*). Este sistema receptor ha sido implicado también en el desarrollo y la progresión de diversos tumores sólidos humanos, incluyendo el de pulmón, pecho, próstata, colon, ovario, cabeza y cuello. HER1/EGFR es un miembro de una familia de cuatro receptores {EGFR (también denominado
35 HER1 o ErbB1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4)}. Los receptores residen en la membrana plasmática celular y se componen de un

dominio externo de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio interno tirosina-quinasa. La unión del ligando desencadena la dimerización y autofosforilación del receptor del dominio receptor interno. Ello inicia una cascada de reacciones celulares que influyen en la división celular y en
5 numerosos otros aspectos del crecimiento celular. La actividad creciente en el receptor EGF, causada por una mayor concentración de ligando, un aumento del números de receptores o por la mutación del receptor, puede conducir a un aumento de la proliferación celular. Existe ahora evidencias notables para demostrar que el sistema de HER1/EGFR puede ser mediador en el
10 establecimiento y la progresión de diversos tumores sólidos.

Aunque los estudios han examinado el papel de la vía EGF en el control y el tratamiento del cáncer, se conoce poco sobre los cambios en esta vía durante la progresión y metástasis tumoral. Alteraciones sutiles en los efectores aguas abajo en la vía EGFR pueden proporcionar dianas únicas y adaptables para una
15 intervención terapéutica basada, entre otros, en el tipo de tumor, estadio y composición individual. Dicha variación podría tener un impacto significativo en el diagnóstico y el tratamiento tumoral.

En este contexto, Kanavaros y col. (Kanavaros, P. y col., Expression of p53, p21/waf, bcl-2, bax, Rb and Ki67 proteins in colorectal carcinomas, Medical
20 Oncology 16(1), abril 1999, pp. 23-30) describen la inmunoexpresión de las proteínas p53, p21, bcl-2, bax, Rb y Ki67 en adenocarcinomas colorrectales y ponen en correlación los modelos de expresión con el estadio y la clase de tumor. Además, Kopp y col. (Kopp, R. y col., Clinical implications of the EGF receptor / ligand system for tumor progression and survival in gastrointestinal
25 carcinomas: evidence for new therapeutic options, Recent Results in Cancer Research 162, 2003, pp. 115-132) describen la determinación cuantitativa de los receptores EGF en carcinomas colorrectales en comparación con la mucosa adyacente normal. Además, Hayashi y col. (Hayashi, Y. y col., Expression of EGF, EGF-receptor, p3, v-erb B and ras p21 in colorectal neoplasms by
30 immunostaining paraffin-embedded tissues, Pathology International 44(2), 1994, pp. 124-130) describen el significado de la expresión o sobreexpresión de EGF, receptor EGF, v-erb B, ras y p21 en casos de adenoma tubular y adenocarcinoma. También, Kato y col. (Kato, S. y col., An immunohistologic study on Ki67, p53, p21 and CEA expression in colorectal carcinogenesis,
35 Annals of Cancer Research and Therapy 11(1-2), 2003, pp. 109-120) describen la expresión de Ki67, p53, p21 y CEA en mucosa colónica normal, adenomas, adenocarcinomas, cánceres y cánceres avanzados, respectivamente.

Finalmente, Tuynman y col. (Tuynman, J. y col., Detection of kinase activity profiles of colon cancer predicts stage of disease and identifies potential macromolecular targets for therapy, Proceedings of the American Association for Cancer Research 46, April 2005, p. 292) describen un microensayo de proteínas
5 para la detección de la actividad quinasa en pacientes sanos y con carcinoma de colon.

Se han desarrollado regímenes terapéuticos tradicionales para el cáncer basados en los resultados derivados de ensayos a gran escala y dependen de los resultados predictivos para una amplia variedad de pacientes y tumores. La
10 capacidad para adaptar la terapia al paciente, al tumor y al estadio patológico particular (mostrada en la Figura 2) puede proporcionar tratamientos más eficaces contra los tumores con menos efectos secundarios. Además, la capacidad para monitorizar la progresión del tratamiento del cáncer y ajustar la terapia en consecuencia podría implicar una reacción más rápida a las
15 diferencias particulares en respuesta a regímenes terapéuticos que se han desarrollado anteriormente utilizando datos procedentes de un amplio grupo de pacientes.

Existe la necesidad en la técnica de desarrollar biomarcadores de diagnóstico para permitir la exploración y detección rápida de cambios en
20 diversas moléculas de señalización intracelular antes y durante el tratamiento del cáncer, con el fin de diagnosticar rápidamente el estadio del cáncer y monitorizar los efectos del tratamiento dirigido contra la vía EGFR. También existe la necesidad de mejores métodos de identificación de los inhibidores dirigidos a la vía EGFR.

La invención proporciona métodos para evaluar la progresión de un tumor en un individuo con cáncer, caracterizados en particular porque dichos métodos se utilizan para establecer el estadio del tumor y para evaluar la eficacia de las terapias anticancerosas. Se puede utilizar la invención para proporcionar al paciente métodos de tratamiento contra el cáncer individualizados, así como las
30 respuestas al tratamiento, donde se administra un tratamiento particular a un paciente particular en base al tipo y el estadio del tumor establecidos por medio de los métodos de la invención, manteniéndose o cambiándose el tratamiento en base a la respuesta particular del paciente a dicho tratamiento. En un primer aspecto, la invención proporciona métodos para valorar la progresión del tumor,
35 en particular la progresión del cáncer colorrectal, en un individuo. En este aspecto, se analiza un tejido o una muestra que contiene células tumorales

procedente del paciente para detectar un modelo de expresión, de fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación, de dos o más marcadores biológicos. En particular, dichos marcadores biológicos son miembros de la vía metabólica del EGF, incluyendo EGFR, PTEN, pAKT, pMEK, pHER1, pERK o Ki67. En estas realizaciones, se evalúa la progresión del tumor, siendo los modelos de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de dos marcadores biológicos, o en particular de una pluralidad de los mismos, sustancialmente similares al modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de los dos marcadores biológicos, o en particular de una pluralidad de los mismos, procedentes de una muestra de células o de tejido con un estadio establecido de progresión de dicho tumor.

En realizaciones alternativas, la invención proporciona métodos para evaluar la progresión del tumor, particularmente la progresión del cáncer colorrectal, en un individuo. Al respecto, se analiza un tejido o una muestra que contiene células tumorales procedente del paciente para detectar un modelo de expresión, de fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de dos o más marcadores biológicos. En particular, dichos marcadores biológicos son miembros de la vía metabólica de EGF, incluyendo EGFR, PTEN, pAKT, pMEK, pHER1, pERK o Ki67. En estas realizaciones, se evalúa la progresión del tumor, donde el modelo de expresión, de fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de uno de estos marcadores biológicos, o en particular de una pluralidad de los mismos, difiere del modelo de expresión, de fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación del marcador biológico, o en particular de una pluralidad de estos marcadores biológicos, procedentes de una muestra de células o de tejido no tumoral que comprende células normales pero no tumorales.

Las utilizaciones preferentes de los métodos de la invención consisten en evaluar el estadio clínico del carcinoma colorrectal, donde los marcadores biológicos que comprenden dicho modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación incluyen EGFR, PTEN, pMEK, Ki67 y pHER1. Asimismo, la siguiente etapa que consiste en medir la amplificación genética del ADN genómico que codifica EGFR forma parte del alcance de estos aspectos de la invención. Estos ensayos detectan la disomía equilibrada en el ADN genómico que codifica EGFR.

A este respecto, preferentemente la muestra de tejido es un adenoma pequeño o un pólipo adenomatoso. En particular, en estas realizaciones, la

invención proporciona un modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación en el que la expresión, la fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación del EGFR está incrementada; la expresión, la fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación del PTEN está incrementada; la expresión, la fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación de pMEK se reduce en los niveles de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de estos marcadores biológicos en una muestra de células o de tejido no tumoral.

En otras realizaciones, el tumor es un adenocarcinoma. En particular, en estas realizaciones, la invención proporciona un modelo de expresión, fosforilación o tanto expresión como fosforilación donde la expresión, fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación del PTEN se reduce, y la expresión, fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación de pMEK aumenta en los niveles de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de estos marcadores biológicos en una pequeña muestra de células o de tejido de adenoma. Estas realizaciones pueden incluir en su alcance la siguiente etapa de medida de la amplificación genética del ADN genómico que codifica EGFR. Estos ensayos detectan la disomía equilibrada y la trisomía equilibrada en el ADN genómico que codifica EGFR.

En otras realizaciones, la muestra de tejido procedente del paciente es una muestra tumoral y la invención proporciona un modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación donde la expresión, fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación del PTEN se reduce y la expresión, fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación de pMEK aumenta en los niveles de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de estos marcadores biológicos en una pequeña muestra de células o de tejido de adenoma. Estas realizaciones pueden incluir en su alcance la siguiente etapa de medida de la amplificación genética del ADN genómico que codifica EGFR. Estos ensayos detectan la disomía equilibrada y la polisomía equilibrada en el ADN genómico que codifica EGFR.

En realizaciones preferentes, estos modelos de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de los marcadores biológicos que comprenden los modelos detectados en los métodos de la invención se detectan mediante inmunohistoquímica o hibridación *in situ*. En realizaciones preferentes, dichos métodos comprenden ensayos realizados ventajosamente por medio de análisis de imágenes asistido por ordenador del trozo de tejido después de la

tinción utilizando un reactivo marcador de unión específica, preferentemente un reactivo inmunológico.

En la práctica de los métodos de esta invención, se proporcionan métodos para identificar a un individuo que tiene un tumor, en particular un tumor de cáncer colorrectal, que tenga capacidad de respuesta a uno o a una combinación de agentes quimioterapéuticos particulares. En estas realizaciones, se utilizan los métodos de la invención para detectar un modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de dos o más marcadores biológicos. En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer colorrectal y los marcadores biológicos incluyen EGFR, PTEN, pAKT, pMEK, pHER1, pERK o Ki67. En las realizaciones ventajosas de los métodos de la invención, el modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación identifica el tumor como teniendo capacidad de respuesta a uno o a una combinación de agentes quimioterapéuticos. En realizaciones específicas, los métodos de la invención sirven para identificar muestras tumorales con capacidad de respuesta a los agentes quimioterapéuticos, incluyendo y sin limitarse al mismo el anticuerpo de EGFR o un inhibidor de la quinasa, o tanto un anticuerpo de EGFR como un inhibidor de la quinasa.

La invención se puede utilizar como un kit para poner en práctica los métodos de la invención. Dichos kits pueden comprender al menos dos reactivos, preferentemente agentes de unión específica y en particular reactivos inmunológicos, para detectar la expresión, fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación de marcadores biológicos informativos sobre la progresión del tumor o sobre la capacidad de respuesta al agente quimioterapéutico o ambos en una muestra tumoral humana. Los al menos dos reactivos pueden ser útiles para detectar la expresión, la fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación de los marcadores biológicos, incluyendo, pero sin limitarse a los mismos, EGFR, pEGFR, PTEN, pAKT, pMEK, pHER1, pERK o Ki67. Además, los al menos dos marcadores biológicos pueden ser PTEN y pMEK. Dichos kits pueden comprender reactivos para detectar la expresión, la fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación de al menos tres marcadores biológicos, que incluyen preferentemente, sin limitarse a los mismos, EGFR, pEGFR, PTEN, pMEK, pERK o Ki67. Los al menos tres marcados biológicos pueden ser EGFR, PTEN y pMEK. Como alternativa, el kit comprende reactivos para detectar la expresión, la fosforilación o tanto la expresión como la fosforilación de EGFR, pEGFR, PTEN, pMEK, pERK o Ki67. Los kits pueden incluir asimismo reactivos para detectar la amplificación genética del ADN genómico que codifica EGFR.

Cada uno de dichos kits comprende además ventajosamente instrucciones de uso de los kits en la puesta en práctica de los métodos de la invención.

Las realizaciones específicas preferentes de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de algunas realizaciones preferentes así como de las reivindicaciones.

Figura 1: diagrama esquemático de la vía EGFR.

Figura 2: diagrama esquemático de la progresión del cáncer colorrectal.

Figura 3: fotomicrografía de una tinción representativa con hematoxilina y eosina (H&E) para la progresión del cáncer colorrectal. La Figura 3A es una tinción representativa con H&E de un adenoma < 2 cm en su dimensión máxima. La Figura 3B es una tinción representativa con H&E de un adenoma > 2 cm en su dimensión máxima. La Figura 3C es una tinción representativa con H&E de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T1 ó T2. La Figura 3D es una tinción representativa con H&E de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T3 ó T4. La Figura 3E es una tinción representativa con H&E de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia los ganglios linfáticos. La Figura 3F es una tinción representativa con H&E de un adenocarcinoma colorrectal metastático hacia puntos más distantes.

Figura 4: representa un mapa de microarrays de tejido con progresión de cáncer colorrectal (TMA; CHTN2003CRCProg) obtenido de la Red Cooperativa de Tejidos Humanos (CHTN).

Figura 5: representa los resultados de una evaluación de tejido por histoquímica; se representa y expresa como porcentaje medio de positivos la expresión ptyr en muestras de tejido colorrectal tal como se ensayó por IHC.

Figura 6: fotomicrografía de los niveles de expresión representativos de EGFR para la progresión del cáncer colorrectal. La Figura 6A es una imagen representativa de la tinción de EGFR de un adenoma < 2 cm en su dimensión máxima (C10); la muestra tiene una puntuación de 3+ con un 100% de tinción positiva de la membrana/citoplasmática. La Figura 6B es una imagen representativa de la

tinción de EGFR de un adenoma > 2 cm en su dimensión máxima (F5); la muestra tiene una puntuación de 3+ con un 100% de tinción positiva de la membrana/citoplasmática. La Figura 6C es una imagen representativa de la tinción de EGFR de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T1 ó T2 (E4); la muestra tiene una puntuación de 3+ con un 100% de tinción positiva de la membrana/citoplasmática. La Figura 6D es una imagen representativa de la tinción de EGFR de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T3 ó T4 (H10); la muestra tiene una puntuación de 3+ con un 90% de tinción positiva de la membrana/citoplasmática. La Figura 6E es una imagen representativa de la tinción de EGFR de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia los ganglios linfáticos (J20); la muestra tiene una puntuación de 2+ con un 85% de tinción positiva de la membrana / citoplasmática. La Figura 6F es una imagen representativa de la tinción de EGFR de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia puntos distantes (B13); la muestra tiene una puntuación de 1+ con un 1% de tinción positiva de la membrana/citoplasmática.

Figura 7: fotomicrografía de los niveles de expresión de un PTEN representativo para la progresión del cáncer colorrectal. La Figura 7A es una imagen representativa de la tinción de PTEN de un adenoma < 2 cm en su dimensión máxima (C4); la muestra tiene una puntuación de 3+ con un 80% de tinción citoplásmica positiva. La Figura 7B es una imagen representativa de la tinción de PTEN de un adenoma > 2 cm en su dimensión máxima (F3); la muestra tiene una puntuación de 1+ con un 75% de tinción citoplásmica positiva. La Figura 7C es una imagen representativa de la tinción de PTEN de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T1 ó T2 (E2); la muestra tiene una puntuación de 2+ con un 80% de tinción citoplásmica positiva. La Figura 7D es una imagen representativa de la tinción de PTEN de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T3 o T4 (H4); la muestra tiene una puntuación de 1+ con un 40% de tinción citoplásmica positiva. La Figura 7E es una imagen representativa de la tinción de PTEN de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia los ganglios linfáticos (J18); la muestra fue

negativa. La Figura 7F es una imagen representativa de la tinción de PTEN de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia puntos distantes (B7); la muestra fue negativa.

- Figura 8:** fotomicrografía de los niveles de expresión de un pMEK representativo para la progresión del cáncer colorrectal. La Figura 8A es una imagen representativa de la tinción de pMEK de un adenoma < 2 cm en su dimensión máxima (C4); la muestra tiene una puntuación de 1+ con un 10% de tinción citoplásmica positiva. La Figura 8B es una imagen representativa de la tinción de pMEK de un adenoma > 2 cm en su dimensión máxima (F3); la muestra tiene una puntuación de 1+ con un 70% de tinción citoplásmica positiva. La Figura 8C es una imagen representativa de la tinción de pMEK de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T1 ó T2 (E2); la muestra tiene una puntuación de 1+ con un 80% de tinción citoplásmica positiva y de 1+ con un 10% de tinción nuclear positiva. La Figura 8D es una imagen representativa de la tinción de pMEK de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T3 o T4 (H4); la muestra tiene una puntuación de 2+ con un 100% de tinción citoplásmica positiva y de 2+ con un 5% de tinción nuclear positiva. La Figura 8E es una imagen representativa de la tinción de pMEK de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia los ganglios linfáticos (J18); la muestra tiene una puntuación de 3+ con un 100% de tinción citoplásmica positiva. La Figura 8F es una imagen representativa de la tinción de pMEK de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia puntos distantes (B7); la muestra tiene una puntuación de 2+ con un 100% de tinción citoplásmica positiva y de 3+ con un 15% de tinción nuclear positiva.
- Figura 9:** fotomicrografía de los niveles de expresión de un Ki67 representativo para la progresión del cáncer colorrectal. La Figura 9A es una imagen representativa de la tinción de Ki67 de un adenoma < 2 cm en su dimensión máxima (C4); la muestra tiene una puntuación de 2+ con un 10% de tinción nuclear positiva. La Figura 9B es una imagen representativa de la tinción de Ki67 de un adenoma > 2 cm en su dimensión máxima (F3); la muestra tiene una puntuación de 2+ con un 25% de tinción nuclear positiva. La

Figura 9C es una imagen representativa de la tinción de Ki67 de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T1 ó T2 (E2); la muestra tiene una puntuación de 2+ con un 85% de tinción nuclear positiva. La Figura 9D es una imagen representativa de la tinción de Ki67 de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T3 o T4 (H4); la muestra tiene una puntuación de 2+ con un 40% de tinción nuclear positiva y de 3+ con un 15% de tinción nuclear positiva. La Figura 9E es una imagen representativa de la tinción de Ki67 de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia los ganglios linfáticos (J10); la muestra tiene una puntuación de 3+ con un 45% de tinción nuclear positiva. La Figura 9F es una imagen representativa de la tinción de Ki67 de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia puntos distantes (B7); la muestra tiene una puntuación de 2+ con un 70% de tinción citoplásmica positiva.

Figura 10: fotomicrografías representativas de los niveles de expresión de biomarcadores de la progresión de cáncer colorrectal procedentes de un único caso individual (hombre, 71 años de edad). La Figura 10A consiste en imágenes representativas de inmunohistoquímica (IHC) de un adenoma < 2 cm en su dimensión máxima; un adenoma > 2 cm en su dimensión máxima, un tumor invasivo primario de estadio patológico T3 o T4; y un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia los ganglios linfáticos. Se utilizaron anticuerpos reactivos a EGFR, pHER1, PTEN, pAKT, pMEK y Ki67. La Figura 10B muestra los resultados de forma gráfica, utilizando tanto los resultados del análisis de imagen asistido por ordenador (A) como puntuación de la patología (B).

