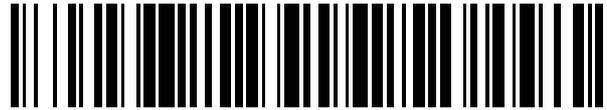


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 224**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2007 E 07776850 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **11.03.2009 EP 2032982**

54 Título: **Uso de perfiles de localización subcelular como indicadores de pronóstico o predictivos**

30 Prioridad:

**05.05.2006 US 797932 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.01.2013**

73 Titular/es:

**YALE UNIVERSITY (50.0%)  
Two Whitney Avenue  
New Haven, CT 06510, US y  
HISTORX, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DOLLED-FILHART, MARISA, P.;  
GUSTAVSON, MARK;  
GILTANE, JENNIFER;  
CAMP, ROBERT, L. y  
RIMM, DAVID, L.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 394 224 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

Uso de perfiles de localización subcelular como indicadores de pronóstico o predictivos.

La presente invención se refiere a un método para determinar el estado de un tumor que expresa un receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR).

5 **Antecedentes**

La señalización del receptor de tirosina quinasas y otras vías de señalización mediadas por receptores generalmente avanzan a través de una vía que incluye la unión al ligando, la activación del receptor, la fosforilación de proteínas intermedias de señalización en el citoplasma que amplifican o interconectan la señal, la translocación de un subconjunto de proteínas de señalización hacia el núcleo, seguido de la activación de la transcripción por la proteína translocada o por otros cofactores nucleares.

El EGFR (HER1) es un miembro de la familia HER de receptores de tirosina quinasas (RTK). Cada RTK tiene un dominio de unión al ligando, una única región que abarca la membrana, y un dominio que contiene tirosina quinasa citoplásmico. En condiciones fisiológicas normales, la activación generalmente es controlada por la expresión temporal y espacial de los ligandos de RTK que incluye mecanismos tales como la homo- o heterodimerización de receptores, la activación de dominios de quinasas, la fosforilación, y los sitios de acoplamiento resultantes en dominios modificados que permiten la activación de vías de señalización corriente abajo implicadas en el crecimiento, la proliferación y/o la supervivencia, tales como Ras/MAPK, PI3K/Akt, PLC $\gamma$ , y STAT. Se sabe que la desregulación de la vía de señalización de EGFR/HER1 está implicada en el desarrollo y el crecimiento de muchos tumores, incluyendo de vejiga, cerebro, mama, colon, esófago, cabeza, riñón, pulmón, ovario, cuello, páncreas, próstata y estómago (véase, por ejemplo, Marmor, M.D., K.B. Skaria, y Y. Yarden, 2004, Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 58:903-913; Olayioye, M.A., R.M. Neve, H.A. Lane, y N.E. Hynes. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19:3159-3167; Riese, D.J., y D.F. Stem, 1998, Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network, *Bioessays*, 20:41-48; Schlessinger, J., 2004, Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors, *Science*, 306:1506-1507; y Yarden, Y., y M.X. Sliwkowski, 2001, Untangling the ErbB signalling network, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:127-137.)

El anticuerpo monoclonal Erbitux (cetuximab), que se dirige a EGFR, tiene la aprobación de la FDA para el tratamiento del cáncer colorrectal. Además, Iressa y Tarceva, dos moléculas pequeñas que se dirigen a EGFR, tienen la aprobación de la FDA para el cáncer de pulmón no microcítico. DakoCytomation California, Inc., proporciona un compañero de diagnóstico aprobado por la FDA que puede detectar EGFR en biopsias de pacientes. Este ensayo puede ser útil, por ejemplo, para identificar pacientes que deberían responder favorablemente a compuestos terapéuticos dirigidos a EGFR. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que los ensayos de diagnóstico de EGFR disponibles en la actualidad no se correlacionan bien con la respuesta del paciente a un tratamiento con compuestos terapéuticos dirigidos a EGFR.

Los documentos US2006/0094068 y US2007/0059785 presentan cada uno un ensayo para uno u otro marcador molecular (que puede incluir pERK o un ERK citoplásmico total comparado con ERK nuclear total) que puede ser útil para predecir si un individuo responderá, o para determinar si un paciente individual está respondiendo al tratamiento con un inhibidor de EGF o EGRF. El método requiere una biopsia antes y después del tratamiento procedente de un sujeto tratado con un inhibidor de EGF o EGFR.

Berclaz et al., *Int. J. Oncology*, 2001, 19:1155-1160 describen un análisis inmunohistoquímico de la expresión de las proteínas STAT1 y STAT3 nuclear y citoplásmica en carcinomas de mama primarios y lo correlacionan, entre otros, con la expresión de EGFR.

Suzuki et al., *Modern Pathology*, 2006, 19:986-998, describen un análisis de la amplificación del gen EGFR, la mutación del gen, la sobreexpresión/fosforilación de la proteína de EGFR, y la activación de sus moléculas corriente abajo en carcinomas de pulmón humanos.

Son necesarios métodos para determinar el estado de activación de una vía de transducción de señales con una referencia específica al receptor de interés, que probablemente requiera determinar dentro del mismo ensayo los niveles de expresión del receptor y de la molécula efectora de la vía, para lograr unos niveles de precisión adecuados.

También son necesarios métodos para determinar el estado de activación de una vía de transducción de señales asociada a un receptor, que evalúen más de una vía posible dentro del mismo ensayo.

También es necesario un ensayo que no requiera una biopsia tras el tratamiento. La labilidad de las proteínas fosforiladas, incluso durante cortos tiempos isquémicos entre la excisión del tejido y la fijación (o congelación) del tejido, puede limitar la utilidad clínica de un ensayo basado estrictamente en la detección de las proteínas fosforiladas. Por tanto, también es necesario diseñar estrategias alternativas para determinar el estado de activación de una vía de transducción de señales que no se basen en la detección precisa de moléculas efectoras fosforiladas,

en especial para las moléculas que resultan inestables en la práctica clínica habitual o cuando no estén disponibles reactivos de detección específicos adecuados.

También es necesario un método que proporcione una información de pronóstico basada en la expresión del receptor y en el estado de activación de una vía o vías de transducción de señales.

## 5 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para determinar el estado de pronóstico de un tumor que expresa un receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende:

a) teñir una sección de tejido del tumor con:

(i) un reactivo para detectar EGFR,

10 (ii) un segundo reactivo para detectar una molécula efectora, siendo la molécula efectora un miembro de la vía de transducción de señales relacionada con EGFR,

(iii) un tercer reactivo para detectar el núcleo;

b) utilizando un microscopio, obtener una imagen digital de alta resolución de:

(i) el EGFR teñido;

15 (ii) la molécula efectora teñida; y

(iii) el núcleo teñido;

c) analizar la imagen digital para cuantificar una cantidad de:

(i) EGFR presente en la sección de tejido;

(ii) molécula efectora presente en el núcleo; y

20 (iii) molécula efectora presente en el citoplasma;

d) determinar una proporción efectora de la cantidad de molécula efectora dentro del núcleo a la cantidad de molécula efectora presente en el citoplasma;

25 en el que (i) un tumor con un nivel elevado de EGFR y una proporción efectora menor que el control indica una mala prognosis; (ii) un tumor con un nivel elevado de EGFR y una proporción efectora mayor que el control indica una prognosis mejor; y (iii) un tumor con un nivel disminuido de EGFR y una proporción efectora menor que el control indica una buena prognosis.

30 La tinción en la etapa a) puede realizarse mediante un método inmunohistoquímico. El microscopio puede ser un microscopio óptico. En el método de la presente invención, la molécula efectora puede seleccionarse de Grb2, Ras, ERK1, ERK2, RAF1, MEK1, MEK2, AKT, pAKT, GSK3, pGSK3, mTOR, 70s6k, eIF4B, 4E-BPI, eIF2B, NFkB, CREB, JAK, y STAT. En una realización, la molécula efectora se selecciona del grupo que consisten en Akt1, Erk y Stat3. La proporción efectora de Akt1, ERK, y STAT3 puede cuantificarse y pueden promediarse las proporciones para obtener un cociente de señalización. En la presente invención, el segundo reactivo puede utilizarse para determinar la cantidad de expresión total de una molécula efectora o la cantidad de expresión de una molécula efectora fosforilada. La molécula efectora puede ser un efector final.

35 El análisis de tumores para determinar el nivel de expresión de EGFR y la proporción de la cantidad de al menos una molécula efectora corriente abajo de EGFR en el núcleo con relación al citoplasma proporciona una indicación del nivel de activación de una vía de señalización de EGFR en un tumor concreto. Esta importante información puede ser útil, por ejemplo, para: (a) la clasificación de pronóstico de pacientes; (b) la predicción de la respuesta a un fármaco; (c) la selección de pacientes para terapias bioespecíficas (tales como, pero sin limitarse a fármacos dirigidos a EGFR o señalización de la familia HER); (d) la identificación de respondedores a fármacos y/o la identificación de resistencia a fármacos. La cuantificación de múltiples moléculas efectoras corriente abajo de EGFR y el promedio de las proporciones nuclear/citoplásmica para cada uno se puede normalizar para las variaciones (por ejemplo, debidas a las condiciones de fijación, etc.), proporcionando con ello un mayor poder clasificador que el que se consigue a través de mediciones cuantitativas de marcadores individuales.

45 Otras características y ventajas serán evidentes basándose en la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que representa la supervivencia acumulada frente al tiempo (en meses).

