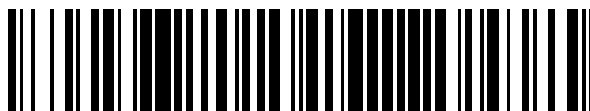


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 157**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010** **E 10765446 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015** **EP 2488873**

54 Título: **Biomarcadores de respuesta farmacodinámica tumoral**

30 Prioridad:

16.10.2009 US 252497 P

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

26.11.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BOWDEN, MICHAELA;
BUCKLER, ALAN y
GUY, CHANTALE T.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 552 157 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

Biomarcadores de respuesta farmacodinámica tumoral

Antecedentes de la invención

La proteína de choque térmico 90 (Hsp90) es un miembro abundante, expresado de manera ubicua de un complejo de chaperona de múltiples proteínas que media en la estabilización y maduración de proteínas, incluyendo varias que, cuando se alteran genéticamente, son importantes para la oncogénesis. (Drysdale MJ, *et al.* (2006) Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 9(4), 483-495) (Whitesell L, *et al.* (2005) Nat. Rev. Cancer 5(10), 761-772). Hasta la fecha se han identificado más de 100 proteínas "cliente" de Hsp90, incluyendo EGF-R, MET, Raf-1 cinasa, AKT, Bcr-abl, p53 mutante y CDK4. (Zhang H, *et al.* (2004) J. Mol. Med., 82, 488-499) (Xu W, *et al.* (2001) J. Biol. Chem., 276, 3702-3708).

Las chaperonas Hsp90, que presentan un sitio de unión a ATP en su dominio N-terminal (Chene, 2002) pertenecen a una subfamilia de ATPasa pequeña conocida como ADN girasa, Hsp90, histidina cinasa y subfamilia de MutL (GHKL) (Dutta e Inouye, 2000). La actividad de chaperona (plegado) de Hsp90 depende de su actividad ATPasa, que es débil para la enzima aislada. Sin embargo, se ha mostrado que la actividad ATPasa de Hsp90 se potencia tras su asociación con proteínas conocidas como co-chaperonas (Kamal *et al.*, 2003). Por tanto, *in vivo*, las proteínas Hsp90 funcionan como subunidades de grandes complejos proteicos dinámicos. Entre las proteínas de estrés, Hsp90 es única porque no se requiere para la biogénesis de la mayoría de polipéptidos (Nathan *et al.*, 1997). Sus dianas celulares, también denominadas proteínas cliente, son transductores de señales conformacionalmente lábiles que desempeñan un papel crítico en el control del crecimiento, la supervivencia celular y el desarrollo tisular (Pratt y Toft, 2003). La inhibición de la actividad ATPasa intrínseca de Hsp90 perturba la interacción Hsp90-proteína cliente dando como resultado su degradación a través de la ruta ubiquitina-proteasoma.

La familia Hsp90 de chaperonas se compone de cuatro miembros: Hsp90 α y Hsp90 β ambas ubicadas en el citosol, GRP94 en el retículo endoplasmático y TRAP1 en la mitocondria (Csermely *et al.*, 1998). Hsp90 es la chaperona celular más abundante, que constituye aproximadamente el 1% - 2% de la proteína total (Jakob y Buchner, 1994). Entre las proteínas de estrés, Hsp90 es única porque no se requiere para la biogénesis de la mayoría de polipéptidos (Nathan *et al.*, 1997).

Hsp90 es esencial para la supervivencia de células eucariotas y se sobreexpresa en muchos tumores. En células tumorales, Hsp90 permite que proteínas mutantes oncogénicas mantengan o adquieran la función mientras que facilita que las células cancerosas toleren el desequilibrio que crea su presencia. La inhibición de Hsp90 dificulta estos efectos prooncogénicos y conduce a una actividad antitumoral significativa *in vivo*. (Maloney A, *et al.* (2003) Curr. Cancer Drug Targets, 3, 331-341). Un subconjunto de proteínas Hsp90, tales como Raf, AKT, fosfo-AKT y CDK4 son moléculas de señalización oncogénicas implicadas de manera crítica en el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis celulares, procesos que son importantes en células cancerosas. Se cree que la degradación de una o múltiples oncoproteínas produce los efectos antitumorales observados con los inhibidores de Hsp90.

Debido a su implicación en la regulación de varias rutas de señalización que son cruciales en el impulso del fenotipo de un tumor, y el descubrimiento de que determinados productos naturales bioactivos ejercen sus efectos a través de la actividad de Hsp90, la chaperona molecular Hsp90 se valora como diana para el desarrollo de fármacos anticancerígenos (Neckers *et al.*, 1999). Existen muchos inhibidores conocidos de Hsp90 para la terapia contra el cáncer. Entre el número creciente de inhibidores de Hsp90 candidatos terapéuticos, los análogos de benzoquinona-ansamicina de geldanamicina, 17-alilamino-17-desmetoxigeldanamicina (17-AAG) y 17-dimetilaminogeldanamicina (17-DMAG), son inhibidores de Hsp90 que son los más avanzados en estudios clínicos. (Solit DB, *et al.* (2007) Clin. Cancer Res., 13(6), 1775-1782) (Hollingshead M, *et al.* (2005) Cancer Chemother Pharmacol., 56(2), 115-25). Un inhibidor de Hsp90 descrito recientemente, NVP-AUY922, puede resultar más prometedor a través de sus propiedades farmacéuticas y farmacológicas mejoradas tal como se demuestra mediante su actividad antitumoral más potente en un modelo preclínico de cáncer de mama humano. (Jensen MR, *et al.* (2008) Breast Cancer Res., 10(2), R33) (Eccles S, *et al.* (2008) Cancer Res, 68(8), 2850-2860). En un panel de líneas de células cancerosas representativas, NVP-AUY922 inhibió la proliferación celular entre 3,6 y 300 veces más eficazmente que 17-AAG. Se sabe que la interleucina 8 (IL-8) es un posible biomarcador farmacodinámico. (Christensen J. *et al.* (2005) Molecular cancer therapeutics, vol. 4, n.º 6, páginas 938-947; Crawford S. *et al.* (2008) Molecular cancer therapeutics, vol. 7, n.º 3, páginas 492-499).

Los biomarcadores farmacodinámicos clínicos conocidos de la inhibición de Hsp90 han demostrado ser útiles, pero muchos (por ejemplo, medición de la inducción de Hsp70) requieren procedimientos invasivos y laboriosos tales como análisis de biopsias tumorales y/o células sanguíneas nucleadas. Como tal, existe la necesidad real de identificar marcadores farmacodinámicos circulantes, convenientes que puedan reflejar de manera exacta y conveniente el efecto *in vivo* de la inhibición de Hsp90 en tumores. Tal como se describe en el presente documento, se ha identificado la citocina IL-8 como posible biomarcador secretado de respuesta farmacodinámica de células

tumorales a inhibidores de HSp90 tanto *in vitro* como *in vivo*.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos de evaluación de la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar cáncer en un sujeto. Estos métodos incluyen poner en contacto una primera muestra obtenida de dicho sujeto antes de administrar al menos una parte del régimen de tratamiento al sujeto con un reactivo que puede detectar IL-8; poner en contacto una segunda muestra obtenida de dicho sujeto tras la administración de al menos una parte del régimen de tratamiento con un reactivo que puede detectar IL-8; y comparar los niveles de IL-8 de la primera y la segunda muestras, en los que un nivel elevado de IL-8 presente en la primera muestra, en relación con la segunda muestra, es una indicación de que el régimen de tratamiento es eficaz para tratar cáncer en el sujeto. En una realización particular, el régimen de tratamiento comprende administrar un inhibidor de Hsp90.

En realizaciones preferidas, el régimen de tratamiento contra el cáncer es para melanoma o cáncer gástrico.

La detección de IL-8 puede producirse a nivel de proteína o a nivel de la expresión de ARNm. Los medios de detección pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos, ácidos nucleicos y proteínas. La detección también puede ser indirecta, tal como mediante la observación de la interacción entre IL-8 y receptores de IL-8 (por ejemplo, IL8R1 o IL8R2), o mediante la monitorización de los niveles de Hsp70 (ya que resulta inducción de Hsp70 de la inhibición de Hsp90).

La presente invención también proporciona métodos de identificación de un agente de prueba que puede tratar el cáncer, que comprende poner en contacto una primera muestra antes de administrar dicho agente de prueba a la muestra con un reactivo que puede detectar IL-8; poner en contacto una segunda muestra obtenida de la misma fuente que la primera muestra tras la administración de dicho agente de prueba con un reactivo que puede detectar IL-8; y comparar los niveles de IL-8 de la primera y la segunda muestras, en los que un nivel elevado de IL-8 presente en la primera muestra, en relación con la segunda muestra, es una indicación de que dicho agente de prueba puede tratar el cáncer en el sujeto.

Dichos métodos pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. La fuente de las muestras pueden ser líneas de células cancerosas, por ejemplo, GTL-16 o A375, puede ser un animal transgénico que presenta síntomas de cáncer, y puede ser un sujeto aquejado de cáncer.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Niveles relativos de citocinas en sobrenadantes de cultivo celular de (A) células GTL-16 y (B) A375 que se lavaron y trataron durante 48 h con NVP-AUY922 en nuevo medio de cultivo, medido mediante ensayo multiplexado basado en perlas de un panel de citocinas de 27-plex. Los recuadros muestran la disminución de la acumulación de IL-8 (como % control) a las 24 h y las 48 h tras el tratamiento con NVP-AUY922. Las líneas discontinuas representan la viabilidad celular después de 48 h de tratamiento con NVP-AUY922.