Figura 11: resumen de la evaluación del biomarcador en la vía de expresión de EGFR durante la progresión del cáncer colorrectal según se determina mediante análisis de imagen. Se muestran los resultados como cambio en % en la puntuación media.

Figura 12: fotomicrografía de ensayos de hibridación fluorescente *in situ* de doble color que investiga el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, rojo); el cromosoma 7 (CEP7, verde). La Figura 12A muestra la disomía equilibrada; la Figura 12B muestra la

trisomía equilibrada, la Figura 12C muestra la polisomía equilibrada y la Figura 12D muestra la amplificación genética.

Figura 13: fotomicrografía de la detección del gen EGFR por FISH en la progresión del cáncer colorrectal. La Figura 13A es la detección representativa del gen EGFR por FISH de un adenoma < 2 cm en su dimensión máxima, que muestra disomía equilibrada. La Figura 13B es la detección representativa del gen EGFR por FISH de un adenoma > 2 cm en su dimensión máxima que muestra disomía equilibrada. La Figura 13C es la detección representativa del gen EGFR por FISH de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T1 o T2, que muestra disomía equilibrada. La Figura 13D es la detección representativa del gen EGFR por FISH de una muestra de tumor invasivo primario de estadio patológico T3 o T4 que muestra polisomía equilibrada. La Figura 13E es la detección representativa del gen EGFR por FISH de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia los ganglios linfáticos, que muestra polisomía equilibrada. La Figura 13F es la detección representativa del gen EGFR por FISH de un adenocarcinoma colorrectal que es metastático hacia puntos distantes, que muestra disomía en la amplificación genética.

Figura 14: fotomicrografía de los niveles de expresión de EGFR en el cáncer colorrectal. La Figura 14A muestra dos regiones (Región 1 y Región 2) a una pasada de exploración de 20X; y la Figura 14B muestra los resultados para la puntuación combinada de EGFR (ARIOL) para las dos regiones.

Figura 15: fotomicrografía de los niveles de expresión de HER2 en el cáncer colorrectal. La Figura 15A muestra dos regiones (Región 1 y Región 2) a una pasada de exploración de 20X; y la Figura 14B muestra los resultados para la puntuación combinada de HER2 (ARIOL) para las dos regiones.

Figura 16: fotomicrografía de los niveles de expresión de pAKT en el cáncer colorrectal. La Figura 16A muestra dos regiones (Región 1 y Región 2) a una pasada de exploración de 20X; y la Figura 16B muestra los resultados para la puntuación combinada de pAKT (ARIOL) para las dos regiones.

- 5 **Figura 17:** fotomicrografía de los niveles de expresión de Ki67 en el cáncer colorrectal. La Figura 17A muestra dos regiones (Región 1 y Región 2) a una pasada de exploración de 20X; y la Figura 17B muestra los resultados para la puntuación combinada de Ki67 (ARIOL) para las dos regiones.
- 10 **Figura 18:** fotomicrografía de los niveles de expresión de la Survivina en el cáncer colorrectal. La Figura 18A muestra dos regiones (Región 1 y Región 2) a una pasada de exploración de 20X; y la Figura 18B muestra los resultados para la puntuación combinada de Survivina (ARIOL) para las dos regiones.
- 15 **Figura 19:** fotomicrografía de los niveles de expresión de VEGF en el cáncer colorrectal. La Figura 19A muestra dos regiones (Región 1 y Región 2) a una pasada de exploración de 20X; y la Figura 19B muestra los resultados para la puntuación combinada de VEGF (ARIOL) para las dos regiones.
- Figura 20:** diagrama esquemático de hibridación *in situ* con plata.

20 La presente invención proporciona métodos para evaluar la progresión del cáncer colorrectal en un individuo, incluyendo un pacientes con cáncer, que utilizan biomarcadores predictivos para evaluar la progresión del cáncer colorrectal.

25 Contrariamente a los métodos contra el cáncer tradicionales, en los que el tratamiento con medicamentos quimioterapéuticos se emprende como complemento a y después de la intervención quirúrgica, la quimioterapia neoadyuvante (o primaria) consiste en administrar medicamentos como
tratamiento inicial en ciertos pacientes de cáncer. Una ventaja de dicha
30 propuesta consiste en que, para tumores primarios de más de 3 cm, permite la utilización posterior o concomitante de procedimientos quirúrgicos conservadores (en oposición, por ejemplo, a la mastectomía radical en
pacientes con cáncer de mama) para la mayoría de los pacientes, debido al
efecto de reducción del tumor de la quimioterapia. Otra ventaja consiste en que,
para numerosos cánceres, se logra una respuesta parcial y/o completa en
aproximadamente dos terceras partes de los pacientes. Finalmente, debido a
que la mayoría de los pacientes responden después de dos a tres ciclos de

tratamiento quimioterapéutico, es posible monitorizar la eficacia *in vivo* del régimen quimioterapéutico empleado, para identificar a los pacientes cuyos tumores no tienen capacidad de respuesta al tratamiento quimioterapéutico. La identificación precoz de los tumores sin capacidad de respuesta permite a los
5 médicos limitar la exposición de un paciente de cáncer a los efectos secundarios innecesarios del tratamiento y establecer tratamientos alternativos. Desafortunadamente, los métodos que existen en la técnica, incluido el examen histológico, son insuficientes para la aplicación óptima de dicha identificación oportuna y precisa. La presente invención proporciona métodos para desarrollar
10 regímenes terapéuticos mejor fundados y eficaces que se pueden administrar a pacientes de cáncer con una mayor probabilidad de resultado efectivo (es decir, la reducción o eliminación del tumor).

El diagnóstico del cáncer, tanto el diagnóstico inicial de la enfermedad como la monitorización posterior del curso de la enfermedad (antes, durante o
15 después del tratamiento), se confirma convencionalmente mediante el examen histológico de muestras de células o de tejido que se extraen del paciente. Los médicos patólogos necesitan poder determinar con precisión si dichas muestras son benignas o malignas, así como clasificar la agresividad de las muestras tumorales consideradas malignas, debido a que, a menudo, estas
20 determinaciones sientan las bases para seleccionar un programa adecuado de tratamiento del paciente. Similarmente, el patólogo necesita poder detectar el punto hasta el cual ha crecido o ha empezado a remitir un cáncer, en particular como resultado o como consecuencia del tratamiento, especialmente en el tratamiento con agentes quimioterapéuticos o biológicos.

25 Tradicionalmente, el examen histológico conlleva procedimientos de tinción de los tejidos que permiten observar fácilmente las características morfológicas de una muestra bajo un microscopio de luz. Un patólogo, tras examinar la muestra teñida, normalmente realiza una determinación cualitativa de si la muestra tumoral es maligna. Es difícil, sin embargo, averiguar la
30 agresividad de un tumor simplemente a través del examen histológico de la muestra, debido a que la agresividad de un tumor a menudo es resultado de la bioquímica de las células en el interior del tumor, tal como la expresión o la eliminación de proteínas y la fosforilación de proteínas, que puede o no estar reflejada en la morfología de la muestra. Por tanto, es importante poder evaluar
35 la bioquímica de las células dentro de una muestra de un tumor. Además, es deseable poder observar y cuantificar tanto la expresión de proteínas como la fosforilación de proteínas de los genes o las proteínas asociados al tumor, o de

forma más específica los componentes celulares de las vías de señalización asociadas a los tumores.

La terapia contra el cáncer puede basarse en el perfil molecular de los tumores en lugar de simplemente su histología o lugar de la enfermedad. El
5 dilucidar los efectos biológicos de las terapias dirigidas en el tejido tumoral y correlacionar estos efectos con la respuesta clínica ayuda a identificar el crecimiento predominante, así como las vías de supervivencia operativas en los tumores, estableciendo así un modelo de los probables respondedores y, a la inversa, proporcionando una base para diseñar estrategias para superar la
10 resistencia. Por ejemplo, un enfoque de diagnóstico con éxito de un receptor del factor de crecimiento debe determinar si el crecimiento o la supervivencia del tumor está siendo llevado por el receptor dirigido o por la familia del receptor, por otros receptores no dirigidos por la terapia, y si la señalización aguas abajo sugiere que está implicada otra vía oncogénica. Además, cuando está implicada
15 más de una vía de señalización, los miembros de estas vías de señalización se pueden utilizar como dianas de diagnóstico para determinar si una terapia de doble inhibidor es o será eficaz.

Para que la quimioterapia sea eficaz, las medicaciones deben destruir las células tumorales y salvar las células corporales normales, en particular aquellas
20 células normales que pueden ser adyacentes o cercanas al tumor. Esto se puede realizar mediante la utilización, entre otras, de modificaciones que afectan a las actividades celulares que avanzan predominantemente en las células cancerosas pero no en las células normales.

Los sistemas de análisis de imágenes automatizados (asistidos por
25 ordenador) conocidos en la técnica pueden aumentar el examen visual de las muestras tumorales. En una realización representativa, la muestra de célula o de tejido se expone a reactivos marcados de forma detectable específicos de un marcador biológico particular y la imagen ampliada de la célula es procesada entonces por un ordenador, que recibe la imagen de un dispositivo de carga
30 acoplada (CCD) o cámara, tal como una cámara de televisión. Se puede utilizar dicho sistema, por ejemplo, para detectar y medir los niveles de expresión y activación de EGFR, ptyr, PTEN, pAKT, pMEK, pHER1, pERK o Ki67 en una muestra, o cualquier biomarcador de diagnóstico adicional. Por tanto, los métodos de la invención proporcionan un diagnóstico más preciso del cáncer y
35 una mejor caracterización de la expresión genética en células cancerosas identificadas histológicamente, en particular con respecto a la expresión de los

genes marcadores tumorales o los genes conocidos por expresarse en tipos y subtipos de cáncer particulares (por ejemplo con diferentes grados de malignidad). Esta información permite administrar un régimen de terapia mejor fundado y eficaz, ya que los medicamentos con eficacia clínica para ciertos tipos o subtipos de tumores pueden ser administrados a pacientes cuyas células están así identificadas.

Otro inconveniente de las terapias anticáncer convencionales es que la eficacia de los agentes quimioterapéuticos específicos en el tratamiento de un cáncer particular en un paciente humano particular es imprevisible. A la vista de esta imprevisibilidad, la técnica es incapaz de determinar, antes de iniciar la terapia, si uno o más agentes seleccionados serán activos como agentes antitumorales o darán un pronóstico preciso o un programa de tratamiento en un paciente particular. Esto es especialmente importante debido a que un cáncer clínico particular puede representar para el médico una selección de regímenes de tratamiento, sin ninguna manera actual de evaluar qué régimen será el más eficaz para un individuo particular. Resulta una ventaja de los métodos de esta invención el hecho de que sean capaces de evaluar mejor la eficacia esperada de un agente terapéutico propuesto (o de una combinación de agentes) en un paciente particular. Los métodos reivindicados son ventajosos por la razón adicional de que ahorran tiempo y son rentables en la evaluación de la eficacia de los regímenes quimioterapéuticos y son mínimamente traumáticos para los pacientes de cáncer.

Los modelos de expresión y fosforilación de los polipéptidos se detectan y cuantifican por medio de los métodos de la presente invención. De forma más particular, los modelos de expresión y fosforilación de los polipéptidos que son componentes celulares de una vía de señalización asociada al tumor se detectan y cuantifican por medio de los métodos de la presente invención. Por ejemplo, los modelos de expresión y fosforilación de los polipéptidos se pueden detectar por medio de reactivos de biodetección específicos de los polipéptidos, incluyendo, pero sin limitarse a los mismos, los anticuerpos. Como alternativa, los reactivos de biodetección pueden ser sondas de ácido nucleico.

Tal como se utiliza con los métodos de la invención descritos aquí, una sonda de ácido nucleico se define como una colección de uno o más fragmentos de ácido nucleico donde la hibridación de una muestra puede ser detectada. La sonda puede ser no marcada o marcada para que se pueda detectar su unión a la diana o muestra. La sonda se produce a partir de una fuente de ácidos

nucleicos procedentes de una o más partes particulares (preseleccionadas) del genoma, por ejemplo uno o más clones, un cromosoma total o un fragmento de cromosoma aislado o una colección de productos de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La sonda de ácido nucleico puede consistir

5 también en ácidos nucleicos aislados inmovilizados en una superficie sólida (por ejemplo un portaobjetos de nitrocelulosa, vidrio, cuarzo, sílice fundida), tal como en un array. La sonda puede ser un miembro de un array de ácidos nucleicos, tal como se describe, por ejemplo, en la WO 96/17958. Las técnicas capaces de producir arrays de alta densidad se pueden utilizar también con este propósito

10 (véase por ejemplo Fodor, 1991, Science X: 767-773; Johnston, 1998, Curr. Biol. 8: R171-R174; Schummer, 1997, Biotechniques 23: 1087-1092; Kern, 1997, Biotechniques 23: 120-124; Patente de Estados Unidos N° 5.143.854). Un especialista reconocerá que la secuencia precisa de las sondas particulares se puede modificar hasta cierto punto para producir sondas que son

15 “sustancialmente idénticas”, pero que conservan la capacidad de unirse específicamente (es decir, hibridarse específicamente) a las mismas dianas o muestras que la sonda de la que proceden. El término “ácido nucleico” se refiere a un desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de una sola hebra o de doble hebra. El término engloba los ácidos nucleicos, por ejemplo

20 oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de los nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares o mejoradas con los objetivos deseados, como el ácido nucleico de referencia. El término incluye asimismo los ácidos nucleicos que se metabolizan de forma similar a los nucleótidos de origen natural o a velocidades mejoradas con el propósito deseado. El término engloba

25 asimismo las estructuras de tipo ácido nucleico con esqueletos sintéticos. Un especialista en la técnica reconocerá cómo utilizar sondas de ácido nucleico para explorar células cancerosas en una muestra de referencia, por ejemplo, como en la patente de Estados Unidos N° 6.326.148, dirigida a explorar células de carcinoma de colon.

30 Los polipéptidos asociados al cáncer pueden cuantificarse por análisis de imagen utilizando un anticuerpo primario adecuado contra los biomarcadores, incluyendo, pero sin limitarse a los mismos, EGFR, PTEN, pAKT, pMEK, p, pERK o Ki67, detectados directamente o mediante un anticuerpo secundario adecuado (tal como IgG anti-ratón de conejo cuando se utilizan anticuerpos

35 primarios de ratón) y/o un complejo terciario avidina (o Estreptavidina) biotina (“ABC”).

Ejemplos de reactivos útiles en la puesta en práctica de los métodos de la invención tal como se ilustran aquí incluyen reactivos inmunológicos. Se entiende por “reactivo inmunológico” anticuerpos, incluidos en particular los anticuerpos monoclonales y antisueros policlonales. Se pueden producir los anticuerpos mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, incluyendo la síntesis química o técnicas de expresión recombinante, o preferentemente mediante métodos inmunológicos convencionales. Tal como se emplea aquí, el término “anticuerpo” incluye, sin limitarse a, tanto anticuerpos de origen natural como de origen no natural. Tal como se utiliza aquí, el término “anticuerpo” pretende referirse, en términos generales, a cualquier agente de unión inmunológica tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En general, se prefieren IgG y/o IgM debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque son los que más fácilmente se obtienen en un entorno de laboratorio. De forma más específica, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como fragmentos de Fab, Fab', y F(ab')₂. Además, el término “anticuerpo” comprende anticuerpos quiméricos y anticuerpos totalmente sintéticos, incluyendo anticuerpos creados genéticamente y fragmentos de los mismos. Los anticuerpos policlonales y monoclonales se pueden “purificar”, lo que significa que los anticuerpos policlonales y monoclonales están exentos de otros anticuerpos.

Los métodos para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo Sambrook y col., 1989, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y.; y Hurrell (Ed.), MONOCLONAL HYBRIDOMA ANTIBODIES: TECHNIQUE AND APPLICATIONS, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., que se incorporan aquí como referencia). Como será evidente para un especialista en la técnica, los anticuerpos policlonales se pueden generar a partir de diversos animales de sangre caliente, tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas. La inmunogenicidad de un epitopo antigénico puede aumentar mediante la utilización de un adyuvante tal como el de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas superficiales tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes son bien conocidos también en la técnica. Se describe la información sobre

adyuvantes y varios aspectos de los inmunoensayos, por ejemplo, en Tijssen (1987, PRACTICE AND THEORY OF ENZYME IMMUNOASSAYS, 3rd Ed., Elsevier: New York). Otras referencias útiles sobre métodos para preparar anticuerpos policlonales incluyen MICROBIOLOGY (1969, Hoeber Medical Division, Harper and Row); Landsteiner (1962, SPECIFICITY OF SEROLOGICAL REACTIONS, Dover Publications: New York), y Williams y col. (1967, METHODS IN IMMUNOLOGY AND IMMUNOCHEMISTRY, Vol. 1, Academic Press: New York).

La cantidad de composición inmunogénica utilizada en la producción de anticuerpos policlonales varía según la naturaleza del inmunógeno así como del animal empleado para la inmunización. Se pueden utilizar varias vías para administrar el inmunógeno (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). La producción de anticuerpos policlonales puede ser monitorizada mediante el muestreo de la sangre del animal inmunizado en varios puntos después de la inmunización. Se puede aplicar también una segunda inyección de refuerzo. El proceso de revacunación y titulación se repite hasta obtener el título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, se puede extraer sangre al animal inmunizado, aislándose y almacenándose el suero.

El suero producido a partir de animales inmunizados mediante métodos estándar se puede utilizar directamente, se puede separar del suero la fracción de IgG por medio de métodos estándar, tales como plasmaféresis o cromatografía de adsorción con adsorbentes específicos de IgG, como la Proteína A inmovilizada.

Los fragmentos de anticuerpos, tales como los fragmentos de $F(ab')_2$ y Fab, se pueden producir a partir de los anticuerpos correspondientes mediante segmentación y recolección de los fragmentos deseados de acuerdo con los métodos conocidos (véase por ejemplo Andrew y col., 1992, "Fragmentation of Immunoglobulins" en CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Unit 2.8, Greene Publishing Assoc. and John Wiley & Sons).

Como alternativa, los anticuerpos monoclonales contra los péptidos antígenos de la invención se pueden preparar de acuerdo con técnicas bien conocidas, tales como aquellas que se ilustran en la patente de Estados Unidos Nº 4.196.265. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra los péptidos antígenos se producen mediante técnicas bien conocidas.

Normalmente, el proceso implica la fusión de una línea celular inmortalizada con un linfocito-B que produce el anticuerpo deseado. Las líneas celulares inmortalizadas son normalmente células de mamíferos transformadas, en particular células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Los roedores, tales como ratones y ratas, son los animales preferentes, sin embargo también es posible utilizar células de conejo o de oveja. Son preferentes los ratones, en particular el ratón BALB/c, ya que se utiliza de forma más rutinaria y normalmente produce un mayor porcentaje de fusiones estables.

Son bien conocidas las técnicas para obtener linfocitos productores de anticuerpos a partir de mamíferos inyectados con antígenos. En general, se utilizan linfocitos de sangre periférica (PBL) cuando se emplean células de origen humano, o se utilizan células de bazo o de ganglio linfático procedentes de fuentes de mamíferos no humanos. Se inyecta a un animal huésped repetidas dosis de antígeno purificado, lo que da lugar a que el animal genere las células productoras de anticuerpos deseadas antes de ser cosechadas para la fusión con la línea celular inmortalizada. Más frecuentemente, las líneas celulares inmortalizadas son líneas celulares de mieloma de rata o de ratón, que se emplean por comodidad y disponibilidad. Son bien conocidas en la técnica también las técnicas de fusión y, en general, implican la mezcla de las células con un agente de fusión tal como polietilenglicol.

