(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 343 840**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04818346 .1**
(96) Fecha de presentación : **04.11.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1682512**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

(54) Título: **Procedimientos inmunohistoquímicos para supervisar los niveles de pERK.**

(30) Prioridad: **04.11.2003 US 517495 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.08.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.08.2010

(73) Titular/es: **Bayer HealthCare L.L.C.**
555 White Plains Road
Tarrytown, New York 10591, US

(72) Inventor/es: **Taylor, Ian y**
Wilhelm, Scott

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Procedimientos inmunohistoquímicos para supervisar los niveles de pERK.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos inmunohistoquímicos para identificar biomarcadores. Por ejemplo, esta invención se refiere al uso de los niveles de fosfo-ERK (pERK) en las células tumorales como un biomarcador para un inhibidor de la quinasa Raf.

Antecedentes de la invención

Muchos estados patológicos se caracterizan por diferencias en los niveles de fosforilación de diferentes proteínas de señalización a través de los cambios en la actividad de proteína quinasas o fosfatasas. Los compuestos que se usan como productos terapéuticos para tratar diferentes enfermedades (p. ej., cáncer) probablemente invierten alguna o todas estas modulaciones del nivel de fosforilación de proteínas. Por lo tanto, el nivel o cambio de nivel de fosforilación de al menos algunas de estas proteínas se puede usar como un procedimiento para controlar o incluso predecir, la eficacia de dichos productos terapéuticos. Como resultado, algunos o todos estos niveles o cambios de nivel de fosforilación de proteínas se puede considerar que son, y se pueden usar como, un biomarcador. Además de usarlos para controlar o predecir la eficacia de un producto terapéutico, los biomarcadores también se pueden usar para seleccionar pacientes que se prevé que responderán positivamente a la administración del producto terapéutico y aquellos que pueden volver a un estado no sensible. El análisis de estos niveles o cambios de nivel de fosforilación de proteínas se puede llevar a cabo en el tejido diana de interés (p. ej., tumor) o en alguna población de células secundarias (p. ej., leucocitos de la sangre periférica). En este último caso, la correlación de los niveles o cambios de nivel de fosforilación de proteínas con la eficacia (p. ej., reducción o no crecimiento del tumor) debe ser especialmente fuerte para usar el patrón del cambio de expresión como un marcador para la eficacia.

La quinasa Raf es una proteína implicada en la ruta de transducción de señales de Ras. Ras regula varias rutas que inducen de forma sinérgica la transformación celular, incluyendo la cascada Raf/Mek/Erk y las rutas de rac y rho. En particular, Ras activa la ruta de Raf/MEK localizando primero Raf en la membrana plasmática, donde Raf inicia una cascada de quinasas mitógenas (Hall, *Science* 264:1413-1414, 1994). Raf activado fosforila y activa MEK (un sustrato conocido secuencia abajo), que a su vez fosforila y activa ERK. Después, la ERK activada se transloca del citoplasma al núcleo y modula la expresión de genes a través de la fosforilación de factores de transcripción. Por lo tanto, la activación de la quinasa Raf, por activación de Ras, se considera un mecanismo importante por el cual se desarrolla el cáncer humano.

Una serie de estudios han sugerido que la inhibición de la quinasa Raf es una diana importante para la terapia del cáncer. Por ejemplo, los mutantes negativos dominantes de la actividad de Raf, MEK o ERK reducen significativamente la capacidad transformante de Ras mutante en un contexto de fibroblastos de roedor. Además, las líneas de células tumorales humanas que expresan una MEK negativa dominante, eran deficientes en su capacidad para crecer tanto en cultivo tisular como en ensayos de crecimiento de anclaje independientes, comparado con la línea celular original. Dichos mutantes también inhibían tanto el crecimiento primario como metastático de xenoinjertos de tumores humanos *in vivo*. Un apoyo adicional para dirigirse a la quinasa Raf viene del trabajo con oligonucleótidos antisentido. Se encontró que ISIS 5132, un oligonucleótido antisentido fosforotioato diseñado para dirigirse a c-Raf, inhibía el crecimiento del xenoinjerto de pulmón humano A549 *in vivo* (Monia, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci* 93:15481-15484, 1996). Cuando se consideran juntos, estos datos sugieren que la proteína quinasa Raf es un contribuyente significativo del fenotipo maligno dirigido por la señalización de Ras activado. Además, los datos también sugieren que las moléculas pequeñas inhibidoras de la actividad de la quinasa raf serán un mecanismo terapéutico importante en el tratamiento del cáncer.

Sin embargo, debido a la red de receptores de factores de crecimiento, ligandos y moléculas efectoras de la proliferación celular y supervivencia celular corriente abajo, la inhibición de quinasas específicas puede no ser una estrategia terapéutica eficaz en todos los individuos con cáncer, ya que pueden existir diferentes rutas compensatorias para superar la inhibición terapéutica. Por consiguiente, será útil identificar marcadores biológicos que indiquen, en un paciente individual, si el tumor del paciente está respondiendo a una intervención terapéutica particular. Aunque tradicionalmente se ha usado el tamaño del tumor o la evolución de la enfermedad para determinar si un individuo estaba respondiendo a una terapia particular, el uso de marcadores moleculares puede permitir la identificación más temprana de los pacientes que responden y los que no responden. Así pues, a los pacientes que no responden se les puede ofrecer una terapia alternativa, y ahorrarse los potenciales efectos secundarios de una terapia que no es eficaz para su tumor específico.

Sería útil identificar uno o más o una combinación de marcadores moleculares capaces de indicar si el tumor de un individuo responde al tratamiento (p. ej., tratamiento con un inhibidor de la quinasa Raf). Dichos marcadores ayudarían (i) a identificar en que marco clínico y que poblaciones de pacientes es más probable que el procedimiento terapéutico sea eficaz, y (ii) a evaluar, en pacientes individuales, si el tumor del paciente está respondiendo a un tratamiento específico.

Puesto que el tejido normal tiene un aspecto característico, a menudo se usa el examen histológico para identificar el tejido enfermo. La inmunohistoquímica (IHC) es una herramienta útil en el diagnóstico histológico. La IHC se puede usar para detectar una entidad en una muestra usando agentes de unión específicos capaces de unirse a la entidad detectable. El agente de unión específico puede comprender un anticuerpo, y la entidad detectable puede comprender un polipéptido, proteína o epítopo. La capacidad creciente de dichos anticuerpos puede ayudar al diagnóstico diferencial del tejido enfermo y normal. Los procedimientos IHC los describen con detalle Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual).

Las técnicas de IHC requieren una serie de etapas que se pueden llevar a cabo en una sección de tejido montada en un portaobjetos de vidrio u otro soporte plano. Algunos indicadores morfológicos de estados patológicos pueden destacarse mediante tinción selectiva. Por ejemplo, se toma una muestra de un paciente y después se fija y se expone a anticuerpos contra un antígeno de interés. Pueden ser necesarias etapas de procesamiento adicionales, por ejemplo, recuperación del antígeno, exposición a anticuerpos secundarios (normalmente acoplados a una enzima adecuada) y a sustratos enzimáticos cromogénicos, para poner de manifiesto el patrón de unión del antígeno.