Figura 2. Efectos dependientes de la dosis y del tiempo de NVP-AUY922 sobre la viabilidad celular y sobre la producción de IL-8. Panel superior: Sobrenadantes de cultivo celular recogidas de células GTL-16 (A) y A375 (B) lavadas con nuevo medio de cultivo y tratadas con NVP-AUY922 durante 24 h. Panel inferior: Viabilidad celular y acumulación de IL-8 a lo largo de los tiempos indicados después del tratamiento de células GTL-16 (C) y A375 (D) con NVP-AUY922 0,3 μ M.

Figura 3. Efectos de NVP-AUY922 sobre la expresión de ARNm de IL-8 y reguladores conocidos de la expresión génica de IL-8. Análisis cuantitativo mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de IL-8 en células GTL-16 (A) y A375 (B) después del tratamiento con NVP-AUY922 0,3 μ M durante los tiempos indicados. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de 30 μ g de lisados de proteína total preparados a partir de células GTL-16 (C) y A375 (D) no tratadas (-) y tratadas con NVP-AUY922 0,3 μ M (+).

Figura 4. Niveles de p65 de NF κ B nuclear (A) y fosfo-cJun (B) a las 16 h y las 24 h tras el tratamiento con NVP-AUY922 en la línea celular GTL-6 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se calcularon datos semicuantitativos mediante el software Licor, mediante el cual se mide la intensidad de señal en cuentas K. se normalizaron los valores de cuentas K para p65 de NF κ B y fosfo-c-Jun con respecto a las concentraciones de proteína total medidas mediante ensayo de BCA y se representaron gráficamente como % control.

Figura 5. Inducción de Hsp70 observada en tumores derivados de ratones que portan tumores GTL-16 tratados con

NVP-AUY922 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western de lisados de proteína total (A) e IHC de tumores incluidos en parafina en los que se cuantificó la tinción mediante ScanScope de Aperio (B). Disminución temprana de los niveles séricos de IL-8 (C) tras el tratamiento con una dosis única de 75 mg/kg de NVP-AUY922 (n = 4 ratones / punto de tiempo, excepto a t = 0 h donde n = 8 ratones). Se representaron gráficamente los niveles individuales de IL-8 (D) frente al peso tumoral destacando la varianza entre ratones.

Figura 6. Supresión dependiente de la dosis de la acumulación de IL-8 medido en sobrenadantes de cultivo celular recogidos de las líneas celulares GTL-16 (A) y A375 (B) tratadas con NVP-AUY922, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos de evaluación de la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar cáncer en un sujeto. Estos métodos incluyen poner en contacto una primera muestra obtenida de dicho sujeto antes de administrar al menos una parte del régimen de tratamiento al sujeto con un reactivo que puede detectar IL-8; poner en contacto una segunda muestra obtenida de dicho sujeto tras la administración de al menos una parte del régimen de tratamiento con un reactivo que puede detectar IL-8; y comparar los niveles de IL-8 de la primera y la segunda muestras, en los que un nivel elevado de IL-8 presente en la primera muestra, en relación con la segunda muestra, es una indicación de que el régimen de tratamiento es eficaz para tratar cáncer en el sujeto. En una realización particular, el régimen de tratamiento comprende administrar un inhibidor de Hsp90.

En realizaciones preferidas, el régimen de tratamiento contra el cáncer es para melanoma o cáncer gástrico.

La detección de IL-8 puede producirse a nivel de proteína o a nivel de la expresión de ARNm. Los medios de detección pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos, ácidos nucleicos y proteínas. La detección también puede ser indirecta, tal como mediante la observación de la interacción entre IL-8 y receptores de IL-8 (por ejemplo, IL8R1 o IL8R2), o mediante la monitorización de los niveles de Hsp70 (ya que resulta inducción de Hsp70 de la inhibición de Hsp90).

La presente invención también proporciona métodos de identificación de un agente de prueba que puede tratar el cáncer, que comprende poner en contacto una primera muestra antes de administrar dicho agente de prueba a la muestra con un reactivo que puede detectar IL-8; poner en contacto una segunda muestra obtenida de la misma fuente que la primera muestra tras la administración de dicho agente de prueba con un reactivo que puede detectar IL-8; y comparar los niveles de IL-8 de la primera y la segunda muestras, en los que un nivel elevado de IL-8 presente en la primera muestra, en relación con la segunda muestra, es una indicación de que dicho agente de prueba puede tratar el cáncer en el sujeto.

Dichos métodos pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. La fuente de las muestras pueden ser líneas de células cancerosas, por ejemplo, GTL-16 o A375, puede ser un animal transgénico que presenta síntomas de cáncer, y puede ser un sujeto aquejado de cáncer.

La presente invención también proporciona métodos de tratamiento de un sujeto humano aquejado de cáncer con un inhibidor de Hsp90, comprendiendo el método poner en contacto una primera muestra de dicho sujeto, antes de administrar dicho inhibidor al sujeto, con un reactivo que puede detectar IL-8 humana; poner en contacto una segunda muestra obtenida de la misma fuente que la primera muestra, tras la administración de dicho inhibidor a dicho paciente, con un reactivo que puede detectar IL-8 humana; medir los niveles de IL-8 humana en las primeras dos etapas; y comparar los niveles de IL-8 humana obtenidos en las dos etapas, en los que un nivel elevado de IL-8 humana en la primera etapa en comparación con la segunda etapa es una indicación de respuesta terapéutica por dicho paciente a dicho inhibidor.

En realizaciones preferidas, el régimen de tratamiento contra el cáncer es para melanoma o cáncer gástrico.

Definiciones

Se usan diversas definiciones en la totalidad de este documento. La mayor parte de los términos tienen el significado que les atribuiría a esos términos un experto en la técnica. Los términos definidos específicamente o bien a continuación o bien en otra parte de este documento tienen el significado proporcionado en el contexto de la presente invención en su totalidad y tal como se entienden normalmente por los expertos en la técnica.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican en mayor detalle en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); y Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual

(2ª edición, 1989).

Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares “un/o”, “una” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un anticuerpo” incluye una mezcla de dos o más de tales anticuerpos.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere a +/- 20%, +/- 10% o +/- 5% de un valor.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “IL-8” se refiere a una potente citocina de activación y quimiotáctica para leucocitos que se produce por numerosos tipos de células en respuesta a estímulos inflamatorios, y cuya transcripción requiere la activación de o bien la combinación de NF-kappa B y AP-1 o bien la de NF-kappa B y NF-IL6, dependiendo del tipo de células.

Se expone una secuencia de aminoácidos de IL-8 (n.º de registro de GenBank NP_000575) como SEQ ID NO: 1, y se expone una secuencia de ARNm de IL-8 (n.º de registro de GenBank NM_000584) como SEQ ID NO: 2.

Una secuencia de IL-8 representativa, incluye, pero no se limita a, la secuencia expuesta a continuación.

Interleucina 8 (IL-8) [*Homo sapiens*] (NP_000575) (SEQ ID NO: 1)

15 1 MTSKLAVALL AAFLLISAALC EGAVLPRSAK ELRCQCIKTY SKPFHPKFIK ELRVIESGPH
61 CANTEIIVKL SDGRELCLDP KENWVQRVVE KFLKRAENS

Interleucina 8 (IL-8) [*Homo sapiens*] (NM_000584) (SEQ ID NO: 2)

```

1  ctccataagg  cacaaacttt  cagagacagc  agagcacaca  agctttcta
61  ggaagaaacc  accggaagga  accatctcac  tgttgttaaa  catgacttc
121  tggctctctt  ggcagccttc  ctgattttctg  cagctctgtg  tgaagggtg
181  ggagtgtctaa  agaacttaga  tgtcagtgc  taaagacata  ctccaaac
241  aatttatcaa  agaactgaga  gtgattgaga  gtggaccaca  ctgcgccac
301  ttgtaaagct  ttctgatgga  agagagctct  gtctggacc  caaggaaa
361  gggttgttga  gaagtttttg  aagagggctg  agaattcata  aaaaaatt
421  tatccaagaa  tcagtgaaga  tgccagtga  acttcaagca  aatctact
481  gtatttgttg  ggtctgttgt  agggttgcca  gatgcaatac  aagattcc
541  aatttcagta  aacaatgaat  agtttttcat  tgtaccatga  aatatcca
601  atgtaaagta  ttatttat  gaatctacaa  aaaacaacaa  ataatttt
661  ttttcttaga  tattgcacgg  gagaatatac  aaatagcaaa  attgaggo
721  gaatatocga  actttaattt  caggaattga  atgggtttgc  tagaatgt
781  atcacataaa  aatgatggga  caataaattt  tgccataaag  tcaaattt
841  tggatttttt  tctgttaa  ctggcaacc  tagtgtgcta  gccaggat
901  gtccactgt  gccttggttt  ctcttttatt  tctaagtga  aaaagtat
961  tacctcacag  tgatgttgtg  aggacatgtg  gaagcacttt  aagttttt
1021  aaattatttt  caagtgtaac  ttattaacct  atttattatt  tatgtatt
1081  aaatatttgt  gcaagaattt  ggaaaaatag  aagatgaatc  attgattg
1141  gatgttatag  taaatttatt  ttatttttaga  tattaaatga  tgttttat
1201  aatcagggtt  tttagattaa  acaaacaac  aattgggtac  ccagttaa
1261  gataaacaac  aaataatttt  ttagtataag  tacattattg  tttatctg
1321  aactaacaat  cctagtttga  tactcccagt  cttgtcattg  ccagctgt
1381  gtgttgaatt  acggaataat  gagttagaac  tattaaaaca  gccaaaac
1441  attagtaatt  tcttgctggt  tgaaacttgt  ttattatgta  caaataga
1501  tatttaaatg  actgcatttt  taaatacaag  gcttttatatt  tttaactt
1561  atgtgtctct  caaatttttt  ttactgtttc  tgattgtatg  gaaatata
1621  aaacatttaa  aatataattt  gttgtcaaag  taacaaaaaa  aaaaaa