La figura 2A es una gráfica de los resultados de un análisis de agrupamiento jerárquico supervisado realizado agrupando especímenes según la media de la puntuación de la tecnología AQUA® para EGFR y la media del cociente de señalización (SQ) para Akt, Erk1/2 y Stat3. Se observaron cuatro grupos clave de tumores. En la figura 2B, la gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier demuestra que no existe una diferencia significativa en la supervivencia entre estos 4 grupos.

La figura 3A muestra el análisis de la supervivencia repartido entre el punto de corte óptimo según el programa informático X-Tile para la expresión de EGFR, y la media de las proporciones nuclear:citoplásmica (un agrupamiento más riguroso que el mostrado en la anterior figura 2). La figura 3B indica que el SQ por sí solo no se correlaciona significativamente con la supervivencia global. Sin embargo, la figura 3C demuestra que la combinación de la expresión de EGFR con el SQ produce diferencias significativas ( $p = 0,008$ ) observadas en la supervivencia específica de enfermedad en tres años entre los cuatro grupos.

La figura 4A muestra el análisis de la supervivencia repartido entre la puntuación media (puntuación  $Z = 0$ ) para la expresión de EGFR y la media de las proporciones nuclear:citoplásmica. Los pacientes con alto EGFR y bajo cociente de señalización tienen la peor prognosis. La figura 4B indica que el SQ por sí solo no se correlaciona significativamente con la supervivencia global. Sin embargo, la figura 4C demuestra que la combinación de la expresión de EGFR con el SQ produce diferencias significativas ( $p = 0,028$ ) observadas en la supervivencia específica de enfermedad en tres años entre los cuatro grupos. Los grupos A-D son distintos de los que aparecen en la figura 3.

La figura 5 muestra de modo esquemático el EGFR sobre la membrana de la célula y los efectores corriente abajo Akt, Erk, y Stat3 en el citoplasma y en el núcleo.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Por conveniencia, antes de profundizar en la descripción de la presente invención, se definen ciertos términos y expresiones empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas. Las formas singulares “un/una” y “el/la” incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término “anticuerpo”, tal como se emplea en la presente, pretende incluir anticuerpos completos, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), e incluye cualquiera de sus fragmentos que también sean específicamente reactivos con una proteína de vertebrado, por ejemplo, de mamífero. Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales, y los fragmentos pueden seleccionarse según su utilidad de la misma manera que la descrita anteriormente para anticuerpos completos. Así, el término incluye segmentos de porciones de una molécula de anticuerpo rota de modo proteolítico o preparados de modo recombinante que son capaces de reaccionar de modo selectivo con una proteína concreta. Los ejemplos no limitantes de estos fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv y anticuerpos monocatenarios (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unidos por un conector peptídico. Los scFv pueden estar unidos de modo covalente o no covalente para formar anticuerpos que tengan dos o más sitios de unión. La presente invención incluye anticuerpos policlonales, monoclonales u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes. Un anticuerpo empleado para la detección de un biomarcador de la presente invención puede ser un anticuerpo marcado. El anticuerpo marcado puede comprender un marcador fluorescente para la detección.

El término “biomarcador” puede referirse a cualquier constituyente de una célula en un tejido incluyendo, por ejemplo, una proteína cuya presencia, concentración, actividad, estado de fosforilación, perfil de localización subcelular y/o estado de translocación puede determinarse. Un “biomarcador” puede referirse a una proteína que es un miembro de la vía de transducción de señales de EGFR, incluyendo EGFR y moléculas efectoras corriente abajo de EGFR.

La expresión “punto de corte” se refiere al punto en el que se dividen los datos. Por ejemplo, una población de pacientes puede dividirse en un punto de corte  $x$  entre un grupo que tiene un número alto de expresores de biomarcadores ( $\geq x$ ) y un grupo que tiene un número bajo de expresores de biomarcadores ( $\leq x$ ) (véase, por ejemplo, Camp, R.L., et al. (2004), Xtile: a new bioinformatics tool for biomarker assessment and outcome-based cutpoint optimization, 9, Clin. Cancer Res., 10:7252-7259).

Los “fármacos” según los métodos proporcionados en la presente incluyen, entre otros, proteínas, ácidos nucleicos que incluyen ADN, ARN, ARNi, ANP, ribozimas, anticuerpos, moléculas pequeñas, ligandos y similares, para los cuales se está investigando el efecto del fármaco sobre la vía de transducción de señales diana, o este efecto es conocido y se emplea para determinar las poblaciones de pacientes apropiadas de las cuales se predice que van a responder al fármaco. El término “fármaco” incluye compuestos naturales o sintéticos, incluyendo candidatos a compuestos terapéuticos.

La expresión “molécula efectora” se refiere a cualquier molécula en una vía de señalización celular. La expresión “molécula efectora final” se refiere a cualquier molécula en una vía de señalización celular que es capaz de

- translocarse entre el citoplasma y el núcleo de la célula. Loas moléculas efectoras preferidas incluyen el protooncogén vírico de timoma 1 (Akt1 o Akt o PKB/Akt o PKBalfa; la secuencia de la proteína humana se proporciona en el nº de registro NCBI AAL55732), transductor de señales y activador de la transcripción 3 o factor respondedor de fase aguda (Stat3; la secuencia de la proteína humana se proporciona en el nº de registro NCBI AAK17196), y la proteína quinasa activada por mitógenos 3 (MAPK3 o Erk1; la secuencia de la proteína humana se proporciona en el nº de registro NCBI AAH13754), Grb2, Ras, mTOR, GSK3, eIF2B, NFkB, CREB, JAK. Las moléculas efectoras corriente abajo de EGFR pueden o no estar fosforiladas en cualquier momento.
- 5 “EGFR o receptor del factor del crecimiento epidérmico”, también denominado HER1 o ErbB-1, es un receptor de la superficie celular que es miembro de la familia del factor del crecimiento epidérmico. La proteína de EGFR humana se proporciona en el nº de registro NCBI NP\_958439 y NP\_958441, cuyas secuencias se incorporan expresamente en la presente como referencia.
- 10 Un “perfil de señalización” se refiere a la combinación de un nivel de expresión de un receptor para un tumor particular y el nivel de expresión de al menos una molécula efectora. En una realización preferida, el perfil de señalización es la combinación del nivel de expresión de EGFR para un tumor particular y el promedio de la proporción nuclear:citoplásmica para al menos una molécula efectora corriente abajo.
- 15 Un “producto terapéutico dirigido a EGFR” se refiere a un fármaco que se dirige a EGFR en un sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a Erbitux (cetuxibam), Iressa y Tarceva.
- Un “paciente” o un “sujeto” puede significar un ser humano o un animal no humano.
- 20 Una “proteína”, un “polipéptido” y un “péptido” se emplean de modo intercambiable en la presente cuando se refieren a un producto génico, por ejemplo, tal como puede ser codificado por una secuencia codificadora de un ácido nucleico.
- El “cociente de señalización” se refiere a la proporción promediada nuclear:citoplásmica para al menos una molécula efectora corriente abajo del receptor.
- 25 El “potencial de señalización” se refiere a la actividad relativa de una vía de transducción de señales de una célula tumoral. Se espera que los tumores con vías de señalización activas sean más agresivos, lo cual produce un menor tiempo de supervivencia del paciente. A la inversa, se espera que los tumores con vías de señalización inactivas sean menos agresivos, lo cual produce un mayor tiempo de supervivencia del paciente.
- 30 Una “molécula pequeña” se refiere a una composición que tiene un peso molecular menor que aproximadamente 2000 kDa. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, basándose en la siguiente descripción pueden seleccionarse bancos de mezclas químicas y/o biológicas, a menudo extractos fúngicos, bacterianos o de algas, con cualquiera de los ensayos de la invención para identificar compuestos que modulen una bioactividad.
- 35 Un “perfil de localización subcelular” se refiere al nivel de una molécula efectora corriente abajo del receptor en una localización subcelular, por ejemplo, el núcleo celular o el citoplasma celular. En una realización preferida, el perfil de localización subcelular es el nivel de una molécula efectora final en el núcleo, comparado con el nivel de la misma molécula efectora en el citoplasma. El perfil de localización subcelular puede expresarse en términos de una proporción (o el logaritmo de una proporción).
- 40 Una “muestra de tejido”, tal como emplea en la presente, se refiere a una muestra biológica obtenida de un tejido en el cuerpo, por ejemplo, una biopsia. En una realización preferida, la muestra de tejido es de tumor. Con frecuencia, la muestra de tejido será una “muestra clínica”, que es una muestra procedente de un paciente, tal como una muestra de biopsia con aguja fina. Una “muestra de tejido” también puede incluir una sección de tejido, tal como una sección obtenida de un tumor congelado o fijado. Las muestras de tejido pueden obtenerse de tumores, por ejemplo, pero sin limitarse a tumores de vejiga, cerebro, mama, útero, cérvix, colon, recto, esófago, boca, cabeza, piel, riñón, pulmón, ovario, cuello, páncreas, próstata, testículo, hígado y estómago. La muestra de tejido puede estar presente en una colección de tejidos o puede comprender una sección de un tejido completo. Una muestra de tejido “con correspondencia pareja” es una muestra de tejido del mismo tipo (es decir, que comprende los mismos tipos de células procedentes del mismo tipo de tumor del mismo tipo de sujeto). Las muestras de tejido “con correspondencia pareja” puede utilizarse para proporciona perfiles de referencia en los métodos proporcionados en la presente.
- 45 50 Un “tumor” se refiere a un crecimiento anómalo de tejido que puede estar formado por células que, por ejemplo, expresan el receptor del factor del crecimiento epidérmico sobre sus membranas celulares. Los tumores pueden estar presentes, por ejemplo, en la vejiga, cerebro, mama, útero, cérvix, colon, recto, esófago, cabeza, piel, riñón, pulmón (incluyendo el cáncer de pulmón no microcítico), ovario, cuello, páncreas, próstata, testículo, hígado y estómago.

