



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 920**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/48 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09153048 .5**
96 Fecha de presentación : **20.11.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **2055786**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2009**

54 Título: **Anticuerpos de PAK fosfoespecíficos y kits de diagnóstico.**

30 Prioridad: **27.11.2002 US 429363 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2011

73 Titular/es: **SUGEN, Inc.**
235 East 42nd Street
New York, New York 10017, US

72 Inventor/es: **Smeal, Tod R.;**
Callow, Marinella G. y
Jallal, Bahija

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 920 T3

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

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de proteínas quinasas activadas por p21 fosforiladas (PAK) como biomarcadores de tumorigénesis, anticuerpos fosfoespecíficos para detectar PAK fosforilada de biopsias de mamíferos y ensayos de exploración para identificar compuestos que modulan la actividad de PAK. También se contempla un procedimiento para determinar un subconjunto de una población dada que es susceptible al tratamiento con un compuesto que modula la actividad de PAK.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las proteína quinasa activada por p21 (PAK) serina/treonina quinasas son importantes efectores de las GTPasas de la familia Rho y se han implicado en la regulación de morfología y motilidad celular, así como en transformación celular. Véase Callow y col., (2002), J. Biol. Chem., Vol. 277, Nº 1, 550-558.

Un miembro de esta familia de quinasas, PAK4, se sobreexpresa con frecuencia en líneas celulares tumorales humanas de diversos orígenes tisulares. La secuencia de aminoácidos de PAK4 comprende un sitio de autofosforilación en el dominio de quinasa de PAK4. La mutación de esta serina a ácido glutámico (S474E) da como resultado una activación constitutiva de la quinasa. Los anticuerpos fosfoespecíficos dirigidos contra serina 474 detectan PAK4 activada en la membrana del Golgi cuando PAK4 se co-expresa con Cdc42 activada. Además, la expresión del mutante de PAK4 activo (S474E) tiene potencial de transformación, lo que conduce a un crecimiento independiente de anclaje de las células NIH3T3. Una PAK4 inactivada por quinasa (K350A, K351A), por otro lado, bloquea de forma eficaz la transformación mediante Ras activado e inhibe el crecimiento independiente de anclaje de las células de cáncer de colon HCT116. Por lo tanto, PAK4 está fuertemente implicada en la transformación oncogénica y sugiere que la actividad de PAK4 es necesaria para el crecimiento independiente de anclaje dirigido por Ras. Véase Callow y col. mencionado anteriormente.

Hasta la fecha, se han identificado seis PAK humanas. La primera subfamilia consiste en PAK1, PAK2 y PAK3, que muestran una identidad de secuencia del 80-90% dentro de sus dominios catalíticos. Los miembros de la segunda subfamilia de PAK recientemente identificada, PAK4, PAK5 y PAK6, también están altamente relacionados entre sí pero muestran solamente 40-50% de identidad con los dominios quinasa de las PAK 1-3. Todos los miembros de la familia de PAK se caracterizan por la presencia de un dominio de unión p21, que se une a GTPasas de la familia Rho activadas (véase, Manser y col. (1994) Nature 367, 40-46; Bagrodia y col. (1995) J. Biol. Chem. 270, 22731-22737; Knaus y col., (1995) Science 269, 221-223; Martin y col., (1995) EMBO J. 14, 1970-1978; Teo y col., (1995) J. Biol. Chem. 270, 26690-26697; y Abo y col., (1998) EMBO J. 17, 6527-6540).

Como efectores de GTPasas de la familia Rho, las quinasas PAK desempeñan un papel importante en la regulación de la morfología y motilidad celular mediante la regulación del citoesqueleto de actina. Véase, Sells y col., (1997) Curr. Biol. 7, 202-210; Sells y col., (2000) J. Cell Biol. 151, 1449-1457; Haung y col., (1998) Mol. Cell. Biol. 18, 7130-7138; Zhao y col., (1998) Mol. Cell. Biol. 18, 2153-2163; Edwards y col., (1999) Nature Cell Biol. 1, 253-259; y Kiosses y col., (1999) J. Cell Biol. 147, 831-844. Por ejemplo, la actividad de PAK se ha implicado en el ensamblaje localizado en el borde anterior y desensamblaje en el borde posterior de las adhesiones focales durante la motilidad celular (Sells (1997), mencionado anteriormente; Frost y col., (1998) J. Biol. Chem. 273, 28191-28198; y Eby y col., (1998) Curr. Biol. 8, 967-970). Durante la curación de heridas de monocapas de fibroblastos, la PAK1 activada se sitúa rápidamente en el borde anterior desde las células móviles (Sells y col. (2000) mencionado anteriormente). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de PAK4 induce polimerización de actina localizada y formación de filopodios (Abo y col., (1998) mencionado anteriormente). Los cambios dependientes de PAK4 en el citoesqueleto de actina son dependientes de la actividad quinasa de PAK4 y localización dependiente de Cdc42 en la membrana del Golgi. La capacidad de las PAK para modular el citoesqueleto de actina se debe a mecanismos dependientes e independientes de quinasa.

Qu y col., ((2001) Molecular and Cellular Biology 21 (10), 3523 - 3533) sugieren que PAK4 es un mediador esencial en el crecimiento independiente de anclaje inducido por Cdc42 y factores de intercambio de la familia Dbl.

Puesto que PAK4 es un efector de Cdc42, se asocia con más probabilidad con quimiotaxis, adhesión celular, respuestas inflamatorias y actividades inmunológicas innatas. Por ejemplo, existen pruebas crecientes que implican a las quinasas PAK en crecimiento independiente de anclaje dirigido por Ras oncogénico y en la regulación de supervivencia celular. Véase, por ejemplo, Qiu y col., (1995) Nature 374, 457-459; Qiu y col., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 11781-11785; Qiu y col., (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 3449-3458; Khosravi-Far y col., (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 6443-6453; Prendergast y col., (1995) Oncogene 10, 2289-2296; Keely y col., (1997) Nature 390, 632-636; Tang y col., (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 4454-4464; Tang y col., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 5139-5144; Tang y col., (2000) J. Biol. Chem. 275, 9106-9109; Osada y col., (1997) FEBS Lett. 404, 227-233; y Lin y col. (1999) J. Biol. Chem. 274, 23633-23641.

Sin embargo, no hay ninguna sugerencia en la técnica anterior para usar PAK4 fosforilada como un biomarcador para tumorigénesis en muestras de biopsia obtenidas de mamíferos sanos y enfermos. De forma similar, no existe ninguna sugerencia para el uso de anticuerpos fosfoespecíficos de PAK4 para determinar el efecto de una composición terapéutica en un mamífero sometido a tratamiento. De forma similar, la técnica no dice nada al

respecto del uso de ensayos de exploración de fosforilación de PAK4 para identificar compuestos que son útiles como moduladores de la actividad de PAK. Tampoco existen enseñanzas en la técnica anterior para la detección y comparación de niveles de fosforilación de PAK como un medio para identificar subconjuntos de una población dada que son susceptibles al tratamiento con moduladores de la actividad de PAK.