En general, hay dos categorías de materiales histológicos: (a) preparaciones que comprenden tejidos y/o células recientemente obtenidos, que no se fijan con fijadores basados en aldehído, y (b) muestras de tejido insertadas y fijadas, a menudo material de archivo. Se conocen muchos procedimientos para fijar e insertar muestras de tejido (p. ej., fijación en alcohol). Sin embargo, la técnica de fijación/inserción más ampliamente usada, usa la fijación con formalina y posterior inserción en parafina (FFPE). Un procedimiento de tinción IHC de FFPE típico puede implicar las etapas de: corte y recorte tejido, fijación, deshidratación, infiltración en parafina, corte en secciones finas, montaje sobre portaobjetos de vidrio, horneado, desparafinización, rehidratación, recuperación del antígeno, etapas de bloqueo, aplicación de anticuerpo primario, lavado, aplicación de conjugado de anticuerpo secundario-enzima, lavado, aplicación de sustrato cromógeno enzimático, lavado, tinción de contraste, deslizamiento de la cubierta y examen al microscopio.

Como se ha descrito antes, la fosforilación de ERK es corriente abajo de la ruta de ras/raf/MEK/ERK. En el carcinoma de células renales (CCR), están presentes niveles mayores de proteínas raf y ERK fosforiladas (es decir, activadas) aproximadamente el 50% del tiempo (Oka, y col., *Cancer Res*. 55:4182-4187, 1995). Como tal, los pacientes con ERK fosforilada elevada tienen más probabilidad de beneficiarse del tratamiento con un inhibidor de quinasa Raf que los pacientes cuya ruta ras/raf/ERK no está favorecida. Con el fin de evaluar este efecto, se puede analizar en una muestra de biopsia de tumor los niveles de pERK usando inmunohistoquímica cuantitativa o semicuantitativa.

Resumen de la invención

La presente invención se dirige a procedimientos inmunohistoquímicos para identificar biomarcadores. Por ejemplo, esta invención se refiere al uso de los niveles de fosfo-ERK (pERK) en células tumorales como un biomarcador para un inhibidor de la quinasa Raf.

Una realización de la presente invención es un procedimiento para evaluar en un sujeto que necesita tratamiento para un tumor, si es probable que el sujeto presente una respuesta clínica favorable a dicho tratamiento por un procedimiento que comprende determinar el nivel previo al tratamiento de pERK en el tumor.

Otra realización de la presente invención es un procedimiento para evaluar en un sujeto que necesite tratamiento para un tumor, si es probable que el sujeto presente una respuesta clínica favorable a dicho tratamiento, determinando el nivel previo al tratamiento de pERK en el tumor, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de quinas Raf y determinando el nivel de pERK en el tumor después de un periodo inicial de tratamiento con el agente terapéutico. Una disminución del nivel de pERK indica que es más probable que el sujeto presente una respuesta clínica favorable al tratamiento, comparado con un sujeto sin cambio o con un aumento de los niveles de pERK.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para seleccionar los efectos de un fármaco, por ejemplo, un inhibidor de quinasa Raf en una muestra de tejido o célula, que comprende la etapa de analizar los niveles de pERK en las células tumorales, en el que los niveles de pERK en las células tumorales en el tejido o muestra de células se analizan antes y después de la exposición al fármaco, y una variación de los niveles de pERK en las célula tumorales es indicativo de un efecto del fármaco o proporciona un diagnóstico de paciente o predice la respuesta de un paciente al tratamiento.

Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento para distinguir entre estados patológicos y normales que comprende la etapa de analizar los niveles de pERK en las células tumorales, en el que se analizan los niveles de pERK de los tejidos normales y enfermos, y una variación de los niveles de pERK en las células tumorales es indicativo de un estado patológico.

La presente invención también proporciona un procedimiento para proporcionar un diagnóstico del paciente, que comprende la etapa de analizar los niveles de pERK en las células tumorales, en el que se analizan los niveles de pERK de muestras normales y del paciente, y una variación de los niveles de pERK en las células tumorales en la muestra del paciente es un diagnóstico de una enfermedad. Las muestras del paciente incluyen, pero sin limitar, sangre, líquido amniótico, plasma, semen, médula ósea y biopsia de tejido.

La invención también proporciona un procedimiento para la selección de pacientes que comprende la etapa de analizar los niveles de pERK en células tumorales, en el que se analizan los niveles de pERK de muestras del paciente, y los niveles de pERK de células tumorales en la muestra del paciente son pronóstico de la respuesta de este paciente a un inhibidor de quinasa Raf. Las muestras de pacientes incluyen, pero sin limitar, sangre, líquido amniótico, plasma, semen, médula ósea y biopsia de tejido. Los niveles de pERK en las células tumorales pueden considerarse entonces un biomarcador de la eficacia de un inhibidor de quinasa Raf.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para descubrir nuevos fármacos, que comprende la etapa de analizar los niveles de pERK en las células tumorales, en el que se analizan los niveles de pERK antes y después de la exposición al fármaco, y una variación de los niveles de pERK en las células tumorales es indicativa de la eficacia del fármaco. Los niveles de pERK en las células tumorales se pueden considerar entonces un biomarcador de la eficacia de un inhibidor de quinasa Raf.

Otra realización de la presente invención es un kit de diagnóstico. Por ejemplo, el kit de diagnóstico puede contener fotomicrografías de diferentes grupos de células con diferentes niveles de tinción. El kit también puede contener una indicación de que un grupo particular de células representa un punto de corte o umbral, siendo "positivas" las células que se corresponden o superan esta tinción, y "negativas" las células que tienen menos tinción. Los kits también pueden contener muestras reales de tejidos o células, que ya están teñidos en portaobjetos de control. Por ejemplo, un kit puede incluir varios portaobjetos de referencia con secciones de líneas de células de carcinoma de mama que representan diferentes niveles de la expresión de una proteína de mama específica.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica de Kaplan-Meier del porcentaje de pacientes que no han evolucionado en función del tiempo frente a la evolución en pacientes con una intensidad de tinción de pERK máxima de 0 y 1+ o 2 a 4+.

Descripción de la invención

Hay que entender que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales, construcciones y reactivos particulares descritos y como tales pueden variar. También hay que entender que la terminología usada en el presente documento tiene solo el propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

Debe observarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen la referencia plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una proteína" es una referencia a una o más proteínas e incluye equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, etc.

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente el experto en la materia a la que pertenece esta invención. Se pueden usar cualesquiera procedimientos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en la práctica o ensayo de la invención.

Definiciones

Por conveniencia, a continuación se proporciona el significado de determinados términos y expresiones usados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

La expresión "una célula normal correspondiente a" o "célula normal que corresponde a" o "célula normal homóloga de" una célula enferma se refiere a una célula normal del mismo tipo que la de la célula enferma. Por ejemplo, una célula normal correspondiente de una célula de linfoma B es un linfocito B.

El término "agonista", tal como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a un agente que imita o favorece (p. ej. potencia o complementa) la bioactividad de una proteína. Un agonista también puede ser una proteína salvaje o un derivado de la misma que tiene al menos una bioactividad de la proteína salvaje. Un agonista también puede ser un compuesto que favorece la expresión de un gen o que aumenta al menos una bioactividad de una proteína. Un agonista también puede ser un compuesto que aumenta la interacción de un polipéptido con otra molécula, por ejemplo, un péptido diana o ácido nucleico.