Generalmente, después de la inmunización de células somáticas con potencial para producir anticuerpos, se seleccionan linfocitos B (células B) para su utilización en el protocolo de generación de mAb. Estas células se pueden obtener a partir de bazos, tonsilas o ganglios linfáticos biopsiados o de una muestra de sangre periférica. Se prefieren las células de bazo y las células de sangre periférica, las primeras porque representan una fuente rica en células productoras de anticuerpos que se encuentran en la etapa de división de plasmoblastos, y las segundas porque la sangre periférica es de fácil acceso. A menudo, se habrá inmunizado un panel de animales y se extraerá el bazo del animal con el mayor título de anticuerpos, con lo que se obtendrán linfocitos de bazo mediante homogeneización del bazo con una jeringa. Típicamente, un bazo procedente de un ratón inmunizado contiene aproximadamente de cincuenta millones a doscientos millones de linfocitos.

Las líneas celulares de mieloma adaptadas para su utilización en los procedimientos de fusión para producir hibridomas son preferentemente no productoras de anticuerpos, tienen un alto rendimiento de fusión y las

deficiencias de enzimas que las convierten en incapaces de crecer en ciertos medios selectivos sólo soportan el crecimiento de las células fusionadas deseadas (hibridomas). Se puede utilizar cualquiera de las diversas células de mieloma, como es conocido por los especialistas en la técnica. Se pueden
5 utilizar en la hibridación las líneas de mieloma murino disponibles, tales como las de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA. Por ejemplo, cuando el animal inmunizado es un ratón, se puede utilizar P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, Fo, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul;
10 para ratas, se puede utilizar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6 sirven todos con relación a fusiones de células humanas. Una célula preferente de mieloma murino es la línea celular de mieloma NS-1 (también denominada P3-NS-1-Ag4-1), fácilmente disponible de NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository
15 mediante solicitud del número de depósito de líneas celulares GM3573. Otra línea celular de mieloma de ratón que se puede utilizar es la línea celular no productora SP2/0 de mieloma murino de ratón resistente a la 8-azaguanina.

Los métodos para generar híbridos de células de ganglios linfáticos o de bazo productoras de anticuerpos y células de mieloma comprenden
20 normalmente células somáticas mezcladas con células de mieloma en una relación 2:1, aunque la relación puede variar de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, respectivamente, en presencia de uno o más agentes (químicos o eléctricos) que favorecen la fusión de las membranas celulares. Se han descrito métodos de fusión utilizando el virus Sendai (Kohler y col., 1975,
25 Nature 256:495; Kohler y col., 1976, Eur. J. Immunol. 6:511; Kohler y col., 1976, Eur. J. Immunol. 6:292), así como otros que utilizan polietilenglicol (PEG), tal como un 37% (volumen/volumen) de PEG, por Gefter y col. (1977, Somatic Cell Genet 3:231-236). La utilización de métodos de fusión inducida eléctricamente también es adecuada (Goding, 1986).

30 Los procedimientos de fusión producen normalmente híbridos viables con bajas frecuencias, de aproximadamente 1×10^{-6} a 1×10^{-8} . Sin embargo, esto no plantea ningún problema, ya que los híbridos viables, fusionados, se diferencian de las células parentales, no fusionadas (particularmente las células de mieloma no fusionadas que normalmente seguirían dividiéndose indefinidamente),
35 mediante su cultivo en un medio selectivo. El medio selectivo es generalmente un medio que contiene un agente que bloquea la síntesis de novo de los nucleótidos en los medios de cultivo de tejidos. Ejemplos y agentes preferentes

son aminopterina, metotrexato y azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis de novo tanto de las purinas como de las pirimidinas, mientras que la azaserina bloquea solamente la síntesis de la purina. Cuando se utiliza aminopterina o metotrexato, el medio es suplementado con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT). Cuando se utiliza azaserina, el medio es suplementado con hipoxantina. El medio de selección preferente es HAT. Las células de mieloma son defectuosas en enzimas clave de la vía de salvamento, por ejemplo la hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT), y no pueden sobrevivir. Las células B pueden funcionar en esta vía, pero tienen una duración de vida limitada en el cultivo y mueren generalmente en dos semanas aproximadamente. Por tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en el medio selectivo son aquellos híbridos formados a partir de células B y de mieloma.

El cultivo de los productos de fusión en estas condiciones proporciona una población de hibridomas, a partir de los cuales se seleccionan los hibridomas específicos. Típicamente, la selección de hibridomas se lleva a cabo mediante el cultivo de las células por dilución de un único clon en placas de microvaloración, seguido de ensayos de la reactividad deseada en los sobrenadantes clonales individuales (después de aproximadamente dos a tres semanas). Los hibridomas que secretan el anticuerpo deseado, se seleccionan por medio de inmunoensayos estándar, tales como Western blotting, ELISA (ensayo inmunsorbente ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), o similares. Los anticuerpos se recuperan del medio utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas (tal como Tijssen, 1985, Id.). El ensayo debe ser sensible, sencillo y rápido, por ejemplo un radioinmunoensayo, inmunoensayos de enzimas, ensayos de citotoxicidad, ensayos de placas, ensayos de inmunounión puntual y similares.

Los hibridomas seleccionados se diluyen entonces en serie y se clonan en líneas celulares productoras de anticuerpos individuales, cuyos clones pueden ser propagados entonces indefinidamente para proporcionar los mAb. Se pueden explotar las líneas celulares para la producción de mAb en al menos dos días. Se puede inyectar una muestra del hibridoma (a menudo en la cavidad peritoneal) en un animal histocompatible del tipo que se utilizó para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido de células fusionadas. Los fluidos corporales del animal, tal como suero o líquido ascítico, se pueden extraer entonces para proporcionar los mAb

a alta concentración. Las líneas celulares individuales se pueden cultivar también *in vitro* cuando los mAb son secretados naturalmente en el medio de cultivo del que se pueden obtener fácilmente a altas concentraciones. Los mAb producidos por uno de los medios además pueden ser purificados, si se desea, por medio de filtración, centrifugación, así como diversos métodos cromatográficos, tales como HPLC o cromatografía de afinidad.

Se dispone de muchas referencias para proporcionar una orientación en cuanto a la aplicación de las técnicas anteriores, incluyendo Kohler y col. (1980, HYBRIDOMA TECHNIQUES, Cold Spring Harbor Laboratory, New York); Tijssen (1985, Id.); Campbell (1984, MONOCLONAL ANTIBODY TECHNOLOGY, Elsevier: Amsterdam); Hurrell (1982, Id). Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir por medio de sistemas bien conocidos de librerías de fagos. Véase por ejemplo, Huse y col. (1989, Science 246:1275); Ward y col. (1989, Nature 341:544).

Los fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos F(ab')₂ y Fab, se pueden producir a partir de los anticuerpos correspondientes mediante segmentación y colección de los fragmentos deseados de acuerdo con métodos conocidos (véase por ejemplo Andrew y col., 1992, "Fragmentation of Immunoglobulins" en CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Unit 2.8, Greene Publishing Assoc. and John Wiley & Sons).

Se pueden utilizar los anticuerpos así producidos, policlonales o monoclonales, por ejemplo en una forma inmovilizada unida a un soporte sólido por métodos bien conocidos.

Se pueden utilizar también los anticuerpos, no marcados o marcados por medio de métodos estándar, como base para inmunoensayos y ensayos de unión inmuno-específicos. Los inmunoensayos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos, mediante técnicas tales como Western blot, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), inmunoensayos tipo "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos para proteína A, por citar algunos. Dichos ensayos son rutinarios y son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo Ausubel y col., eds. 1994, Id.).

En particular, los anticuerpos se pueden utilizar también junto con bloques de tejidos incrustados en parafina recién congelados como fijados mediante formalina preparados para su estudio inmunohistoquímico (IHC).

La detección puede ser facilitada por el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, materiales bioluminescentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones que se aplican en diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar ya sea directamente con el anticuerpo (o con un fragmento del mismo) o indirectamente a través de un intermedio (por ejemplo un enlazante conocido en la técnica), por medio de técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.741.900 en cuanto a los iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para su utilización diagnóstica. El marcador particular empleado dependerá del tipo de inmunoensayo. Ejemplos de marcadores que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan, a radiomarcadores tales como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc ; marcadores fluorescentes tales como fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo y umbeliferona; quimioluminiscentes tales como luciferasa y 2,3-dihidroftalazindionas; y enzimas tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, lisozima, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y acetilcolina-esterasa. Los anticuerpos pueden etiquetarse con dichos marcadores por métodos conocidos. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento tales como aldehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, imidatos, succinimidas, benzadinas bisdinitrogenadas y similares se pueden utilizar para etiquetar los anticuerpos con marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes o enzimas. Se conocen bien en la técnica los métodos generales involucrados y se describen, por ejemplo, en IMMUNOASSAY: A PRACTICAL GUIDE (1987, Chan (ed.), Academic Press, Inc.: Orlando, FL).

Además, el modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de los polipéptidos predictivos se puede comparar con una muestra celular o tisular no tumoral. La muestra celular o tisular no tumoral se puede obtener de una muestra de célula o tejido no tumorales procedente del mismo individuo o, como alternativa, de una muestra de célula o tejido no tumorales procedentes de un individuo diferente. Un modelo detectado para un polipéptido se denomina "reducido" en la muestra celular, tisular o tumoral de un mamífero cuando aparece menos polipéptido detectado en comparación con

una muestra de célula o tejido no tumoral. Un modelo detectado para un polipéptido se denomina “aumentado” en la muestra celular, tisular o tumoral de un mamífero cuando aparece más polipéptido detectado en comparación con una muestra de célula o tejido no tumoral. Un modelo detectado para un polipéptido se denomina “normal” en la muestra celular, tisular o tumoral de un mamífero cuando aparece el mismo o aproximadamente el mismo polipéptido detectado en comparación con una muestra de célula o tejido no tumoral.

En la puesta en práctica de los métodos de la invención, los procedimientos de tinción pueden ser realizados por una persona, tal como un histomédico en un laboratorio de patología anatómica. Como alternativa, los procedimientos de tinción pueden llevarse a cabo mediante sistemas automatizados, por ejemplo la serie Ventana Medical Systems Benchmark® de instrumentos de tinción automatizados. En cualquiera de los casos, los procedimientos de tinción para su uso de acuerdo con los métodos de esta invención se realizan según las técnicas y protocolos estándar bien conocidos en la técnica.

Se entiende por “muestra tisular o celular” muestras biológicas que comprenden células, preferentemente células tumorales, que están aisladas de las muestras corporales, tal como, pero sin limitarse a, frotis, esputos, biopsias, secreciones, fluido cerebroespinal, bilis, sangre, fluido linfático, orina y heces, o tejido que se ha extraído de órganos, tal como mama, pulmón, intestino, piel, cuello uterino, próstata y estómago. Por ejemplo, las muestras de un tejido pueden comprender una región de células asociadas funcionalmente o células adyacentes.

La cantidad de proteína diana se puede cuantificar midiendo la densidad óptica media de los antígenos teñidos. Concomitantemente, la proporción o porcentaje del área de tejido total teñida se puede calcular fácilmente, por ejemplo como el área teñida por encima de un nivel control (tal como un nivel umbral de anticuerpos) en la segunda imagen. Tras la visualización de los núcleos que contienen los biomarcadores, el porcentaje o la cantidad de dichas células en el tejido procedente de pacientes después del tratamiento se compara con el porcentaje o cantidad de dichas células en el tejido no tratado. Con el propósito de la invención, se entiende en términos generales que “la determinación” de un modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de polipéptidos significa simplemente la obtención de la información sobre el nivel de expresión en dicho(s) polipéptido(s), ya sea

mediante examen directo o indirectamente, a partir de, por ejemplo, un servicio de diagnóstico contratado.

Como alternativa, la cantidad de proteína diana se puede determinar por métodos fluorescentes. Por ejemplo, los puntos cuánticos (Qdots) son cada vez
5 más útiles en una lista creciente de aplicaciones que incluyen inmunohistoquímica, citometría de flujo y ensayos basados en placas, y, por tanto, se pueden utilizar conjuntamente con esta invención. Los nanocristales Qdot tienen propiedades ópticas únicas que incluyen una señal extremadamente brillante para la sensibilidad y la cuantificación; alta fotoestabilidad para la
10 formación de imágenes y análisis. Se necesita una única fuente de excitación y un rango creciente de conjugados hace que sean útiles en un amplio rango de aplicaciones basadas en células. Los puntos cuánticos bioconjugados se caracterizan por rendimientos cuánticos comparables con los más brillantes tintes tradicionales disponibles. Además, estos fluoróforos basados en puntos
15 cuánticos absorben 10-1.000 veces más luz que los tintes tradicionales. La emisión procedente de los puntos cuánticos Qdot subyacentes es estrecha y simétrica, lo que significa que se minimiza la superposición con otros colores, resultando en un sangrado mínimo a través y dentro de los canales de detección adyacentes y en una atenuación de las interferencias, a pesar del hecho de que
20 se pueden utilizar simultáneamente muchos más colores. Los microscopios de fluorescencia estándar son una herramienta barata para la detección de bioconjugados Qdot. Debido a que los conjugados Qdot son virtualmente fotoestables, se puede tomar el tiempo necesario con el microscopio para encontrar regiones de interés y centrarse adecuadamente en las muestras. Los
25 conjugados Qdot son útiles en cualquier momento que sea necesaria una emisión fotoestable brillante y son particularmente útiles en aplicaciones multicolor, donde se dispone solamente de una fuente/filtro de excitación y se requiere una interferencia mínima entre los colores. Por ejemplo, se han empleado puntos cuánticos como conjugados de la estreptavidina e IgG para etiquetar
30 marcadores superficiales celulares y antígenos nucleares y para teñir microtúbulos y actina (Wu y col. 2003, Nature Biotech., 21, 41-46).

Por ejemplo, la fluorescencia IHC QDOT se puede realizar con anticuerpos secundarios, donde los sustratos de detección son puntos cuánticos conjugados con estreptavidina (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)
35 ("Ventana"). El análisis de imágenes se puede realizar capturando inicialmente cubos de imágenes en una cámara de imágenes espectrales (Cambridge Research Instruments, Woburn, MA). La excitación se puede llevar a cabo con

una fuente luminosa UV (mercurio). Los cubos de imágenes se pueden analizar entonces en una aplicación Ventana Research Imaging. Brevemente, los cubos de imágenes se pueden recuperar en la aplicación y se pueden extraer y reportar los datos en base a las intensidades de píxeles de los puntos cuánticos de los que se espera emitan a 605 nm y 655 nm.

Como ejemplo, se puede medir la fluorescencia con el sistema de formación de imágenes multiespectrales NuanceTM (Cambridge Research & Instrumentation, Woburn, MA). Otro ejemplo consiste en que la fluorescencia se puede medir con el sistema de formación de imágenes espectrales SpectrViewTM (Applied Spectral Imaging, Vista, CA). La formación de imágenes multiespectrales es una técnica en la que se recoge la información espectroscópica en cada píxel de una imagen y los datos resultantes se analizan con un software de procesamiento de imágenes espectrales. Por ejemplo, el sistema Nuance puede tomar una serie de imágenes a distintas longitudes de onda que son electrónica y continuamente elegibles y que luego son utilizadas con un programa de análisis diseñado para manejar dichos datos. El sistema Nuance es capaz de obtener información cuantitativa de múltiples tintes simultáneamente, incluso cuando los espectros de los tintes se superponen mucho o cuando están co-localizados, o cuando aparecen en el mismo punto en la muestra, siempre que las curvas espectrales sean diferentes. Numerosos materiales biológicos son autofluorescentes o emiten luz de baja energía cuando son excitados por luz de alta energía. Esta señal puede resultar en imágenes de menor contraste y menos datos. Las cámaras de alta sensibilidad sin capacidad de formación de imágenes multiespectrales sólo incrementan la señal de autofluorescencia junto con la señal de fluorescencia. La formación de imágenes multiespectrales puede no mezclar o separar la autofluorescencia del tejido y, con ello, incrementar la relación señal-ruido obtenible.

Con respecto a los métodos de detección de anticuerpos, se entiende por “reactivos de detección” reactivos que se pueden utilizar para detectar anticuerpos, incluidos anticuerpos tanto primarios como secundarios. Por ejemplo, los reactivos de detección pueden ser reactivos de detección fluorescentes, puntos cuánticos, reactivos de detección cromogénicos o sistemas de detección basados en polímeros. Sin embargo, los métodos de la invención no están limitados por estos reactivos de detección, ni se limitan tampoco a un esquema de anticuerpos primarios y secundarios (por ejemplo, los métodos de la invención incluyen anticuerpos terciarios, etc.).

La presente invención puede utilizar asimismo sondas de ácido nucleico como medio para detectar indirectamente los biomarcadores proteicos expresados. Por ejemplo, se pueden construir sondas para el biomarcador de EGFR mediante la metodología de diseño de sondas estándar, bien conocida por un especialista en la técnica de diseños de sondas. A modo de ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos N° US 20050137389A1, "Métodos y composiciones para la tinción específica de cromosomas", describe métodos de diseño de composiciones de sondas exentas de repeticiones que comprenden mezclas heterogéneas de secuencias diseñadas para marcar un cromosoma completo.

Se pueden diseñar sondas génicas específicas de acuerdo con uno cualquiera de los siguientes procedimientos publicados. Con este fin, es importante producir sondas puras, u homogéneas, para minimizar las hibridaciones en puntos distintos del lugar de interés (Henderson, 1982, International Review of Cytology 76: 1-46). Manuelidis y col. (1984, Chromosoma 91:28-38) describen la construcción de un único tipo de sonda de ADN para detectar múltiples loci en cromosomas correspondientes a miembros de una familia de secuencias repetidas de ADN.

Wallace y col. (1981, Nucleic Acids Research 9:879-94) describen la construcción de sondas de oligonucleótidos sintéticos que tienen secuencias base mixtas para detectar un único locus correspondiente a un gen estructural. La mezcla de las secuencias base se determinó considerando todas las posibles secuencias de nucleótidos que podrían codificar para una secuencia seleccionada de aminoácidos en la proteína a la que correspondía el gen estructural.

Olsen y col. (1980, Biochemistry 19:2419-28) describe un método para aislar ADN del cromosoma X humano de secuencia única marcada por hibridaciones sucesivas: primera, ADN humano genómico total contra él mismo para que se pueda aislar una fracción de ADN de secuencia única; segunda, una fracción aislada de ADN humano de secuencia única contra ADN de ratón para eliminar las secuencias homólogas humanas/ratón; y finalmente, un ADN humano de secuencia única no homóloga de ratón contra el ADN genómico total de un híbrido humano/ratón cuyo único cromosoma humano es el cromosoma X, para aislar una fracción de ADN del cromosoma X de secuencia única.