5 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para seleccionar un mamífero susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK. Este procedimiento comprende (i) determinar la relación de PAK4 fosforilada con proteína PAK total en una biopsia de ensayo de un tejido de un mamífero candidato; y (ii) comparar la relación de (i) con la relación de PAK4 fosforilada con proteína PAK total en una biopsia de control que se obtiene del mismo tipo de tejido que la biopsia de ensayo del mamífero candidato. En una realización preferida, el mamífero candidato es susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK4 si la relación de PAK4 fosforilada con proteína PAK total en la biopsia de ensayo es mayor que la de la biopsia de control.

En otra realización, la biopsia de control se obtiene de un mamífero sano de la misma especie que el mamífero candidato. En otra realización más, el mamífero candidato comprende una célula cancerosa. En otra realización, el mamífero candidato tiene un tumor.

Algunas realizaciones de la divulgación se refieren al uso de una PAK distinta de PAK4. Sin embargo, la invención reivindicada se limita a procedimientos que implican PAK4.

La divulgación también proporciona un procedimiento para controlar el efecto de una composición terapéutica en un mamífero. En una realización, el procedimiento comprende (i) medir un primer nivel de fosforilación de PAK en una primera biopsia obtenida del mamífero antes de la administración de una composición terapéutica al mamífero; y (ii) medir un segundo nivel de fosforilación de PAK en una biopsia posterior obtenida del mamífero después de la administración de la composición terapéutica. De acuerdo con el procedimiento, un menor nivel de fosforilación de PAK en la biopsia posterior en comparación con la primera biopsia es indicativo de un efecto de la composición terapéutica del mamífero.

El procedimiento también contempla en una realización, que ambas o una de las biopsias son sospechosas de contener células capaces de crecimiento celular independiente de anclaje. Como alternativa, en otra realización, ni la primera ni la segunda biopsia son sospechosas de contener células capaces de crecimiento celular independiente de anclaje. En una realización preferida, una biopsia es una biopsia tisular. En ese caso, en una realización, el tejido es tejido de la mucosa bucal, piel, folículos pilosos, tejido tumoral o médula ósea. El tejido también puede obtenerse de un órgano interno del mamífero a ensayar. En otra realización, la biopsia es un fluido biológico. En otra realización más, el fluido biológico es fluido sinovial, sangre fresca completa, células mononucleares de sangre periférica, sangre completa congelada, plasma fresco, plasma congelado, orina o saliva. En otra realización, la primera y posteriores biopsias se toman de un tumor en el mamífero.

En otra realización, la composición terapéutica modula directa o indirectamente la fosforilación de al menos una PAK. En una realización preferida, se mide la fosforilación de cualquier combinación de PAK4, PAK5 o PAK6. En otra realización preferida, se mide la fosforilación de PAK4.

Con respecto a la temporización de la dosificación al mamífero, en una realización, el primer nivel de PAK fosforilada en la primera biopsia obtenida del mamífero se mide al menos 1 día, al menos 5 días, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos un mes, antes de que se administre la composición terapéutica al mamífero.

En una realización, la administración de la composición terapéutica comprende al menos una dosis de la composición terapéutica. En otra realización, la administración de la composición terapéutica comprende un régimen de múltiples dosis de la composición terapéutica. Las dosis pueden administrarse durante un periodo de 4 horas hasta aproximadamente 100 días.

En otra realización, la biopsia posterior obtenida de mamífero en el procedimiento se produce después de la administración de la dosis final de la composición terapéutica. En otra realización más, se obtienen múltiples biopsias del mamífero durante el régimen de dosificación de la composición terapéutica.

De acuerdo con el procedimiento, la composición terapéutica, después de la administración al mamífero, puede ocasionar, o lograr, un cambio en uno o más rasgos fisiológicos, bioquímicos, genéticos, celulares o inmunológicos del mamífero.

La divulgación también proporciona un procedimiento para seleccionar un mamífero susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK. Este procedimiento comprende medir el nivel de PAK fosforilada en una biopsia de ensayo obtenida de un mamífero candidato. En una realización, un nivel de PAK fosforilada en la biopsia de ensayo que es mayor que el nivel de PAK fosforilada en una biopsia de control indica que el mamífero es susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK.

En una realización, la biopsia de control se obtiene del mismo tipo de tejido que la biopsia de ensayo del mamífero candidato. En una realización preferida, la biopsia de control se obtiene de un mamífero sano de la misma

especie que el mamífero candidato. En otra realización, el tipo de tejido es linfocitos. En otra realización más, el tipo de tejido es de cerebro, corazón, pulmón, mama, piel, intestino, colon, estómago, vejiga. En una realización adicional, el mamífero comprende una célula cancerosa.

La divulgación también proporciona un procedimiento para seleccionar de una población de mamíferos que tiene cáncer, un mamífero que es susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK. Este procedimiento comprende (i) determinar un primer nivel de PAK fosforilada en una biopsia tumorogénica obtenida de un tejido de un mamífero candidato; (ii) determinar un segundo nivel de PAK fosforilada en una biopsia no tumorogénica del mismo tejido del mamífero candidato de (i) y (iii) comparar el primer y segundo niveles de PAK fosforilada. En una realización preferida, un nivel de fosforilación de PAK que es mayor en el primer nivel que en el segundo nivel indica que el mamífero candidato es un mamífero que es susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK.

La divulgación también proporciona un procedimiento para determinar el nivel de PAK fosforilada en una biopsia de mamífero. Este procedimiento comprende (i) exponer la biopsia a un anticuerpo fosfoespecífico específico para PAK; y (ii) detectar el anticuerpo. En una realización preferida, el nivel de anticuerpo detectado se correlaciona con el nivel de PAK fosforilada en la biopsia de mamífero.

La divulgación también proporciona un anticuerpo fosfoespecífico que se induce contra un péptido de PAK4 que comprende una serina fosforilada en la posición 474 de la secuencia proteica de PAK4. En una realización, el péptido PAK4 comprende la secuencia de aminoácidos, KEVPRRKS LVGTPYWMAPE, que comprende una serina fosforilada.