```

20 Los términos “polipéptido” y “proteína”, se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos derivatizados o modificados química o biológicamente, y polipéptidos que tienen estructuras principales peptídicas modificadas. El término incluye proteínas de fusión, incluyendo, pero sin limitarse a, proteínas de fusión con una secuencia heteróloga de aminoácidos, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin residuos de metionina N-terminal; proteínas marcadas inmunológicamente; y similares.

25 Los términos “individual”, “sujeto”, “huésped” y “paciente” se usan indistintamente y se refieren a cualquier sujeto para el que se desea diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente seres humanos. Otros sujetos pueden incluir

ganado, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, y similares. En algunas realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, “cáncer” se refiere a cánceres primarios o metastásicos, leucemias o linfomas. El término “células cancerosas” se refiere a células que están transformadas. Estas células pueden aislarse de un paciente que tiene cáncer, o ser células que se transforman *in vitro* para volverse cancerosas. Las células cancerosas pueden derivarse de muchos tipos de muestras incluyendo cualquier tejido o línea de cultivo celular. En algunas realizaciones, las células cancerosas son hiperplasias, células tumorales o neoplasias. En algunas realizaciones, las células cancerosas se aíslan de cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de testículo, cáncer de timo, cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervicouterino, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, mieloma múltiple y melanoma. En algunas realizaciones, las células cancerosas se toman de líneas celulares establecidas que están a disposición del público. En algunas realizaciones, se aíslan células cancerosas de muestras de pacientes preexistentes o de bibliotecas que comprenden células cancerosas. En algunas realizaciones, se aíslan células cancerosas y luego se implantan en un huésped diferente, por ejemplo, en un xenoinjerto. En algunas realizaciones, se trasplantan células cancerosas y se usan en un modelo de ratón con SCID. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de colon. Tal como se usa en el presente documento, el término “cáncer de colon” se usa indistintamente con “cáncer rectal” y “cáncer colorrectal”, y se refiere a un cáncer que se origina en el colon o el recto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “transformada” se refiere a cualquier alteración en las propiedades de una célula que hereda de manera estable su progenie. En algunas realizaciones, “transformada” se refiere al cambio de una célula normal a una célula cancerosa, por ejemplo, una que puede provocar tumores. En algunas realizaciones, una célula transformada se inmortaliza. La transformación puede estar provocada por varios factores, incluyendo sobreexpresión de un receptor en ausencia de fosforilación del receptor, infección viral, mutaciones en oncogenes y/o genes supresores de tumores, y/o cualquier otra técnica que cambie las propiedades de crecimiento y/o immortalización de una célula.

“Fenotipo canceroso” generalmente se refiere a cualquiera de una variedad de fenómenos biológicos que son característicos de una célula cancerosa, fenómenos que pueden variar con el tipo de cáncer. El fenotipo canceroso se identifica generalmente por anomalías en, por ejemplo, el crecimiento o la proliferación celulares (por ejemplo, crecimiento o proliferación descontrolados), regulación del ciclo celular, la motilidad celular, la interacción entre células o la metástasis, o similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término “metástasis” se refiere a un cáncer que se ha diseminado hasta un sitio alejado del origen del cáncer, por ejemplo del tumor primario. Los sitios de metástasis incluyen sin limitación, el hueso, los ganglios linfáticos, el pulmón, el hígado y el cerebro.

Tal como se usa en el presente documento, el término “angiogénesis” se refiere al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes.

Tal como se usa en el presente documento, el término “criterio de valoración clínico” se refiere a un acontecimiento medible indicativo de cáncer. Los criterios de valoración clínicos incluyen sin limitación, tiempo hasta la primera metástasis, tiempo hasta posteriores metástasis, tamaño y/o número de metástasis, tamaño y/o número de tumores, ubicación de tumores, agresividad de tumores, calidad de vida, dolor y similares. Los expertos en la técnica están acreditados con capacidad para determinar y medir criterios de valoración clínicos. Métodos de medir criterios de valoración clínicos se conocen por los expertos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra” se refiere a material biológico de un paciente. La muestra sometida a ensayo mediante la presente invención no se limita a ningún tipo particular. Las muestras incluyen, como ejemplos no limitativos, células individuales, células múltiples, tejidos, tumores, líquidos biológicos, moléculas biológicas o sobrenadantes o extractos de cualquiera de los anteriores. Los ejemplos incluyen muestras de tejido extirpado para biopsia, tejido extirpado durante resección, sangre, orina, tejido linfático, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, mucosidad y deposiciones. La muestra usada variará dependiendo del formato de ensayo, el método de detección y la naturaleza de los tumores, tejidos, células o extractos que van a someterse a ensayo. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar muestras y pueden adaptarse fácilmente para obtener una muestra que sea compatible con el método utilizado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “molécula biológica” incluye, pero no se limita a, polipéptidos, ácidos nucleicos y sacáridos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “modular” se refiere a un cambio en la calidad o la cantidad de un gen, una proteína, o cualquier molécula que está en el interior, el exterior o en la superficie de una célula. El cambio puede ser un aumento o una disminución de la expresión o el nivel de la molécula. El término “modula”

también incluye el cambio en la calidad o la cantidad de una función/actividad biológica incluyendo, sin limitación, proliferación celular, crecimiento, adhesión, apoptosis, señalización intracelular, señalización entre células, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término “expresado de manera diferencial en una célula cancerosa” y “un polinucleótido que se expresa de manera diferencial en una célula cancerosa” se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a un polinucleótido que representa o corresponde a un gen que se expresa de manera diferencial en una célula cancerosa en comparación con una célula del mismo tipo celular que no es cancerosa, por ejemplo, se encuentra ARNm a niveles de al menos aproximadamente el 25%, de al menos aproximadamente el 50% a aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 50 veces o más, diferentes (por ejemplo, mayores o menores). La comparación puede realizarse en tejido, por ejemplo, si está usándose hibridación *in situ* u otro método de ensayo que permita cierto grado de discriminación entre tipos celulares en el tejido. La comparación puede realizarse también o alternativamente entre células retiradas de su fuente de tejido, o entre una célula *in situ* y una segunda célula retirada de su fuente de tejido. En algunas realizaciones, el gen está regulado por incremento en el gen que produce cáncer en comparación con la célula normal.

El término “fragmento” tal como se usa en el presente documento se refiere a una parte físicamente contigua de la estructura primaria de una biomolécula. En el caso de proteínas, una parte está definida por una parte contigua de la secuencia de aminoácidos de esa proteína y se refiere a al menos 3-5 aminoácidos, al menos 8-10 aminoácidos, al menos 11-15 aminoácidos, al menos 17-24 aminoácidos, al menos 25-30 aminoácidos y al menos 30-45 aminoácidos. En el caso de oligonucleótidos, una parte está definida por una parte contigua de la secuencia de ácido nucleico de ese oligonucleótido y se refiere a al menos 9-15 nucleótidos, al menos 18-30 nucleótidos, al menos 33-45 nucleótidos, al menos 48-72 nucleótidos, al menos 75-90 nucleótidos y al menos 90-130 nucleótidos. En algunas realizaciones, las partes de biomoléculas tienen una actividad biológica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, anticuerpos bifuncionales/biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y anticuerpos injertados con región determinante de la complementariedad (CDR), que son específicos para la proteína diana o fragmentos de la misma. El término “anticuerpo” incluye además la transferencia génica de anticuerpos terapéuticos *in vivo*. También se proporcionan por la invención fragmentos de anticuerpo, incluyendo Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, y Fv.

El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraposición a las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinantes (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga con secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo con secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente estadounidense n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente la región variable o de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]);

moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencias de aminoácidos de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

"Funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen unión a $C1q$; citotoxicidad dependiente del complemento; unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida sobre receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos (células NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta antígenos y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y se requieren de forma absoluta para tal destrucción. Las células primarias para mediar en ADCC, las células NK, expresan $Fc\gamma RIII$ únicamente, mientras que los monocitos expresan $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ y $Fc\gamma RIII$. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes estadounidenses n.ºs 5.500.362 ó 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos (células NK). Alternativa, o adicionalmente, puede evaluarse la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el dado a conocer en Clynes *et al.* (USA) 95:652-656 (1998).

"Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En algunas realizaciones, las células expresan al menos $Fc\gamma RIII$ y realizan una función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos (células NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo de sangre o PBMC tal como se describe en el presente documento.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ y $Fc\gamma RIII$, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas de corte y empalme de estos receptores. Los receptores $Fc\gamma RII$ incluyen $Fc\gamma RIIA$ (un "receptor activador") y $Fc\gamma RIIB$ (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador $Fc\gamma RIIA$ contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor $Fc\gamma RIIB$ contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase la revisión en M. en Daron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Se revisan los FcR en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que vayan a identificarse en el futuro, están englobados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 154:249 (1994)).

Tal como se usa en el presente documento, el término "detectar" significa establecer, descubrir o poner en evidencia una actividad (por ejemplo, expresión génica) o biomolécula (por ejemplo, un polipéptido).

Tal como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a secuencias de ácido nucleico de longitud variable. En algunas realizaciones, las sondas comprenden al menos aproximadamente 10 y hasta aproximadamente 6.000 nucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas comprenden al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18, al menos 20, al menos 25, al menos 50 o al menos 75 nucleótidos consecutivos. Se usan sondas en la detección de secuencias de ácido nucleico idénticas, similares o complementarias. Habitualmente se obtienen sondas de mayor longitud de fuentes naturales o recombinantes, son altamente específicas para la secuencia diana, y se hibridan de forma mucho más lenta a la diana que lo que lo hacen los oligómeros. Las sondas pueden ser mono o bicatenarias y están diseñadas para tener especificidad en tecnologías de PCR, hibridación basada en membrana, hibridación *in situ* (ISH), hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o de tipo ELISA.

Tal como se usa en el presente documento, el término “mezclar” se refiere al proceso de combinar uno o más compuestos, células, moléculas, y similares juntos en la misma zona. Esto puede realizarse, por ejemplo, en un tubo de ensayo, placa de Petri o cualquier recipiente que permita que se mezclen uno o más compuestos, células o moléculas.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado” se refiere a un polinucleótido, un polipéptido, un anticuerpo o una célula huésped que está en un entorno diferente del entorno en que se produce de manera natural el polinucleótido, el polipéptido o el anticuerpo. Los expertos en la técnica conocen bien métodos de aislamiento de células. Generalmente, un polinucleótido, un polipéptido o un anticuerpo que está aislado generalmente está sustancialmente purificado.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente purificado” se refiere a un compuesto (por ejemplo, o bien un polinucleótido o bien un polipéptido o bien un anticuerpo) que se retira de su entorno natural y está libre al menos al 60%, libre al menos al 75% y libre al menos al 90% de otros componentes con los que está asociado de manera natural.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “unión” significa la interacción física o química entre dos o más biomoléculas o compuestos. La unión incluye interacciones iónicas, no iónicas, enlaces de hidrógeno, de Van der Waals, hidrófobas, etc. La unión puede ser o bien directa o bien indirecta; siendo indirecta a través de o debida a los efectos de otra biomolécula o compuesto. Unión directa se refiere a interacciones que no tienen lugar a través de o debidas al efecto de otra molécula o compuesto sino que se dan en su lugar sin otros productos intermedios químicos sustanciales.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “poner en contacto” significa poner juntos, o bien directamente o bien indirectamente, una molécula en proximidad física con una segunda molécula. La molécula puede estar en cualquiera de varios tampones, sales, disoluciones, etc. “Poner en contacto” incluye, por ejemplo, poner un polinucleótido en un vaso de precipitados, una placa de microtitulación, un frasco de cultivo celular o un microalineamiento, o similar, que contiene una molécula de ácido nucleico. Poner en contacto también incluye, por
25 ejemplo, poner un anticuerpo en un vaso de precipitados, una placa de microtitulación, un frasco de cultivo celular o un microalineamiento, o similar, que contiene un polipéptido. Poner en contacto puede tener lugar *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “condiciones de hibridación rigurosas” o “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones en las que una sonda, un cebador u oligonucleótido se hibridará con su
30 secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Se hibridarán secuencias más largas con especificidad por sus complementos apropiados a mayores temperaturas. Generalmente, se selecciona que las condiciones rigurosas sean aproximadamente 5°C menores que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_f es la temperatura (con fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico
35 definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Puesto que las secuencias diana están presentes generalmente en exceso, a la T_f, el 50% de las sondas se hibridan con sus complementos en equilibrio. Normalmente, condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor de ion sodio aproximadamente 1,0 M, normalmente de ion sodio aproximadamente de 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos de
40 aproximadamente 30°C para sondas, cebadores u oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60°C para sondas, cebadores u oligonucleótidos más largos. También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes de desestabilización, tales como formamida.

Tal como se usa en el presente documento, el término “condiciones de rigurosidad moderada” se refiere a
45 condiciones en las que una sonda, un cebador u oligonucleótido se hibridará con su secuencia diana, pero con un número limitado de otras secuencias. Las condiciones moderadas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. El experto conoce bien condiciones moderadas y se describen, entre otros, en Maniatis *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 2ª edición (diciembre de 1989)).

Las composiciones de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, para producir polipéptidos, como sondas para la detección de ARNm en muestras biológicas (por ejemplo, extractos de células
50 humanas) o ADNc producido a partir de tales muestras, para generar copias adicionales de los polinucleótidos, para generar ribozimas u oligonucleótidos (mono y bicatenarios), y como sondas de ADN monocatenario o como oligonucleótidos que forman hebras triples. Las sondas descritas en el presente documento pueden usarse para determinar, por ejemplo, la presencia o ausencia de los polinucleótidos proporcionados en el presente documento en una muestra. Los polipéptidos pueden usarse para generar anticuerpos específicos para un polipéptido asociado con
55 cáncer, anticuerpos que son útiles a su vez en métodos de diagnóstico, métodos de pronóstico, y similares tal como se comenta en más detalle en el presente documento. Los polipéptidos son también útiles como dianas para intervención terapéutica, tal como se comenta en más detalle en el presente documento. Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse, por ejemplo, para purificar, detectar y direccionar los polipéptidos de la

presente invención, incluyendo métodos de diagnóstico y terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos son útiles en inmunoensayos para medir cualitativa y cuantitativamente los niveles de los polipéptidos de la presente invención en muestras biológicas. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.* *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988). Estos y otros usos se describen en más detalle a continuación.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “agente de obtención de imágenes” se refiere a una composición unida a un anticuerpo, molécula pequeña o sonda de la invención que puede detectarse usando técnicas conocidas por el experto en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, el término “evidencia de expresión génica” se refiere a cualquier indicio medible de que se expresa un gen.

- 10 El término “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un portador para la administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o un polipéptido, genes, y otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier portador farmacéutico que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que puede administrarse sin excesiva toxicidad. Los portadores adecuados pueden ser grandes macromoléculas metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos y partículas virales inactivas. Tales portadores los conocen bien los expertos habituales en la técnica. Los portadores farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. También pueden estar presentes en tales vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH, y similares.

Proteínas de choque térmico (HSP)

- 20 Las chaperonas moleculares mantienen el plegamiento y la conformación apropiados de las proteínas y son cruciales en la regulación del equilibrio entre la síntesis y la degradación de proteínas. Han mostrado que son importantes en la regulación de muchas funciones celulares importantes, tales como proliferación y apoptosis celulares (Jolly y Morimoto, 2000; Smith *et al.*, 1998; Smith, 2001).

- 25 La exposición de las células a varios estreses ambientales, incluyendo choque térmico, alcoholes, metales pesados y estrés oxidativo, da como resultado la acumulación celular de varias chaperonas, conocidas comúnmente como proteínas de choque térmico (HSP). La inducción de las HSP protege la célula frente al ataque de estrés inicial, potencia la recuperación y conduce al mantenimiento de un estado tolerante al estrés.

- 30 También ha resultado claro, sin embargo, que determinadas HSP también pueden desempeñar un papel como chaperona molecular principal en condiciones normales, sin estrés regulando el plegamiento, la degradación, localización y función correctos de una lista creciente de importantes proteínas celulares.

Existen varias familias multigénicas de HSP, variando los productos génicos individuales en cuanto a la expresión, función y localización celulares. Se clasifican según el peso molecular, por ejemplo, HSP70, Hsp90 y HSP27.

- 35 Pueden adquirirse varias enfermedades en seres humanos como resultado de un plegamiento erróneo de proteínas (revisado en Tytell *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1998). Así, el desarrollo de terapias que perturban la maquinaria de la chaperona molecular puede demostrar ser beneficioso. En algunas condiciones (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedades priónicas y enfermedad de Huntington), las proteínas con plegamiento erróneo pueden provocar agregación proteica que da como resultado trastornos neurodegenerativos. Además, las proteínas con plegamiento erróneo pueden dar como resultado la pérdida de la función de la proteína de tipo natural, lo que conduce a funciones moleculares y fisiológicas desreguladas en la célula.