"Antagonista", tal como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a un agente que reduce (p. ej., suprime o inhibe) al menos una bioactividad de una proteína. Por ejemplo, un inhibidor de la quinasa Raf es un ejemplo de dicho antagonista. Un antagonista puede ser un compuesto que inhibe o disminuye la interacción entre una proteína y otra molécula, por ejemplo, un péptido diana o sustrato enzimático. Un antagonista también puede ser un compuesto que reduce la expresión de un gen o que reduce la cantidad de proteína expresada presente.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se pretende que incluya anticuerpos enteros, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), e incluye fragmentos de los mismos que también son específicamente reactivos con una proteína de vertebrado (p. ej., mamífero). Los anticuerpos se pueden fragmentar usando

técnicas convencionales y los fragmentos se pueden seleccionar de acuerdo con su utilidad de la misma forma descrita antes para anticuerpos enteros. Por lo tanto, el término incluye segmentos de partes de una molécula de anticuerpo proteolíticamente escindido o preparado de forma recombinante, que son capaces de reaccionar de forma selectiva con una proteína determinada. Los ejemplos no limitantes de dichos fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')2, Fab', Fv, y anticuerpos de cadena sencilla (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unido por un conector peptídico. Los scFv' se pueden unir de forma covalente o no covalente para formar anticuerpos que tienen dos o más sitios de unión. La presente invención incluye preparaciones policlonales, monoclonales, humanizadas u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes.

"Actividad biológica", "bioactividad", "actividad" o "función biológica", que se usan de forma intercambiable, en la presente invención significan una función efectora o antigénica que es realizada directa o indirectamente por un polipéptido (sea en su conformación nativa o desnaturalizada) o por cualquier secuencia del mismo. Las actividades biológicas incluyen la unión a polipéptidos, unión a otras proteínas o moléculas, actividad como una proteína de unión a ADN, como un regulador de la transcripción, capacidad para unirse a ADN dañado, etc. Una bioactividad se puede modular afectando directamente al polipéptido objeto. Alternativamente, una bioactividad se puede alterar modulando el nivel del polipéptido, tal como modulando la expresión del gen correspondiente.

La expresión "muestra biológica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra obtenida de un organismo o de componentes (p. ej., células) del organismo. La muestra puede ser cualquier tejido o fluido biológico. La muestra puede ser una "muestra clínica" que es una muestra obtenida de un paciente. Dichas muestras incluyen, pero sin limitar, esputo, sangre, células sanguíneas (p. ej., leucocitos), tejido o muestras de biopsia con aguja fina, orina, líquido peritoneal, líquido pleural o células de los mismos. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones congeladas obtenidas para propósitos histológicos.

Los términos "biomarcador" o "marcador" abarcan un amplio intervalo de sucesos intra y extracelulares, así como cambios fisiológicos de organismos enteros. Los biomarcadores pueden representar esencialmente cualquier aspecto de la función celular, por ejemplo, pero sin limitar, niveles o tasas de producción de moléculas de señalización, factores de transcripción, metabolitos, transcritos génicos, así como modificaciones postraduccionales de proteínas. Los biomarcadores pueden incluir el análisis de genoma entero de niveles transcritos o análisis de proteoma entero de niveles de proteína y/o modificaciones.

El término "biomarcador" se refiere a un gen o producto génico (p. ej., proteína) que es favorecido o reducido en una célula enferma tratada con compuesto de un sujeto que tiene la enfermedad, con respecto a una célula homóloga enferma no tratada. Es decir, el gen o producto génico es suficientemente específico para la célula tratada, de modo que se puede usar, opcionalmente con otros genes o productos génicos, para identificar, predecir o detectar la eficacia de una molécula pequeña para la enfermedad. En general, un biomarcador es un gen o producto génico que es característico de la eficacia de un compuesto en una célula enferma o de la respuesta de esa célula enferma al tratamiento mediante el compuesto.

El término "cáncer" incluye, pero sin limitación, tumores sólidos, tales como cánceres de mama, tracto respiratorio, cerebro, órganos reproductivos, tracto digestivo, tracto urinario, ojo, hígado, piel, cabeza y cuello, tiroides, paratiroides y sus metástasis distantes. El término también incluye linfomas, sarcomas y leucemias.

Los ejemplos de cáncer de mama incluyen, pero sin limitación, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal *in situ*, y carcinoma lobular *in situ.*

Los ejemplos de cánceres del tracto respiratorio incluyen, pero sin limitación, carcinoma de pulmón de células pequeñas y células no pequeñas, así como adenoma bronquial y blastoma pleuropulmonar.

Los ejemplos de cánceres de cerebro incluyen, pero sin limitación, glioma del tronco encefálico e hipotalámico, astrocitoma cerebeloso y cerebral, meduloblastoma, ependimoma, así como tumor neuroectodérmico y pineal.

Los tumores de los órganos reproductivos masculinos incluyen, pero sin limitación, cáncer de próstata y testicular. Los tumores de los órganos reproductivos femeninos incluyen, pero sin limitación, cáncer de endometrio, cuello de útero, ovario, vagina y vulva, así como sarcoma del útero.

Los tumores del tracto digestivo incluyen, pero sin limitación, cáncer anal, de colon, colorrectal, esofágico, de vesícula biliar, gástrico, pancreático, rectal, de intestino delgado y de glándulas salivares.

Los tumores del tracto urinario incluyen, pero sin limitación, cánceres de vejiga, pene, riñón, pelvis renal, uretra y uretral.

Los cánceres oculares incluyen, pero sin limitación, melanoma intraocular y retinoblastoma.

Los ejemplos de cánceres de hígado incluyen, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular (carcinoma de células hepáticas con o sin variante fibrolamelar), colangiocarcinoma (carcinoma de conductos biliares intrahepáticos) y coloangiocarcinomas hepatocelulares mixtos.

Los cánceres de piel incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel, y cáncer de piel de tipo no melanoma.

Los cánceres de cabeza y cuello incluyen, pero sin limitación, cáncer de laringe/hipofaringe/nasofaringe/orofaringe, y cáncer labial y de cavidad oral.

Los linfomas incluyen, pero sin limitación, linfoma relacionado con SIDA, linfoma de no-Hodgking, linfoma cutáneo de células T, enfermedad de Hodgking y linfoma del sistema nervioso central.

Los sarcomas incluyen, pero sin limitación, sarcoma del tejido blando, oseteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, linfosarcoma y rabdomiosarcoma.

Las leucemias incluyen, pero sin limitación, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, y leucemia de células pilosas.

"Una célula enferma de cáncer" se refiere a una célula presente en sujetos que tienen cáncer. Es decir, una célula que es una forma modificada de una célula normal y no está presente en un sujeto que no tiene cáncer, o una célula que está presente en un número significativamente mayor o menor en sujetos que tienen cáncer con respecto a sujetos que no tienen cáncer.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende secuencias de control y codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor. El polipéptido puede ser codificado por una secuencia codificante de longitud entera o por cualquier parte de la secuencia codificante. El gen puede derivar totalmente o en parte de cualquier fuente conocida en la técnica, incluyendo una planta, un hongo, un animal, un genoma bacteriano o episoma, ADN eucariota, nuclear o plasmídico, ADNc, ADN vírico, o ADN químicamente sintetizado. Un gen puede contener una o más modificaciones en las regiones codificantes o no traducidas que podrían afectar a la actividad biológica o la estructura química del producto de expresión, la tasa de expresión o la forma de control de la expresión. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, mutaciones, inserciones, deleciones y sustituciones de uno o más nucleótidos. El gen puede constituir una secuencia codificante no interrumpida o puede incluir uno o más intrones, unidos por las uniones de corte y empalme adecuadas.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "marcador" y "marcador detectable" se refieren a una molécula que puede ser detectada incluyendo, pero sin limitación, isótopos radiactivos, fluoróforos, restos quimiluminiscentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores de enzimas, tintes, iones de metales, ligandos (p. ej., biotina o haptenos) y similares. El término "fluorescente" se refiere a una sustancia o parte de la misma que puede presentar fluorescencia en el intervalo detectable. Los ejemplos de marcadores que se pueden usar en la presente invención incluyen fluoresceína, rodamina, dansilo, umbeliferona, rojo Texas, luminol, NADPH, alfa- beta-galactosidasa y peroxidasa de rábano picante.