La divulgación también proporciona un procedimiento para identificar un compuesto que modula la fosforilación de PAK. Este procedimiento comprende (i) añadir un compuesto de ensayo a una preparación de proteína PAK4; (ii) medir el nivel de fosforilación de la PAK4 usando un anticuerpo fosfoespecífico dirigido contra PAK4 y (iii) comparar el nivel de la preparación de PAK4 tratada con el nivel de fosforilación de una preparación de PAK4 no tratada. En una realización, un nivel de fosforilación en la preparación tratada que difiere del nivel de fosforilación de la preparación no tratada indica que el compuesto de ensayo es un compuesto que modula la fosforilación de PAK. En una realización preferida, el compuesto de ensayo disminuye, inhibe, reduce o regular de forma negativa el nivel de PAK4 fosforilada en la preparación.

En otra realización, la preparación de PAK 4 comprende proteína PAK4 aislada de una biopsia de un mamífero. En otra realización más, la preparación de PAK4 comprende proteína PAK4 producida de forma recombinante.

La divulgación también proporciona un procedimiento para identificar un compuesto que modula la fosforilación de PAK. Este procedimiento comprende, (i) exponer un cultivo de células a un compuesto de ensayo; (ii) medir el nivel de fosforilación de PAK usando un anticuerpo fosfoespecífico dirigido contra PAK4; y (iii) comparar ese nivel con el nivel de fosforilación de PAK en células no tratadas. En una realización, un nivel de fosforilación que es menor o mayor que el de las células no tratadas indica que el compuesto de ensayo es un compuesto que modula la fosforilación de PAK. En una realización preferida, el compuesto de ensayo disminuye, inhibe, reduce o regula negativamente el nivel de PAK fosforilada producida por las células tratadas.

La divulgación también proporciona un procedimiento para seleccionar un mamífero susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK. Este procedimiento comprende determinar si la proteína PAK4 se sobreexpresa en una biopsia obtenida del mamífero. En una realización, un nivel de proteína PAK que es mayor que el nivel normal de la expresión de PAK4 en una muestra de biopsia del mismo tipo de tejido, indica que el mamífero es susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK.

La divulgación también proporciona otro procedimiento para seleccionar un mamífero susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK. Este procedimiento comprende (i) medir el nivel de proteína PAK en una biopsia obtenida de un primer tejido de un órgano de un mamífero candidato; (ii) medir el nivel de proteína PAK4 en una biopsia obtenida de un segundo tejido del órgano de un mamífero candidato; y (iii) comparar los dos niveles. En una realización, una diferencia entre los niveles de proteína PAK4 en las dos biopsias indica que el mamífero candidato es susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK.

Se desvela otro procedimiento que es un procedimiento para seleccionar un mamífero susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK que comprende (i) determinar si se sobreexpresa ARNm de PAK4 en una biopsia de un tejido obtenido de un mamífero candidato. En una realización, un nivel de ARNm de PAK4 que es mayor que el nivel normal de expresión de ARNm de PAK4 en una biopsia obtenida de un tejido equivalente de un mamífero sano conocido indica que el mamífero candidato es susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK.

Las siguientes realizaciones son aplicables a todos los procedimientos de la presente invención. De este modo, en una realización, un mamífero se selecciona del grupo que consiste en un ser humano, rata, ratón, cerdo, vaca, cabra, mono, gato y perro. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano. En otra realización más, el mamífero tiene una enfermedad. En otra realización, la enfermedad es un cáncer. En otra realización más, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de tiroides, cáncer colorectal, cáncer pancreático, cáncer de

mama, cáncer de la parótida, cáncer de células sinoviales, cáncer de próstata, cáncer de laringe, cáncer testicular, cáncer hepatocelular y leiomioma.

De forma similar, en una realización preferida de procedimientos de la presente invención, el nivel de PAK fosforilada se determina usando un anticuerpo fosfoespecífico específico de la serina fosforilada de PAK4. En una realización, el anticuerpo fosfoespecífico se induce contra el péptido de PAK4, RRKSLVGTPYWMAPE, que comprende una serina fosforilada. En otra realización, que es aplicable a procedimientos de la presente invención el nivel de proteína PAK4 total se determina usando un anticuerpo específico de PAK4. En una realización preferida, el anticuerpo específico de PAK4 se induce contra la secuencia peptídica, ATTARGGPGKAGSRGRFAGHSEA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra secciones de tejido humano teñidas para fosforilación de PAK4 en un paciente con adenoma veloso con adenocarcinoma de gran malignidad *in situ*. Figura 1 (a) carcinoma de colon *in situ*/displasia de gran malignidad; (b) epitelio benigno distante de adenoma; y (c) tinción de hematoxilina y eosina.

La Figura 2 muestra secciones de un paciente humano teñidas para fosforilación de PAK4 de tejidos en adenocarcinoma metastásico de etapa III. Figura 2 (a) carcinoma de colon *in situ*/displasia de gran malignidad; (b) epitelio benigno distante de adenoma; y (c) tinción de hematoxilina y eosina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención se basa en el nuevo uso de anticuerpos de PAK4 fosfoespecíficos para determinar los niveles de PAK fosforilada en biopsias obtenidas de tejidos de mamíferos de ensayo y de control.

Una "biopsia" se refiere a la retirada y examen de una muestra de tejido de un cuerpo vivo con fines diagnósticos.

De acuerdo con la presente invención, un "tejido" puede ser un tejido sólido, tal como el de cualquier órgano interno de un mamífero, tal como corazón, pulmón, cerebro, hígado, estómago, páncreas o intestino. Un "tejido" también puede ejemplificarse con tejido de mucosa bucal, piel, folículos pilosos, tejido tumoral o médula ósea. Un tejido puede ser también un fluido biológico, tal como fluido sinovial, sangre fresca completa, células mononucleares de sangre periférica, sangre completa congelada, plasma fresco, plasma congelado, orina o saliva.

Una "biopsia de ensayo" puede obtenerse de un mamífero candidato, cuyo nivel de PAK fosforilada debe determinarse.

El mamífero candidato puede ser un mamífero que se cree que tiene una enfermedad o se sabe que tiene una enfermedad. La enfermedad puede ser cáncer. Por ejemplo, el mamífero candidato puede estar aquejado de cáncer de tiroides, cáncer colorectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de la parótida, cáncer de células sinoviales, cáncer de próstata, cáncer de laringe, cáncer testicular, cáncer hepatocelular o leiomioma. Un mamífero candidato también puede denominarse "paciente". De este modo, un "mamífero", o "individuo" de la presente invención, puede ser un ser humano, rata, ratón, cerdo, vaca, cabra, mono, gato o perro.

Una "biopsia de control" puede obtenerse de un mamífero sano, tal como uno que no tiene una enfermedad, tal como cáncer. El mamífero sano debería ser de la misma especie que el mamífero candidato. En consecuencia, el nivel de fosforilación de PAK en una biopsia "de ensayo" de hígado de un paciente humano con cáncer se compara con el nivel de fosforilación de PAK en una biopsia "de control" de hígado de un ser humano sano. De este modo, típicamente, la biopsia de control "sana" se toma del mismo tipo de tejido que el tejido del que se toma la biopsia de ensayo del mamífero candidato.