Descripción general

La presente invención se basa en el descubrimiento de que es posible ensayar para una molécula de receptor y para uno o más moléculas efectoras corriente abajo en la vía de transducción de señales del receptor, en secciones de tejido mediante métodos inmunohistoquímicos para determinar un estado de activación de la vía y para proporcionar información de pronóstico.

Una realización específica de la presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que los pacientes con tumores que expresan niveles relativamente altos de EGFR, pero que tienen un cociente de señalización relativamente bajo (es decir, mayor señal citoplásmica con relación a la nuclear para al menos una molécula efectora corriente abajo) tienen la tasa de supervivencia menor. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que las células tumorales con mayor nivel citoplásmico total de una molécula efectora con relación al nivel nuclear de la molécula efectora tienen mayor potencial de señalización, porque hay más moléculas disponibles para la activación. En apoyo a esta hipótesis, se ha demostrado que la acumulación nuclear de Erk1/2 es transitoria, y que Erk1/2 nuclear se relocaliza con rapidez hacia el citoplasma para esperar la siguiente ronda de estimulación (Adachi, M., et al. (2000), Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism, J. Cell. Biol., 148:849-856).

Basándose en estos descubrimientos, la invención incluye métodos para determinar el perfil de señalización de tumores que expresan EGFR (es decir, la cantidad relativa de EGFR expresado y el cociente de señalización (proporción relativa de la cantidad de cada efector corriente abajo expresada en el núcleo frente a la cantidad expresada en el citoplasma). Un método para determinar el perfil de señalización de un tumor comprende determinar el nivel de EGFR en una muestra de tejido procedente de un tumor y al menos una molécula efectora de EGFR. Además de la cuantificación de EGFR, un método para determinar el perfil de señalización de EGFR de un tumor también comprende determinar los niveles nucleares y citoplásmicos de al menos una molécula efectora corriente abajo de EGFR en una sección de tejido. Pueden medirse las proteínas fosforiladas o no fosforiladas. Como ejemplo, pueden medirse los niveles de moléculas efectoras totales corriente abajo en el citoplasma, mientras que también pueden medirse los niveles de moléculas efectoras totales corriente abajo en el compartimento nuclear. Como alternativa, pueden medirse las moléculas p-efectoras totales en el citoplasma y las moléculas p-efectoras totales en el núcleo.

Los niveles nuclear y citoplásmico de al menos una molécula efectora corriente abajo de EGFR en el tejido tumoral después se comparan entre sí para determinar una localización relativa (citoplásmica o nuclear) de al menos una molécula efectora corriente abajo de EGFR en el tumor del sujeto. En una realización, los presentes métodos comprenden determinar si Ekr, AKT, Stat3 y/u otra molécula efectora corriente abajo de EGFR está más localizada en el citoplasma de las células tumorales de la muestra, o está más localizada en el núcleo de las células tumorales de la muestra. En los presentes métodos puede utilizarse cualquier método adecuado para determinar la localización relativa de un marcador biológico específico. En una realización, se determinan específicamente los niveles del receptor y los niveles nuclear y citoplásmico de al menos una molécula efectora corriente abajo en la muestra, y se calcula la proporción de los niveles nuclear a citoplásmico determinados (una "proporción nuclear a citoplásmica") para determinar la localización relativa, y se emplea en el contexto del nivel del receptor. En otra realización puede calcularse un "cociente de señalización" para determinar la localización relativa de dicha al menos una molécula efectora corriente abajo en la muestra, y emplearse en el contexto del nivel de receptor. Como ejemplo, el cociente de señalización puede expresarse como la transformación logarítmica de la media de 3 u otro número de proporciones calculadas para los niveles nuclear:citoplásmico de una o más moléculas efectoras corriente abajo de EGFR.

La localización relativa de dicha al menos una molécula efectora corriente abajo de EGFR, expresada como una proporción simple o cociente de señalización o mediante otra forma, entonces se compara con una referencia de parámetros determinados a partir de una estratificación conocida del paciente. La referencia puede determinarse de modo experimental o puede ser un valor predeterminado procedente de un conjunto de datos ya existentes. Si se determina que dicha dicha al menos una molécula efectora corriente abajo de EGFR en la muestra de tejido está localizada más en el compartimento citoplásmico que en el compartimento nuclear, con relación a una referencia, y la diferencia en la localización con relación a la referencia es significativa, entonces se considera que el tumor es agresivo, con la condición de que también se haya determinado que el tumor tenga un nivel de expresión de EGFR relativamente alto (tal como se describe a continuación). Sin embargo, si se determina que dicha al menos una molécula efectora corriente abajo de EGFR en la muestra de tejido está localizada más en el compartimento citoplásmico que en el compartimento nuclear, con relación a una referencia, y también se ha determinado que el tumor tiene un nivel de expresión de EGFR relativamente bajo (tal como se describe a continuación), y la diferencia en la localización con relación a la referencia es significativa, entonces se considera que el tumor es relativamente menos agresivo. Además, si se determina que dicha al menos una molécula efectora corriente abajo de EGFR en la muestra de tejido está localizada más en el compartimento nuclear que en el compartimento citoplásmico, con relación a una referencia, y también se ha determinado que el tumor tiene un nivel de expresión de EGFR relativamente bajo (tal como se describe a continuación), y la diferencia en la localización con relación a la referencia es significativa, entonces se considera que el tumor es relativamente menos agresivo de modo similar. Si se determina que dicha dicha al menos una molécula efectora corriente abajo de EGFR en la muestra de tejido está localizada más en el compartimento nuclear que en el compartimento citoplásmico, con relación a una referencia, y

también se ha determinado que el tumor tiene un nivel de expresión de EGFR relativamente alto (tal como se describe a continuación), y la diferencia en la localización con relación a la referencia es significativa, entonces se considera que el tumor es relativamente menos a moderadamente agresivo.

- 5 El EGFR y las moléculas efectoras corriente abajo pueden medirse mediante cualquier medio adecuado, según se conoce en la técnica. Para la evaluación de la activación de señales puede utilizarse el logaritmo del cociente de señalización para ajustar una distribución no normal que es el resultado de la construcción de una proporción.

#### Preparación de los tejidos

10 Las muestras de tejido se obtienen del cuerpo e incluyen células y material extracelular. Las muestras de tejido pueden proceder de seres humanos o de animales no humanos. Las muestras de tejido pueden proceder de cualquier órgano y pueden incluir estados de enfermedad de dichos órganos. Las muestras de tejido tales como biopsias de tumores pueden obtenerse utilizando procedimientos conocidos, tales como biopsia con aguja (véase, Kim, C.H. et al., J. Virol., 66:3879-3882 (1992); Biswas, B. et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 590:582-583 (1990); Biswas, B. et al., J. Clin. Microbiol., 29:2228-2233 (1991)). El tejido se procesará de una manera que permita la detección y la cuantificación precisas de EGFR y de proteínas efectoras corriente abajo (por ejemplo, Erk y AKT).  
 15 La muestra de tejido puede prepararse en un formato de micromatriz de tejidos y cortarse en secciones o puede comprender una sección de un tejido completo. Generalmente las secciones se preparan sobre portaobjetos para microscopio. Por ejemplo, pueden prepararse especímenes fijados con formaldehído e introducidos en parafina, puede tomarse la zona central de áreas distintas de los especímenes, cada zona central se dispone en un bloque receptor, y las secciones se cortan y se procesan como se ha descrito previamente, por ejemplo, en Kononen, J. et al., Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens (1987), Nat. Med., 4:844-847.  
 20 Cuando se analizan muestras de tejido procedentes de individuos, puede ser importante evitar que se produzca cualquier cambio, procesamiento fisiológico o degradación, en particular en la expresión de proteínas después de que el tejido o las células se han retirado del sujeto. Se sabe que los cambios en los niveles de expresión cambian con rapidez tras una perturbación, por ejemplo, choque térmico o activación con lipopolisacáridos (LPS) u otros reactivos. Además, el ARN y las proteínas en el tejido y las células pueden degradarse con rapidez. Por consiguiente, los tejidos obtenidos de un sujeto de modo ideal deben fijarse o congelarse inmediatamente. Los especímenes de tejidos también pueden incluir muestras de tumores de xenoinjerto, en particular procedentes de animales en estudios de intervalo de dosis de fármaco o de toxicología.

#### Cuantificación

30 En los presentes métodos puede utilizarse cualquier método para cuantificar el EGFR y para cuantificar y localizar moléculas efectoras corriente abajo. Un método preferido utiliza la inmunohistoquímica, un método de tinción basado en reacciones inmunoenzimáticas que emplea anticuerpos monoclonales o policlonales para detectar células o proteínas específicas, tales como antígenos de tejidos. Generalmente, los protocolos de inmunohistoquímica implican al menos algunas de las siguientes etapas: 1) recuperación del antígeno (por ejemplo, mediante cocido a presión, tratamiento con proteasas, microondas, calentamiento en tampones apropiados, etc.); 2) aplicación de anticuerpos primarios y lavado; 3) aplicación de un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo primario (a menudo un conjugado de anticuerpo secundario que permite la detección en la etapa 5) y lavado; 4) puede incluirse una etapa de amplificación; 5) la aplicación de un reactivo de detección (por ejemplo, un cromógeno, una molécula marcada de modo fluorescente o cualquier molécula que tenga un intervalo dinámico apropiado para lograr el nivel o la sensibilidad requerida para el ensayo); 6) puede utilizarse una contratinción; y 7) una detección utilizando un sistema de detección que hace visible la presencia de proteínas (para el ojo humano o para un sistema de análisis automático), para análisis cualitativos o cuantitativos. En la técnica se conocen diversos métodos de tinción inmunoenzimáticos para detectar una proteína de interés. Por ejemplo, las interacciones inmunoenzimáticas pueden visualizarse utilizando diferentes enzimas, tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, o diferentes cromógenos, tales como DAB, AEC, o rojo Fast; o marcadores fluorescentes, tales como FITC, Cy3, Cy5, Cy7, Alexafluors, etc. Los contratintes pueden incluir H&E, DAPI, Hoechst, con la condición de que dichos tintes sean compatibles con otros reactivos de detección y con la estrategia de visualización empleados. Tal como se conoce en la técnica, pueden utilizarse reactivos de amplificación para intensificar la señal de tinción. Por ejemplo, pueden utilizarse reactivos de tiramida. Los métodos de tinción de la presente invención pueden llevarse a cabo utilizando cualquier método o sistema adecuados, tal como será evidente para los expertos en la técnica, incluyendo sistemas automáticos, semiautomáticos o manuales.