El término "paciente" o "sujeto" tal como se usa en el presente documento, incluye mamíferos (p. ej., seres humanos y animales).

El "perfil" del estado biológico de una célula se refiere a los niveles de diferentes constituyentes de una célula que se sabe que cambian en respuesta a los tratamientos con fármacos y otras perturbaciones del estado biológico de la célula. Los constituyentes de una célula incluyen, por ejemplo, niveles de ARN, niveles de proteína o actividad de proteína o niveles de fosforilación.

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan de forma intercambiable en el presente documento cuando se refieren a un producto génico.

Una "molécula pequeña", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una composición con un peso molecular menor que aproximadamente 5 kDa y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 4 kDa. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Muchas empresas farmacéuticas tienen bibliotecas extensas de mezclas químicas y/o biológicas, a menudo de hongos, bacterias o extractos de algas, que se puede cribar con cualquiera de los ensayos de la invención para identificar compuestos que modulan una bioactividad.

Una "variante" de un polipéptido se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se alteran uno o más restos de aminoácidos. La variante puede tener cambios "conservativos", en el que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares (p. ej., sustitución de leucina por isoleucina). Una variante también puede tener cambios "no conservativos" (p. ej., sustitución de glicina por triptófano). Variaciones minoritarias análogas pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambos. La orientación para determinar que restos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar o eliminar sin suprimir la actividad biológica o inmunológica, se puede identificar usando programas de ordenador conocidos en la materia, por ejemplo el software LASERGENE (DNASTAR).

La presente invención se refiere al uso de los niveles de fosfo-ERK (pERK) en células tumorales como un biomarcador para un inhibidor de la quinasa Raf (véase, p. ej., Wilhelm, y col., *Cancer* Res. 64:7099-7109, 2004, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

Los procedimientos de la presente invención se dirigen al uso de biomarcadores para controlar la respuesta de un sujeto a un tratamiento terapéutico, es decir, determinar si es probable que el sujeto tenga una respuesta clínica favorable a ese tratamiento. Los procedimientos de la presente invención se dirigen a controlar cambios en los niveles de biomarcadores en el periodo anterior al tratamiento terapéutico de un tumor, con un inhibidor de quinasa Raf, y a identificar sujetos que es probable que presenten una respuesta clínica favorable a dicho tratamiento (comparado con la probabilidad de dicha respuesta en la población general).

Los procedimientos de la presente invención también se dirigen al uso de niveles de biomarcadores antes de iniciar la terapia, como una ayuda para predecir si el sujeto tendrá una respuesta clínica favorable a un tratamiento terapéutico específico. Los procedimientos de la presente invención se dirigen además a determinar los niveles de biomarcadores antes del tratamiento terapéutico de un tumor con un inhibidor de la quinasa Raf, y a identificar sujetos que es probable que respondan de modo favorable (clínicamente) a dicho tratamiento (comparado con la probabilidad de dicha respuesta en la población general). Tal como se usa en el presente documento, la predicción no implica una capacidad de predicción de 100%, sino que indica que los sujetos con determinadas características tienen una mayor probabilidad de experimentar una respuesta clínica favorable que los sujetos que carecen de dichas características. Sin embargo, como será evidente para el experto en la materia, algunos individuos identificados como con mayor probabilidad de experimentar una respuesta clínica favorable, experimentarán, no obstante, avance de la enfermedad. Será además evidente para el experto en la materia, que al igual que determinadas afecciones son identificadas en el presente documento como asociadas con una mayor probabilidad de una respuesta clínica favorable, la ausencia de dichas afecciones se asociará con una menor probabilidad de una respuesta clínica favorable.

Tal como se usa en el presente documento, una respuesta favorable (o respuesta clínica favorable) a un tratamiento se refiere a una respuesta biológica o física que es reconocida por los expertos en la materia como indicativa de una menor velocidad de crecimiento del tumor comparado con el crecimiento de tumor que se produciría en ausencia de cualquier tratamiento. La respuesta clínica favorable, tal como se usa en el presente documento, se entiende que significa una cura. Una respuesta clínica favorable a la terapia puede incluir una disminución de los síntomas experimentados por el sujeto, un aumento del tiempo de supervivencia esperado o logrado, una menor velocidad de crecimiento del tumor, parada de crecimiento del tumor (enfermedad estable) y/o regresión de la masa tumoral (cada uno comparado con lo que ocurriría en ausencia de terapia).

Como se sabe en la técnica, los tumores con frecuencia son metastáticos en cuanto que un primer sitio (primario) del crecimiento tumoral se extiende a uno o más sitios anatómicamente separados. Como se usa en el presente documento, la referencia a un tumor en un sujeto incluye no solo el tumor primario, sino también el crecimiento de tumor metastático. En algunos casos, el tumor primario puede ser quirúrgicamente inaccesible mientras que la metástasis es más fácilmente accesible.

Marcadores biológicos en medicina clínica

La identificación de las características tumorales o biomoléculas que se pueden usar como marcadores sustitutos para predecir la respuesta clínica de un paciente individual a un tratamiento particular (marcadores de respuesta médica) y para identificar aquellos sujetos que tienen mayor probabilidad de responder favorablemente a un tratamiento dado así como aquellos que no es probable que respondan (y para los cuales deberían considerarse tratamientos alternativos) será de ayuda en la práctica clínica. Además, dichos marcadores se pueden usar en ensayos clínicos para identificar grupos de pacientes que responden (o no responden) a una terapia particular e identificar rasgos y fenotipos comunes a los pacientes que responden y a los que no responden.

Anderson, y col., (*Ins. J. Cancer* 94:774, 2001) publican que el inhibidor de tirosina quinasa de EGFR ZD1839 inhibía la proliferación de líneas de células de cáncer humanas tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se publicó que las reducciones de las tasas de crecimiento tumoral (xenoinjertos SKOV3 y MDA-MB-231 en ratones) coincidían con la inhibición de la activación de la ERK MAP quinasa constitutiva. También se publicó que la preincubación de las células con ZD1839 bloqueaba los aumentos inducidos por EGF en la activación de las ERK MAP quinasas y PKB/Akt en células SKOV (cáncer de ovario humano).

Albanell, y col., (*Semin. Oncol*. 28(5Suppl. 16): 56-66, 2001) publican que la administración de ZD1839 a seres humanos en ensayos clínicos daba como resultado una disminución de la expresión tanto de MAPK activada como de Ki-67 en quratinocitos (evaluado en biopsias de piel normal obtenidas antes y después de la administración de ZD1839; la capa basal de la epidermis tiene niveles altos de expresión del receptor de EGF. Albanell, y col., (*J. Clin. Oncol.* 20:4292-4302, 2002) también publicaron que las biopsias de piel seriadas obtenidas antes del tratamiento y aproximadamente el día 28 de tratamiento, indicaban inhibición de la ruta de señalización de EGFR.