Como alternativa, la "biopsia de control" puede tomarse de un sitio sin enfermedad (por ejemplo, un sitio no tumorigénico) de un tejido u órgano enfermo del que se obtiene la biopsia de ensayo. En este caso, tanto la biopsia de control como la de ensayo se obtienen del mismo mamífero. Tanto la biopsia de control como la de ensayo deberían ser del mismo tamaño, peso, número de células o cantidad, por ejemplo, antes de la determinación de la actividad de PAK. Ambas o una de las biopsias de control y ensayo pueden modificarse, tal como cortarse, diluirse o manipularse de algún modo para asegurar que son esencialmente iguales en número de células, tamaño o peso, por ejemplo.

El acrónimo "PAK", como se usa en la presente invención, se refiere a las proteínas quinasas activadas por p21, PAK4, PAK5 y PAK6. En consecuencia, ser capaz de detectar niveles anormalmente altos de dichas PAK, especialmente PAK4, en muestras de mamíferos es útil para identificar compuestos que modulan (es decir, inhiben, disminuyen, regulan negativamente o reducen) la actividad de PAK. Esos compuestos pueden después formularse en composiciones terapéuticas y administrarse a mamíferos que requieren regulación negativa de la actividad de PAK. Los individuos que "requieren" regulación negativa de la actividad de PAK son típicamente los individuos que tienen una población de células que muestran crecimiento independiente de anclaje (véase posteriormente). Además, la detección de proteína PAK fosforilada en una muestra obtenida directamente de un individuo tratado con un modulador de PAK permite controlar la eficacia del tratamiento terapéutico a lo largo del tiempo. Identificar individuos que comprenden niveles elevados de proteína PAK fosforilada es una primera etapa útil en la identificación de

individuos que pueden ser susceptibles al tratamiento con un modulador de PAK.

Con este fin, un individuo que tiene un nivel de PAK fosforilada en una biopsia de ensayo que es mayor que el normalmente asociado con el tejido del que se ha obtenido, tiene un nivel anómalo de PAK que es potencialmente tratable con un modulador de PAK. Un "modulador" de la presente invención preferentemente disminuye la actividad de PAK. Los niveles elevados de PAK fosforilada, especialmente PAK4 activada, se correlacionan bien con células que tienen una propensión aumentada a experimentar crecimiento independiente de anclaje. Este último fenómeno es un mecanismo que se sabe que es un factor atribuible en la formación de tumores y crecimientos cancerosos. Por ejemplo, se sabe que el crecimiento independiente de anclaje significa que células viables obtenidas de una biopsia de tumor puede formar colonias en medio de cultivo semisólido. A la inversa, las células dependientes de anclaje no pueden formar dichas colonias. En consecuencia, un nivel de PAK fosforilada que es mayor que el que se considera normal, es un buen biomarcador de tumorigénesis, porque dichos niveles elevados son indicadores de crecimiento celular independiente de anclaje.

Los procedimientos desvelados aplican la detección de niveles de medida basal, aumentados y anómalos de fosforilación de PAK a diversos fines diagnósticos y terapéuticos. Por ejemplo, un procedimiento desvelado controla el efecto de una composición terapéutica en un mamífero, tal como un paciente humano, mediante la comparación del nivel de fosforilación de PAK en muestras de biopsia tomadas antes y después del tratamiento con la composición terapéutica. Antes de tratar al individuo, sin embargo, debería identificarse primero preferentemente que el individuo realmente requiere dicho tratamiento. En consecuencia, determinar la actividad de PAK endógena ayuda a determinar si la actividad de PAK del paciente necesita regularse de forma negativa. La presente invención proporciona un procedimiento para seleccionar un mamífero que es susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK4.

Puede conseguirse un procedimiento de selección tal de diversas maneras. Por ejemplo, se puede determinar la relación de PAK fosforilada con proteína PAK4 total en una biopsia de ensayo obtenida de un tejido de un mamífero candidato. Esos niveles pueden después compararse con la misma relación medida en el mismo tipo de tejido, pero en un mamífero control sano de la misma especie que el mamífero candidato. Se pueden ensayar varios de dichos individuos sanos para obtener un conjunto de relaciones de PAK fosforilada con proteína PAK4 total "normales" para órganos y tejidos particulares. En consecuencia, una relación, de un paciente, que es mayor que la normal indica que ese paciente probablemente es susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK. Como alternativa, la relación de PAK fosforilada con PAK4 puede compararse en la biopsia de ensayo y una biopsia de control del mismo paciente.

El paciente, en este contexto, puede tener ya una enfermedad diagnosticada, tal como cáncer. De este modo, la presente invención contempla seleccionar un subconjunto de pacientes con cáncer que se beneficiarían del tratamiento con un modulador de PAK. En consecuencia, se puede usar el procedimiento de la invención para comparar los niveles de PAK fosforilada en una biopsia de ensayo de un tumor de un paciente (es decir, "mamífero candidato") con una biopsia de control obtenida de un tejido no tumorigénico del mismo órgano o tejido, o uno adyacente. De acuerdo con la invención, un mayor nivel de fosforilación de PAK en la biopsia del tumor que en el tejido no tumorigénico indica que ese paciente de cáncer es susceptible de tratamiento con un modulador de actividad de PAK.

De acuerdo con la presente invención, la PAK4 fosforilada y proteína PAK4 total pueden detectarse usando anticuerpos que reconocen la forma fosforilada de PAK4 y la proteína PAK4 en general. La presente invención proporciona un procedimiento, entonces, para determinar el nivel de PAK fosforilada en una biopsia de ensayo de mamífero mediante la exposición de la biopsia de ensayo a, por ejemplo, un anticuerpo fosfoespecífico, específico de PAK. El anticuerpo puede marcarse para que sea fácilmente detectable. De este modo, la cantidad de anticuerpo que se une a PAK4 fosforilada en una muestra, se correlaciona con el nivel de PAK fosforilada en la biopsia de ensayo. Dicho anticuerpo fosfoespecífico puede diseñarse para la serina 474 fosforilada de la proteína PAK4. Por ejemplo, un anticuerpo puede inducirse contra la secuencia peptídica de PAK4, RRKSLVGTPY-WMAPE (SEC ID N° 1), en la que la serina 474 comprende un resto de fosfato (negrita, subrayado). Los anticuerpos inducidos contra otras secuencias peptídicas que comprenden la serina fosforilada 474 también se contemplan en la presente invención.