- 40 Las HSP se han implicado en el cáncer. Por ejemplo, existen evidencias de expresión diferencial de las HSP que puede estar relacionada con la fase de progresión tumoral (Martin *et al.*, 2000; Conroy *et al.*, 1996; Kawanishi *et al.*, 1999; Jameel *et al.*, 1992; Hoang *et al.*, 2000; Lebeau *et al.*, 1991). Como resultado de la participación de Hsp90 en diversas rutas oncogénicas críticas y el descubrimiento de que determinados productos naturales con actividad anticancerígena seleccionan como diana esta chaperona molecular, se desarrolló el concepto de que la inhibición de la función de HSP puede ser útil en el tratamiento de cáncer. Los inhibidores de chaperonas moleculares están actualmente sometiéndose a ensayos clínicos.

- 50 Hsp90 constituye aproximadamente el 1-2% de la proteína celular total, y está presente habitualmente en la célula como un dímero en asociación con una de varias otras proteínas (véase, por ejemplo, Pratt, 1997). Es esencial para la viabilidad celular y presenta funciones de chaperona duales (Young *et al.*, 2001). Desempeña un papel clave en la respuesta al estrés celular interaccionando con muchas proteínas después de que se haya alterado su conformación nativa por diversos estreses ambientales, tales como choque térmico, garantizando un plegamiento adecuado de la proteína e impidiendo la agregación no específica (Smith *et al.*, 1998). Además, los resultados sugieren que Hsp90 también puede desempeñar un papel en la amortiguación frente a los efectos de mutación, presumiblemente corrigiendo el plegamiento inapropiado de proteínas mutantes (Rutherford y Lindquist, 1998).

Sin embargo, Hsp90 también tiene un importante papel regulador. En condiciones fisiológicas normales, junto con su homólogo de retículo endoplasmático GRP94, Hsp90 desempeña un papel de mantenimiento en la célula, manteniendo la maduración y estabilidad conformacional de varias proteínas cliente clave. Estas pueden subdividirse en tres grupos: (a) receptores de hormonas esteroideas, (b) Ser/Thr o tirosina cinasas (por ejemplo, ERBB2, RAF-1, CDK4 y LCK), y (c) una colección de proteínas aparentemente no relacionadas, por ejemplo, p53 mutante y la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT. Todas estas proteínas desempeñan papeles reguladores clave en muchos procesos fisiológicos y bioquímicos en la célula. Están identificándose de manera continua nuevas proteínas cliente de Hsp90.

La familia de Hsp90 altamente conservada en seres humanos consiste en cuatro genes, concretamente las isoformas citosólicas Hsp90 α y Hsp90 β (Hickey *et al.*, 1989), GRP94 en el retículo endoplasmático (Argon *et al.*, 1999) y HSP75/TRAP1 en la matriz mitocondrial (Felts *et al.*, 2000). Se cree que todos los miembros de la familia tienen un modo de acción similar, pero que se unen a diferentes proteínas cliente dependiendo de su localización dentro de la célula. Por ejemplo, se sabe que ERBB2 es una proteína cliente específica de GRP94 (Argon *et al.*, 1999) y se ha mostrado que tanto el receptor del factor de necrosis tumoral de tipo 1 (TNFR1) como RB son clientes de TRAP1 (Song *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996).

Hsp90 participa en una serie de complejas interacciones con una variedad de proteínas cliente y reguladoras (Smith, 2001). Aunque todavía han de dilucidarse los detalles moleculares precisos, estudios bioquímicos y de cristalografía de rayos X (Prodromou *et al.*, 1997; Stebbins *et al.*, 1997) llevados a cabo en los últimos años han proporcionado un conocimiento cada vez más detallado sobre la función como chaperona de Hsp90.

Hsp90 es una chaperona molecular dependiente de ATP (Prodromou *et al.*, 1997), con dimerización de los dominios de unión a nucleótidos que es esencial para la hidrólisis de ATP, que es esencial a su vez para la función como chaperona (Prodromou *et al.*, 2000a). La unión de ATP da como resultado la formación de una estructura dimérica toroidal en la que los dominios N-terminales se ponen en contacto más próximo entre sí, lo que da como resultado un cambio conformacional conocido como el "mecanismo de fijación" (Prodromou y Pearl, 2000b).

Inhibidores de Hsp90

Se ha mostrado que la inhibición de la función de Hsp90 provoca la degradación selectiva de importantes proteínas de señalización implicadas en la proliferación celular, regulación del ciclo celular y apoptosis, procesos que son fundamentalmente importantes y que están desregulados comúnmente en el cáncer (véase, por ejemplo, Hostein *et al.*, 2001).

La inhibición de la actividad ATPasa de Hsp90 impide el reclutamiento de co-chaperonas y fomenta la formación de un tipo de heterocomplejo de Hsp90 desde el que se dirigen estas proteínas cliente para la degradación a través de la ruta de ubiquitina-proteasoma (véanse, por ejemplo, Neckers *et al.*, 1999; Kelland *et al.*, 1999). El tratamiento con inhibidores de Hsp90 conduce a la degradación selectiva de importantes proteínas implicadas en la proliferación celular, regulación del ciclo celular y apoptosis, procesos que son fundamentalmente importantes en el cáncer.

Un fundamento atractivo para desarrollar fármacos contra esta diana para su uso en la clínica es que reduciendo simultáneamente proteínas asociadas con el fenotipo transformado, puede obtenerse un fuerte efecto antitumoral y lograr una ventaja terapéutica contra el cáncer con respecto a las células normales. Se cree que estos acontecimientos posteriores a la inhibición de Hsp90 son responsables de la actividad antitumoral de los inhibidores de Hsp90 en cultivo celular y modelos animales (véanse, por ejemplo, Schulte *et al.*, 1998; Kelland *et al.*, 1999).

Debido a su implicación en la regulación de varias rutas de señalización que con importantes de manera crucial en el impulso del fenotipo de un tumor, y el descubrimiento de que determinados productos naturales bioactivos ejercen sus efectos a través de la actividad Hsp90, la chaperona molecular Hsp90 se valora como diana para el desarrollo de fármacos anticancerígenos (Neckers *et al.*, 1999). Existen muchos inhibidores de Hsp90 conocidos para la terapia contra el cáncer.

La primera clase de inhibidores de Hsp90 que se descubrió fue la clase de benzoquinona-ansamicina, que incluye los compuestos herbimicina A y geldanamicina. Mostraron que revertían el fenotipo maligno de fibroblastos transformados por el oncogén v-Src (Uehara *et al.*, 1985), y posteriormente presentaron una potente actividad antitumoral tanto en modelos *in vitro* (Schulte *et al.*, 1998) como de animales *in vivo* (Supko *et al.*, 1995).

Estudios de inmunoprecipitación y alineamiento de afinidad han mostrado que el principal mecanismo de acción de geldanamicina implica la unión a Hsp90 (Whitesell *et al.*, 1994; Schulte y Neckers, 1998). Además, estudios de cristalografía de rayos X han mostrado que geldanamicina compite en el sitio de unión a ATP e inhibe la actividad ATPasa intrínseca de Hsp90 (Prodromou *et al.*, 1997; Panaretou *et al.*, 1998). Esto impide a su vez la formación de complejos de Hsp90 multiméricos maduros que pueden actuar como chaperonas sobre proteínas cliente. Como

resultado, se direccionan las proteínas cliente para la degradación a través de la ruta de ubiquitina-proteasoma. 17-Alilamino-17-desmetoxigeldanamicina (17MG) conserva la propiedad de la inhibición de Hsp90 que da como resultado la reducción de la proteína cliente y actividad antitumoral en modelos en cultivo celular y de xenoinjerto (Schulte *et al.*, 1998; Kelland *et al.*, 1999), pero tiene significativamente menos hepatotoxicidad que la geldanamicina (Page *et al.*, 1997). 17MG está evaluándose actualmente en ensayos clínicos de fase I.

Se sabe que los antibióticos de cumarina se unen a ADN girasa bacteriana en un sitio de unión a ATP homólogo al de la Hsp90. Se mostró que la cumarina, novobiocina, se unía al extremo carboxilo-terminal de Hsp90, es decir, en un sitio diferente al ocupado por las benzoquinona-ansamicinas y radicicol que se unen en el extremo N-terminal (Marcu *et al.*, 2000b). Sin embargo, esto dio como resultado todavía la inhibición de la función de Hsp90 y la degradación de varias proteínas de señalización con chaperona de Hsp90 (Marcu *et al.*, 2000a). La geldanamicina no puede unirse a Hsp90 de manera posterior a novobiocina; esto sugiere que debe existir cierta interacción entre los dominios N y C-terminal y concuerda con la opinión de que ambos sitios son importantes para las propiedades como chaperona de Hsp90.

Se ha mostrado que un inhibidor basado en purina de Hsp90, PUS, da como resultado la degradación de moléculas de señalización, incluyendo ERBB2, y que provoca la detención del ciclo celular y la diferenciación en células de cáncer de mama (Chiosis *et al.*, 2001).

El tratamiento de células cancerosas con un inhibidor de mTOR puede provocar la regulación por incremento de la proteína pro-supervivencia fosfo-AKT (O'Reilly, 2006). Puesto que fosfo-AKT es una proteína cliente de Hsp90, el tratamiento conjunto de un inhibidor de mTOR con un inhibidor de Hsp90 impedirá o disminuirá la regulación por incremento inducida por el inhibidor de mTOR de fosfo-AKT dando lugar a un efecto antitumoral aumentado.