Albanell, y col., (*Cancer Res*. 61:6500-6510, 2001) publicaron que en pacientes tratados con un anticuerpo anti-receptor de EGF quimérico (Cetuximab; C225), la activación de ERK1 y ERK2 en la piel eran menores comparado con piel de control (no del paciente).

Se ha informado que ERK1 y ERK2 (ERK1/2) pueden cebar la señalización del receptor de estrógenos (ER) por la fosforilación del ER, y que la actividad de ERK1/2 MAPK exagerada puede ser capaz de dirigir la señalización de ER y por lo tanto, el crecimiento tumoral en ausencia de estrógenos (puesto de manifiesto fenotípicamente como resistencia hormonal en el tumor (véase, p. ej., Coutts y Murphy, *Cancer Res*. 58:4071-4074, 1998). Gee, y col., (*Ins.*

J. Cancer (Pred. Oncol) 95:247-254, 2001) publicaron que en un conjunto de muestras de tejido de cáncer de mama, se encontró un estado positivo de pMAPK en 83% de los cánceres de mama ER negativos; y que la mayor fosforilación de ERK1/2 MAPK estaba asociada con la reincidencia más pronto y menor tiempo de supervivencia en la enfermedad tanto ER negativa como ER positiva.

La mayoría de las señales mitógenas transducidas por la activación del receptor del factor de crecimiento, finalmente convergen en un efector común corriente abajo, la ERK1/2 MAP quinasa (Egan y Weinberg, *Nature* 365:781-783,1993). ERK1/2 activada sirve como un factor de transcripción que regula la proliferación y supervivencia de células tumorales (Pulverer, *et al*., *Nature* 353:670-674, 1991). También se ha demostrado la mayor expresión de ERK1/2 activada en una serie de tumores malignos humanos (Hoshino, y col., *Oncogene* 18: 813-822, 1999); Albanell, y col., *Cancer Res*. 61: 6500-6510, 2001).

La presente invención correlaciona el efecto clínico de un inhibidor de quinasa Raf con los niveles iniciales de pERK en biopsias de tumores. Es decir, en los pacientes los niveles iniciales más altos de un marcador molecular particular en el tejido tumoral se correlacionaban con una respuesta clínica del paciente a una terapia antitumoral tal como un inhibidor de la quinasa Raf.

La presente invención proporciona un procedimiento para seleccionar sujetos tratados con un inhibidor de la quinasa Raf para un tumor y para identificar aquellos sujetos que tienen más probabilidad de responder favorablemente al tratamiento. Así pues, la identificación de pacientes que responden al tratamiento puede servir como una ayuda para tomar una decisión clínica.

En una realización de la presente invención, se obtienen una o más células del sujeto que se va a ensayar y se fijan para procesarlas para el análisis inmunuhistoquímico. Por ejemplo, se puede obtener una biopsia de tumor o muestra de leucocitos de sangre periférica (LSP) del sujeto. También se puede obtener una muestra de células de un sujeto y después enriquecer la muestra para un tipo celular deseado. Por ejemplo, las células se pueden aislar de otras células usando una variedad de técnicas, tales como el aislamiento con un anticuerpo que se une a un epítopo en la superficie celular del tipo de célula deseado. Cuando las células deseadas están en un tejido sólido, las células particulares se pueden diseccionar, por ejemplo, por microdisección o por microdisección por captura láser (LCM) (véase, p. ej., Bonner, y col., *Science* 278:1481, 1997; Emmert-Buck, y col., *Science* 274:998, 1996; Fend, y col., *Am. J. Path*. 154:61, 1999; y Murakami, y col., *Kidney Int*. 5 8:1346, 2000).

Los procedimientos de la presente invención comprenden determinar los niveles previos al tratamiento y del tratamiento inicial de un marcador biológico en el tumor de un sujeto. Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para determinar el nivel de marcador biológico específico en los procedimientos presentes. Uno de dichos procedimientos implica obtener una muestra de biopsia o aspirado celular del tumor del sujeto y evaluar los niveles de marcadores por cualquier medio adecuado, como será evidente para un experto en la materia. La muestra previa al tratamiento puede ser un tejido de tumor que se extirpó quirúrgicamente como parte del plan de tratamiento, o puede ser una biopsia hecha solo para determinar los niveles de marcador. La muestra de tejido debe procesarse de una forma que permita la detección precisa de las proteínas fosforiladas. Por ejemplo, si la muestra de tejido está insertada en parafina, se puede fijar en presencia de inhibidores de fosfatasa y en una disolución de formalina tamponada neutralizada.

De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, el nivel previo al tratamiento de un marcador o marcadores especificados en el tejido tumoral del sujeto se puede evaluar antes de que el sujeto inicie un tratamiento terapéutico. Por ejemplo, la evaluación se puede realizar aproximadamente 3 semanas antes del tratamiento, aproximadamente 2 semanas antes del tratamiento o aproximadamente 1 semana o menos antes del tratamiento.

Después de que haya pasado un periodo de tratamiento inicial, se pueden volver a evaluar el marcador o marcadores para determinar las alteraciones en el nivel de este marcador o marcadores. Una disminución de la pERK puede indicar que es más probable que el sujeto responda favorablemente al tratamiento con un inhibidor de la quinasa Raf comparado con un sujeto similar en el que no ha cambiado o aumentado el nivel de este marcador. Como ejemplo, el sujeto puede presentar al menos aproximadamente una disminución de 30% del nivel de pERK o la disminución en el índice de pERK (o medición comparable) puede ser al menos aproximadamente 50%, 70%, 80% o mayor.

Los procedimientos presentes son adecuados para usar en sujetos sometidos a su primer tratamiento, o sujetos que han recibido previamente un tratamiento para un tumor.

En los procedimientos de la presente invención, los niveles de marcadores biológicos se pueden evaluar antes del tratamiento, y se pueden volver a evaluar en algún punto durante el tratamiento (p. ej., después de un periodo inicial de tratamiento). La reevaluación de los niveles de marcadores puede ocurrir en un momento cuando el agente terapéutico haya alcanzado físicamente el sitio del tumor durante un periodo suficiente para permitir una respuesta biológica al agente terapéutico en el tejido tumoral. En una realización de la presente invención, el periodo de tratamiento inicial puede ser el periodo de tiempo necesario para que el agente terapéutico alcance la concentración de estado de equilibrio en el plasma (o poco después). La reevaluación de los marcadores biológicos también puede ocurrir poco después del periodo de tratamiento inicial y antes del final de un tratamiento terapéutico, de modo que se puede interrumpir la terapia en sujetos que no es probable que respondan. Además, la reevaluación también se puede llevar a cabo al final o inmediatamente después del final de un tratamiento terapéutico para determinar si el sujeto sería adecuado para un segundo tratamiento de la misma terapia, si fuera necesario.

Se puede usar cualquier procedimiento adecuado de detección de marcadores biológicos específicos en los procedimientos presentes. Por ejemplo, se puede usar inmunohistoquímica (IHC). Este procedimiento de tinción se basa en reacciones inmunoenzimáticas que usan anticuerpos monoclonales o policlonales para detectar células o proteínas específicas tales como antígenos tisulares. Normalmente, los protocolos inmunohistoquímicos incluyen sistemas de detección que permiten visualizar los marcadores (p. ej., por microscopía óptica o un sistema de escaneo automático) para el análisis cualitativo o cuantitativo. En la materia se conocen diferentes procedimientos de tinción inmunoenzimáticos para detectar una proteína de interés. Por ejemplo, las interacciones inmunoenzimáticas se pueden visualizar usando diferentes enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina o diferentes cromógenos tales como DAB, AEC o FastRed.