De forma similar, la secuencia peptídica, ATTARGGPGKAGSRGRFAGHSEA (SEC ID N° 2), es exclusiva de PAK4 y puede usarse para producir un anticuerpo que reconoce y se une a esta secuencia particular. En consecuencia, un anticuerpo inducido contra SEC ID N° 2 para detectar la proteína PAK4 por sí misma se contempla en la presente invención.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoclonales, policlonales o una molécula de cadena sencilla recombinante específica. Un anticuerpo de la presente invención también puede marcarse de modo que sea detectable. Por ejemplo, un anticuerpo puede conjugarse o entrecruzarse con una enzima, fluoróforo o cromóforo para ayudar a la detección del anticuerpo una vez que se ha unido a su diana pretendida. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo secundario marcado de forma similar que se une al anticuerpo específico de PAK, facilitando de este modo la detección del anticuerpo unido.

Con dichos anticuerpos, es posible explorar con respecto a compuestos de ensayo que modulan la actividad

de PAK. La divulgación también proporciona un procedimiento para identificar un compuesto que modula la fosforilación de PAK mediante la medición del nivel de fosforilación de PAK4 aislada y/o purificada antes y después de la administración de un compuesto de ensayo. La PAK4 aislada o purificada puede obtenerse a partir de células lisadas o producirse de forma recombinante. El compuesto de ensayo también puede administrarse a células completas que se ensayan posteriormente con un anticuerpo de PAK fosfoespecífico para determinar el efecto del compuesto de ensayo en la actividad de PAK en las células. Una vez identificado como modulador de la actividad de PAK, el compuesto de ensayo puede formularse en una composición terapéutica para su administración a un mamífero *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

Antes del tratamiento con una composición terapéutica, puede tomarse una biopsia de ensayo del mamífero diana para establecer el nivel de fosforilación de PAK en un tejido particular. De este modo, la biopsia de ensayo puede tomarse 1, 5, 7, 14 ó 30 días, por ejemplo, antes del tratamiento con la composición terapéutica. Pueden tomarse múltiples biopsias de ensayo del mismo tejido durante ese tiempo para determinar un nivel de fosforilación de PAK "medio" y para explicar posibles fluctuaciones en esos niveles. Después de dicho tiempo, el mamífero puede someterse a un régimen de dosificación particular en el que la composición terapéutica se administra diariamente, semanalmente o mensualmente, por ejemplo. La composición terapéutica puede administrarse en al menos una dosis de la composición terapéutica, o al menos dos dosis, o al menos 5 o al menos 10 dosis, hasta al menos 55 ó 56 dosis. Estas dosis pueden administrarse durante un periodo de 4 horas hasta aproximadamente 100 días. Las dosis pueden administrarse durante un periodo de 24 horas, 2 días o 28 días. Como alternativa, pueden administrarse dos dosis cada 24 horas o administrarse aproximadamente cada 12 horas. Los expertos en la materia entenderán que la administración de la composición terapéutica puede variarse para adecuarse a las necesidades individuales del mamífero a tratar. Por ejemplo, en un régimen de dosificación típico, el paciente recibe dos dosis por día de composición terapéutica, durante varios días, tal como aproximadamente 28 o aproximadamente 56 días. En otros regímenes de dosificación, la composición terapéutica se administra aproximadamente una vez por día, dos veces por semana o una vez por semana.

Después de que haya terminado el régimen de dosificación, se toma otra biopsia posterior del mismo tejido que el empleado para proporcionar la biopsia "de ensayo". El nivel de fosforilación de PAK en esta biopsia posterior se determina después de acuerdo con los procedimientos de la invención y se compara con los niveles determinados antes del tratamiento. El efecto de la composición terapéutica en el mamífero puede por lo tanto determinarse mediante una disminución en el nivel de fosforilación de PAK después del tratamiento o identificando cambios en los aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos o inmunológicos del mamífero. Las biopsias también pueden tomarse durante el régimen de dosificación y usarse para determinar la eficacia de la composición terapéutica en el mamífero mientras continúa el tratamiento.

Se pretende que los ejemplos a continuación ilustren pero no limiten la invención. Aunque son típicos de los que podrían usarse, pueden usarse otros procedimientos conocidos para los expertos en la materia.

EJEMPLOS

EJEMPLO I

ANTICUERPOS

Anticuerpos policlonales de conejo contra proteína PAK 4 total (Nº 933) se indujeron contra el péptido ATTARGGPGKAGSRGRFAGHSEA (SEC ID Nº 2), que representa los aminoácidos 122-144 de la proteína PAK4. El anticuerpo de conejo policlonal anti-PAK4 fosfoespecífico Nº 108 se indujo contra el fosfopéptido conjugado con KLH sintetizado con Ser-474 fosforilada (CRRKpSLVGTPYWMAPE) (SEC ID Nº 1). La secuencia, RRKSLVGTPYWMAPE, de SEC ID Nº 1 abarca la región 371-385 de la secuencia de la proteína PAK4. Los sueros policlonales de PAK4 fosfoespecíficos Nº 108 se purificaron adicionalmente en una columna de afinidad de proteína A. La especificidad de los sueros purificados con proteína A para PAK4 fosforilada se confirmó mediante ensayos frente a las versiones de péptidos antigénicos CRRKpSLVGTPYWMAPE (SEC ID Nº 1), la CRRKSLVGTPYWMAPE (SEC ID Nº 3) no fosforilada (es decir, péptido "Nº 704") y Thr-478 fosforilada (CRRKSLVGpTPYWMAPE) (SEC ID Nº 4) (es decir, péptido "Nº 681") del péptido de PAK4 para confirmar la especificidad con respecto a la serina fosforilada 474. Se retiró cualquier anticuerpo que se descubriera que reaccionaba de manera cruzada con el péptido no fosforilado pasando los sueros purificados con proteína A a través del péptido Nº 681 acoplado a una columna de Yodoacetilo-Ultralink (Pierce, Estados Unidos).

Para los análisis de transferencia de Western, se usaron los sueros anti PAK4 fosfoespecífico purificados con proteína A (serina 474 fosforilada) a una dilución 1/4000. Para los experimentos de inmunofluorescencia, se preadsorbió el anticuerpo anti PAK4 fosfoespecífico purificado con proteína A con los péptidos Nº 681 y Nº 704. Las diluciones de los anticuerpos de PAK4 usadas para la inmunohistoquímica son las siguientes: Para el Nº 108 se prefirió el intervalo de dilución de 1/250 a 1/100 para los procedimientos de IHC; para el Nº 933 el intervalo de dilución varió 1/50 para el procedimiento de vector red, mientras que se usó una dilución de hasta 1/200 para el procedimiento de tinción ABC.