Se pueden utilizar sondas de ácido nucleico marcadas en los métodos de esta invención en protocolos de detección genética. Por ejemplo, se pueden utilizar métodos de detección genética por hibridación fluorescente *in situ* ("FISH") para determinar el estado genético de los genes, tales como el gen EGFR. La detección de genes por FISH se puede utilizar para medir la amplificación, deleción o rearrreglo del ADN genómico que codifica, por ejemplo, EGFR. La detección de genes por FISH, que permite la medición de la amplificación, deleción o rearrreglo del ADN genómico, permite así detectar el estado genético, por ejemplo, cuando los genes son de disomía equilibrada, trisomía equilibrada o polisomía equilibrada.

La presente invención puede emplear asimismo métodos que incluyen la hibridación *in situ* con plata. Con esta técnica, enzimas como la peroxidasa de rábano (HRP) catalizan la reducción de los iones plata a plata metálica; y las partículas metálicas se depositan en el lugar de la diana hibridizada con la sonda (Hoff y col., 2002, Am J Clin Pathol. 117: 916-21; véase la FIGURA 20). Por ejemplo, se puede utilizar la hibridación *in situ* con plata para medir la amplificación, depleción y rearrreglo del ADN genómico.

Se analizan secciones de tejido canceroso tomadas de pacientes de acuerdo con los métodos de esta invención mediante inmunohistoquímica para la expresión, fosforilación o expresión y fosforilación de miembros de la vía EGF o cualquier combinación predictiva de respuesta positiva al tratamiento del mismo. En los métodos de la invención, un cambio en la "expresión" puede significar un cambio en el número de células en las que se detecta el biomarcador o, como alternativa, el número de células positivas puede ser el mismo, pero la intensidad (o nivel) puede verse alterada. El término "expresión" se puede utilizar como término subrogante, el cual indica cambios en los niveles de activación molecular.

Estas medidas se pueden llevar a cabo, por ejemplo, mediante la utilización de microarrays tisulares. Los microarrays tisulares se utilizan ventajosamente en los métodos de la invención, siendo el método válido para explorar rápidamente múltiples muestras de tejido en condiciones de tinción uniforme y puntuación (Hoos y col., 2001, Am J Pathol. 158: 1245-51). La puntuación de los arrays teñidos se puede realizar manualmente mediante la escala estándar 0 a 3+, o mediante un sistema automatizado que cuantifica con precisión la tinción observada. Los resultados de este análisis identifican los biomarcadores que mejor predicen el resultado para el paciente después del

tratamiento. La “probabilidad de respuesta” del paciente, que oscila entre el 0 y el 100%, se puede pronosticar en base a la expresión, fosforilación o ambos de un pequeño conjunto de ligandos, receptores, proteínas de señalización o combinaciones predictivas de los mismos. Se pueden analizar muestras
5 adicionales procedentes de pacientes de cáncer, ya sea como alternativa o adicionalmente a los resultados de los microarrays tisulares. Por ejemplo, el análisis de muestras procedentes de pacientes con cáncer de mama puede confirmar las conclusiones a partir de arrays tisulares si las respuestas del paciente tienen correlación con un modelo específico de expresión del receptor
10 y/o de señalización aguas abajo.

La invención se puede utilizar en forma de kit para llevar a cabo los métodos de la invención. Por ejemplo, el método se puede utilizar como un kit para evaluar la progresión del cáncer colorrectal en un individuo, el cual comprende al menos dos reactivos, preferentemente anticuerpos, que pueden
15 detectar la expresión, fosforilación o ambos de polipéptidos en la vía EGF. Por ejemplo, el kit puede contener al menos dos, tres o cuatro reactivos que se unen a EGFR, PTEN, pAKT, pMEK, pHER1, pERK o Ki67. Además, el kit puede incluir componentes adicionales distintos de los reactivos identificados anteriormente, incluyendo, pero no limitados a, anticuerpos adicionales. Dichos
20 kits pueden emplearse, por ejemplo, por un clínico o un médico para asistirle en la elección de una terapia adecuada a un paciente particular.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de realizaciones específicas de la invención y de varias utilidades de la misma. Se exponen solamente con propósito explicativo y no deben ser tomados como limitativos de la invención.

25 **Ejemplo 1: Tinción inmunohistoquímica de moléculas aguas abajo en la vía EGF en la progresión de tumor colorrectal**

Con el fin de determinar si los perfiles de los biomarcadores podrían ser identificados para el cáncer colorrectal, los cuales tienen correlación con la estadificación patológica de los carcinomas, se examinaron los niveles de
30 expresión de los biomarcadores ligados a la expresión de EGFR en casos de cáncer colorrectal mediante un array tisular comercial y de muestras de tejidos procedentes de casos individuales. Se evaluaron los biomarcadores mediante inmunohistoquímica (“IHC”).

Se utilizó el clon de anticuerpo murino 3C6 de Ventana Medical Systems
35 para detectar la expresión de HER1/EGFR mediante inmunohistoquímica. El

clon 3C6 reacciona con el dominio extracelular del receptor. Los demás biomarcadores investigados fueron pHER1, PTEN, pAKT, pMEK, Ki67 y pERK. Se evaluó también pTYR como subrogado de activación. Se utilizaron todos los reactivos tal como se describe a continuación en la Tabla 1 y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El rendimiento de las sondas y de los anticuerpos para detectar los marcadores proteicos en los protocolos automatizados de IHC se evaluó en secciones únicas del portaobjetos de FFPE y en un array multitisular (véase la Tabla 2). Todos los análisis por IHC se llevaron a cabo en la plataforma de tinción BenchMark®XT y/o Discovery®XT de Ventana.

Tabla 1 Protocolos de Histoquímica

Ensayos IHC	Vendedor	Catálogo N°	Fuente
HER1, clon 3C6	Ventana	790-2988	monoclonal de ratón
EGFR vIII (806)	Ludwig Inst.	Na	monoclonal de ratón
pHER1 (tyr 1068)	CST	2236	monoclonal de ratón
PTEN	CST	9559	monoclonal de conejo
pAKT (ser 473)	CST	3787	monoclonal de conejo
pMEK (ser 217/221)	CST	9121	monoclonal de conejo
Ki67	Ventana	790-2910	monoclonal de ratón
pERK (pTpY 185/187)	Ventana	760-4230	monoclonal de conejo
pTYR clon 4G10	Upstate	05-321	monoclonal de ratón

Para las secciones únicas del portaobjetos, se cosecharon las células y se fijaron en un 10% de formalina neutra tamponada ("NBF") y luego se incrustaron en parafina ("FFPE"). Se centrifugaron las células de FFPE durante 10 minutos a 1.500 r.p.m. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 3 gotas de reactivo 1 del Sistema de Preparación Cell Block de Shandon Cytoblock® ("Shandon Cytoblock") (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). Se centrifugaron las células durante 2 minutos a 3.000 r.p.m. Tres (3) gotas de reactivo 2 de Shandon Cytoblock se vertieron en el lateral del tubo para que el reactivo 2 pudiera circular bajo la suspensión de las pellas celulares. Se incubaron las muestras durante 10 minutos y después se añadieron 5 ml de etanol al 70% (las pellas flotaban hacia la parte superior del etanol). Finalmente, se agitaron las muestras durante 2 minutos a 3.000 r.p.m., luego se transfirieron a un cassette de biopsia y se procesaron para su incrustación en parafina.

La tinción con hematoxilina y eosina (“H&E”) se revisó para comprobar la aptitud de las secciones para la IHC y para la hibridación *in situ* (ISH) (Figura 3). La tinción con H&E incluía las siguientes etapas: desparafinización en xileno, 100% de etanol y 95% de etanol e inmersión en agua. Se sumergieron los portaobjetos en hematoxilina durante 3 minutos, se enjuagaron en agua, se sumergieron en reactivo añil durante 1 minuto, se enjuagaron en agua, se sumergieron en eosina y finalmente se añadió un cubreobjetos.

Los inmunoensayos implicaban las siguientes etapas: desenmascarado de antígenos y detección posterior a la incubación con los anticuerpos primario y secundario relevantes. Como control negativo, se incubó el Diluyente (Ventana) de BenchMark XT® o Discovery XT® con los portaobjetos relevantes. Se detectaron los anticuerpos primarios mediante el kit de detección DABMap™, OmniMap™ (Discovery XT®), o iView™ DAB (BenchMark XT®) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, el Kit de Detección iView™ DAB detectó los anticuerpos específicos IgG de conejo e IgG, IgM de ratón unidos a un antígeno en la sección tisular congelada o incrustada en parafina. El anticuerpo específico fue encontrado por un anticuerpo secundario conjugado con biotina. Esta etapa fue seguida por la adición de un conjugado de estreptavidina-enzima que se unía a la biotina presente en el anticuerpo secundario. Luego, se visualizó el complejo utilizando un producto enzimático cromogénico de precipitación. Al final de cada etapa de incubación, el dispositivo de tinción automatizada de portaobjetos lavó las secciones para eliminar el material no unido y aplicó un cubreobjetos líquido que minimizó la evaporación de los reactivos acuosos del portaobjetos. Se interpretaron los resultados mediante un microscopio de luz y asistido en el diagnóstico diferencial de los procesos patofisiológicos, que pueden o no haber sido asociados a un antígeno particular.

Como ejemplo específico, la detección de pMEK se realizó de la siguiente manera. Las H&E fueron revisadas por un patólogo para comprobar la presencia de tumor en los tejidos así como la viabilidad celular en las líneas celulares y tejidos. Se obtuvo el anticuerpo primario pMEK de Cell Signaling Technology, Inc. (“CST”) (Danvers, MA).

Para el ensayo por IHC de pMEK, el condicionamiento celular se llevó a cabo en un instrumento de la serie Ventana Benchmark® con tampón condicionante CC1 durante 60 minutos a 100°C, donde CC1 es una solución acondicionadora celular de alto pH: tampón Tris/Borato/EDTA, pH 8 (Ventana).

Se incubaron los portaobjetos con una dilución 1/40 de concentración stock del anticuerpo primario pMEK (Tabla 1) durante 1 hora a temperatura ambiente. La concentración stock de anticuerpos se refiere a la concentración a la que se vende comercialmente el anticuerpo; algunos fabricantes no indican esta información y las diluciones adecuadas son determinadas experimentalmente. Como control negativo, el diluyente para anticuerpos Ventana, utilizado siguiendo las instrucciones de fabricación, se incubó con los portaobjetos relevantes en las mismas condiciones. Se detectó el anticuerpo pMEK mediante el kit de detección iView DAB de Ventana, a excepción del anticuerpo secundario universal que fue sustituido por el IgG anti-conejo biotinilado de Vector, según las instrucciones del fabricante (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se aplicó durante 32 minutos a 37°C. La detección/localización enzimática de pMEK se realizó con un conjugado de peroxidasa de rábano-estreptavidina (Ventana), seguido de reacción con peróxido de hidrógeno en presencia de diaminobenzidina (“DAB”) y sulfato de cobre, según las instrucciones de fabricación y el kit utilizado (véase la Tabla 1). El conjugado y todos los reactivos cromogénicos, a excepción del anticuerpo de conejo secundario biotinilado de Vector, componen también el kit de detección iView y se aplicaron en los momentos recomendados por el fabricante.

Se obtuvo el microarray tisular de progresión colorrectal (TMA; CHTN2003CRCProg) de la Cooperative Human Tissue Network (CHTN). Se muestran en la Figura 4 los detalles del array y se resumen en la Tabla 2. Brevemente, este array de progresión del cáncer colorrectal fijado mediante formalina e incrustado en parafina (“FFPE”) se creó recogiendo muestras de donantes. Este TMA representa un número limitado de casos que pueden detectar fuertes tendencias en la expresión genética diferencial. Las secciones histológicas no teñidas tenían un espesor de 4 micras y se proporcionaron en portaobjetos de vidrio cargados. El TMA de CHTN2003CRCprog contiene hasta 20 casos de mucosa colónica no neoplásica, 14 casos de pólipos adenomatosos, 14 casos de adenocarcinomas colorrectales primarios, 7 casos de adenocarcinoma metastático hacia los ganglios linfáticos regionales y 7 casos de adenocarcinoma metastático hacia puntos distantes. Cada caso se muestrea tres veces con tubos de 0,6 mm.

Tabla 2 Composición del Array de Progresión Colorrectal de CHTN

Cód.	Tipo de tejido	nº de Casos
C	Adenomas $\leq$ 2 cm en su dimensión máxima	7
F	Adenomas $>$ 2 cm en su dimensión máxima	7
E	Adenocarcinoma primario invasivo estadio patológico T1 o T2	7
H	Adenocarcinoma primario invasivo estadio patológico T3 o T4	7
J	Adenocarcinoma colorrectal metastático hacia los ganglios linfáticos, mismos casos que los cánceres primarios L	7
B	Adenocarcinoma colorrectal metastático hacia puntos distantes	7
A	Mucosa colónica no neoplásica normal de casos sin cáncer	7
G	Mucosa colónica no neoplásica normal de casos con cáncer	7
D	Mucosa no neoplásica inflamada y/o regenerativa (colitis ulcerosa)	3
I	Mucosa no neoplásica inflamada y/o regenerativa (colitis ulcerosa)	3

La puntuación manual fue realizada por patólogos acreditados. Se registraron las intensidades de tinción, el porcentaje de células reactivas y la localización celular. En cuanto a las evaluaciones de IHC de los patólogos, las puntuaciones sobre la intensidad de tinción oscilaban entre 0 (negativo) y 3+ (lo más positivo).

La formación de imágenes ópticas utilizó una aplicación digital de cuantificación de imágenes basada en la intensidad (expresada como densidad óptica media u OD media) del tinte convertido en una puntuación numérica. Se capturó para cada muestra una imagen de alta resolución y el valor de OD se basó en clasificadores específicos por rango de colores para las células teñidas positivamente. Se capturaron imágenes para su análisis mediante un objetivo 40X. En algunos casos, se calculó una “puntuación combinada” o índice multiplicativo, el cual incorpora tanto el porcentaje de células positivas como la intensidad de tinción de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{puntuación combinada} = (\% \text{ positivo}) \times (\text{puntuación de densidad óptica}).$$

Los resultados de la evaluación tisular por histoquímica utilizando la actividad de ptyr como medición subrogante de la activación mostraron un incremento en la expresión de la neoplasia y tejido no neoplásico inflamado en comparación con la mucosa colónica normal procedente de casos con cáncer y

sin cáncer (Figura 5). Los resultados de la evaluación por histoquímica de los niveles de expresión procedentes de moléculas de la vía EGFR en el TMA se muestran en las Figuras 6-9. Los resultados de la evaluación por histoquímica de los niveles de expresión procedentes de moléculas de la vía EGFR en casos individuales se muestran en la Figura 10. Los resultados de ambos experimentos demuestran que, a medida que progresa el cáncer colorrectal a través de las categorías de estadificación secuencial, los niveles proteicos de pMEK, Ki67 y pHER1 aumentan y los niveles proteicos de EGFR, PTEN y pAKTA disminuyen (Figura 11). Estos descubrimientos identifican perfiles de biomarcadores que podrían ser útiles en el diagnóstico y seguimiento de la progresión de tumores colorrectales, incluidos los altos niveles de EGFR (proteína), PTEN y bajos niveles de pMEK en pequeños adenomas tempranos y los bajos niveles de PTEN y altos niveles de pMEK en estados avanzados de la enfermedad, incluidos los fenotipos malignos.

Ejemplo 2: Correlación entre el número de copias del gen EGFR y la estadificación del tumor por cáncer colorrectal mediante hibridación *in situ*

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para EGFR se realizó en secciones únicas del portaobjetos procedentes de casos individuales, así como en un array multitisular, con el fin de evaluar el estado genético en la progresión del cáncer colorrectal.

Utilizando FISH de doble color, se evaluó el número de copias del gen EGFR por célula en secciones únicas del portaobjetos fijadas mediante formalina e incrustadas en parafina (FFPE), así como en un array multitisular (Figura 12). Se señalan en el Ejemplo 1 los detalles de las secciones únicas del portaobjetos y del array multitisular.

La detección por hibridación *in situ* del gen EGFR se realizó con una de las sondas de Ventana (etiquetadas Spectrum Orange), Invitrogen (etiquetadas SPOTLight™ - EGFR, DIG) o Vysis (sondas etiquetadas Spectrum Orange EGFR y Spectrum Green CEP7). Las sondas de EGFR de Ventana y Zymed se detectaron con protocolos totalmente automatizados en el Ventana Discovery®XT. La detección de las sondas de Vysis era semiautomática, realizándose la hibridación con sondas fuera de línea tal como describe el fabricante (Vysis, Downers Grove, IL). El protocolo FISH se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vysis, Cat. No. 32-191053). La

evaluación por FISH se realizó tal como se describe en Hirsch y col. (JCO, 21: 3798-3807). La Figura 12 muestra las fotomicrografías representativas procedentes de células que muestran disomía equilibrada, trisomía equilibrada, polisomía equilibrada y amplificación genética.

- 5 El promedio del número de copias de genes por célula se determinaron para EGFR y CEP7 por revisión patológica. Los resultados de los ensayos FISH de EGFR en casos individuales y en el TMA demuestran que el estado del gen EGFR se desarrolla desde la disomía equilibrada (normal) hacia la trisomía/polisomía equilibrada (anormal) desde un adenoma pequeño hacia el
- 10 adenocarcinoma (Figuras 13) tal como se muestra en la Tabla 3. Las muestras con niveles elevados de copias del gen EGFR (trisomía+) tenían todas subpoblaciones con altos niveles de proteína según se ensayó por IHC (3+, > 50%) (Ejemplo 1). Los descubrimientos de los Ejemplos 1 y 2 sugieren también niveles discordantes de la amplificación genética (normal) y de la expresión
- 15 proteica (alta) en estadios tempranos del cáncer.

Tabla 3 Resumen de la Distribución de la Expresión del Gen EGFR en la Progresión del Cáncer Colorrectal

Modelo FISH						
Diagnosis	nº de Casos	Disomía equil.	Trisomía equil.	Polisomía equil.	Bajo nivel GA	Alto nivel GA
Adenomas < 2 cm	7	100%	-	-	-	-
Adenomas > 2 cm	7	86%	14%	-	-	-
Adenocarcinoma primario invasivo, estadio T1 o T2	6	83%	17%	-	-	-
Adenocarcinoma primario invasivo, estadio T3 o T4	7	86%	-	14%	-	-
Adenocarcinoma metastático hacia ganglios linfáticos	6	67%	-	33%	-	-
Adenocarcinoma metastático hacia puntos distantes	7	86%	-	-	14%	-

Ejemplo 3: Heterogeneidad en los niveles de expresión de las moléculas de la vía de EGFR dentro de un tumor

Los niveles de expresión de las moléculas de la vía EGFR se evaluaron en el estudio de un caso de cáncer colorrectal para valorar la posible
5 heterogeneidad en los niveles de expresión de estas moléculas en un único tumor.

Se diagnosticó una masa rectal de 3 cm a un hombre de 41 años de edad que presentaba sangrado rectal y calambres abdominales. La resección del colon distal después de la radioterapia reveló un adenocarcinoma rectal bien
10 diferenciado de estadio T3. Se prepararon secciones únicas del portaobjetos a partir de varias regiones del tumor tal como se detalla en el Ejemplo 1. Se realizó una IHC para determinar los niveles de expresión para EGFR, HER-2, pAKT, Ki67, Survivina y VEGF tal como se describe en el Ejemplo 1. Se detectó la survivina con un anticuerpo de Novus (NB500-201), mediante incubación
15 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se detectó el VEGF por medio de un anticuerpo de Santa Cruz (SC-7269), mediante incubación durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las Figuras 14-19 muestran que los niveles de expresión de los biomarcadores tumorales pueden variar significativamente dentro del mismo
20 tumor. Estos resultados demuestran que los pacientes pueden beneficiarse de terapias combinadas individualizadas adaptadas a la firma de expresión individual del tumor particular.