Brevemente, se introduce en una muestra patológica un anticuerpo primario que reconoce la molécula diana de interés. El anticuerpo primario se une a la molécula diana en o sobre la muestra patológica. Después de incubación, se lleva a cabo un lavado para separar el anticuerpo no unido. Después se incuba con la muestra patológica un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario y marcado con una enzima. Durante la incubación, el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario. Alternativamente, el anticuerpo primario, que reconoce la molécula diana, se marca con la enzima y no es necesario un anticuerpo secundario. En otro ejemplo, el anticuerpo marcado se puede marcar con biotina en lugar de con una enzima. Después, en una etapa adicional, se introduce la enzima marcada con avidina o estreptavidina en la muestra y se deja que se una al anticuerpo biotinilado.

La IHC se ha usado en una amplia variedad de aplicaciones de inmunodiagnóstico, tales como serodiagnóstico para detectar antígenos de una amplia variedad de virus, bacterias, hongos y parásitos específicos, y para medir la presencia de anticuerpos contra estos microorganismos. Igualmente, estas técnicas se pueden usar para controlar, por ejemplo, los niveles de hormonas, factores hematológicos, marcadores tumorales en el suero, niveles de fármaco o niveles de anticuerpo. Además, la IHC se puede usar para clasificar y diagnosticar los tumores malignos poco diferenciados. Además, la IHC permite la identificación del sitio primario u origen de los tumores metastáticos, ya que los tumores normalmente contienen marcadores que identifican el sitio de origen.

Los procedimientos de la presente invención se pueden llevar a cabo usando cualquier procedimiento o sistema inmunohistoquímico adecuado, como será evidente para el experto en la materia, incluyendo sistemas automáticos, IHC cuantitativa, IHC semicuantitativa y procedimientos manuales.

Tal como se usa en el presente documento, la inmunohistoquímica cuantitativa se refiere a un procedimiento automático de exploración y puntuación de muestras que permite por inmunohistoquímica identificar y cuantificar la presencia de un biomarcador especificado tal como un antígeno u otra proteína. La puntuación dada a la muestra puede ser una representación numérica de la intensidad de la tinción inmunohistoquímica de la muestra, y representa la cantidad de biomarcadores diana presentes en la muestra. Por ejemplo, la densidad óptica (DO) es una puntuación numérica que representa la intensidad de la tinción. Tal como se usa en el presente documento, la inmunohistoquímica semicuantitativa se refiere a la puntuación de los resultados inmunohistoquímicos por el ojo humano, en el que un trabajador entrenado clasifica los resultados numéricamente (p. ej., como 1+, 2+ o 3+).

Están disponibles en la técnica diferentes sistemas de análisis, exploración y procesamiento de la muestra adecuados para usar con la inmunohistoquímica. Dichos sistemas pueden incluir la tinción automática (p. ej., el sistema de Benchmark, Ventana Medical Systems, Inc.) y barrido microscópico, análisis de imágenes informatizado, comparación seriada de secciones (para controlar la variación de la orientación y el tamaño de una muestra), generación de informe digital, y archivo y rastreo de muestras (tal como portaobjetos en los que se ponen secciones de tejido). Están disponibles en el comercio sistemas de generación de imágenes celulares que combinan los microscopios ópticos convencionales con los sistemas de procesamiento digital de imágenes para realizar el análisis cuantitativo en células y tejidos, incluidas las muestras inmunoteñidas (p. ej., sistema CAS-200, Becton, Dickinson & Co.).

Procedimientos de análisis de datos

Se pueden incluir descripciones relacionadas con el patrón o distribución de la tinción para ayudar al análisis. Por ejemplo, puntuación 0 (negativa): no se observa tinción, o se observa tinción de la membrana en menos de 10% de las células tumorales. Puntuación 1+ (negativa): se detecta una tinción de la membrana débil o apenas perceptible en más de 10% de las células tumorales. Las células se tiñen solo en parte de la membrana. Puntuación 2+ (débilmente positiva): se observa una tinción completa de la membrana de débil a moderada en más de 10% de las células tumorales. Puntuación 3+ (muy positiva): se observa una tinción de la membrana completa y fuerte en más de 10% de las células tumorales.

Aunque se pueden establecer los niveles de referencia de la tinción, es considerablemente difícil establecer una calidad de tinción uniforme de las propias muestras. Esto surge de una variedad de factores diferentes que incluyen el material tisular no homogéneo, la naturaleza laboriosa y compleja de los procedimientos, la variabilidad en la calidad del reactivo (incluyendo afinidad y especificidad del anticuerpo/sonda), y la naturaleza subjetiva de la interpretación realizada por el profesional. Además, otras fuentes de variabilidad en la tinción de la muestra incluye las condiciones en las que las muestras de tejidos se recogen, procesan y almacenan; la variabilidad de los procedimientos de recuperación del epítopo; y la precipitación del cromógeno catalizada por enzima.

En el intento de resolver estos problemas, se conoce de la técnica anterior el incluir grupos de tejidos o células no teñidos de referencia con diferentes niveles de expresión del antígeno relevante (o ácido nucleico). Las muestras de referencia pueden comprender muestras de biopsias (p. ej., muestras de tejidos) de individuos que se sabe que están enfermos o normales, o individuos que expresan el antígeno o ácido nucleico detectable relevante en niveles mayores de los normales, pero que no están clínicamente enfermos. Además, también se pueden usar células de cultivos tisulares que pueden transfectarse con vectores de expresión para permitir que expresen el antígeno o ácido nucleico detectable en diferentes niveles, como patrones de referencia. Los grupos de referencia pueden comprender portaobjetos con células fijadas e insertadas en formalina, pero por lo demás no están teñidas y pueden insertarse en parafina. Después, los portaobjetos pueden procesarse en paralelo con la muestra para poner de manifiesto el nivel y el patrón de tinción del antígeno (o ácido nucleico detectable). Finalmente, la muestra se puede comparar con el grupo de referencia para determinar si los niveles de proteína o expresión del ácido nucleico son significativos para el diagnóstico.

Kits

Otra realización de la invención incluye un kit para usar en la identificación de las moléculas de pERK diana en una muestra de tejido patológico. Por ejemplo, el kit puede incluir una disolución de anticuerpo que incluye un primer anticuerpo o primario que reconoce inmunológicamente la molécula diana, un segundo anticuerpo o secundario que reconoce inmunológicamente el primer anticuerpo y que está conjugado con un medio de detección. El kit también puede incluir un reactivo para producir un producto de reacción detectable. Alternativamente, el anticuerpo primario que reconoce la molécula diana, puede estar marcado con la enzima. El anticuerpo marcado puede estar marcado con biotina en lugar de con enzima. Después, en una etapa adicional, la enzima marcada con avidina o estreptavidina se puede introducir en la muestra y dejar que se una al anticuerpo biotinilado.

Ejemplos

Las estructuras, materiales, composiciones y procedimientos descritos en el presente documento se pretende que sean ejemplos representativos de la invención, y se entenderá que el alcance de la invención no está limitado por el alcance de los ejemplos. Los expertos en la materia reconocerán que la invención se puede llevar a la práctica con variaciones en las estructuras, materiales, composiciones y procedimientos descritos, y dichas variaciones se considera que están dentro del ámbito de la invención.