Ejemplo II

Protocolo IHC para Anticuerpos Primarios de Conejo

Se usó un microtomo para cortar secciones de tejido a 4-5 micrómetros. Véase la Tabla 1, dada a continuación, para ejemplos de los tipos de tejido usados en la presente invención. Las secciones se colocaron flotando en un baño de agua y se recogieron en portaobjetos. Los portaobjetos que contenían secciones de parafina se desparafinizaron usando xileno y alcohol, se rehidrataron y después se sometieron a procedimiento de vapor de recuperación de diana (reactivo DAKO N° S1700). Se realizaron experimentos inmunohistoquímicos en un autocolorante DAKO siguiendo los procedimientos y reactivos desarrollados por DAKO. Específicamente, los portaobjetos se bloquearon (el agente bloqueante se incluía con el kit de Vectastain ABC-AP), se aclararon, se aplicó el anticuerpo primario, se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente y se aclararon los portaobjetos de nuevo. Se aplicó después anticuerpo secundario biotinilado (anticuerpo secundario anti-ratón de Vector, BA-100, diluido a 5 µl/ml) al tejido en el portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron después durante 30 minutos a temperatura ambiente, se aclararon, y se aplicó el reactivo ABC-AP de Vector (AK-5000). Se usó Vector Red (SK-5100) como un sustrato para Vector ABC-AP (AK-5000). Se obtuvo el anticuerpo control, CD31, de DAKO (monoclonal de ratón M0823) y se usó siguiendo sus condiciones a una dilución 1:80 para asegurar la calidad e integridad del tejido de muestra.

Ejemplo III

Procedimiento de Inmunoperoxidasa ABC

(i) Preparación de Portaobjetos

1. Cortar secciones de tejido de 4 µm en portaobjetos cargados. Véase Tabla 1 a continuación para ejemplos de tipos de tejido usados en la presente invención. Colocar portaobjetos en un horno de secado a 60°C durante 20 minutos. Como alternativa, los portaobjetos pueden secarse con aire durante una noche, si se desea.

2. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en rejillas.

3. Eliminar la parafina y rehidratar los portaobjetos (3 cambios de xileno-10 minutos seguido de etanol al 100% 3X, etanol al 95% 2X-10 minutos totales; aclarar con agua destilada).

4. Bloquear peroxidasa endógena: colocar los portaobjetos en peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 minutos.

5. Aclarar los portaobjetos en agua destilada.

6. Pretratamientos: Realizar pretratamiento si se desea. Obsérvese que el posible pretratamiento incluye digestión con proteasa u otra enzima de calentamiento de los portaobjetos en tampón citrato 10 mM, pH 6,0 o tampón EDTA, pH 8,0. Permitir que se enfríen gradualmente los portaobjetos tratados con calor (durante 20 minutos en el tampón) antes de transferirlos a agua destilada. No permitir que los portaobjetos se sequen.

7. Bloqueo de Biotina Endógeno: Realizar procedimientos de bloqueo de biotina si se desea, usando, por ejemplo, un kit Vector de DAKO. Como alternativa, usar el siguiente procedimiento: añadir 200 ml de agua destilada a 75 ml de sustituto de huevo; empapar los portaobjetos durante 15 minutos en la mezcla de huevo, aclarar en agua destilada dos veces; empapar los portaobjetos durante 15 minutos en leche desnatada; aclarar en agua destilada dos veces; transferir los portaobjetos a PBST (tampón PBS más Tween).

8. Lavar en tres cambios de PBST; sin embargo, obsérvese que algunos anticuerpos son sensibles a Tween-20, en cuyo caso no debería añadirse Tween-20 al tampón de PBS.

(ii) Aplicación de Anticuerpo

1. Primario: Diluir anticuerpo primario de ratón (es decir, el anticuerpo de PAK4 fosfoespecífico o el anticuerpo de PAK4 total) en PBS con BSA al 1%. Para anticuerpos monoclonales purificados, habitualmente son óptimas concentraciones en el intervalo de 1-5 µg/ml. Deben determinarse las concentraciones reales, sin embargo mediante valoración. Aplicar un volumen adecuado, por ejemplo, de aproximadamente 100 µl, del anticuerpo primario diluido al tejido; cubrir el tejido completo.

2. Incubar los portaobjetos durante 40 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente o durante una noche a 4°C. Mientras tanto preparar anticuerpo secundario y reactivo terciario (por ejemplo, IgG biotinilado anti-ratón de caballo de Vector (H+L) diluido 1:300 para primarios de ratón monoclonales y ABC Vector Elite). Típicamente, el anticuerpo secundario se dirige a la misma especie en la que se preparó el anticuerpo primario.

3. Lavar los portaobjetos en tres cambios de solución PBST.

4. Aplicar el anticuerpo secundario biotinilado e incubar durante 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

5. Lavar los portaobjetos en 3 cambios de pBST como anteriormente.

6. Aplicar terciario (ABC) a portaobjetos e incubar durante 25 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

5 7. Durante la incubación llenar dos recipientes de rejillas de portaobjetos con 175 ml de tampón Tris 0,05 M y colocar en un baño de agua a 37°C para precalentar. Descongelar una alícuota congelada de diaminobencidina (DAB).

8. Lavar en 3 cambios de PBST durante un mínimo de 10 minutos.

9. Aclarar los portaobjetos en tampón Tris 0,05 M precalentado, pH 7,8-8,0.

10. Colocar los portaobjetos en una solución de DAB e incubar durante 8 minutos.

10 11. Lavar los portaobjetos dos veces en agua destilada.

12. Contrateñir los portaobjetos en hematoxilina de Mayer durante 25-30 segundos.

13. Aclarar los portaobjetos en agua hasta que estén transparentes.

14. Colocar los portaobjetos en hematoxilina azul, que se disuelve en agua con amoníaco al 0,5%, durante aproximadamente 30 segundos. Lavar con tres cambios de agua.

15 15. Deshidratar los portaobjetos con etanol al 95% dos veces y con etanol al 100% tres veces y aclarar con tres lavados de xileno.