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar la progresión del cáncer colorrectal en un individuo, que comprende la etapa de someter a ensayo una muestra tisular o celular obtenida del individuo para detectar un modelo de expresión, de fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de dos o más marcadores biológicos, caracterizado porque los marcadores biológicos son EGFR, PTEN, pAKT, pMEK, pHER1, pERK o Ki67, caracterizado porque el modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de dos o más marcadores biológicos es sustancialmente similar al modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de los dos o más marcadores biológicos procedentes de una muestra tisular o celular característica para un diagnóstico de la progresión colorrectal, o caracterizado porque el modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de dos o más marcadores biológicos difiere del modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de los dos o más marcadores biológicos procedentes de una segunda muestra tisular o celular.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de dos o más marcadores biológicos difiere del modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de los dos o más marcadores biológicos procedentes de una segunda muestra tisular o celular.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la segunda muestra tisular o celular es una muestra de tejido o célula sin cáncer colorrectal o es una muestra de tejido o célula con cáncer colorrectal procedente de un estadio temprano de progresión.
4. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque los marcadores biológicos son EGFR y PTEN.
5. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la etapa de medir la amplificación, delección o rearrreglo del ADN genómico que codifica EGFR por medio de una sonda etiquetada basada en ácido nucleico.

6. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el método evalúa la progresión del cáncer colorrectal en un individuo en un estadio de pequeño adenoma o en un estadio de adenocarcinoma o en un estadio de adenocarcinoma maligno.
- 5 7. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de dos o más marcadores biológicos es sustancialmente similar al modelo de expresión, fosforilación o tanto de expresión como de fosforilación de dos o más marcadores biológicos procedentes de una muestra de tejido o
10 célula característicos de un adenoma pequeño o de un adenocarcinoma o de un adenocarcinoma maligno.
8. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la etapa de ensayo comprende el análisis de imágenes asistido por ordenador de la muestra de tejido o de célula después de la tinción mediante un reactivo
15 de unión específico etiquetado.

FIGURA 1

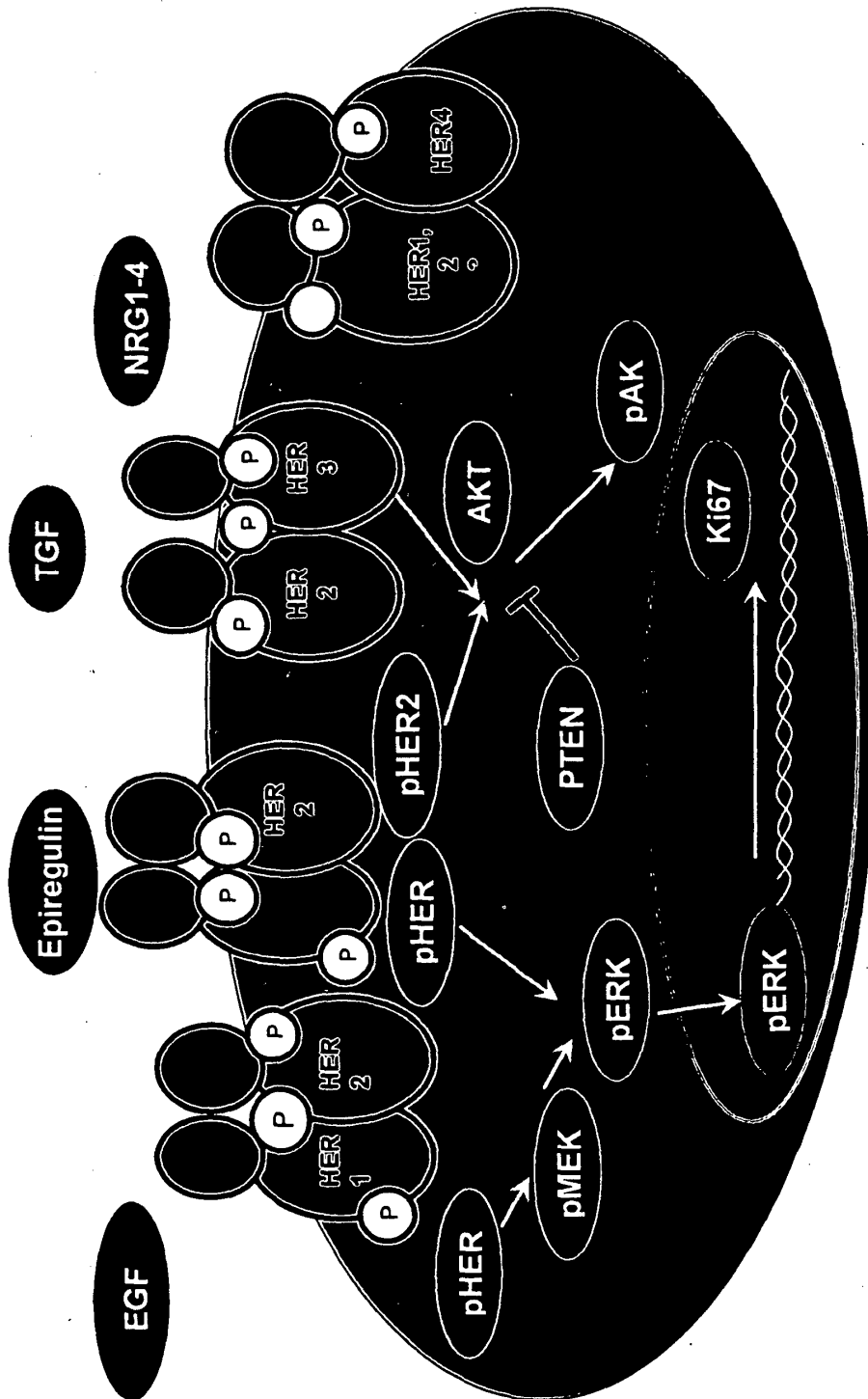


FIGURA 2

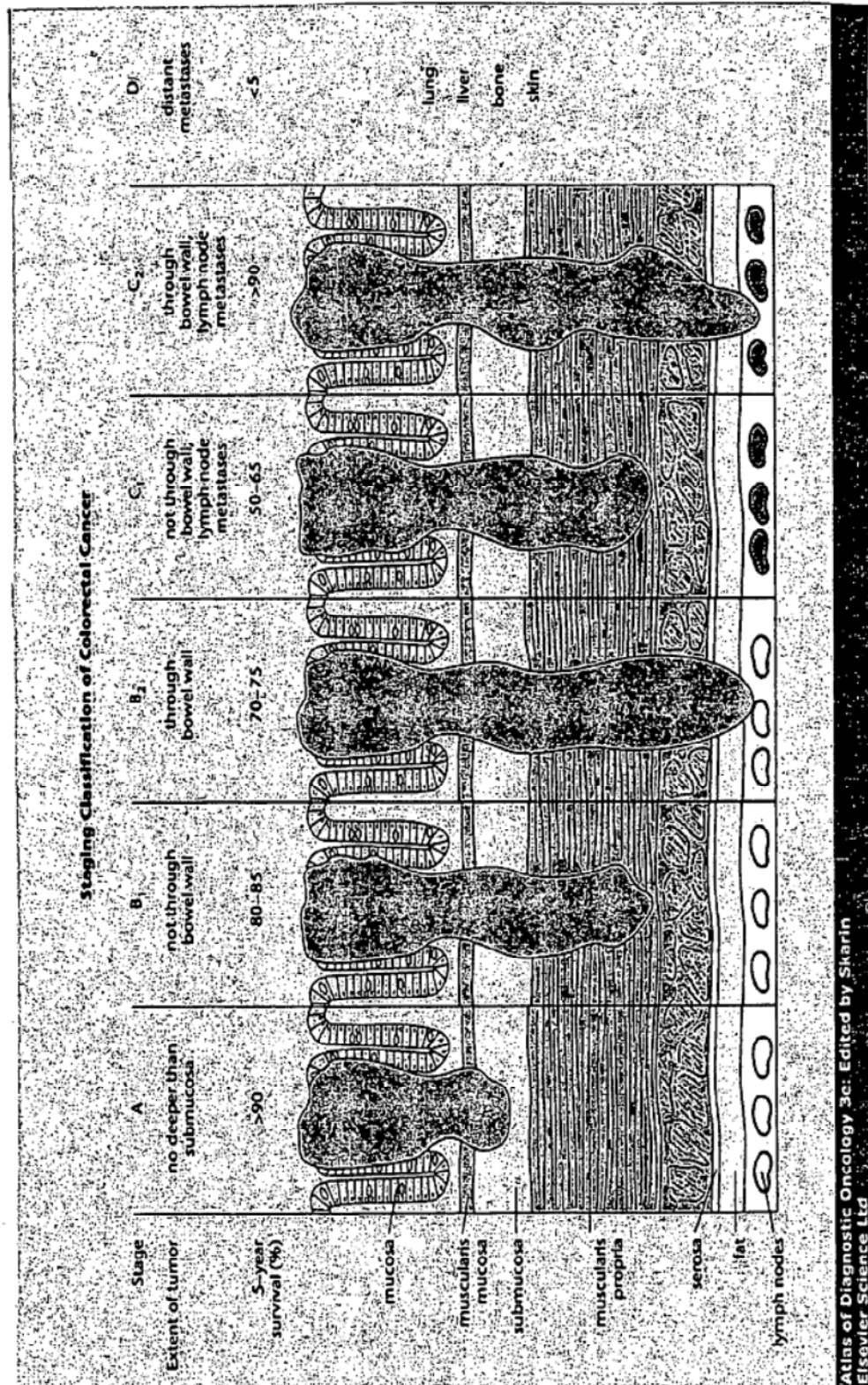


FIGURA 3

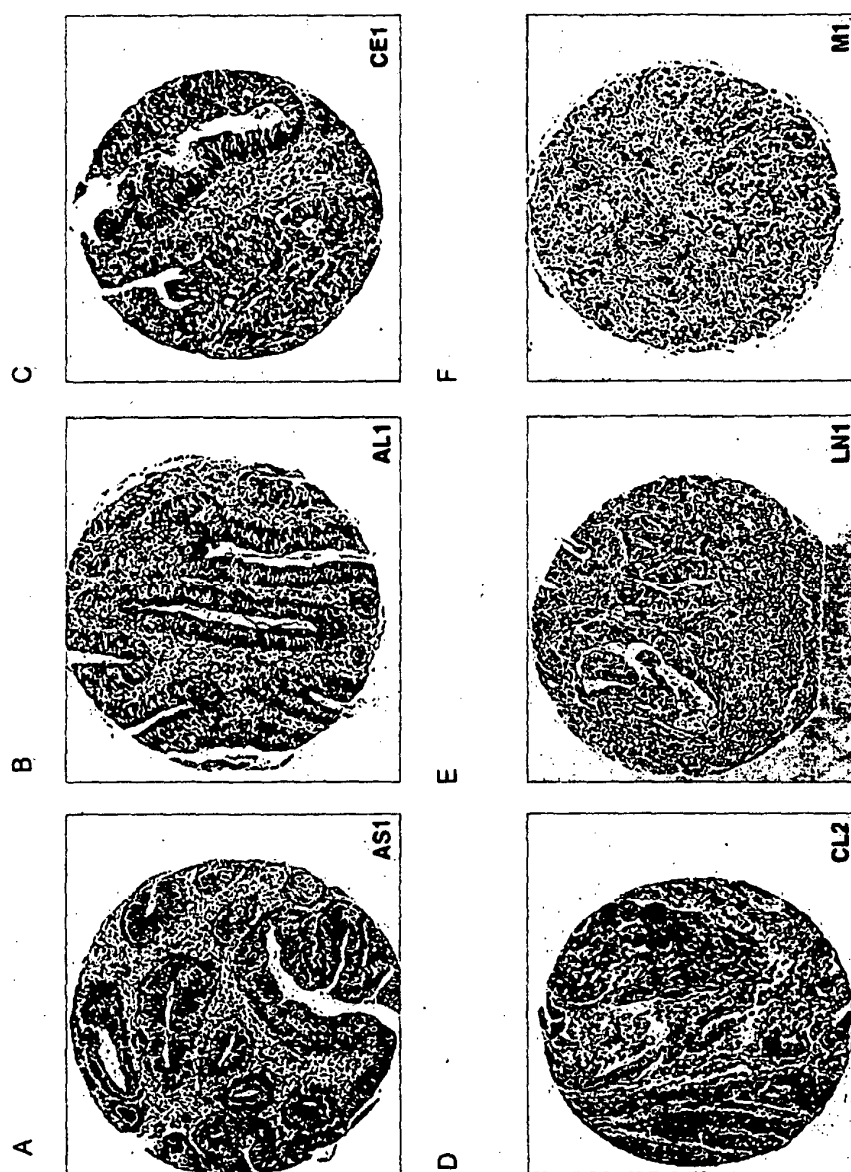


FIGURA 4

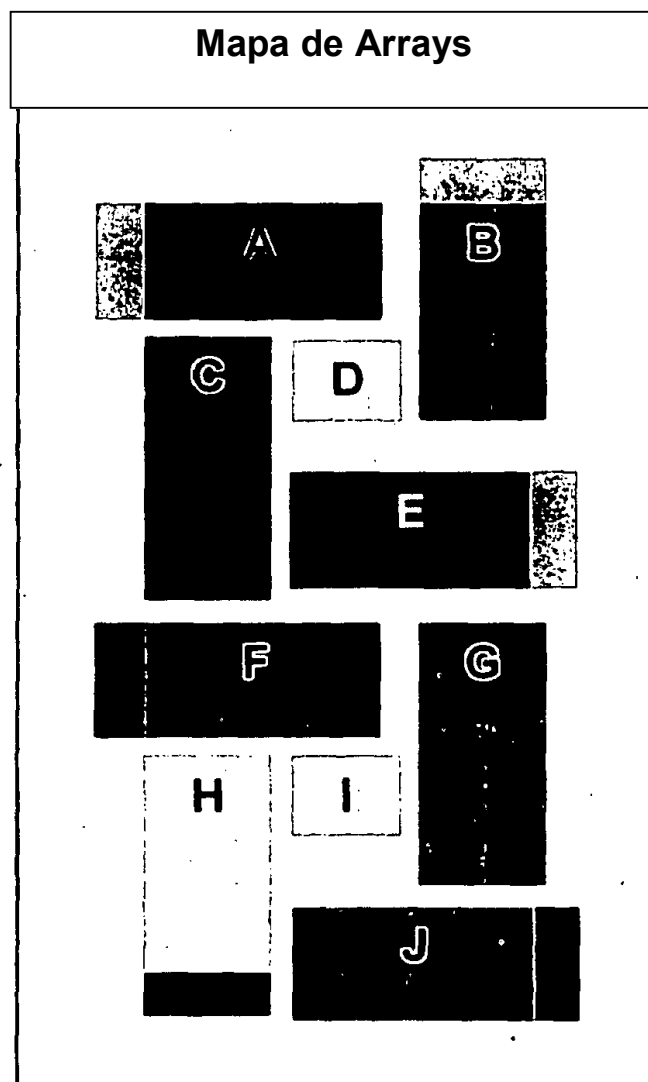
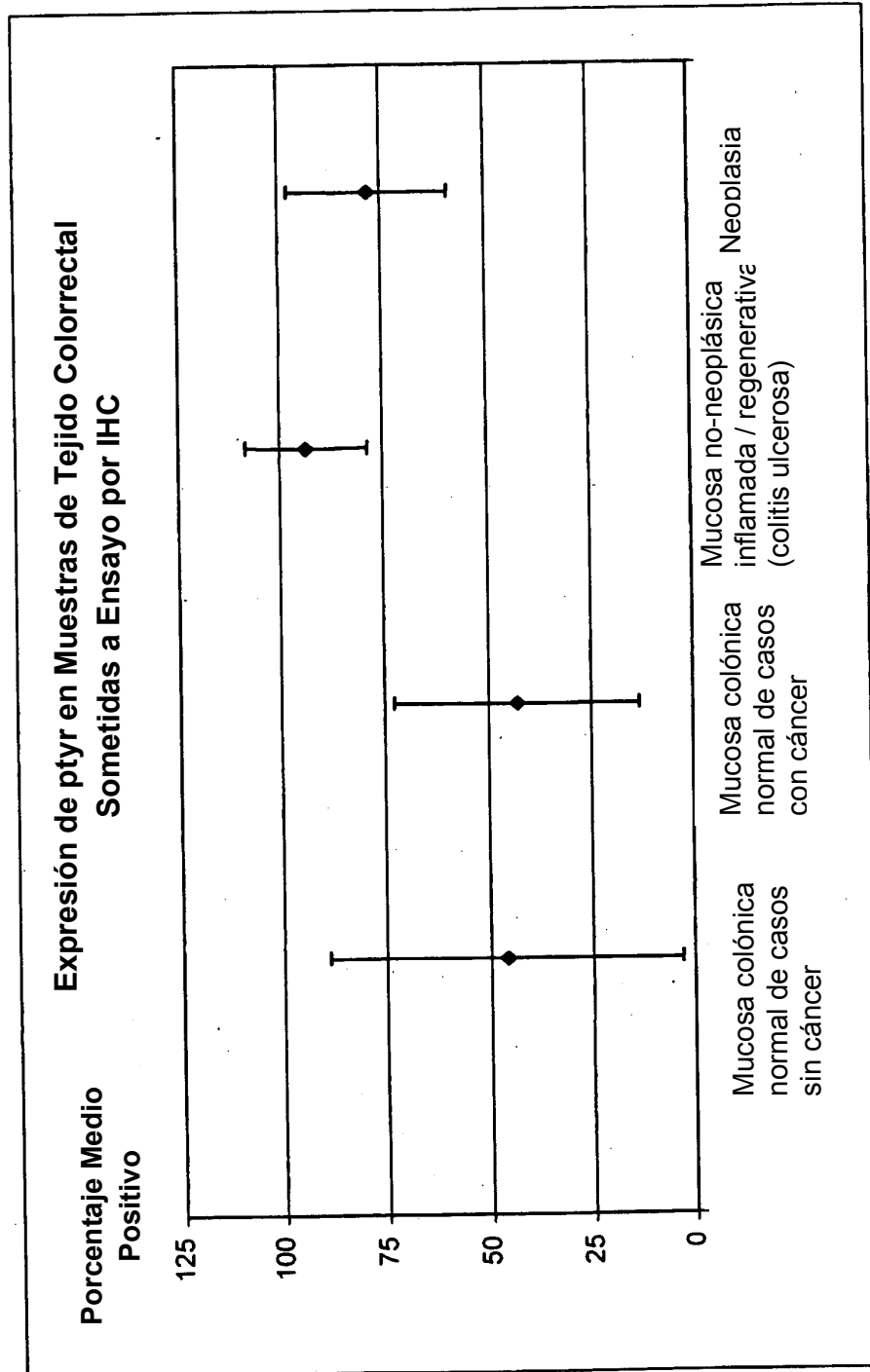