El nivel de la proteína de EGFR y de la molécula o moléculas efectoras corriente abajo puede analizarse utilizando un anticuerpo específico apropiado, tal como entenderán los expertos en la técnica. Puede determinarse el nivel total de proteínas o, de modo específico, el nivel de proteínas fosforiladas.

55 Los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo utilizando métodos o sistemas adecuados para un análisis de inmunohistoquímica, tal como será evidente para los expertos en la técnica, que incluyen sistemas automáticos, IHC cuantitativa y, en algunas circunstancias pero de modo menos preferido, IHC semicuantitativa, y métodos manuales. Tal como se utiliza en la presente, una inmunohistoquímica "cuantitativa" se refiere a un método, que puede consistir en un barrido y puntuación automáticos del tejido teñido con IHC para identificar y cuantificar la presencia de un biomarcador específico, tal como un antígeno u otra proteína. La puntuación que se le da a la

muestra puede ser una representación numérica de la intensidad o de la densidad óptica (OD) de la tinción inmunohistoquímica de la muestra, y representa la cantidad de biomarcador diana presente en la muestra. La medición cuantitativa puede ser relativa o absoluta. Por ejemplo, los especímenes control en el ensayo de IHC pueden correlacionarse con resultados de ELISA obtenidos para los mismos especímenes control, generando con ello una curva patrón para determinar las concentraciones absolutas del biomarcador en los especímenes de tejidos. La puntuación puede representar la intensidad de tinción u OD dividida entre la unidad de área o porcentaje de células teñidas. Tal como se emplea en la presente, una inmunohistoquímica semicuantitativa se refiere a la puntuación de los resultados inmunohistoquímicos, por ejemplo por el ojo humano, en la que un operario cualificado clasifica los resultados numéricamente (por ejemplo, como 0, 1+, 2+ o 3+). Lo más preferido es una inmunohistoquímica cuantitativa que proporcione resultados en una escala continua.

En la técnica se conocen diversos sistemas de procesamiento, barrido y análisis de muestras automáticos para su uso en la inmunohistoquímica. Estos sistemas pueden incluir tinción automática y barrido microscópico, análisis de imágenes por ordenador, comparación de secciones en serie (para controlar la variación en la orientación y el tamaño de una muestra), generación de un informe digital, y archivo y seguimiento de muestras (tales como portaobjetos sobre los cuales se colocan las secciones de tejido). En el mercado están disponibles sistemas de formación de imágenes celulares que combinan microscopios ópticos, fluorescentes o confocales convencionales con sistemas de procesamiento de imágenes digitales para realizar análisis cuantitativos de células y tejidos, incluyendo muestras inmunoteñidas. Véase, por ejemplo, el sistema CAS-200 (Becton, Dickinson & Co.); BLISS y IHCscore de Bacus Laboratories, Inc. (Lombard, Ill); ACIS de Clariant, Inc. (San Juan Capistrano, California); iVision y GenoMx de BioGenex (San Ramon, California); ScanScope de Aperio Technologies (Vista, California); Ariol SL-50 de Applied Imaging Corporation (San Jose, California); LSC Laser Scanning Cytometer de CompuCyte Corporation (Cambridge, Massachusetts); y AQUA® de HistoRx Inc. (New Haven, Connecticut).

En ciertas realizaciones, se determina el nivel de expresión (y/o la modificación, tal como una fosforilación) de la proteína de EGFR y los biomarcadores de moléculas efectoras corriente abajo en secciones de tejido teñidas utilizando la tecnología AQUA®, que permite mediciones cuantitativas de la expresión de proteínas dentro de compartimentos subcelulares que producen, por ejemplo, un número directamente proporcional al número de moléculas expresadas por unidad de área (véase, Camp, R.L., Chung, G.G. y Rimm, D.L., Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays, *Nat. Med.*, 8, 1323-1327 (2002), así como el documento WO02/086498). Los compartimentos subcelulares pueden incluir compartimentos morfológicamente definidos o compartimentos molecularmente definidos. Un compartimento subcelular puede ser la membrana celular, el citoplasma celular, el núcleo, un lisosoma, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, etc.

Los métodos para determinar de modo cuantitativo la expresión de biomarcadores pueden comprender determinar la localización subcelular de los biomarcadores en la célula, así como la cantidad de proteínas totales o fosforiladas en compartimentos subcelulares seleccionados de la célula. La tecnología AQUA® es un ejemplo de un método que consigue ambos objetivos. Una realización de los métodos de la invención en la que se emplea la tecnología AQUA® para cuantificar biomarcadores en un tejido se describe en la siguiente sección de ejemplos.

Pueden utilizarse diversas metodologías para representar la relación entre la proteína del receptor y las moléculas efectoras corriente abajo.

La actividad de la vía de transducción de señales puede representarse mediante la relación entre el nivel de expresión de la proteína del receptor y los niveles de expresión de la molécula o moléculas efectoras corriente abajo. Esta relación puede representarse mediante una proporción de receptor:efector, de receptor a múltiples efectores, de modo individual o en combinación (por ejemplo, una combinación de un promedio, una media, una mediana o una determinación basada en un punto de corte óptimo, o una determinación en agrupamiento). Además, el nivel de expresión de la proteína del receptor puede relacionarse con el nivel de expresión de la molécula efectora corriente abajo en un compartimento subcelular particular (por ejemplo, expresión citoplásmica de receptor:efector o expresión nuclear de receptor:efector). En una realización, el nivel de expresión de la proteína del receptor se relaciona con la proporción de la proporción de expresión del receptor en un compartimento con respecto a otro compartimento, es decir, la proporción citoplásmica:nuclear. Puesto que muchas moléculas de receptor transmiten su señal de activación a través de múltiples vías, puede resultar deseable combinar el nivel de expresión del receptor con múltiples moléculas efectoras que representan una o más de las vías posibles. Por ejemplo, el EGFR, tras la unión al ligando, se homodimeriza o heterodimeriza activando la fosforilación de la tirosina de las subunidades del receptor. Las tirosina quinasa intracelulares de la familia Src y la familia Abl también son capaces de fosforilar la tirosina de los receptores EGFR, permitiendo que las proteínas se unan a través de dominios de Src de homología 2 (SH2), que conduce a la activación de cascadas de señalización corriente abajo que incluyen: 1) la vía de RAS/ERK, 2) la vía de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3k), y 3) la vía de quinasa Janus/transductor de señales y activador de la transcripción (JAK/STAT). Se cree que las vías actúan de una manera coordinada para estimular la supervivencia celular, en particular en ciertos cánceres. Por tanto, para determinar el estado de activación de la transducción de señales de EGFR, un ensayo puede incluir EGFR y moléculas efectoras (totales y/o fosforiladas) de la vía de ERK, la vía de PI3k y/o la vía de JAK/STAT. Las moléculas efectoras de la vía de ERK incluyen Grb2, RAS, RAF1, MEK1, MEK2, ERK1 y ERK2. Las moléculas efectoras de la vía de PI3k incluyen AKT, mTOR, 70s6k, eIF4B, 4E-BP1, GSK3, eIF2B, NFkB, y CREB. Las moléculas efectoras de la vía de JAK/STAT incluyen JAK y STAT (véase, Asnaghi L., et al., 2004, *Pharmacol. Res.*, 50:545-549; Henson E.S., et al., 2006, *Cell Sig.*; Jorissen R.N., et

al., 2003, Exp. Cell Res., 284:31-53; Kisseleva T., et al., 2002, Gene, 285:1-24; Lizcano J.M., et al., 2002, Curr. Bio., 12:236-238; Nair P., 2005, Curr. Sci., 88:890-898; Yarden Y., 2001, Eur. J. Cancer, 37:S3-S8). En una realización particular, un ensayo de actividad de transducción de señales de EGFR mide de modo específico la expresión de las moléculas efectoras finales para una o más de las vías, es decir, ERK, AKT y/o STAT. Puesto que estas moléculas se translocan desde el citoplasma hacia el núcleo cuando la vía está activa, en una realización particular de la presente invención se determinan los niveles citoplásmico y nuclear de estas moléculas efectoras finales. Además, en una realización particular, un ensayo de actividad de transducción de señales de EGFR incluye la determinación de la proporción de los niveles de expresión citoplásmica a nuclear de ERK, AKT y/o STAT. En otra realización, las proporciones de expresión del efector citoplásmica a nuclear se promedian para proporcionar un cociente de señalización.