16. Colocar un cubreobjetos usando medio de montaje compatible con xileno y cubreobjetos de vidrio o cinta.

Ejemplo IV

20 Inmunofluorescencia

Los cubreobjetos se colocaron en bandejas de cultivo tisular de 24 pocillos y se sembraron a una densidad de 2×10^4 células por pocillo. Las células se transfectaron al siguiente día con un vector de expresión de mamíferos que dirige la expresión de un clon de PAK4 humana. El medio se reemplazó seis horas después de la transfección y se permitió que las células crecieran durante 48 horas. Se lavaron los cubreobjetos de forma prolongada con PBS y después se fijaron con paraformaldehído al 4% frío. Las células fijadas se solubilizaron usando una solución convencional de Triton-X-100 al 0,5%, se lavaron e incubaron con anticuerpos primarios diluidos en PBS que contenía BSA al 1%, suero de conejo purificado con Proteína A dirigido contra el péptido N° 682 (S474-fosfoespecífico), se desalaron y se confirmó la especificidad con respecto a S474 fosfoespecífico mediante análisis de transferencia de Western antes de su uso. Se usó el anticuerpo HA-7 (Sigma, Estados Unidos) para detectar PAK4 exógena. La PAK4 expresada comprende un marcador de epítipo reconocido por anticuerpo HA-7 fusionado con su extremo N terminal. Los cubreobjetos se lavaron de forma prolongada con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario para conejo α de cabra conjugado con rodamina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Estados Unidos) o con un anticuerpo para isotiocianato de fluoresceína de ratón α ("FITC") de cabra conjugado con FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Estados Unidos), junto con Hoechst N° 33342 1 μ g/ml (bis-Bencimida, Sigma, Estados Unidos) en la oscuridad durante dos horas a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavaron y montaron en Fluorosave (Calbiochem Corp., Estados Unidos) y se permitió que secaran durante una noche. Se adquirieron las imágenes usando un objetivo 1,30/emersión en aceite 40 x Nikon, en un microscopio Nikon Eclipse E800 con una cámara SPOT RT.

Tabla 1

	Muestra	Tejido	Diagnóstico	Edad/Sexo
1	1	Cerebro	Normal	74 M
	2	Cerebro	Normal	N/A
2	1	Cerebro	Glioblastoma Multiforme	49 M
	2	Cerebro	Glioblastoma Multiforme	49 M
3	1	Mama	Normal	49 F
	2	Mama	Normal	49 F
4	1	Mama	Adenocarcinoma. Metastásico	79 F
	2	Mama	Adenocarcinoma. Metastásico	62 F

	Muestra	Tejido	Diagnóstico	Edad/Sexo
5	1	Mama	Adenocarcinoma, Intraductal	F
	2	Mama	Adenocarcinoma, Intraductal	54 F
6	1	Mama	Adenocarcinoma, No-Metastásico Local	F
	2	Mama	Adenocarcinoma, No-Metastásico Local	Addendum
7	1	Colon	Normal	N/A
	2	Colon	Normal	F
8	1	Colon	Adenocarcinoma, In Situ o Microinvasivo	N/A
	2	Colon	Adenocarcinoma, In Situ o Microinvasivo	68 M
9	1	Colon	Adenocarcinoma, Metastásico	54 M
	2	Colon	Adenocarcinoma, Metastásico	57 F
10	1	Colon	Adenocarcinoma, No-Metastásico Local	68 M
	2	Colon	Adenocarcinoma, No-Metastásico Local	75 F
11	1	Riñón	Normal	52 F
	2	Riñón	Normal	49 F
12	1	Riñón	Carcinoma de células Renales <7cm	66 M
	2	Riñón	Carcinoma de células Renales <7cm	33 M
13	1	Riñón	Carcinoma de células Renales >7cm	67 M
	2	Riñón	Carcinoma de células Renales >7cm	79 M
14	1	Pulmón	Normal	36 F
	2	Pulmón	Normal	76 F
15	1	Pulmón	Adenocarcinoma, Metastásico	65 M
	2	Pulmón	Adenocarcinoma, Metastásico	34 F
16	1	Pulmón	Adenocarcinoma, No-Metastásico (T1, Etapa fa)	75 F

(cont.)

	Muestra	Tejido	Diagnóstico	Edad/Sexo
	2	Pulmón	Adenocarcinoma, No-Metastásico (T1, Etapa Ia)	66 M
17	1	Pulmón	Adenocarcinoma, No-Metastásico (T2, Etapa Ib)	73 M
	2	Pulmón	Adenocarcinoma, No-Metastásico (T2, Etapa Ib)	Addendum
18	1	Ovario	Normal	F
	2	Ovario	Normal	F
19	1	Ovario	Tumor Seroso o Mucoso de Bajo Potencial Maligno	F
	2	Ovario	Tumor Seroso o Mucoso de Bajo Potencial Maligno	26 F
20	1	Ovario	Carcinoma Seroso Papilar	39 F
	2	Ovario	Carcinoma Seroso Papilar (Limitado a Ovario)	Addendum
	3	Ovario	Carcinoma Seroso Papilar (Limitado a Ovario)	Addendum
21	1	Ovario	Carcinoma Seroso Papilar con Metástasis	26 F
	2	Ovario	Carcinoma Seroso Papilar con Metástasis	F
22	1	Próstata	Normal	18 M
	2	Próstata	Normal	55 M
23	1	Próstata	Adenocarcinoma (Gleason 2-6)	64 M
	2	Próstata	Adenocarcinoma (Gleason 2-6)	65 M
24	1	Próstata	Adenocarcinoma (Gleason 7-10)	66 M
	2	Próstata	Adenocarcinoma (Gleason 7-10)	60 M
25	1	Próstata	Adenocarcinoma, Metastásico	75 M
	2	Próstata	Adenocarcinoma, Metastásico	71 M
26	1	Piel	Normal	72 M
	2	Piel	Normal	7 F
27	1	Piel	Angiosarcoma	92 F
	2	Piel	Angiosarcoma	Addendum
28	1	Piel	Sarcoma de Kaposi	46 M
	2	Piel	Sarcoma de Kaposi	Addendum
29	1	Vaso, Arteria, Coronaria	Normal	69 M
	2	Vaso, Arteria, Coronaria	Normal	26 F

Ejemplo V**Resultados**

Los datos para el anticuerpo fosfoespecífico (Nº 108) en carcinomas de colon son especialmente informativos (6 de 6 pacientes mostraron tinción perinuclear notable en tejido tumoral y benigno no distal; obsérvese que la tinción se detectó usando sustrato de vector red, que proporciona un depósito de color fucsia/rojo. Este resultado sugiere firmemente que PAK4 es específicamente activo en las células tumorales de colon y no en tejido de colon benigno del mismo paciente. La tinción de PAK4 fosforilada también se observó en carcinoma de células renales, adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma prostático, adenocarcinoma de mama intraductal y adenocarcinoma de ovario.

En tumores, una tinción fuerte con anticuerpo de PAK4 fosfoespecífico se identificó en adenocarcinomas de colon (mientras que el tejido benigno distal no mostró tinción de fosfo-PAK4). En una escala de 0-3, "0" indica sin tinción, "1" indica tinción débil, "2" indica tinción moderada y "3" indica tinción fuerte. El epitelio adenomatoso fue positivo de débil a moderadamente, pero la mayor parte del epitelio normal mostró solamente tinción de "1" para PAK4 fosforilada. Los adenocarcinomas prostáticos mostraron tinción moderada ("2").