Actualmente, tres inhibidores de Hsp90 están en desarrollo clínico, varios otros en desarrollo preclínico. 17-AAG, desarrollado conjuntamente por Kosan y NCI, es un análogo de geldanamicina y fue el primero en desarrollo clínico. 17-AAG está ahora en ensayos de fase II como agente individual en melanoma, cáncer de mama, RCC, cáncer de ovario y cáncer de próstata. Están en marcha varios estudios de combinaciones de fase Ib con gemcitabina, docetaxel, paclitaxel, rituxamib, imatinib y bortezomib en tumores sólidos y hematológicos. 17-DMAG, la segunda geldanamicina desarrollada por Kosan, está ahora en ensayos de fase I en tumores sólidos y tumores hematológicos. CNF 1010, desarrollado por Conformia, es una formulación sin disolvente orgánico de 17-AAG y está actualmente en fase I en tumor sólido y CML.

Otros inhibidores de Hsp90 en desarrollos preclínicos incluyen IPI-504 (Infinity Pharma), CGI 242 (Cellular Genomics), SRN 005 (Sirenade), Stresgenin (Mercian Group), y compuestos sin nombrar de Memorial Sloan-Kettering Cancer Center y Quorex.

Tal como se describe en el presente documento, se investigaron muchas proteínas secretadas para evaluar su capacidad para servir como indicadores circulantes de respuesta tumoral a la inhibición farmacológica de Hsp90. Se encontró que la citocina IL-8 en particular funcionaba bien como biomarcador secretado de respuesta farmacodinámica de células tumorales a NVP-AUY922 tanto *in vitro* como *in vivo*. La investigación adicional de una vinculación mecanística proporcionó evidencias que concordaban con la hipótesis de que la expresión de IL-8 se veía afectada por los inhibidores de Hsp90 a través de sus efectos sobre proteínas que regulan la actividad transcripcional del gen de IL-8, concretamente AP-1 y NFκB. IL-8 es un biomarcador farmacodinámico prometedor de la inhibición de Hsp90 en el contexto de tumores que se sabe que expresan altos niveles de esta quimiocina.

Entre el número creciente de inhibidores de Hsp90 candidatos terapéuticos, los análogos de benzoquinona-ansamicina de geldanamicina, 17-alilamino-17-desmetoxigeldanamicina (17-AAG) y 17-dimetilamino-geldanamicina (17-DMAG), son inhibidores de Hsp90 que son los más avanzados en estudios clínicos. (Solit DB, *et al.* (2007) Clin. Cancer Res., 13(6), 1775-1782) (Hollingshead M, *et al.* (2005) Cancer Chemother Pharmacol., 56(2), 115-25). Un inhibidor de Hsp90 descrito recientemente, NVP-AUY922, puede resultar más prometedor a través de sus propiedades farmacéuticas y farmacológicas mejoradas tal como se demuestra mediante su actividad antitumoral más potente en un modelo preclínico de cáncer de mama humano. (Jensen MR, *et al.* (2008) Breast Cancer Res., 10(2), R33) (Eccles S, *et al.* (2008) Cancer Res, 68(8), 2850-2860). En un panel de líneas de células cancerosas representativas, NVP-AUY922 inhibió la proliferación celular entre 3,6 y 300 veces más eficazmente que 17-AAG. También puede encontrarse una descripción de AUY922 y otros inhibidores de Hsp90 relacionados en la publicación de patente WO04/72051.

Biomarcadores de inhibición de Hsp

La reciente aparición de inhibidores de Hsp90 como posibles agentes anticancerígenos trae consigo la necesidad de biomarcadores relevantes que indiquen un efecto farmacodinámico *in vivo* en tumores. Existen varios biomarcadores de la inhibición de Hsp90 bien establecidos, tales como el aumento de la expresión de Hsp70 y la disminución de los niveles de varias moléculas de señalización relevantes para el cáncer pero su medición requiere normalmente

análisis comparativos laboriosos e invasivos de biopsias antes y tras el tratamiento. (Banerji U, *et al.* (2005) 23(18), 4152-4161). Esto ha conducido a la investigación de proteínas liberadas o secretadas derivadas de tumor cuyos niveles cambian posiblemente en respuesta a la inhibición de Hsp90. Recientemente, un estudio del cáncer de mama evaluó IGFBP-2 y el dominio extracelular liberado de Her2 (Her2-ECD), pudiendo ambos ser prometedores como marcadores farmacodinámicos circulantes para un subconjunto de tumores que sobreexpresan estas proteínas. (Zhang H, *et al.* (2006) Mol. Cancer Ther., 5(5), 1256-1264).

Puesto que las estabilidades de múltiples proteínas cliente se ven afectadas por la actividad del complejo de Hsp90-chaperona, la abundancia relativa de cada cliente en determinados tumores puede servir como indicador farmacodinámico de la actividad inhibidora de Hsp90, tal como AKT (Sato S, *et al.* (2000) PNAS, 97(20), 10832-10837), ErbB2 (Xu, 2001) y Cdk4 (Stepanova L, *et al.* (1996) Genes Develop., 10, 1491-1502). Además de la desestabilización de proteínas cliente, la inhibición farmacológica de Hsp90 también conduce al aumento de la expresión de la proteína de respuesta a estrés, Hsp70. Esto se logra mediante la activación de HSF-1 a través de su disociación de Hsp90 y la posterior translocación al núcleo, en el que activa la transcripción de múltiples genes, incluyendo Hsp70. (Shi Y, *et al.* (1998) Genes and Devel., 12(5), 654-666).

La utilización de la degradación de proteínas cliente específicas y/o la inducción de Hsp70 como biomarcadores farmacodinámicos clínicos de la inhibición de Hsp90 han demostrado ser útiles, pero requieren procedimientos invasivos y laboriosos tales como análisis de biopsias tumorales y/o de células sanguíneas nucleadas. Por tanto, se prefieren marcadores farmacodinámicos circulantes, y pueden reflejar de manera exacta y conveniente el efecto *in vivo* de la inhibición de Hsp90 en tumores. Dos de tales proteínas, el factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGFBP-2) y dominio extracelular de Her-2 liberado (ECD), se identificaron *in vitro* y en suero a partir de un modelo de xenoinjerto de tumor de mama BT474 (Zhang H, *et al.* (2006) Mol. Cancer Ther., 5(5), 1256-1264), y su evaluación como biomarcadores clínicos sólo se ha sometido a prueba en un pequeño número de muestras de pacientes. (Eiseman JL, *et al.* (2007) Clin. Cancer Res., 13(7), 2121-2127). Aunque se requerirá un estudio más exhaustivo en pacientes para comprender la utilidad de IGFBP-2 y ECD de Her-2 como posibles biomarcadores farmacodinámicos de la inhibición de Hsp90, es probable que la heterogeneidad tumoral conduzca a la necesidad de múltiples proteínas liberadas o secretadas derivadas de tumor.

Tal como se describe en el presente documento, la posible utilidad de IL-8 como biomarcador circulante de respuesta farmacodinámica tumoral a la inhibición de Hsp90 contribuye significativamente al campo de los biomarcadores para el cáncer. El inhibidor de Hsp90 descrito recientemente, NVP-AUY922, bloqueó la producción de IL-8 de manera dependiente de la dosis en líneas celulares gástricas y de melanoma que se sabe que expresan niveles relativamente altos de esta citocina. Esta disminución en la producción de IL-8 parece producirse con cinéticas más rápidas que la pérdida de la viabilidad celular y puede atribuirse a la perturbación de la expresión de ARNm de IL-8 en estas células. La pérdida observada de los niveles de fosfo-c-Jun (una subunidad de AP-1) y, en menor medida, de NFκB sugiere una vinculación mecanística con la inhibición farmacológica de Hsp90, que concuerda con informes de que la actividad de ambos factores de transcripción depende de la actividad del complejo de Hsp90-chaperona. (Pittet JF, *et al.* (2005) J. Immunol., 174(1), 384-394) (Broemer M, *et al.* (2004) Oncogene, 5378-5386) (Vasileskaya IA, *et al.* (1999) Cancer Res., 59, 3935-3940) (Lu C, *et al.* (2007) Mol. Cells, 24(2), 210-214) (Duo F, *et al.* (2005) Acta Biochim. Biophys. Sinica, 37(7), 501-505). Además, una dosis única de NVP-AUY922 dio como resultado una disminución transitoria del 40-70% de los niveles séricos de IL-8 en ratones que portan tumor, lo que indica que las respuestas tumorales con expresión de IL-8 a inhibidores de Hsp90 pueden evaluarse midiendo esta citocina en circulación.