En la presente se describen kits para la práctica de los métodos descritos anteriormente. Estos kits pueden comprender anticuerpos contra biomarcadores y reactivos apropiados. Los reactivos pueden incluir reactivos de bloqueo, anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios, sistemas de amplificación, reactivos de detección (cromógeno, fluoróforo, etc.), tampones de dilución, disoluciones de lavado, disoluciones de montaje, contratintes o cualquiera de sus combinaciones. Los componentes del kit pueden envasarse para la práctica manual o parcial o totalmente automática de los anteriores métodos, y pueden incluir instrucciones para su uso. Estos kits pueden tener una diversidad de usos que incluyen, por ejemplo, la formación de imágenes, la estratificación de poblaciones de pacientes, el diagnóstico, la prognosis, indicaciones para las decisiones de tratamiento terapéutico, y otras aplicaciones.

La cuantificación de EGFR y al menos una molécula efectora en el núcleo y en el citoplasma puede analizarse utilizando un anticuerpo apropiado. En el mercado están disponibles anticuerpos contra EGFR (por ejemplo, PharmDx Kit; DAKO, Carpintería, CA). También están disponibles en el mercado anticuerpos contra Akt1 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal de ratón, clon 2H10; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y Erk1/2 (por ejemplo, anticuerpo policlonal de ratón; Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Están disponibles anticuerpos específicos de Ser(473)fosfo-AKT (véase, por ejemplo, Srinivasan et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., octubre de 2002, 283(4):E784-793). En el mercado están disponibles anticuerpos que reaccionan con p-erk1 y p-erk2 (por ejemplo, en Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; véase también la patente de EEUU nº 6.001.580). Otros anticuerpos están disponibles en Calbiochem® (catálogo general de Calbiochem, 2006-2007). En la técnica se conocen otras fuentes comerciales de anticuerpos apropiados. En ciertas realizaciones, el nivel de expresión (y/o una modificación, tal como la fosforilación) de los biomarcadores se determina mediante la determinación de la puntuación de la tecnología AQUA® de cada biomarcador en el panel, por ejemplo, utilizando el sistema de patología automática de la tecnología AQUA®. La tecnología AQUA® (de "Automated Quantitative Analysis", análisis cuantitativo automático) es un método de análisis de medición absoluta de la expresión de proteínas *in situ*. Este método permite las mediciones de la expresión de proteínas dentro de compartimentos subcelulares que produce un número directamente proporcional al número de moléculas expresadas por unidad de área.

Este método, incluyendo los detalles de métodos de formación de imágenes de sustracción de luz desenfocada, se describe en detalle en Camp, R.L., Chung, G.G. y Rimm, D.L., Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays, Nat. Med., 8, 1323-1327 (2002), así como en el documento WO02/086498. AQUA® es un método de análisis de medición absoluta de la expresión de proteínas *in situ*. Este método permite las mediciones de la expresión de proteínas dentro de compartimentos subcelulares que, por ejemplo, produce un número directamente proporcional al número de moléculas expresadas por unidad de área. Brevemente, por ejemplo, para medir Akt el tejido se "enmascara" utilizando una imagen de tinción de queratina obtenida en un canal para determinar el área del tumor y para eliminar del análisis el material estromático y otro material que no sea del tumor. Como alternativa, puede emplearse una imagen de la tinción de EGFR para generar la máscara del tumor. Se emplea una imagen de tinción de DAPI obtenida en un segundo canal para comparar con la tinción del tumor para definir un compartimento nuclear y citoplásmico. La intensidad de la expresión de Akt se mide detectando la tinción de Akt utilizando un tercer canal. Se mide la intensidad de la expresión de una segunda molécula efectora (por ejemplo, Erk o STAT2) detectando la segunda molécula efectora en un cuarto canal. Puede generarse una puntuación AQUA para un compartimento subcelular específico empleando la intensidad del subconjunto de píxeles asignado al compartimento, dividido entre el número de píxeles. Esta puntuación es directamente proporcional al número de moléculas de Akt por unidad de área del compartimento subcelular, y pueden estandarizarse y determinarse los valores absolutos utilizando una curva patron de puntuaciones obtenida para líneas celulares con niveles conocidos de expresión de proteína Akt. Este método se describe en detalle en Camp, R.L., Chung, G.G. y Rimm, D.L., Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays, Nat. Med., 8, 1323-1327 (2002), así como en el documento WO 02/086498. Un ejemplo de realización de los métodos de la invención en los que se emplea la tecnología AQUA® para cuantificar biomarcadores en un tejido se describe en la siguiente sección de ejemplos. Los métodos para determinar de modo cuantitativo la expresión de biomarcadores pueden comprender determinar la localización subcelular de los biomarcadores en la célula, así como la cantidad o el estado de fosforilación de los biomarcadores de la célula. La tecnología AQUA® es un ejemplo de un método que consigue ambos objetivos.

## Ejemplos

La presente invención se ilustra más a fondo mediante los siguientes ejemplos, que no deben considerarse limitantes de ninguna manera. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la técnica. Estas técnicas se explican a fondo en la bibliografía (véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); DNA Cloning, volúmenes I y II (D.N. Glover ed., 1985); e Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987).

## Métodos para obtener perfiles de señalización de EGFR

### 10 Materiales y métodos

#### Diseño y procesamiento de micromatrices de tejidos

Se obtuvieron especímenes fijados en formaldehído e introducidos en parafina de 213 casos de carcinomas de pulmón no microcítico (1996-2003), según están disponibles, de los archivos de Yale University, Department of Pathology. Cada muestra de tumor se marcó para las áreas del carcinoma invasivas, fuera de las lesiones *in situ* y del epitelio normal, y se tomaron zonas centrales de 0,6 mm por duplicado. Cada zona central se dispone en bloques receptores en una rejilla con separaciones de 1 mm, y se cortaron secciones con un espesor de 5 micrómetros y se procesaron como se ha descrito previamente (Kononen, J. et al., 1998, Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens, Nature Medicine, 4, 844-847).

#### Inmunohistoquímica

Brevemente, los portaobjetos de la micromatriz de tejidos revestida de parafina precortada se desparafinaron y se recuperó el antígeno con proteinasa K (EGFR, kit PharmDx, DAKO, Carpintería, CA) o cocido a presión durante 10 minutos en tampón citrato pH 6,0 (los demás anticuerpos primarios, véase a continuación). Los portaobjetos se preincubaron con albúmina de suero bovina al 0,3% en disolución salina tamponada con Tris 0,1 M (pH 8,0) (BSA/TBS) durante 60 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos después se incubaron con anticuerpos primarios contra EGFR (kit PharmDx, utilizado sin diluir; DAKO, Carpintería, CA), o Akt1 (anticuerpo monoclonal de ratón, clon 2H10, diluido 1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) o Erk1/2 (anticuerpo policlonal de ratón, diluido 1:100; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) o Stat3 (anticuerpo monoclonal de conejo, clon 124H6, diluido 1:500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y pan-citoqueratina (anticuerpo policlonal de ratón o de conejo, dilución 1:100, DAKO, Carpintería, CA) diluidos en BSA/TBS durante la noche a 4 °C. Los portaobjetos se lavaron 3x 10 min con 1X TBS que contenía Tween-20 al 0,05%. Se aplicaron los correspondientes anticuerpos secundarios durante 1 h a temperatura ambiente en BSA/TBS. Estos incluyen anticuerpos directamente conjugados con un fluoróforo para anti-citoqueratina (anticonejo de cabra conjugado con Alexa 488; 1:100, Molecular Probes, Eugene, Oregón, y/o conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) para anti-timidilato sintasa (DAKO, Carpintería, California). Los portaobjetos se volvieron a lavar 3x 10 min con TBS que contenía Tween 20 al 0,05%. Los portaobjetos se incubaron con cromógeno fluorescente (Cy-5-tiramida, NEN Life Science Products, Boston, Massachusetts) que, al igual que DAB, se activa con HRP y da como resultado el depósito de numerosos tintes Cy-5 asociados covalentemente que están inmediatamente adyacentes al anticuerpo secundario conjugado con HRP. Se utilizó Cy-5 (rojo) porque su pico de emisión está fuera del espectro de verde-naranja de la autofluorescencia del tejido. Los portaobjetos para el análisis automático se cubrieron con un medio de montaje que contiene DAPI antidesdoblado (ProLong Gold, Molecular Probes, Eugene, OR).

#### Adquisición de imágenes

La adquisición de imágenes se realizó como se ha descrito previamente (Camp R.L. et al., 2002, Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays, Nature Medicine, 8(11):1323-1327). Brevemente, se obtuvieron imágenes de micromatrices utilizando una plataforma Deltavision y un programa informático (SoftWorx 2.5; Applied Precision, Issaquah, Washington), con una cámara Photometrics serie 300 enfriada en agua unida, a través de una lente x10 Nikon Super-Fluor en un microscopio fluorescente invertido TE200 con un movimiento de etapa x, y, z automático. Las imágenes de baja potencia de las micromatrices se cosieron entre sí utilizando múltiples imágenes de baja resolución (aproximadamente 1500) de la micromatriz (64 x 64 píxeles) con una resolución de aproximadamente 7 micrómetros. Las zonas centrales de los especímenes (histopuntos) se identificaron utilizando la señal de DAPI. Entonces se registraron las coordenadas de cada histopunto. Después se obtuvieron imágenes monocromáticas de alta resolución (1024 x 1024 píxeles, resolución de 0,5 micrómetros) de cada histopunto, en el plano de enfoque y 8 micrómetros por debajo de este, y se registraron en una pila de imágenes como mapas de bits. Las imágenes se obtuvieron utilizando un intervalo dinámico de 0-1024, pero se guardaron y se analizaron como imágenes de formato tiff de 8 bits con un intervalo dinámico de 0-255.