Ejemplo 1

Tinción inmunohistoquímica del anticuerpo de pERK

Se recogen muestras de biopsia tumoral en el tiempo inicial antes de empezar el tratamiento y se recogen muestras adicionales en diferentes tiempos de medición durante los ciclos de tratamiento. Las muestras se recogen del mismo sitio del tumor. Las muestras de tumor se insertan en parafina antes del análisis por inmunohistoquímica.

A. *Procedimientos de tinción manual*

Las secciones de los portaobjetos se sacaron de la parafina poniendo los portaobjetos en tampón de citrato (0,01 M, pH 6,0) que se calentó a aproximadamente 95ºC y después se pusieron los portaobjetos en un microondas a potencia alta durante aproximadamente 2-3 minutos. El recipiente con el tampón y los portaobjetos después se puso en un vaporizador precalentado durante aproximadamente 30 minutos. Cuando se completó, los portaobjetos se dejaron permanecer en el tampón calentado y aclimatar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Después, los portaobjetos se aclararon en agua destilada. Después de este aclarado, los portaobjetos se bloquearon en una disolución de peróxido de hidrógeno al 1,5% durante 10 minutos, se lavaron en agua destilada y después se lavaron en PBS (0,01 M, pH 7,4) durante aproximadamente 5 minutos.

Los portaobjetos se incubaron en anticuerpo primario [phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)] con una dilución de 1:50 durante aproximadamente 30 minutos. Los portaobjetos de control negativo se incubaron en IgG correspondiente. Los portaobjetos se aclararon en PBS durante 5 minutos, y después se puso en los portaobjetos polímero marcado con HRP de conejo (p. ej., DAKO EnVision System, HRP (DAB), nº K4011) durante 30 minutos. Los portaobjetos se aclararon en PBS durante 5 minutos. Después se aplicó sustrato cromógeno durante 5 minutos, seguido de lavado en agua durante 5 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con contraste con hematoxilina filtrada durante aproximadamente 20 segundos. Los portaobjetos se lavaron con agua caliente, se deshidrataron y se montó un cubreobjetos con Permount.

B. *Procedimiento de tinción automático*

Las secciones de los portaobjetos se sacan de la parafina poniendo los portaobjetos en tampón de citrato (0,01 M, pH 6,0) que se calentó a aproximadamente 95ºC y después se pusieron los portaobjetos en un microondas a potencia alta durante aproximadamente 2-3 minutos. El recipiente con el tampón y los portaobjetos después se puso en un vaporizador precalentado durante aproximadamente 30 minutos. Cuando se completó, los portaobjetos se dejaron permanecer en el tampón calentado y aclimatar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Después los portaobjetos se aclararon en tampón de lavado DAKO (véase, p. ej., Wilhelm, y col., *Cancer Res*. 64:7099-7109, 2004, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

Los portaobjetos después se tiñeron usando un aparato de tinción automática (p. ej., DAKO Autostainer Universal Staining System, DakoCytomation, Inc., Carpinteria, CA). Los portaobjetos se bloquearon en una disolución de peróxido de hidrógeno al 1,5% durante 10 minutos, y después se incubaron durante 20 minutos con suero de bloqueo normal. Los portaobjetos después se lavaron con tampón DAKO y se incubaron con anticuerpo primario [phosphop44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)] con una dilución 1:50 durante aproximadamente 30 minutos. Los portaobjetos de control negativo permanecieron en suero de bloqueo. Después de la incubación con anticuerpo primario, los portaobjetos se aclararon con tampón DAKO. Después los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos con disolución diluida de anticuerpo secundario biotinilado, y después se aclararon con tampón DAKO. Los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos con el reactivo Vectastain Elite ABC (p. ej., Vector PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, CA), y después se aclararon con tampón DAKO. Después, se aplicó el sustrato cromógeno DAB a los portaobjetos durante 1 minuto seguido de un aclarado con agua destilada. Los portaobjetos se tiñeron con contraste con hematoxilina DAKO Automation durante 1 minuto, se aclararon con tampón DAKO, se aclararon en agua destilada, se deshidrataron y se montó un cubreobjetos con Permount.

C. *Evaluación de las secciones de tejido teñidas con anticuerpo anti-fosfo-ERK*

Los portaobjetos se evalúan cualitativa y semicuantitativamente. La evaluación cualitativa consiste en evaluar la intensidad de la tinción, identificar las células con tinción positiva y los compartimentos intracelulares implicados en la tinción y evaluar la calidad del portaobjetos en general. Se realizan evaluaciones separadas en las células tumorales y el estroma de células tumorales. La intensidad de la tinción se graduó basándose en la siguiente escala: Negativa ± (ambigua), 1+ (débil), 2+ (moderada), 3+ (fuerte) o 4+ (intensa). La intensidad de la tinción se determina evaluando la muestra entera. La evaluación semicuantitativa de la expresión del antígeno diana se lleva a cabo usando un sistema de gradación basado en el porcentaje de células a lo largo de toda la muestra que expresan cada antígeno diana, como sigue: 0-5% con expresión del antígeno diana positiva =<5%; 6-25% = 1er cuartil (1Q); 26-50% = 2º cuartil (2Q); 51-75% = 3er cuartil (3Q); 76-100% = 4º cuartil (4Q). Para la evaluación cuantitativa, cada sección de tejido se evalúa usando el sistema de análisis de imágenes Bioquant TCW98. Por ejemplo, se seleccionan 5 campos/tejidos que no se superponen y se capturan electrónicamente usando un microscopio Olympus BX-60 y una cámara digital de color Optronics DEI-750 conectada a un ordenador PC mediante el software Bioquant. Se mide el número total de sucesos de inmunotinción individuales por área de tejido muestreado por campo 20X. Los datos recogidos de estas mediciones se presentan como una densidad de tinción por sección de tejido (es decir, el número de sucesos de tinción por unidad de área de tejido [nº de células teñidas/mm^2]).

La mejor respuesta del paciente se clasifica como se resume a continuación:

Respuesta completa (RC): desaparición de toda prueba clínica y radiológica de tumor (tanto diana como no diana).

Respuesta parcial (RP): disminución de al menos 30% de la suma del diámetro más largo (DL) de las lesiones diana tomando como referencia la suma del DL de los valores iniciales.

Respuesta minoritaria (RM): disminución menor de 30% de la suma del diámetro más largo (DL) de las lesiones diana tomando como referencia la suma del DL de los valores iniciales.

Enfermedad estable (EE): Estado de equilibrio de la enfermedad. No hay suficiente contracción para calificarlo como RP ni suficiente aumento para calificarlo como EP.

Enfermedad progresiva (EP): aumento de al menos 20% de la suma del DL de las lesiones diana tomando como referencia la suma menor del DL registrada desde que se inició el tratamiento o la aparición de una o más lesiones nuevas. La aparición de lesiones nuevas también puede constituir enfermedad progresiva (también llamado progresión).

Para determinar si existe una correlación entre los niveles y/o la intensidad de la tinción de pERK y la respuesta del paciente, se realizan las siguientes gráficas y análisis estadísticos de los datos de pERK usando el software R (www.r-project.org) versión 1.9.0 en un PC con Windows 2000. Las gráficas se generan creando primero un objeto de supervivencia usando la función Surv y después usando survfit para ajustar este objeto al tiempo hasta los datos de progresión. Después se usa la función de gráfica en el resultado de survfit. El valor p que representa la significancia de la comparación entre dos grupos de pacientes se calcula usando la función survdiff con el parámetro opcional rho ajustado a 1. Por lo tanto, el algoritmo que se puede usar para calcular p era Peto y la modificación Peto del ensayo de suma de rangos de Gehan-Wilcoxon.