FIGURA 5



Tipo de Tejido

FIGURA 6

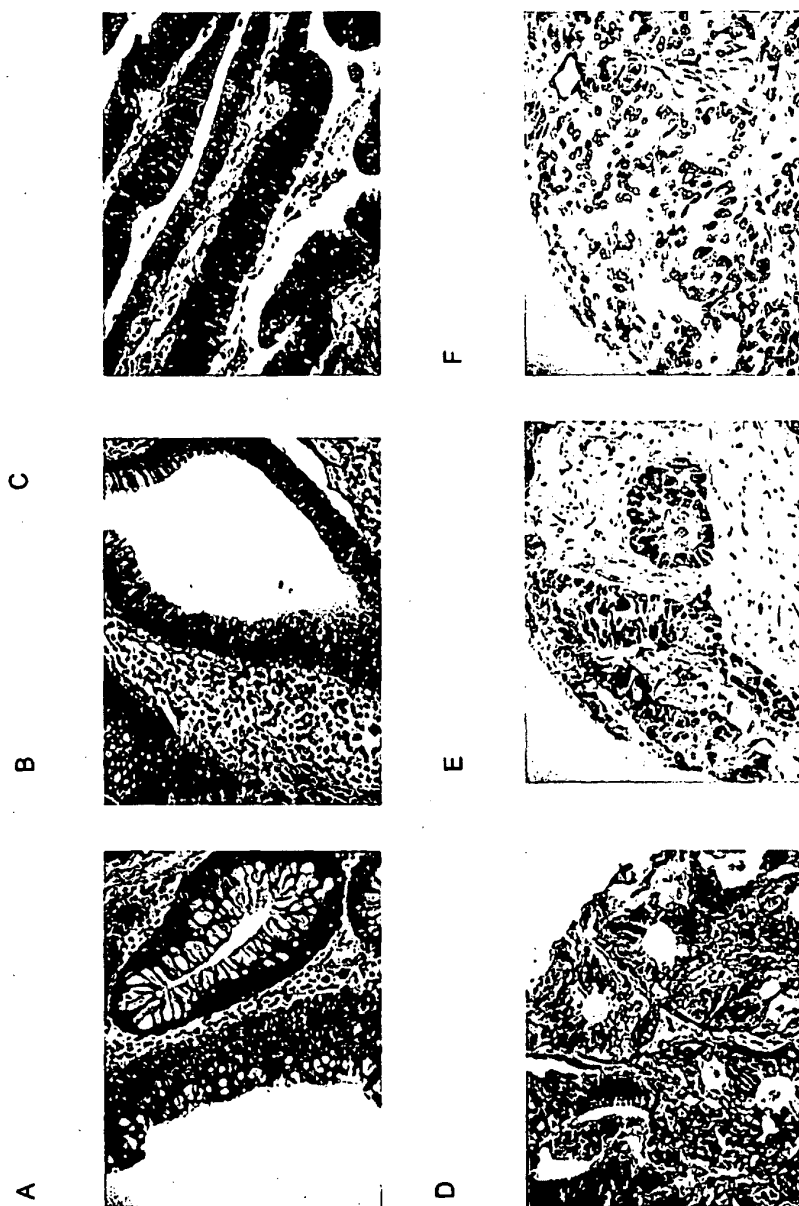


FIGURA 7

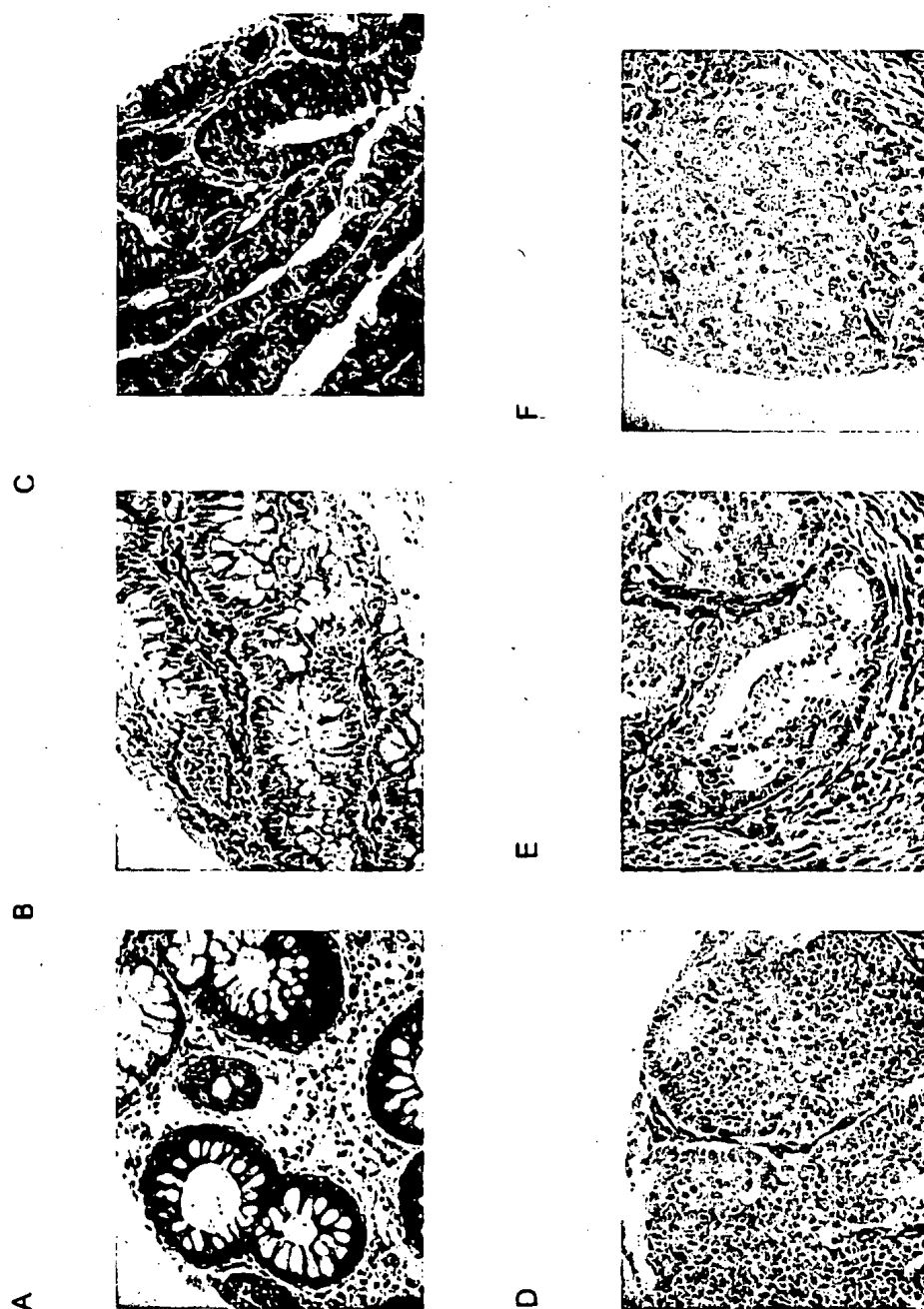


FIGURA 8

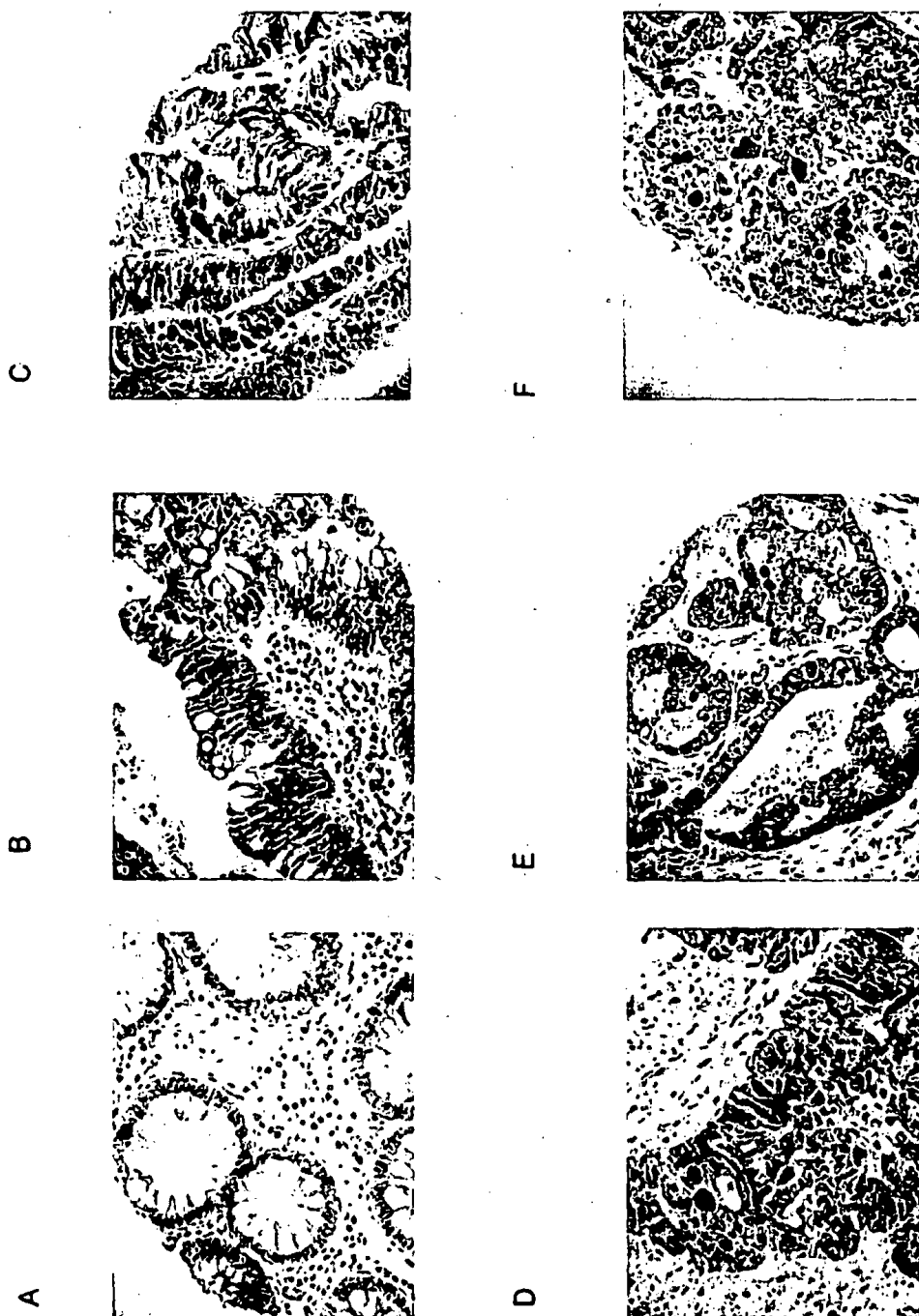


FIGURA 9

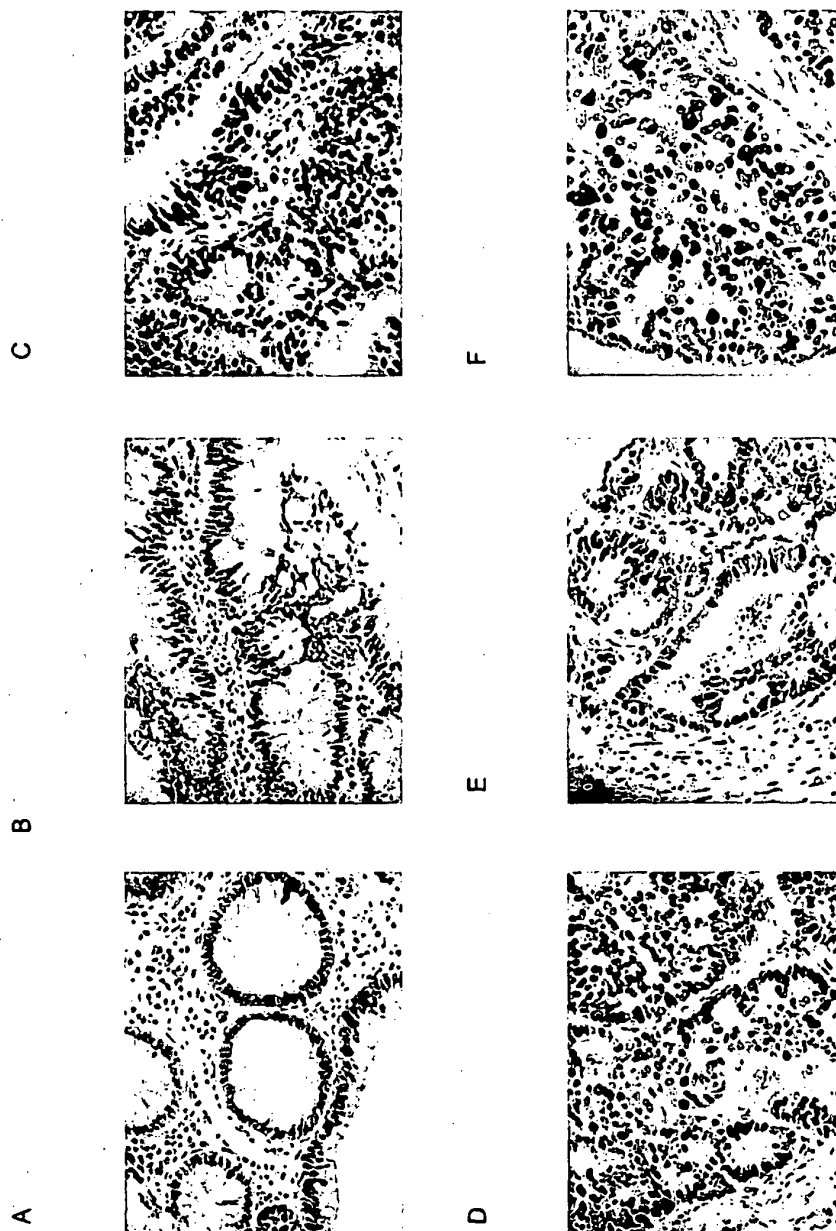


FIGURA 10A

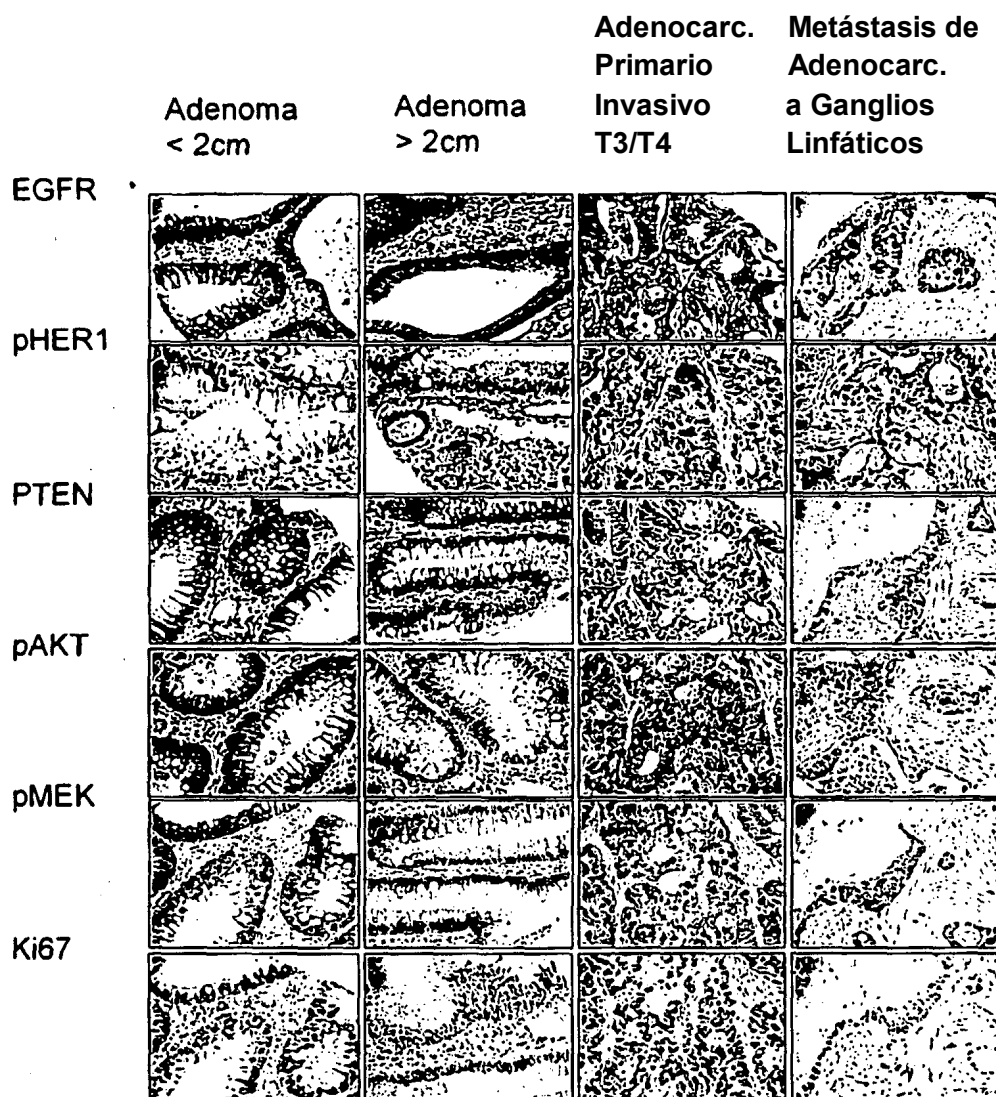