En tejidos benignos, la tinción más prominente para PAK4 fosforilada se vio en adipocitos, miocitos cardiacos, glándulas sebáceas y macrófagos ocasionales. Los tipos celulares y tisulares positivos adicionales incluyeron folículos pilosos, epitelio prostático benigno, epitelio de mama y urotelio. Los tipos celulares negativos para PAK4 fosforilada incluyeron neumocitos, oocitos, fibroblastos, células gliales del cerebro, neuronas corticales, glomérulos renales, epitelio tubular renal distinto de tubos colectores, oocitos, estroma ovárico y epitelio de la superficie ovárica.

Ocasionalmente, fueron positivos neutrófilos y eosinófilos. Se identificó un resultado positivo menos prominente en tubos colectores renales, asas anchas de Henle, mastocitos y epitelio colónico benigno. Se identificó una tinción débil ("1") en epitelio respiratorio, células de la granulosa ovárica, células de la teca, glándulas sudoríparas ecrinas, estroma prostático y focalmente en endotelio y músculo liso vascular. Se tiñeron varias muestras de epitelio escamoso en la capa basal. Los linfocitos también mostraron tinción ocasional.

En consecuencia, un nivel de PAK4 consolidada que está por encima de lo normal en un cierto tejido es un biomarcador útil para determinar la integridad y estado de las células del tejido.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sugem, Inc.

<120> Anticuerpos de PAK fosfoespecíficos y kits de diagnóstico

<130> PC23574

<150> US 60/429.363

<151> 27-11-2002

<160> 5

<170> Patentin versión 3.3

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ser fosforilada

<400> 1

Cys Arg Arg Lys Ser Leu Val Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ala Pro Glu
1 5 10 15

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Thr Thr Ala Arg Gly Gly Pro Gly Lys Ala Gly Ser Arg Gly Arg
1 5 10 15

Phe Ala Gly His Ser Glu Ala
20

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Cys Arg Arg Lys Ser Leu Val Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ala Pro Glu
1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Thr fosforilada

<400> 4

Cys Arg Arg Lys Ser Leu Val Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ala Pro Glu
1 5 10 15

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ser fosforilada

<400> 5

Lys Glu Val Pro Arg Arg Lys Ser Leu Val Gly Thr Pro Tyr Trp Met
1 5 10 15

Ala Pro Glu

REIVINDICACIONES

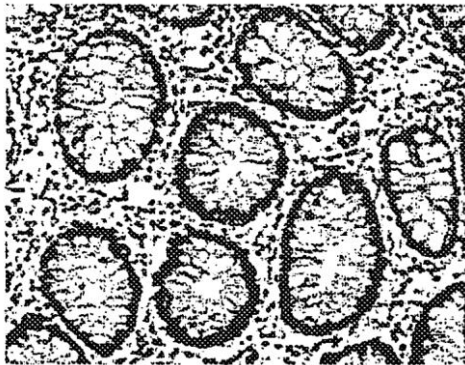
1. Un procedimiento para seleccionar un mamífero susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK4, que comprende:
 - (i) determinar la relación de PAK4 fosforilada a la proteína PAK4 total en una biopsia de ensayo de un tejido de un mamífero candidato; y
 - (ii) comparar la relación de (i) con la relación de PAK4 fosforilada a la proteína PAK4 total en una biopsia de control que se obtiene del mismo tipo de tejido que la biopsia de ensayo del mamífero candidato, en el que el mamífero candidato es susceptible al tratamiento con un modulador de la actividad de PAK4 si la relación de PAK4 fosforilada a la proteína PAK4 total en la biopsia de ensayo es mayor que la de la biopsia de control.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la biopsia de control se obtiene de un mamífero sano de la misma especie que el mamífero candidato.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el mamífero candidato comprende una célula cancerosa.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el mamífero candidato tiene un tumor.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mamífero candidato se selecciona del grupo que consiste en un ser humano, rata, ratón, cerdo, vaca, cabra, mono, gato y perro.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el mamífero es un ser humano.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el nivel de PAK4 fosforilada se determina usando un anticuerpo fosfoespecífico específico para la serina fosforilada de PAK4.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo fosfoespecífico se induce contra el péptido de PAK4, RRKSLVGTPY-WMAPE (SEC ID N°: 1), que comprende una serina fosforilada.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nivel de proteína PAK4 total se determina usando un anticuerpo específico para PAK4.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo específico de PAK4 se induce contra la secuencia peptídica ATTARGGPG-KAGSRGRFAGHSEA (SEC ID N°: 2).

A. Paciente con adenoma vellosos con adenocarcinoma de gran malignidad *in situ*

Carcinoma de colon *in situ*/displasia de gran malignidad



Epitelio benigno distante de adenoma



Tinción de hematoxilina y eosina

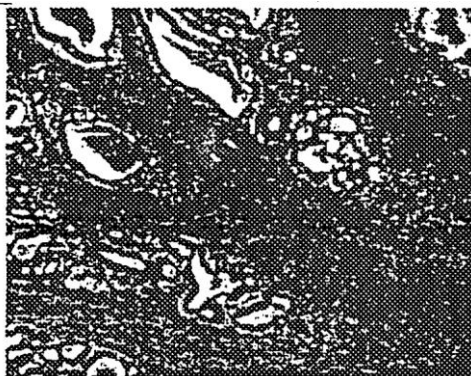


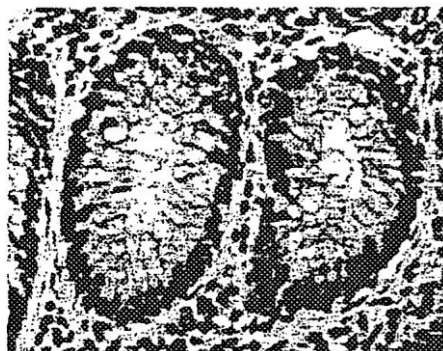
FIG. 1

B. Paciente con adenocarcinoma metastásico de etapa III

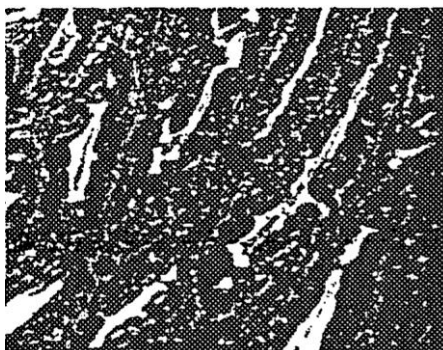
Adenocarcinoma de colon



Epitelio benigno



Tinción de hematoxilina y eosina



C. Sección de colon normal del paciente (detalles del paciente desconocidos)

FIG. 2