#### 55 Análisis AQUA® (algoritmos RESA/PLACE)

El análisis AQUA® se realizó como se ha descrito previamente (Camp R.L. et al., 2002, Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays, Nature Medicine, 8(11):1323-1327).

Brevemente, se genera una máscara específica de tumor estableciendo como umbral la imagen de un marcador (citoqueratina) que diferencia al tumor del estroma circundante y/o de los leucocitos. Esto crea una máscara binaria (cada píxel está "activado" o "desactivado"). Los niveles de umbral se verificaron comprobando los puntos de unas cuantas imágenes y después se automatizó para el resto de las imágenes. Todas las posteriores manipulaciones de las imágenes implican sólo la formación de imágenes del área enmascarada. Después se tomaron dos imágenes (una enfocada, otra ligeramente más profunda) de los marcadores específicos de compartimento y del marcador diana. Un porcentaje de la imagen desenfocada se resta de la imagen enfocada, basándose en un análisis píxel a píxel de las dos imágenes. El grado de sustracción global se basa en un porcentaje definido por el usuario para cada compartimento subcelular. Para la mayoría de las aplicaciones, este se ajusta de modo empírico al 40% de la señal total, y permanece constante para las imágenes de una micromatriz completa. Por tanto, RESA elimina toda la información desenfocada. El algoritmo tiene el beneficio añadido de potenciar la interfase entre áreas de mayor intensidad de tinción y áreas adyacentes de menor intensidad de tinción, permitiendo una asignación más precisa de píxeles de los compartimentos adyacentes. Por contraste con los marcadores específicos de compartimento, la sustracción de RESA de la señal diana es uniforme y no se basa en la intensidad global de la intensidad de la imagen. Esto asegura que se produce la misma cantidad de sustracción con la señal diana de todos los especímenes. Por último, el algoritmo PLACE asigna cada píxel de la imagen a un compartimento subcelular específico. Los píxeles que no pueden asignarse de forma precisa a un compartimento con un grado de confianza definido por el usuario (normalmente 95%) se rechazan. Esto se realiza iterativamente determinando la proporción de señal de dos marcadores específicos de compartimento que minimiza la tasa de excedente del marcador de un compartimento hacia otro. Los píxeles en los que las intensidades de píxel nuclear y de membrana son demasiado similares como para asignarse de modo preciso se niegan (normalmente comprenden <8% de los píxeles totales). Puede definirse un tercer compartimento (el citoplasma) mediante exclusión (no membrana, no nuclear). Cuando cada píxel ha sido asignado a un compartimento subcelular (o excluido como se describió anteriormente), la señal en cada localización se suma. Este dato se guarda y puede expresarse posteriormente como un porcentaje de la señal total o como la media de la intensidad de señal por área del compartimento. La puntuación se expresa en una escala de 1 a 1000.

#### Análisis de los datos

Los histopuntos que contienen <10% del tumor, según el área de máscara (automática), se excluyen de posteriores análisis. Los estudios previos de los inventores han demostrado que las puntuaciones de la media de dos histopuntos se corresponden con la puntuación de una sección de tejido completa >95% del tiempo (Camp, R.L. et al., 2002, Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma, Lab. Invest., 80:1943-1949). Cada tumor del paciente está representado por dos zonas centrales de tejido independientes para estos análisis, y posteriormente las puntuaciones AQUA® se promedian para cada paciente. Además, se realiza un análisis de regresión para cada marcador examinado como una métrica para la reproducibilidad experimental, así como la heterogeneidad de expresión con valores R de Pearson < 0,4 para el error experimental, de 0,4 a 0,7 para la expresión heterogénea, y >0,7 para la expresión homogénea. Los valores R de Pearson para cada biomarcador son los siguientes: EGFR, 0,78; Akt1, 0,44; Erk1/2, 0,55, y Stat3, 0,69. Para el análisis de supervivencia independiente, se seleccionaron unos puntos de corte óptimos utilizando X-Tile™, según se ha descrito previamente (Camp, R.L. et al., 2004, X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cutpoint optimization, Clinical Cancer Research, 10(21):7252-7259). Se emplearon simulaciones de Montecarlo puesto que la puntuación de rangos logarítmicos de Mantel-Cox no tiene suficiente rigor estadístico para la selección de un punto de corte óptimo. Para un mayor rigor estadístico, se determinaron los puntos de corte óptimos en 1/3 de la cohorte (conjunto de entrenamiento) y se aplicaron a las 2/3 partes restantes de la cohorte (conjunto de validación). Se realizaron análisis de agrupamiento jerárquico no supervisados y supervisados utilizando el programa informático Cluster, y se visualizaron empleando el programa informático TreeView para la visualización de agrupamientos (Elsen Laboratory en Stanford University). Se realizaron posteriores análisis de supervivencia utilizando SPSS v14.01 (SPSS, Inc., Chicago, IL) y R (GNU, Boston, MA).

### **Resultados**

#### Análisis de la supervivencia

El examen de la expresión de EGFR mediante un análisis AQUA® reveló que el 25% superior de los tumores NSCLC que expresan EGFR (equivalente a una puntuación AQUA® relativa de 12; véase el histograma (recuadro, figura 1)) tienen una disminución del 25% estadísticamente significativa en la supervivencia específica de enfermedad en tres años (figura 1).

Análisis AQUA® de los efectores de señalización corriente abajo clave para la vía de EGFR: Akt1, Erk1/2, y Stat3 revelaron que la expresión total de Erk1/2 y Stat3, pero no Akt1, tenía un efecto significativo en la disminución de la supervivencia global (los datos no se muestran).

El análisis AQUA® se empleó para evaluar cuantitativamente la expresión entre compartimentos subcelulares, en particular, la proporción de expresión nuclear:citoplásmica para cada marcador. Las proporciones de cada marcador de manera individual no se correlacionan con la supervivencia. Se espera que la proporción de expresión nuclear:citoplásmica para las moléculas efectoras Akt1, Erk1/2, y Stat3 indique que esa vía particular está activa.

Agrupamiento jerárquico

Para evaluar el poder predictivo de efectores individuales corriente abajo como función del receptor EGFR corriente arriba se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico supervisado agrupando los especímenes según la expresión de EGFR e investigando las tendencias con respecto a las proporciones nuclear:citoplásmica de los efectores corriente abajo clave: Akt1, Erk1/2, y Stat3. Según se demuestra en la figura 2A, se observaron cuatro grupos clave de tumores (figura 2A). El grupo de tumores 1 tiene una baja expresión de EGFR con altas proporciones nuclear:citoplásmica de efectores corriente abajo. El grupo 2 tiene una alta expresión de EGFR con altas proporciones nuclear:citoplásmica. El grupo de tumores 3 tiene una baja expresión de EGFR con bajas proporciones nuclear:citoplásmica, y el grupo 4 tiene una alta expresión de EGFR con bajas proporciones nuclear:citoplásmica. Un análisis de la supervivencia de Kaplan-Meier demuestra que no existe una diferencia significativa en la supervivencia entre estos grupos (figura 2B).

Cociente de señalización

Los 4 grupos observados con el análisis de agrupamiento jerárquico dieron lugar a un análisis basado en agrupamientos más estrictos basándose en dos parámetros: 1) los puntos de corte óptimos (figura 3A), y 2) la media de los puntos de corte (puntuación  $Z = 0$ ; figura 4A) para la expresión de EGFR y la media de las proporciones nuclear:citoplásmica de las moléculas efectoras corriente abajo (denominado "cociente de señalización"). Las figuras 3B y 4B demuestran que el cociente de señalización por sí solo no se correlaciona significativamente con la supervivencia global. Sin embargo, la combinación de la expresión de EGFR con el cociente de señalización produjo unas diferencias observadas significativas (figura 3C;  $p = 0,008$ ) en la supervivencia específica de enfermedad en tres años entre los cuatro grupos basándose en el análisis del punto de corte óptimo con el grupo que representa EGFR alto con un bajo "cociente de señalización" (grupo C) que tiene la menor supervivencia global. En otro análisis en el que se utilizó la media como punto de corte (figura 4C), se produjo una diferencia global significativa en la supervivencia entre los grupos ( $p = 0,028$ ), y el grupo C (EGFR alto, cociente de señalización bajo) mostró una correlación más altamente significativa con la disminución de la supervivencia global, comparado con otros grupos ( $p = 0,004$ ).

**Referencias**

Los números de registro de las bases de datos públicas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) están disponibles en la red en [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov), que se corresponden con cualquiera de las secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas indicadas en la presente.

30

**REIVINDICACIONES**

1.- Un método para determinar el estado de pronóstico de un tumor que expresa un receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende:

a) teñir una sección de tejido del tumor con:

- 5 (i) un reactivo para detectar EGFR,
- (ii) un segundo reactivo para detectar una molécula efectora, siendo la molécula efectora un miembro de la vía de transducción de señales relacionada con EGFR,
- (iii) un tercer reactivo para detectar el núcleo;

b) utilizando un microscopio, obtener una imagen digital de alta resolución de:

- 10 (i) el EGFR teñido;
- (ii) la molécula efectora teñida; y
- (iii) el núcleo teñido;

c) analizar la imagen digital para cuantificar una cantidad de:

- (i) EGFR presente en la sección de tejido;
- 15 (ii) molécula efectora presente en el núcleo; y
- (iii) molécula efectora presente en el citoplasma;

d) determinar una proporción efectora de la cantidad de molécula efectora dentro del núcleo a la cantidad de molécula efectora presente en el citoplasma;

- 20 en el que (i) un tumor con un nivel elevado de EGFR y una proporción efectora menor que el control indica una mala prognosis; (ii) un tumor con un nivel elevado de EGFR y una proporción efectora mayor que el control indica una prognosis mejor; y (iii) un tumor con un nivel disminuido de EGFR y una proporción efectora menor que el control indica una buena prognosis.