FIGURA 10B

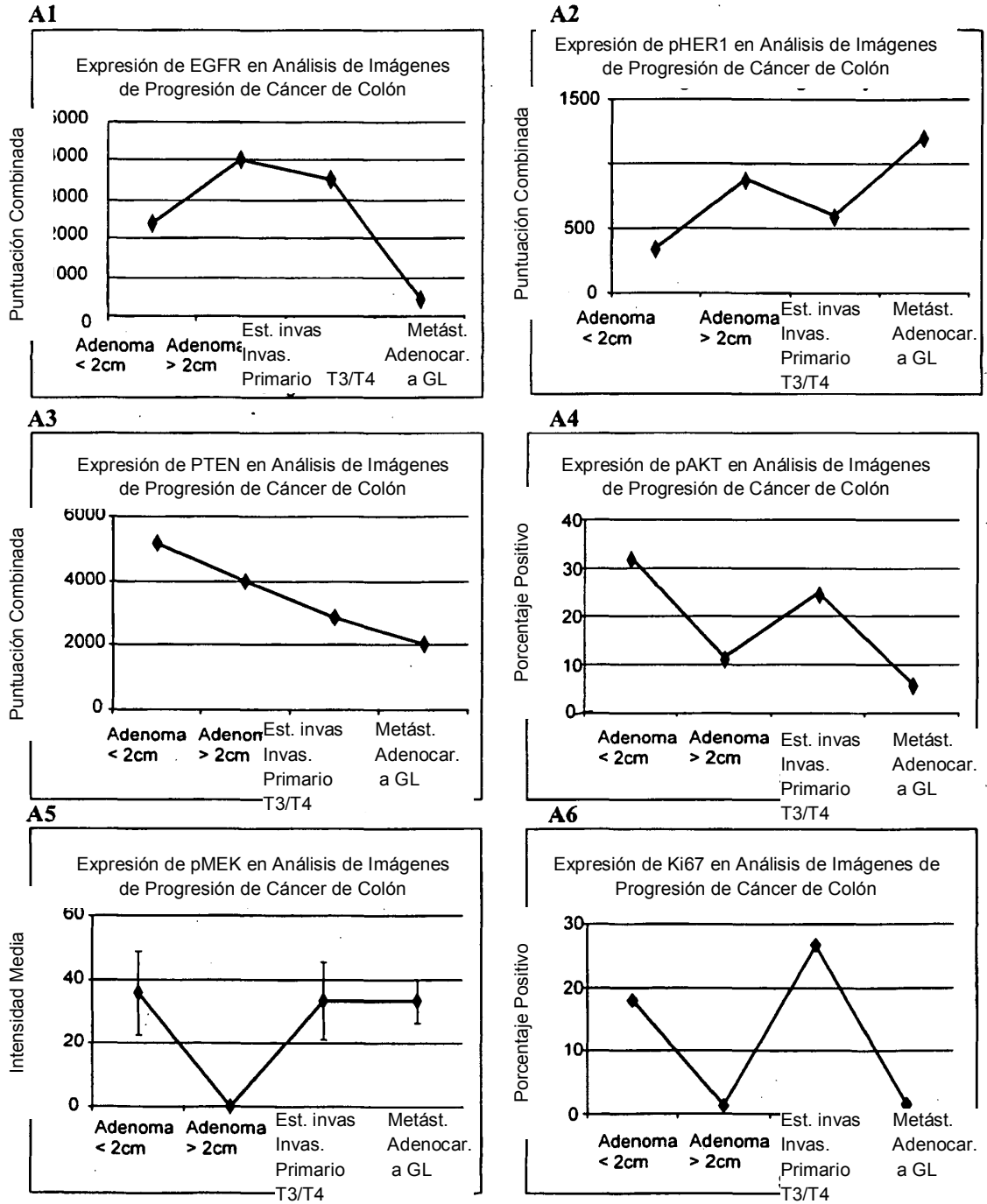


FIGURA 10B

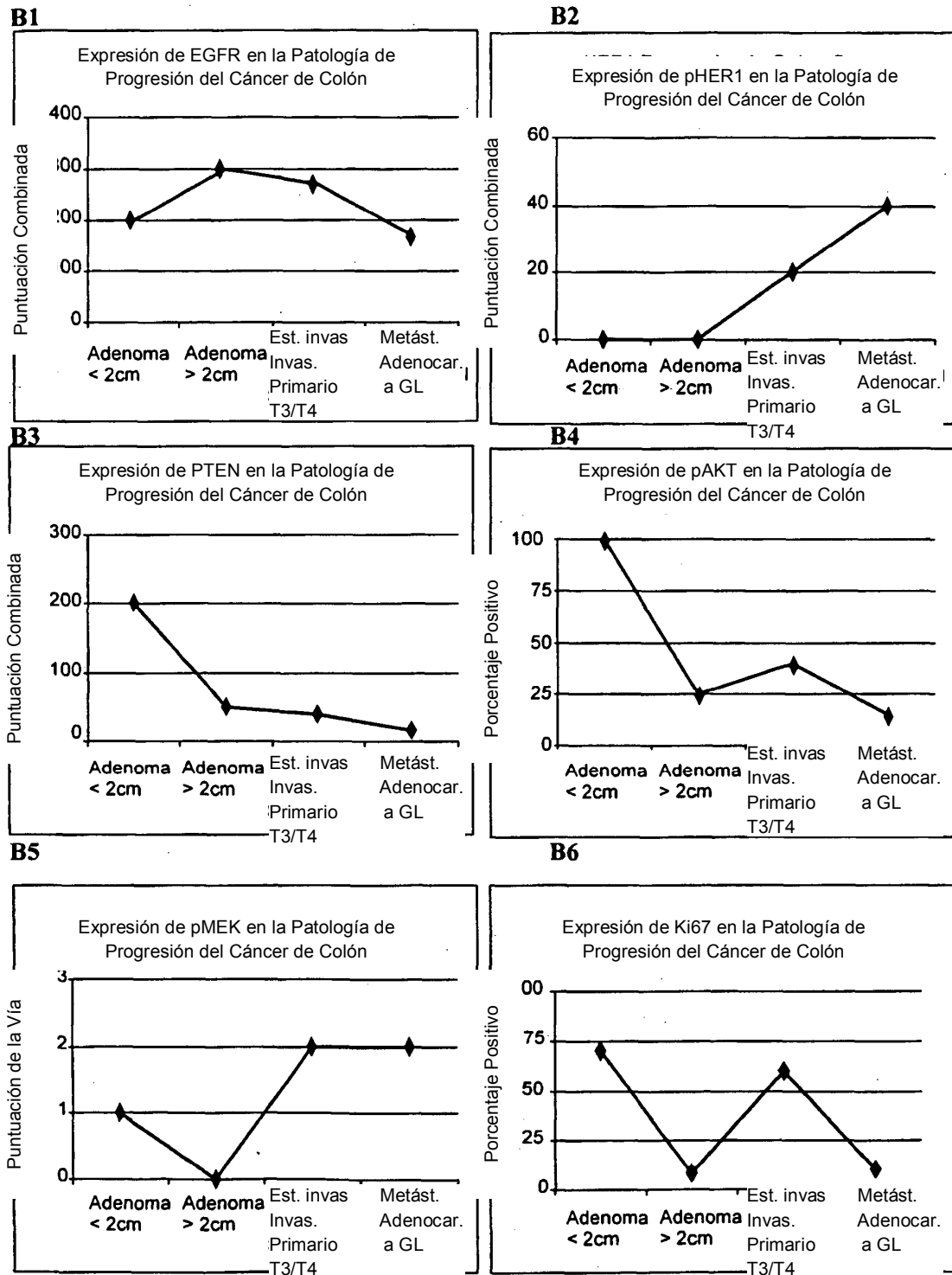


FIGURA 11

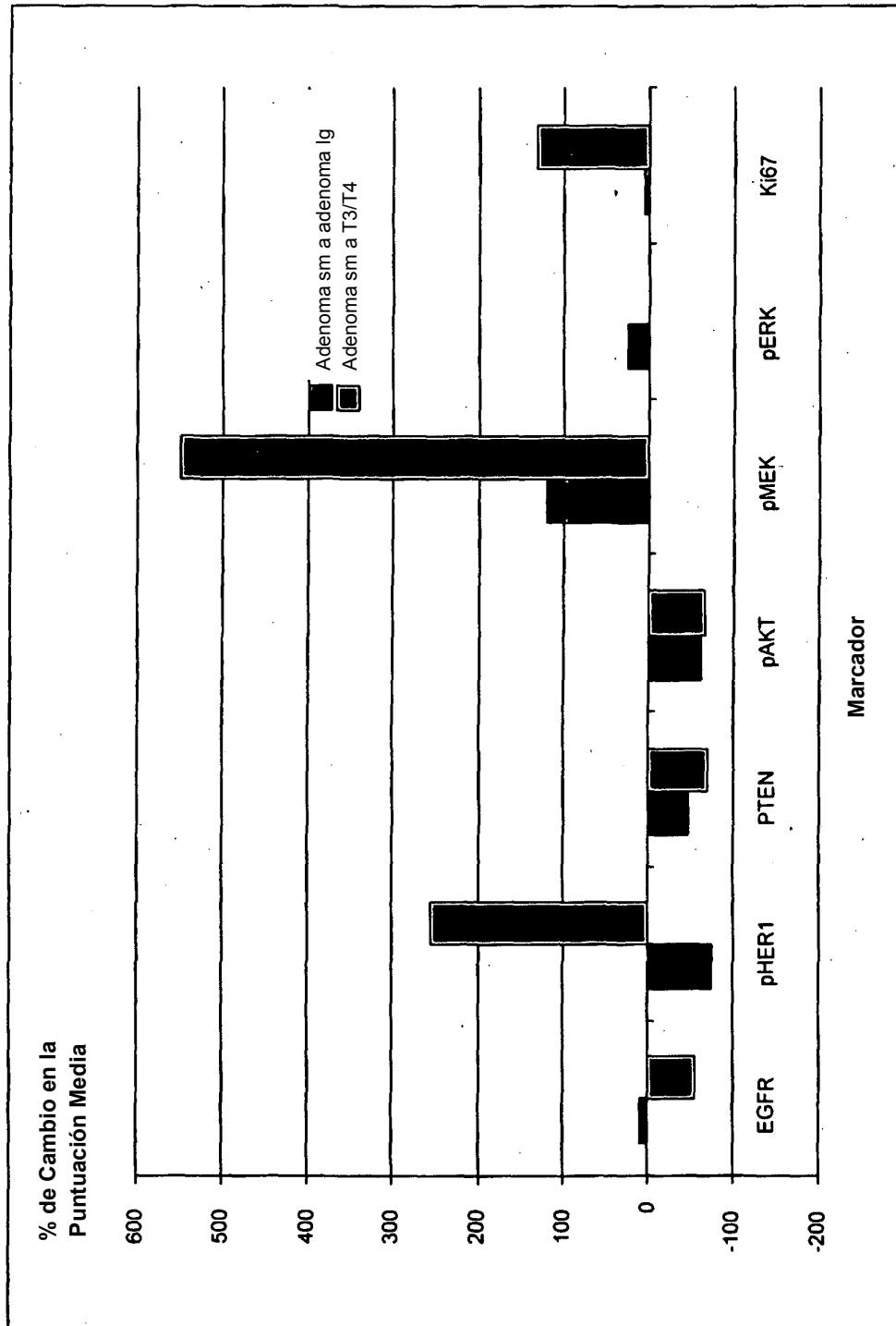


FIGURA 12

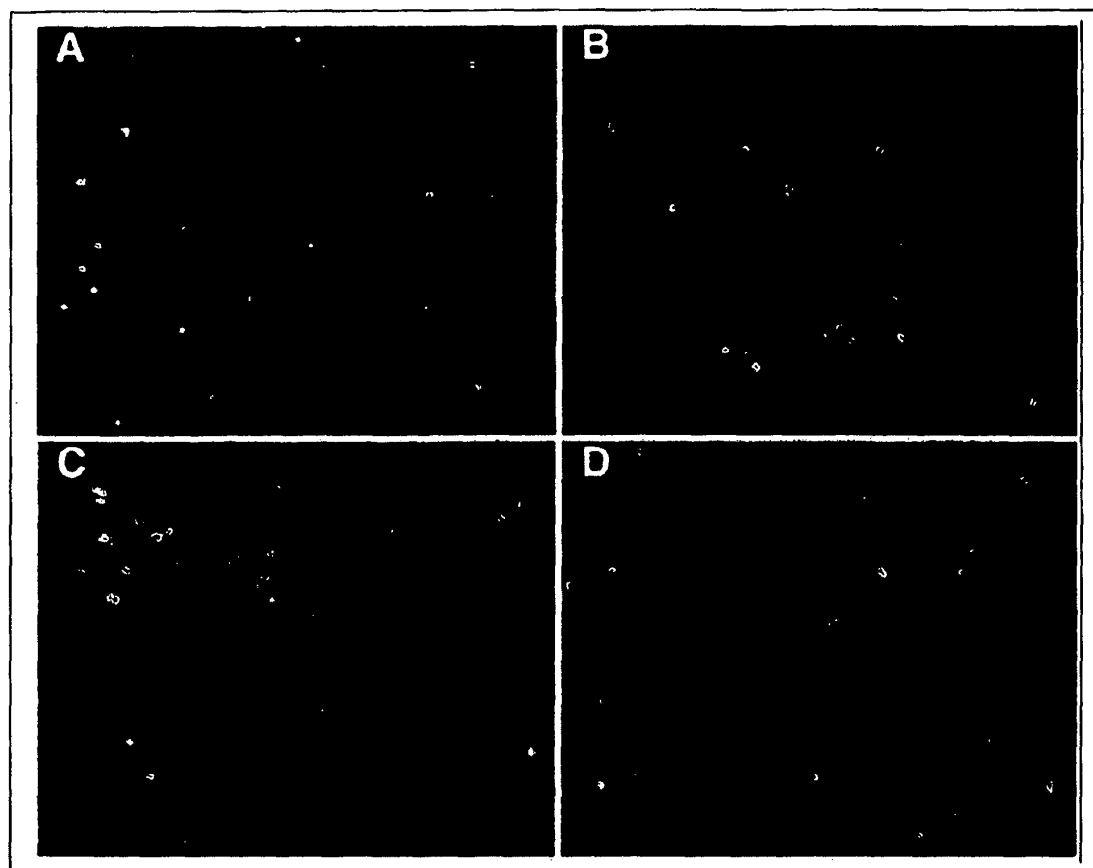


FIGURA 13

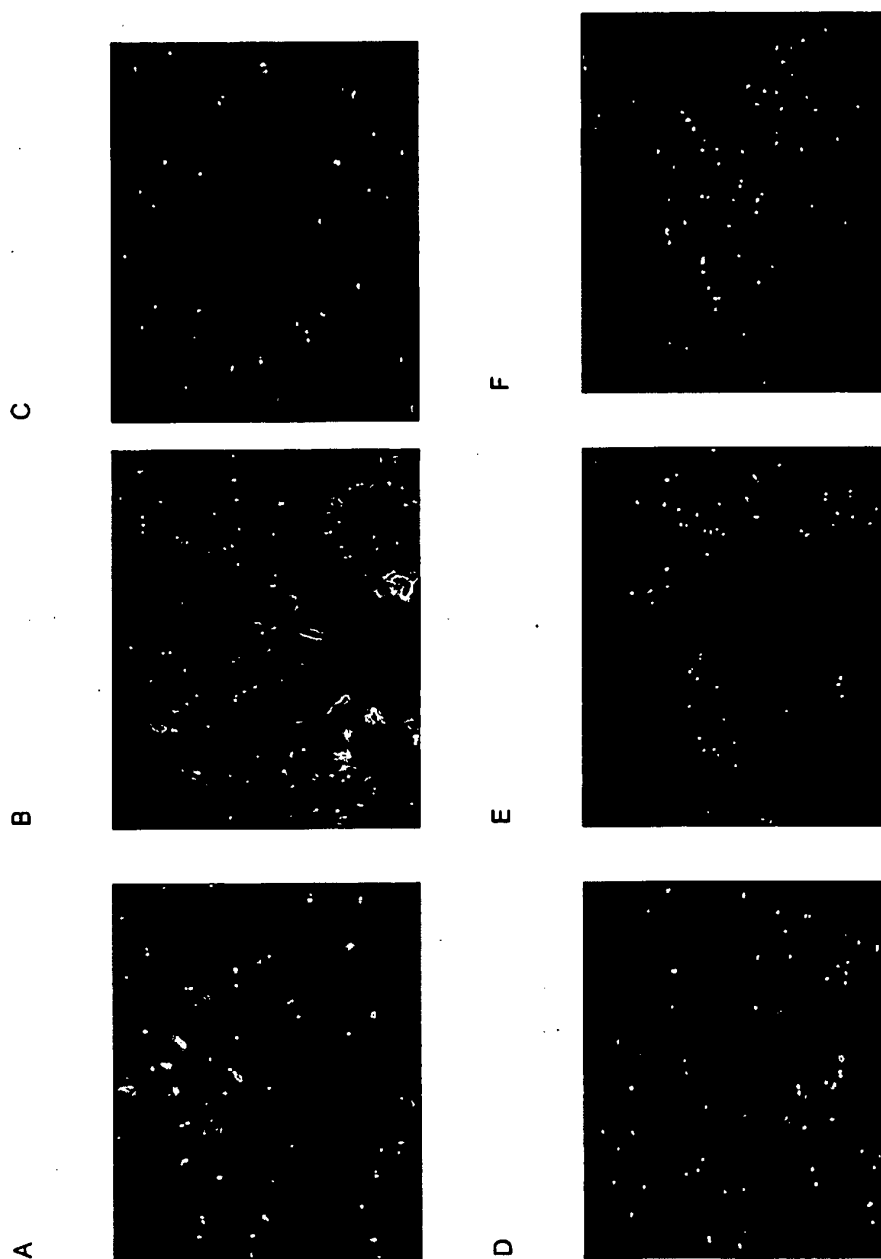


FIGURA 14

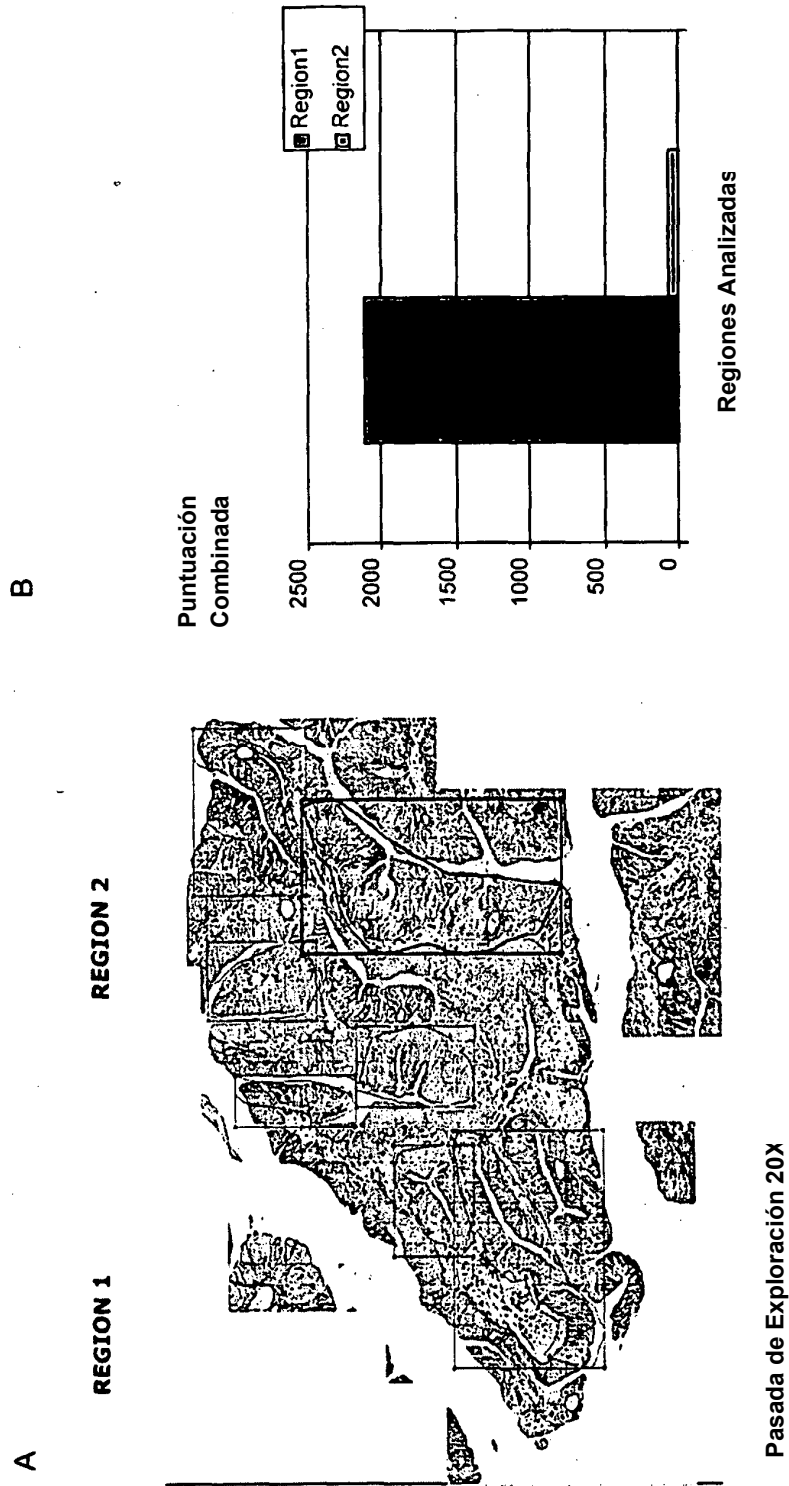