Se han notificado niveles elevados de expresión de IL-8 en múltiples líneas de células cancerosas, incluyendo de mama (Chavey C, *et al.* (2008) Mol. Pharmacol., 74(5), 1359-1366), cervicouterinas (Fujimoto J, *et al.* (2006) Cancer Sci., 97(9), 861-867), de melanoma (Peng HH, *et al.* (2007) Exp. Cell Res., 313(3), 551-559), gástricas (Kim JM, *et al.* (2003) Helicobacter, 8(5), 542-553) (Kitadai Y, *et al.* (1999) Br. J. Cancer, 81(4), 647-653), de ovario (Wang Y, *et al.* (2007) Cancer Biol. Ther., 6(6), 864-871) y de próstata (Golovine K, *et al.* (2008) Prostate, 68(13), 1443-9). Se han medido los niveles séricos o plasmáticos de IL-8 en múltiples estudios con pacientes con cáncer, incluyendo cáncer gástrico (MacRi A, *et al.* (2006) Biomarkers, 11(2), 184-193) (Yamaoka Y, *et al.* (2001) Helicobacter, 6(20), 116-124), melanoma (Yurkovetsky ZR, *et al.* (2007) Clin. Cancer Res., 13(8), 2422-2428) (Guida M, *et al.* (2006) Melan. Res., 16(4), 317-323) y de pulmón (Tas F, *et al.* (2006) Cancer Invest., 24(5), 492-496) y se observa generalmente que son de 10 a 100 veces mayores que en pacientes con la mayor parte de estados que pueden confundir. Además, los niveles de IL-8 en individuos sanos son muy bajos, dentro de los límites del ensayo utilizado para la medición. La rápida inhibición de la producción de IL-8 derivada de tumor en respuesta a la inhibición de Hsp90 señala a su posible utilidad para un subconjunto de cánceres que expresan altos niveles de IL-8. Por tanto, IL-8 podría ser un biomarcador circulante muy informativo de respuesta farmacodinámica tumoral a la inhibición de Hsp90 para el subconjunto de tumores que expresan altos niveles de esta citocina.

No es probable que un único biomarcador circulante sea relevante de manera universal para inhibidores de Hsp90 u otros agentes anticancerígenos a través de todos los tipos de cáncer, ni siquiera para tumores dentro de un tipo de cáncer definido actualmente. Por tanto, existe la necesidad de descubrir múltiples posibles biomarcadores para monitorizar de manera informativa respuestas farmacodinámicas para maximizar la fracción de tumores

“monitorizables” en la población de pacientes. Los resultados descritos validaron IL-8 como otro marcador farmacodinámico útil en cáncer gástrico y melanoma. Además de Her-2 ECD, IGFBP-2, y ahora IL-8, el análisis multiplexado de citocinas también sugiere que existen varios de otros posibles marcadores que pueden tener una utilidad similar, tales como IL-1ra, IL-17, VEGF y GM-CSF que pueden servir como marcadores para aún otro subconjunto de tumores. En conclusión, este estudio muestra que NVP-AUY922, un potente inhibidor de Hsp90, bloquea rápidamente la producción de IL-8 en células tumorales gástricas y de melanoma *in vitro* e *in vivo*. Además, los datos publicados indican que podría haber un diferencial significativo entre los niveles de IL-8 derivada de tumor en oposición a los de IL-8 en circulación no derivada de tumor, facilitando la detección no invasiva de un efecto farmacodinámico específico de tumor. Estos resultados justifican la caracterización adicional de IL-8 como biomarcador farmacodinámico circulante de la inhibición tumoral de Hsp90, incluyendo la evaluación de su utilidad en estudios clínicos.

IL-8

Las células utilizan mediadores difundibles, denominados citocinas, para señalizarse entre sí. Una superfamilia de citocinas son las quimiocinas, que incluye IL-8. Miller *et al.*, Crit Rev Immun 12(1,2): 17-46 (1992) y Baggiolini *et al.* Adv Immunol 55: 97-179 (1994) redactaron un artículo de revisión de la superfamilia de quimiocinas.

IL-8 humana nativa actúa como quimioatrayente para neutrófilos, e induce granulocitosis tras inyección sistémica y reacción en la piel tras inyección local en animales de experimentación. (Bazzoni *et al.*, (1991) 173: 771-774; Van Damme *et al.*, J En Med 167: 1364-1376; Ribero *et al.*, Immunology 73: 472-477 (1991)). La molécula también activa la liberación de aniones superóxido y provoca la liberación de constituyentes granulosos primarios de los neutrófilos, incluyendo mieloperoxidasa, β -glucuronidasa y elastasa. IL-8 humana nativa media en estas actividades biológicas mediante la unión a su receptor y desencadena la transducción, una cascada de reacciones que dan como resultado, en última instancia, una respuesta biológica.

En la actualidad, se han identificado dos receptores de unión a IL-8 y se denominan “IL-8R1” y “EUR2”. La secuencia de aminoácidos de estos polipéptidos se describe en Murphy *et al.*, Science 253: 1280 (1991) y Holmes *et al.*, Science 253: 1278 (1991). Otras proteínas pueden competir con IL-8 para unirse a IL-8R2, tales como GRO α , GRO β y GRO γ . NAP-2 y ENA-78 se han implicado con la unión a IL-8R.2 mediante experimentos de desensibilización cruzada con IL-8 nativa midiendo el Ca²⁺.

Estas otras proteínas que pueden competir por la unión a IL-8 son miembros de la familia de quimiocinas. Las quimiocinas son un grupo de citocinas estructural y funcionalmente relacionadas. Estudios recientes indicaron que estas proteínas funcionan en el reclutamiento y la activación de leucocitos y otras células en sitios de inflamación y, por tanto, parecen ser importantes mediadores inflamatorios. Estructuralmente, estas moléculas presentan una estructura proteica secundaria común y muestran cuatro residuos de cisteína conservados. Las estructuras secundarias comunes de una quimiocina incluyen: (1) un bucle amino terminal; (2) una lámina β antiparalela de tres hebras en forma de clave griega; y (3) una hélice cc C-terminal. Debido a que no se ha llegado aún a un acuerdo sobre una nomenclatura sistemática para estas proteínas, las proteínas pueden dividirse en dos familias según la separación de los dos primeros residuos de cisteína de las proteínas maduras. Las familias se denominan las familias CXC y CC. Los dos primeros residuos de cisteína de los miembros de la familia CXC están separados en un residuo de aminoácido. Para la familia CC, las cisteínas no están separadas. Hasta la fecha, se han descrito diecisiete quimiocinas. Seis son miembros de la familia CXC e incluyen, factor de plaquetas 4 (“PF4”); β -tromboglobulina (“ β TG”); NAP-1/IL-8; gro α , β , y γ ; IP-10; mig; y ENA-78. La familia CXC también se conoce como la familia α . Las quimiocinas restantes forman parte de la familia CC: proteínas inflamatorias de macrófagos (“MIP-1 α ” y “MIP-1 β ”); proteína quimioatrayente de monocitos-1/JE (“MCP-1”/ “JE”) RANTES; HC-14; C10; e I-309. Esta familia también se ha designado como la familia β .

Los investigadores han identificado regiones de IL-8 humana nativa que están implicadas en la unión tanto a IL-8R1 como a IL-8R2. Sin embargo, en este momento, no se conoce ninguna quimiocina que compita con IL-8 nativa por la unión a IL-8R1.

Ensayos

La presencia, ausencia y/o el nivel de IL-8 en una muestra biológica obtenida de un sujeto puede evaluarse mediante cualquiera de una amplia variedad de técnicas y métodos *in vitro* e *in vivo*, que transforman IL-8 dentro de la muestra en un resto que puede detectarse y cuantificarse. Los ejemplos no limitativos de tales métodos incluyen analizar la muestra usando métodos inmunológicos para la detección de proteínas, métodos de purificación de proteínas, ensayos de la actividad o función de proteínas, métodos de hibridación de ácido nucleico, métodos de transcripción inversa de ácido nucleico y métodos de amplificación de ácido nucleico, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), inmunotransferencia, inmunotransferencia de tipo Western, transferencia de tipo Northern, microscopía electrónica, espectrometría de masas, inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, hibridaciones de tipo Southern y similares. Tales técnicas, así como otras descritas en el presente documento,

también pueden usarse para detectar marcadores adicionales de la inhibición de Hsp90 y/o de regímenes de tratamiento de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a IL-1ra, IL-17, eotaxina, GM-CSF, IP-10, PDGF-bb, fosfo-ERK1/2 fosfo-c-Jun, Hsp70, AKT, ErbB2, Cdk4, IGFBP-2, dominio extracelular de Her-2 (ECD), y VEGF, IL-15, cuando sea aplicable.

En una realización, la presencia, ausencia y/o el nivel de IL-8 en una muestra puede evaluarse usando un reactivo, tal como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de una pareja proteína-ligando (por ejemplo biotina-estreptavidina)), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla o un dominio hipervariable de anticuerpo aislado) que se une específicamente a y transforma el biomarcador, por ejemplo, IL-8, en una muestra en una molécula detectable.

Se pretende que el término “marcado”, con respecto al anticuerpo, englobe el marcaje directo del anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, unión física) de una sustancia detectable al anticuerpo, así como el marcaje indirecto del anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente, de manera que puede detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente.

En otra realización, la presencia, ausencia y/o el nivel de IL-8 se evalúa usando un ácido nucleico. Por ejemplo, en una realización, la presencia, ausencia y/o el nivel de IL-8 se evalúa usando una sonda de ácido nucleico.