2.- El método de la reivindicación 1, en el que la tinción en la etapa a) es mediante un método inmunohistoquímico.

3.- El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el microscopio es un microscopio óptico.

- 25 4.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula efectora se selecciona de Grb2, Ras, ERK1, ERK2, RAF1, MEK1, MEK2, AKT, pAKT, GSK3, pGSK3, mTOR, 70s6k, eIF4B, 4E-BPI, eIF2B, NFkB, CREB, JAK, y STAT.

5.- El método de la reivindicación 4, en el que la molécula efectora se selecciona del grupo que consiste en Akt1, Erk, y Stat3.

- 30 6.- El método de la reivindicación 5, en el que se cuantifica la proporción efectora de Akt1, ETK, y STAT3, y se promedian las proporciones para obtener un cociente de señalización.

7.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo reactivo se utiliza para determinar la cantidad de expresión total de una molécula efectora o la cantidad de expresión de una molécula efectora fosforilada.

- 35 8.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula efectora es un efector final.

Figura 1

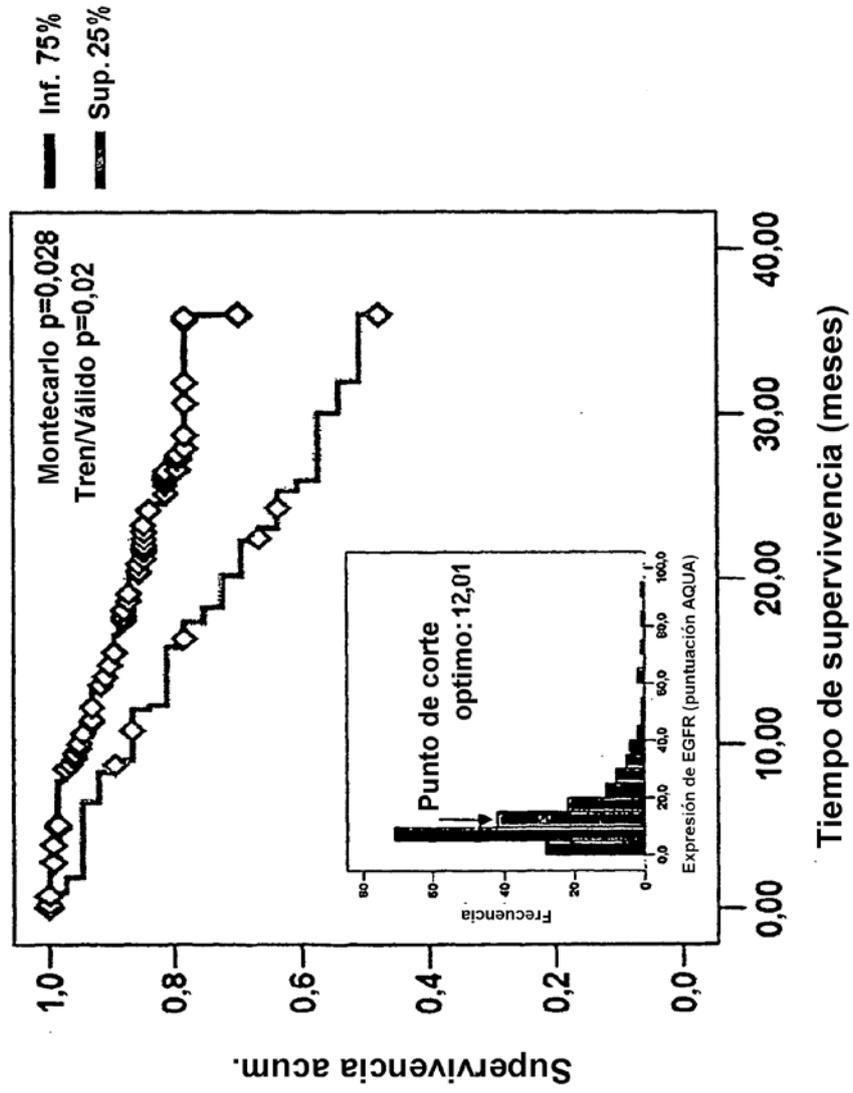
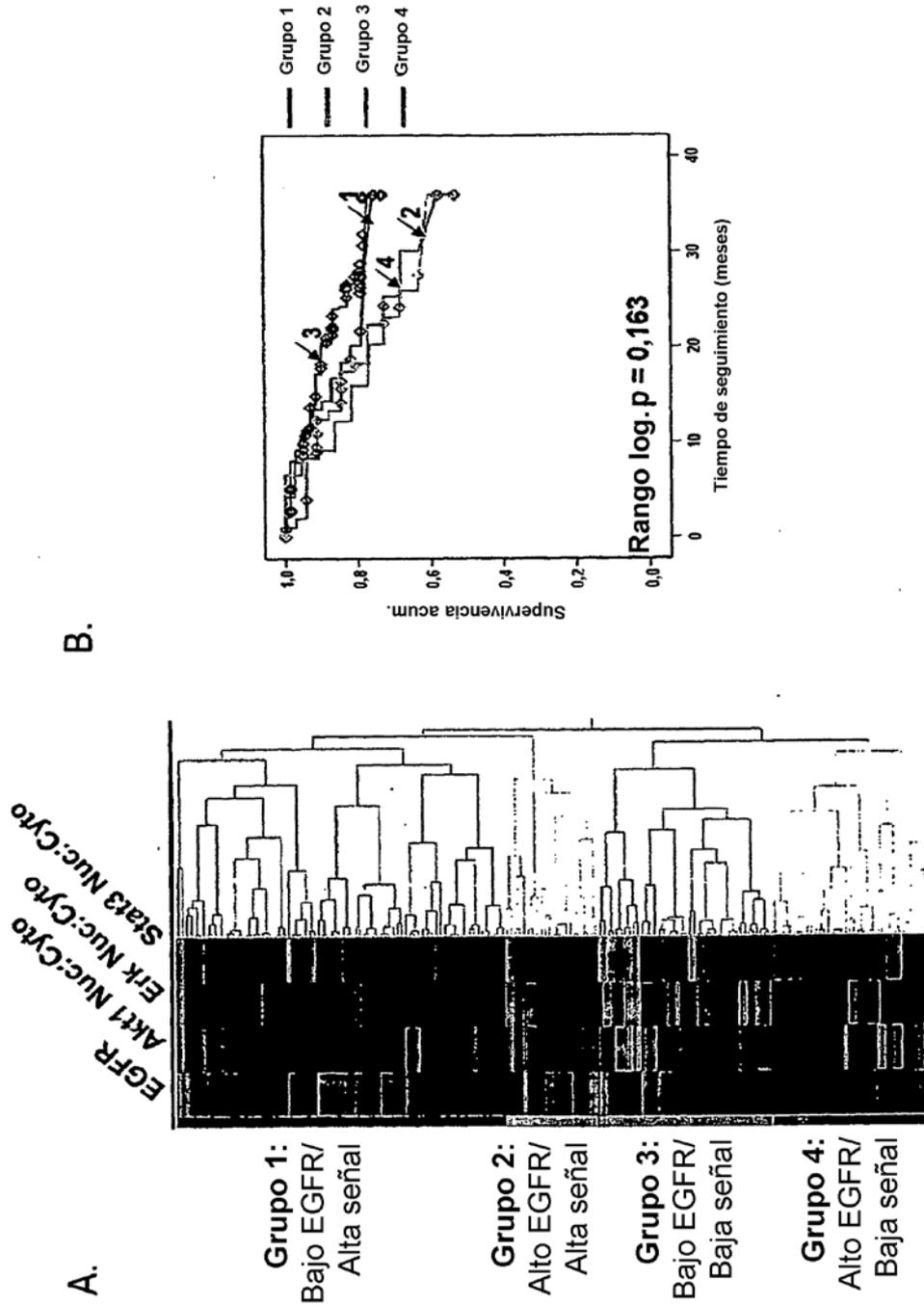
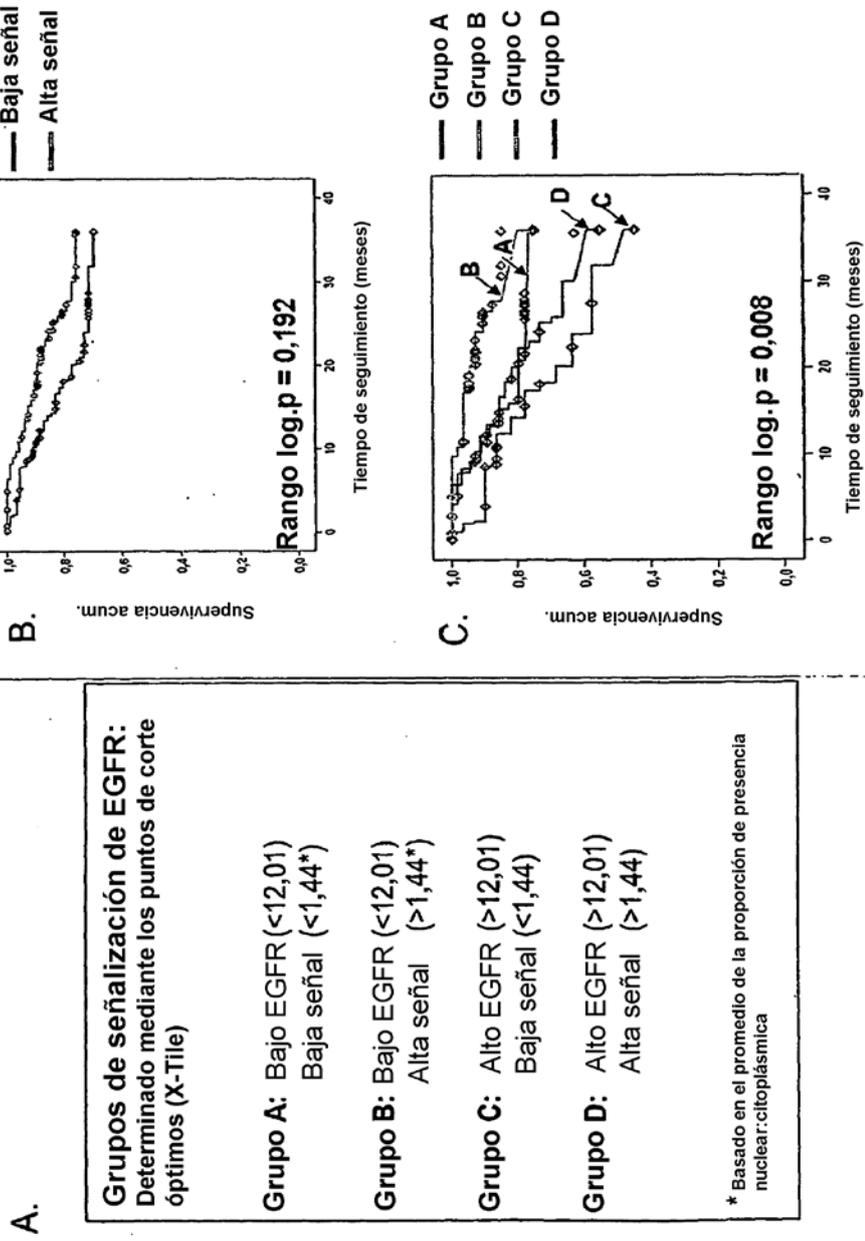