FIGURA 15

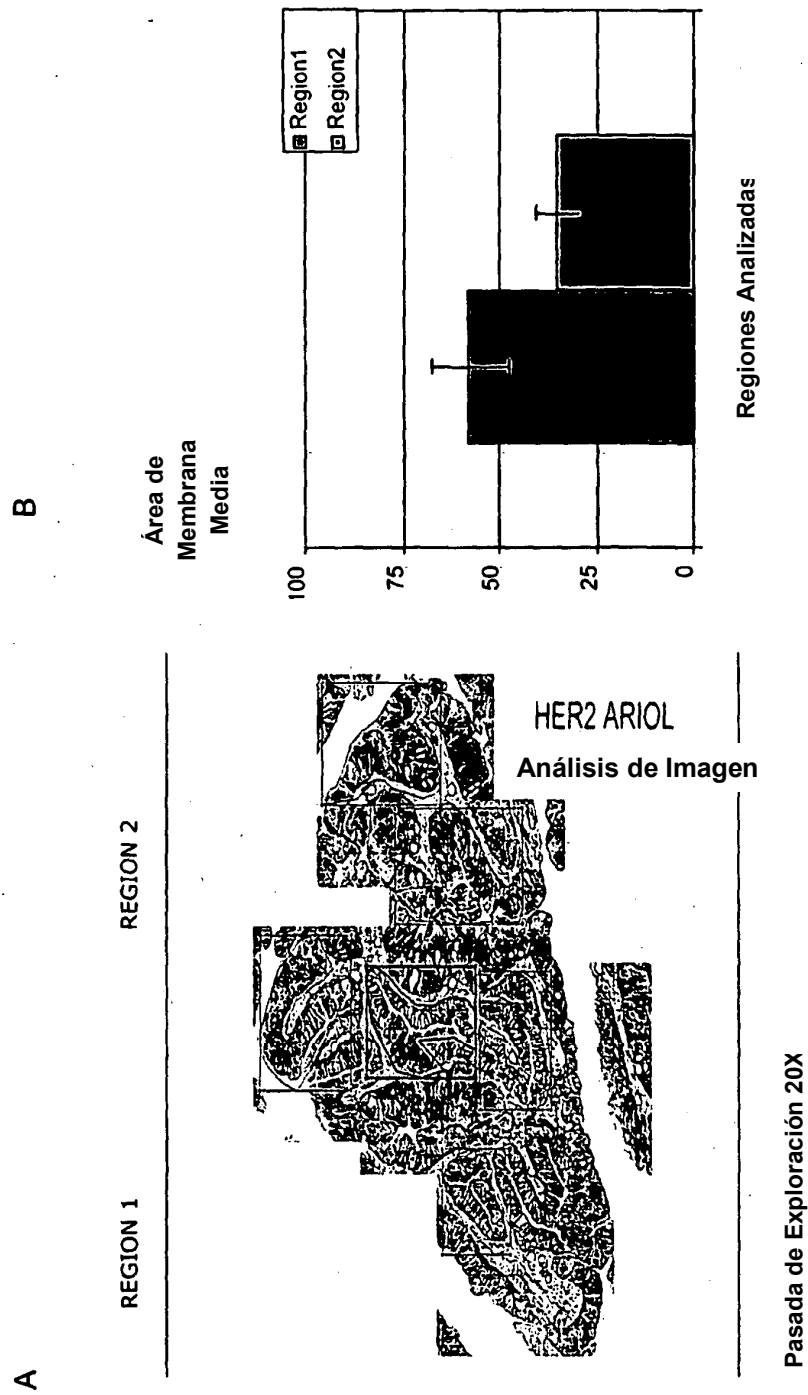


FIGURA 16

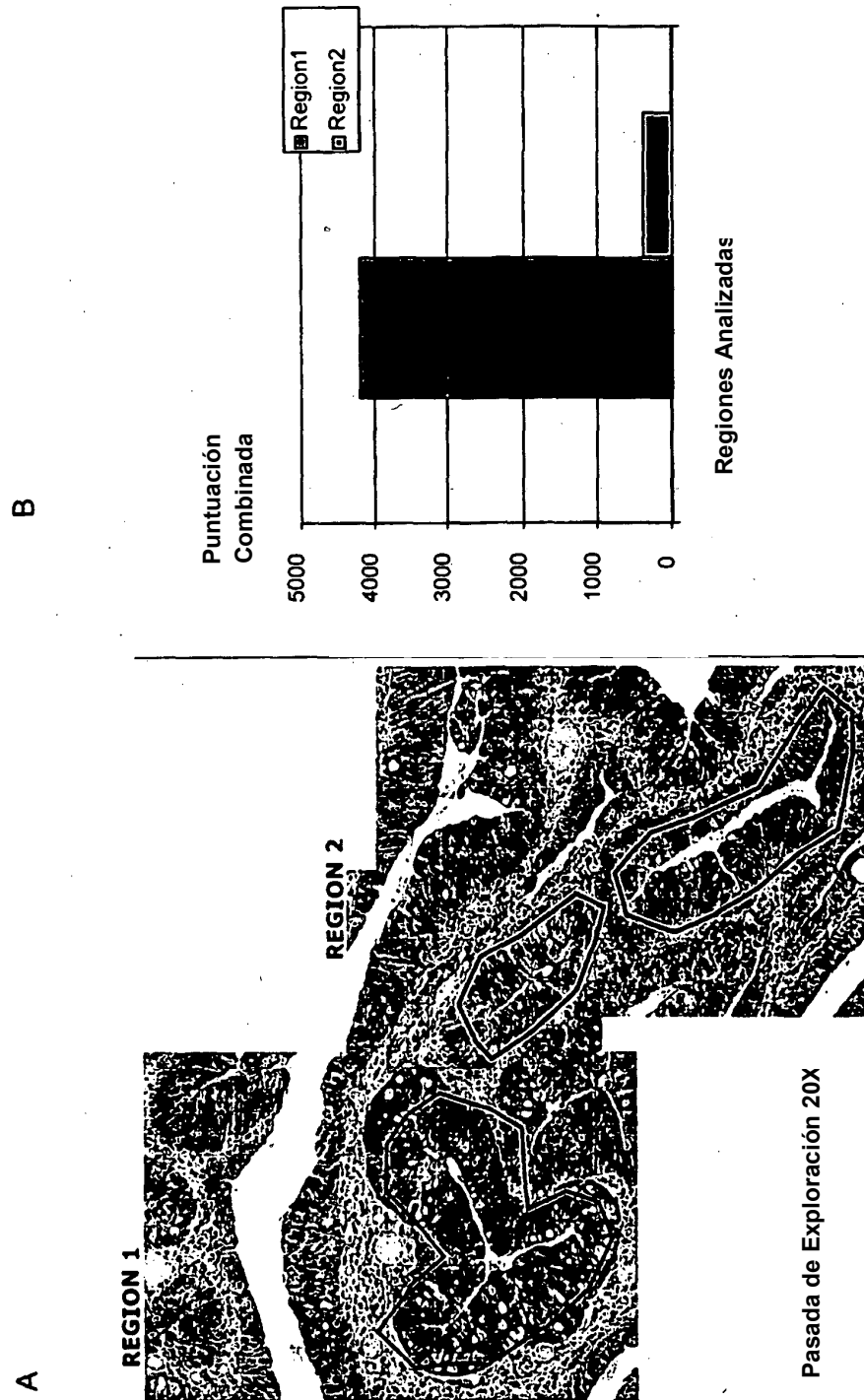


FIGURA 17

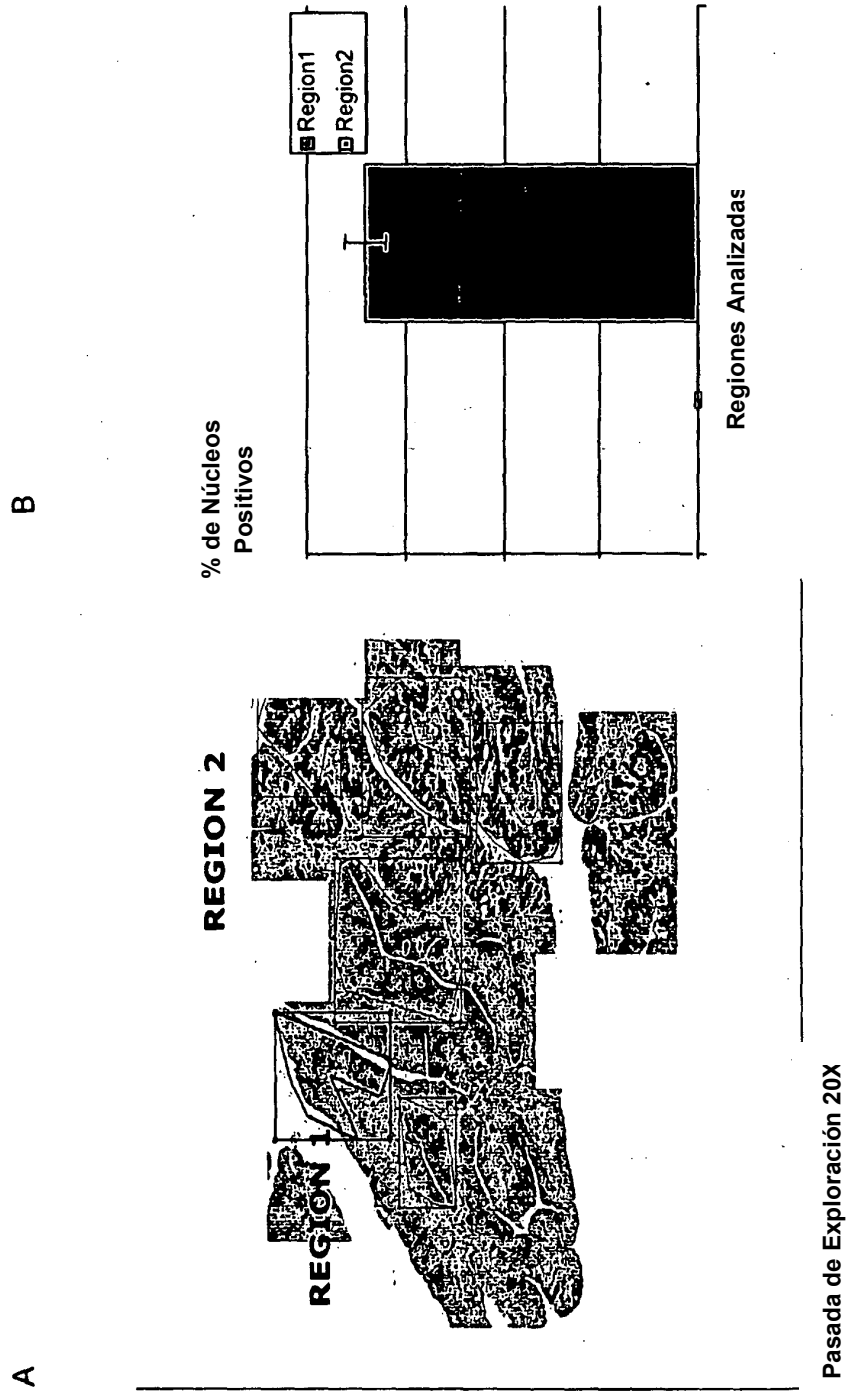


FIGURA 18

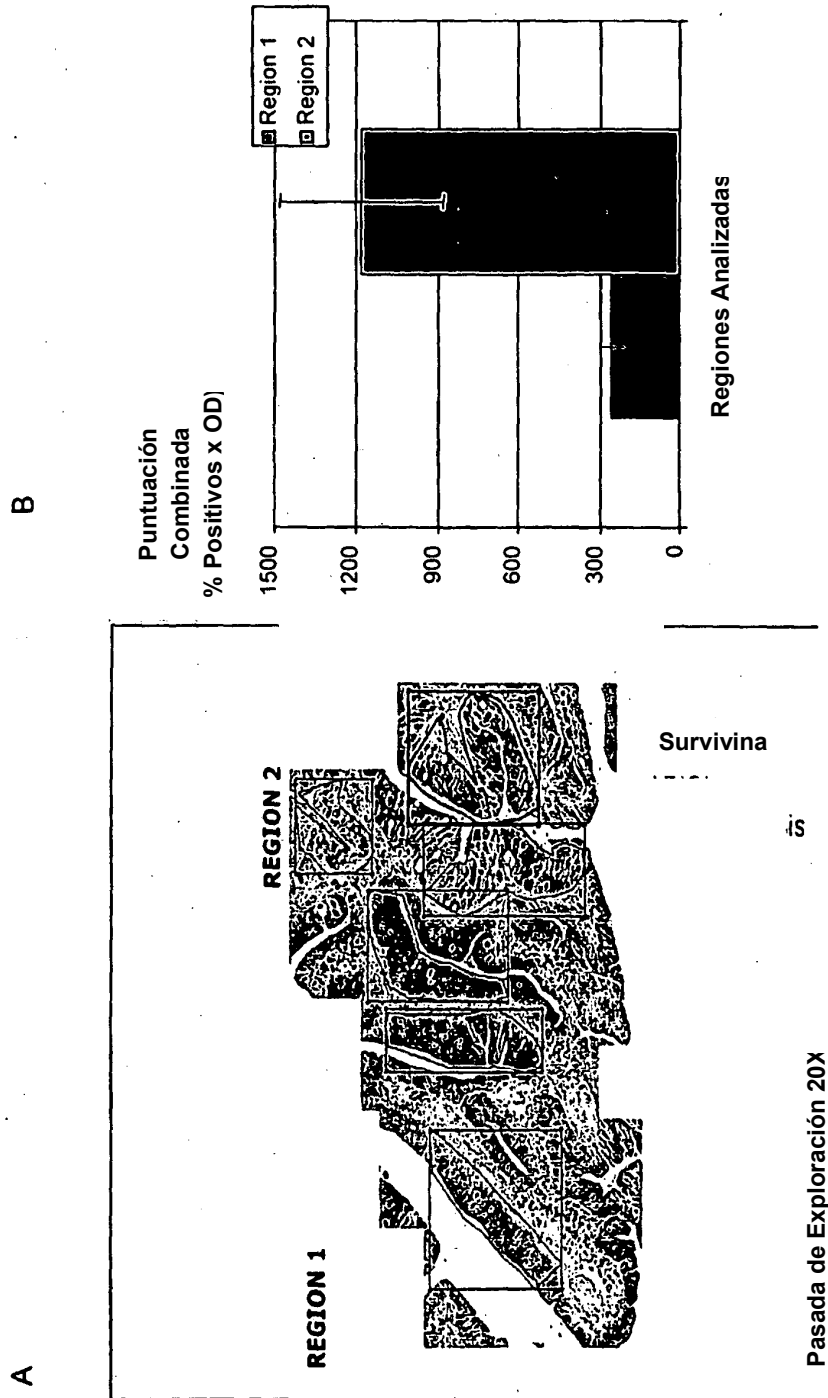


FIGURA 19

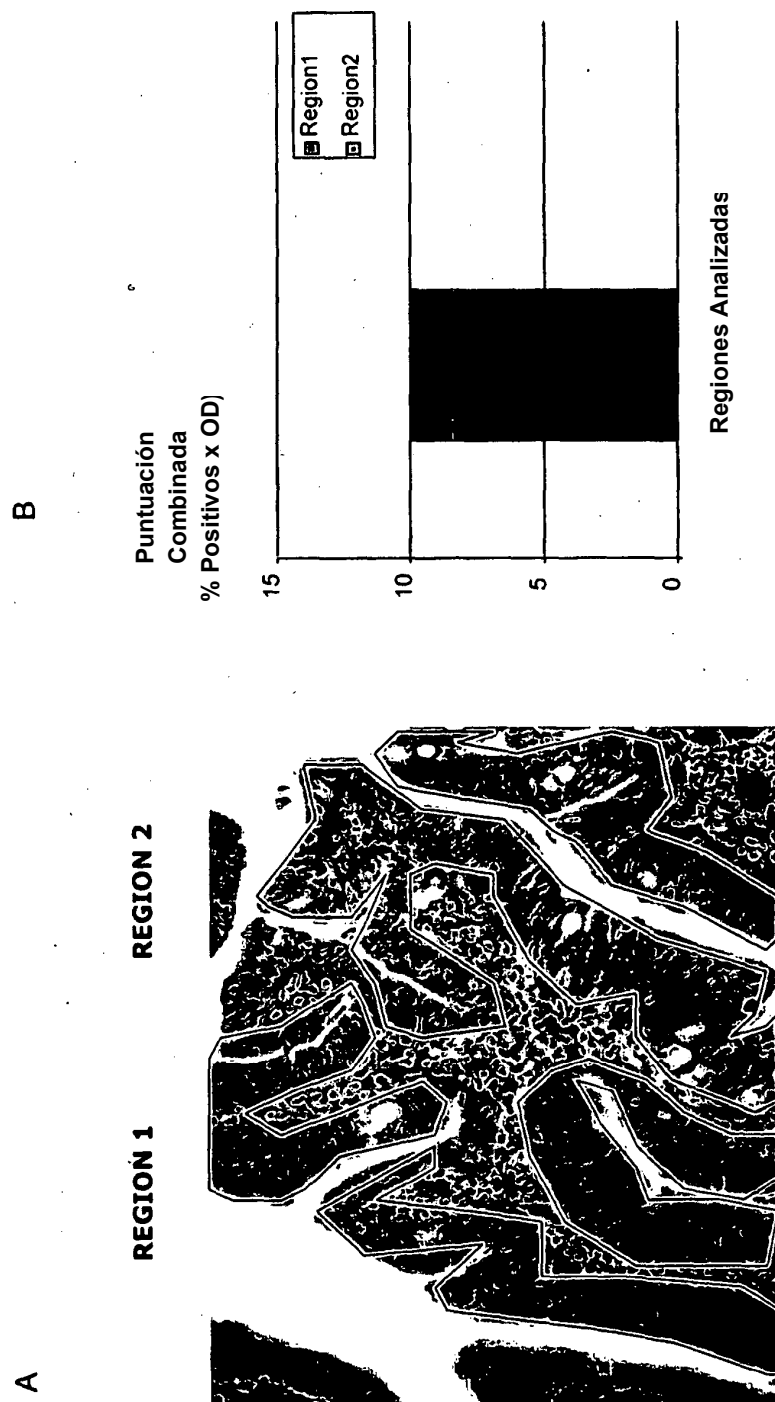


FIGURA 20