Para clasificar los pacientes por el porcentaje de núcleos teñidos, los pacientes con valores dados de menos de 5% se agrupan en la primera clase. Todos los demás pacientes se agrupan juntos en la segunda clase. Para clasificar los pacientes por la intensidad de tinción máxima, la intensidad de la tinción se da como un intervalo. El límite superior del intervalo se designa como la intensidad de tinción máxima. Los pacientes que se describe que tienen tinción negativa o una intensidad máxima de 1 se ponen juntos en la primera clase. Todos los demás pacientes se agrupan en la segunda clase.

Como se representa en la figura 1, parece que hay una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de pERK medidos como intensidad de tinción máxima en el tumor y el tiempo hasta la progresión. En otras palabras, cuanto mayor es el nivel de tinción de pERK inicial en las células tumorales, más probable es que el paciente tenga

un retraso en el tiempo hasta la progresión. Se observó una tendencia hacia una correlación entre los niveles de pERK definidos por porcentaje de núcleos que expresan pERK y el tiempo hasta la progresión. Sin embargo, el valor p de esta tendencia (p = 0,073) cae justo fuera del intervalo estadísticamente significativo (p≤ 0,05). Además, había una diferencia estadísticamente significativa (p = 0,00093) entre "los pacientes que responden" (respuesta parcial (RP) o pacientes con enfermedad estable (EE)) y "los pacientes que no responden" (Enfermedad progresiva (EP)) en la intensidad de tinción máxima. La intensidad de tinción máxima media de "los que pacientes no responden" en la escala de 1+ a 4+ era 0,88+, mientras que en "los pacientes que responden" la media era 2,04+. Además, los pacientes que no eran de los que no responden tenían una intensidad de tinción máxima mayor que 1+.

Además, el análisis estadístico demuestra que para todos los tipos de tumor combinados, los niveles de pERK son estadísticamente significativamente más altos (p = 0,0024) en "los pacientes que no responden" (pacientes con enfermedad progresiva) que en "los pacientes que responden" (RP, RM, EE). Además, los pacientes con tumores que tenían niveles más altos de pERK muestran un tiempo estadísticamente significativamente menor hasta la progresión del tumor (TTP) (p<0,05) y el tiempo hasta la muerte (TDD) (p = 0,023).

Los procedimientos y materiales descritos en el presente documento se pretende que sean ejemplos representativos de la invención, y se entenderá que el alcance de la invención no está limitado por el alcance de los ejemplos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para supervisar la respuesta de un paciente que es tratado de cáncer, a la administración de una molécula pequeña inhibidora de la quinasa Raf, que comprende las etapas de:

a. determinar el nivel de fosforilación de pERK en una primera muestra biológica obtenida del paciente antes del tratamiento con la molécula pequeña inhibidora de la quinasa Raf:

b. determinar el nivel de fosforilación de pERK en al menos una segunda muestra biológica obtenida del paciente después del tratamiento con la molécula pequeña inhibidora de la quinasa Raf; y

c. comparar el nivel de fosforilación en la segunda muestra biológica con el nivel de fosforilación en la primera muestra biológica; en el que el nivel de fosforilación de pERK se evalúa por inmunohistoquímica, y en el que un cambio en el nivel de fosforilación de las proteínas pERK en la segunda muestra biológica comparada con el nivel de fosforilación de pERK en la primera muestra biológica, indica la eficacia del tratamiento con la molécula pequeña inhibidora de la quinasa Raf.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho cáncer se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer gastrointestinal, cáncer de tiroides, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata y melanoma.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una biopsia de tumor.

4. Un procedimiento para seleccionar un paciente de cáncer sensible a una molécula pequeña inhibidora de la quinasa Raf, que comprende las etapas de:

a) determinar el nivel de fosforilación de pERK en una primera muestra biológica obtenida de un paciente de cáncer, habiéndose administrado a dicho paciente una molécula pequeña inhibidora de la quinasa Raf;

b) comparar el nivel de fosforilación de pERK en la primera muestra biológica con el nivel de fosforilación de pERK en una segunda muestra biológica obtenida de un sujeto normal, habiendo administrado a dicho sujeto normal una molécula pequeña inhibidora de la quinasa Raf; en el que el nivel de fosforilación de pERK se evalúa por inmunohistoquímica, y un cambio en el nivel de fosforilación de pERK en la primera muestra biológica comparada con el nivel de fosforilación de pERK en la segunda muestra biológica es un pronóstico de la respuesta del paciente al tratamiento con la molécula pequeña inhibidora de la quinasa Raf.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que se ha diagnosticado al paciente cáncer seleccionado de cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer gastrointestinal, cáncer de tiroides, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata y melanoma.

6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicha muestra es una biopsia de tumor.

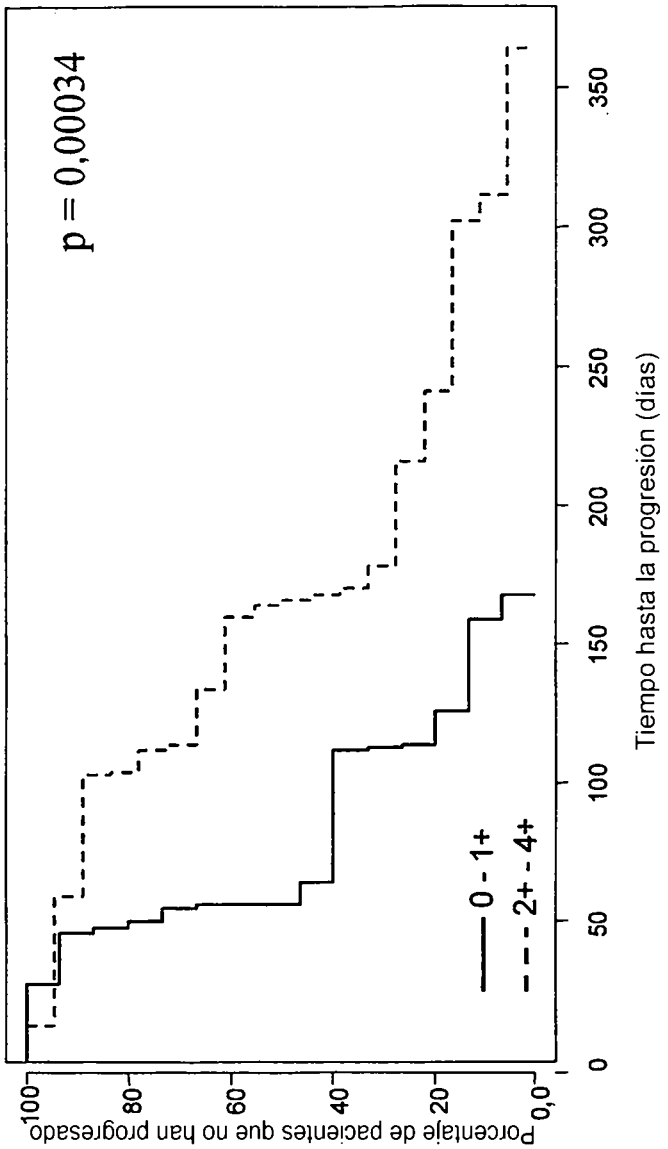

p = 0,00034
0 - 1+
2+ - 4+
Porcentaje de pacientes que no han progresado
100
80
60
40
20
0,0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo hasta la progresión (días)

FIGURA 1