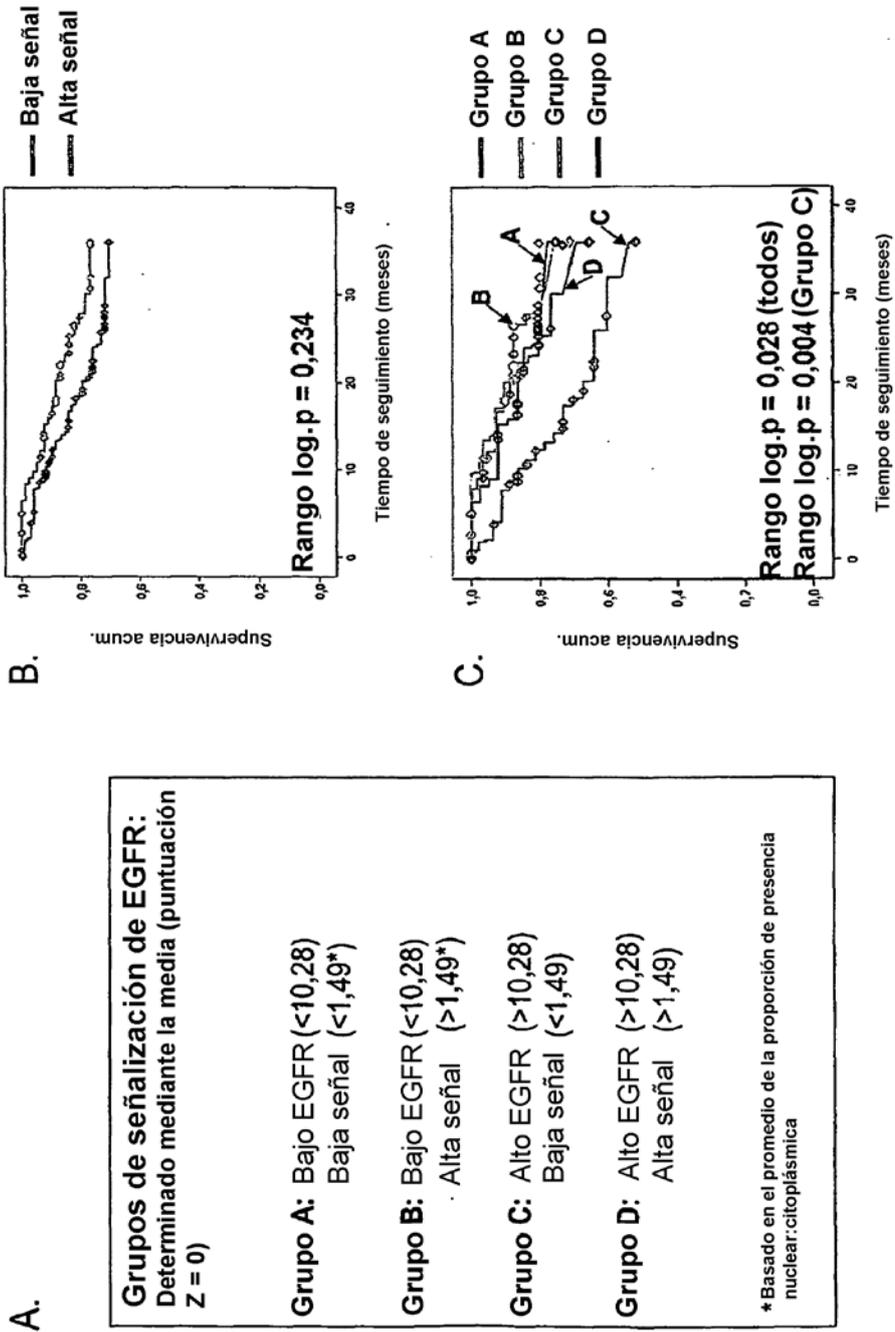
Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**



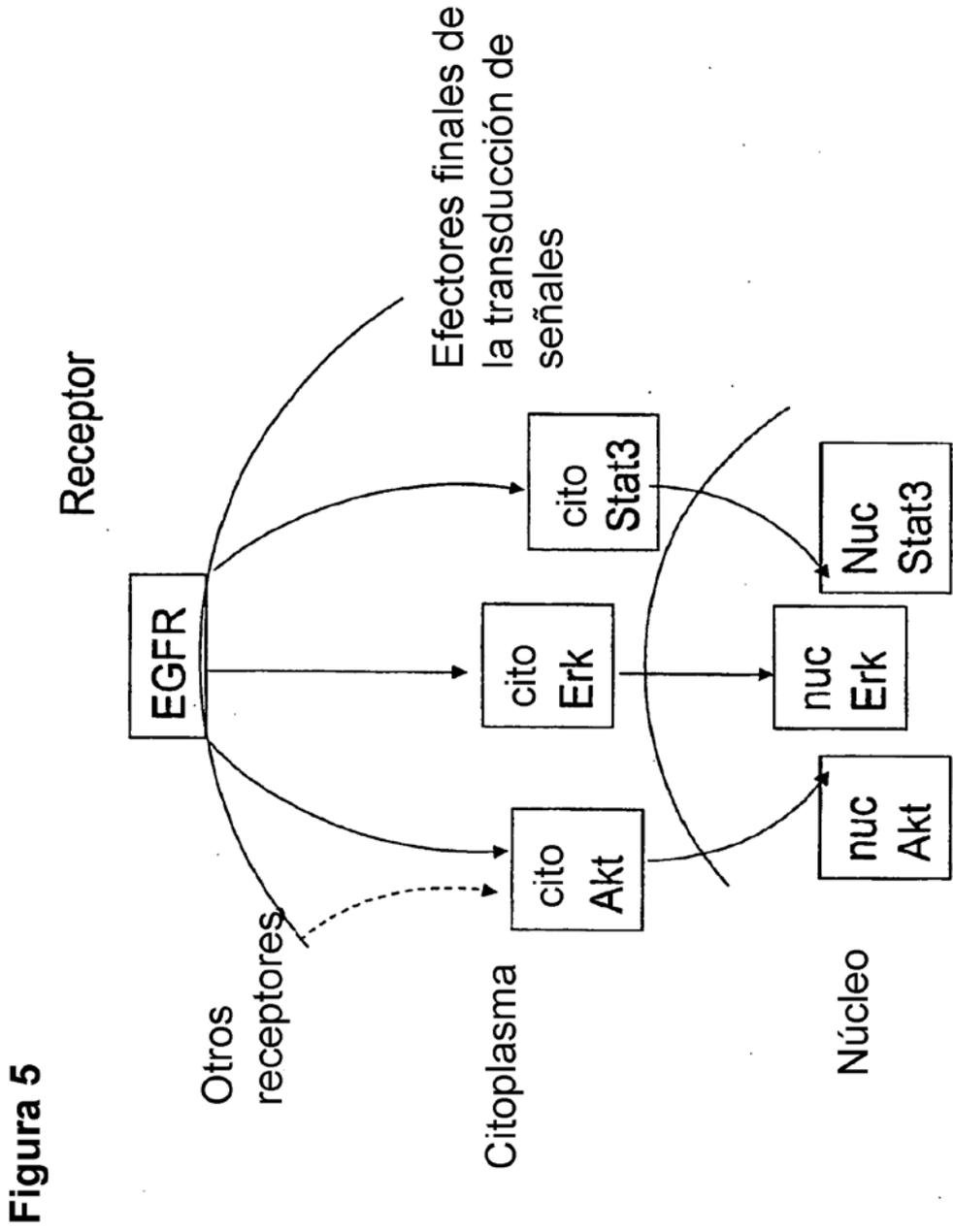


Figura 5