El término “sonda”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula que pueda unirse selectivamente a IL-8. Las sondas pueden sintetizarse por un experto en la técnica, o derivarse de preparaciones biológicas apropiadas. Pueden diseñarse específicamente sondas para marcarse. Los ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como sondas incluyen, pero no se limitan a, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas.

Puede usarse ARNm aislado en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis de tipo Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y alineamientos de sondas. Un método para la detección de los niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse con ARNm de IL-8. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas con ADN genómico de IL-8.

En una realización, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo haciendo correr el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm desde el gel hasta una membrana, tal como nitrocelulosa. En una realización alternativa, la(s) sonda(s) se inmoviliza(n) sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en un alineamiento de chip génico de Affymetrix. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente métodos de detección de ARNm conocidos para su uso en la detección del nivel de ARNm de IL-8.

Un método alternativo para determinar el nivel de ARNm de IL-8 en una muestra implica el procedimiento de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante RT-PCR (la realización experimental expuesta en Mullis, 1987, patente estadounidense n.º 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-beta replicasa (Lizardi *et al.* (1988) Bio/Technology 6:1197), replicación en círculo rodante (Lizardi *et al.*, patente estadounidense n.º 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy bajos. En aspectos particulares de la invención, se evalúa la expresión de IL-8 mediante RT-PCR fluorogénica cuantitativa (es decir, el sistema TaqMan™). Tales métodos utilizan normalmente pares de cebadores oligonucleotídicos que son específicos para IL-8. En la técnica se conocen bien métodos para diseñar cebadores oligonucleotídicos específicos para una secuencia conocida.

Los niveles de expresión de ARNm de IL-8 pueden monitorizarse usando una transferencia a membrana (tal como se usa en análisis de hibridación tales como de tipo Northern, Southern, puntual, y similares), o micropocillos, tubos de ensayo, geles, perlas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprende ácidos nucleicos unidos). Véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.770.722, 5.874.219, 5.744.305, 5.677.195 y 5.445.934. La detección de la expresión de IL-8 también puede comprender el uso de sondas de ácido nucleico en disolución.

En una realización de la invención, se usan microalineamientos para detectar la expresión de IL-8. Los microalineamientos son particularmente muy adecuados para este fin debido a la reproducibilidad entre diferentes

experimentos. Los microalineamientos de ADN proporcionan un método para la medición simultánea de los niveles de expresión de grandes números de genes. Cada alineamiento consiste en un patrón reproducible de sondas de captura unidas a un soporte sólido. Se hibrida ARN o ADN marcado con sondas complementarias en el alineamiento y luego se detectan mediante barrido con láser. Se determinan las intensidades de hibridación para cada sonda en el alineamiento y se convierten en un valor cuantitativo que representa los niveles de expresión génica relativos. Véanse las patentes estadounidenses n.ºs 6.040.138, 5.800.992 y 6.020.135, 6.033.860 y 6.344.316. Alineamientos de oligonucleótidos de alta densidad son particularmente útiles para determinar el perfil de expresión génica para un gran número de ARN en una muestra.

Además, las técnicas *in vivo* para la detección de IL-8 incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra IL-8, que se une a y transforma IL-8 en una molécula detectable. Tal como se comentó anteriormente, puede detectarse la presencia, el nivel o incluso la ubicación de la IL-8 detectable en un sujeto mediante técnicas de obtención de imágenes convencionales.

En otra realización, puede usarse espectrometría de masas para detectar IL-8 en una muestra. La espectrometría de masas es una técnica analítica que consiste en la ionización de compuestos químicos para generar moléculas cargadas (o fragmentos de las mismas) y medir sus razones de masa con respecto a carga. En un procedimiento de espectrometría de masas típico, se obtiene una muestra de un sujeto, se carga en la espectrometría de masas y se ionizan sus componentes (por ejemplo, IL-8) mediante diferentes métodos (por ejemplo, mediante el impacto sobre los mismos de un haz de electrones), dando como resultado la formación de partículas cargadas (iones). Entonces se calcula la razón de masa con respecto a carga de las partículas a partir del movimiento de los iones a medida que transitan a través de campos electromagnéticos.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo se marcará normalmente con un resto detectable. Están disponibles numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radionúclidos tales como los comentados a continuación. El anticuerpo puede marcarse, por ejemplo, con el radioisótopo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991) por ejemplo y puede medirse la radioactividad usando recuento de centelleo.

(b) Están disponibles marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y rojo Texas. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo usando las técnicas dadas a conocer en *Current Protocols in Immunology*, citado anteriormente, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

(c) Están disponibles diversos marcadores de sustrato enzimático y la patente estadounidense n.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de estos. La enzima cataliza generalmente una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse de manera espectrofotométrica. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Se describieron anteriormente técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y entonces puede emitir luz que puede medirse (usando un quimioluminómetro por ejemplo) o donar energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente estadounidense n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa del rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Se describen técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos en O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 73:147-166 (1981).

Los anticuerpos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. En algunas realizaciones, el anticuerpo se marca con un radionúclido de modo que el tumor puede localizarse usando inmunoescintigrafía. Por conveniencia, los anticuerpos de la presente invención pueden proporcionarse en un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, habitualmente liofilizados, que incluyen excipientes que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

En algunas realizaciones, los anticuerpos se conjugan con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede convertirse, por ejemplo, en May-SS-Me que puede reducirse para dar May-SH3 y hacerse reaccionar con anticuerpo modificado (Chari *et al.* Cancer Research 52: 127-131 (1992)) para generar un inmunoconjugado de maitansinoide-anticuerpo. En algunas realizaciones, el conjugado puede ser el derivado de maitansinoide DM1 altamente potente (N2'-desacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina) (véase por ejemplo el documento WO02/098883 publicado el 12 de diciembre de 2002) que tiene una CI50 de aproximadamente 10-11 M (revisión, véase Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212) o DM4 (N2'-desacetil-N2'-(4-metil--4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina) (véase por ejemplo el documento WO2004/103272 publicado el 2 de diciembre de 2004).

En algunas realizaciones, el conjugado de anticuerpo comprende un anticuerpo anti-antígeno de células tumorales conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, gamma1I, alpha2I, alpha3I, N-acetil-gamma1I, PSAG y theta1I (Hinman *et al.* Cancer Research 53: 3336-3342 (1993) y Lode *et al.* Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)). Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; y 5.773.001.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un profármaco que puede liberarse en su forma activa por enzimas sobreproducidas en muchos cánceres. Por ejemplo, pueden prepararse conjugados de anticuerpo con una forma de profármaco de doxorubicina en la que el componente activo se libera del conjugado mediante plasmina. Se sabe que la plasmina se sobreproduce en muchos tejidos cancerosos (véase Decy *et al.*, (2004) FASEB Journal 18(3): 565-567).

En algunas realizaciones, los anticuerpos se conjugan toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas. En algunas realizaciones, las toxinas incluyen, sin limitación, cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), endotoxina de *Pseudomonas*, cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), ribonucleasa (ARNasa), desoxirribonucleasa (ADNasa), proteína antiviral de fitolaca americana, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, neomicina y los tricotecnos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. En algunas realizaciones, las toxinas tienen baja inmunogenicidad intrínseca y un mecanismo de acción (por ejemplo un mecanismo citotóxico frente a un mecanismo citostático) que reduce la posibilidad de que las células cancerosas se vuelvan resistentes a la toxina.

En algunas realizaciones, se preparan conjugados entre los anticuerpos de la invención e inmunomoduladores. Por ejemplo, en algunas realizaciones pueden usarse oligonucleótidos inmunoestimuladores. Estas moléculas son potentes inmunógenos que pueden provocar respuestas de anticuerpos específicos de antígeno (véase Datta *et al.*, (2003) Ann N.Y. Acad. Sci 1002: 105-111). Los compuestos inmunomoduladores adicionales pueden incluir factor de crecimiento de células madre tal como "factor S1", linfotoxinas tales como factor de necrosis tumoral (TNF), factor hematopoyético tal como una interleucina, factor estimulante de colonias (CSF) tal como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón (IFN) tal como interferón alfa, beta o gamma, eritropoyetina y trombopoyetina.

En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos radioconjugados. En algunas realizaciones tales anticuerpos pueden prepararse usando ³²P, ³³P, ⁴⁷Sc, ⁵⁹Fe, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁷⁵Se, ⁷⁷As, ⁸⁹Sr, ⁹⁰Y, ⁹⁹Mo, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶¹Th, ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁹Er, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ¹⁹⁴Ir, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²¹¹Pb, ²¹²Pb, ²¹³Bi, ⁵⁸Co, ⁶⁷Ga, ^{80m}Br, ^{99m}Tc, ^{103m}Rh, ¹⁰⁹Pt, ¹⁶¹Ho, ^{189m}Os, ¹⁹²Ir, ¹⁵²Dy, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²²³Ra, ²¹⁹Rn, ²¹⁵Po, ²¹¹Bi, ²²⁵Ac, ²²¹Fr, ²¹⁷At, ²¹³Bi, ²⁵⁵Fm y combinaciones y subcombinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, se conjugan átomos de boro, gadolinio o uranio con los anticuerpos. En algunas realizaciones, el átomo de boro es ¹⁰B, el átomo de gadolinio es ¹⁵⁷Gd y el átomo de uranio es ²³⁵U.

En algunas realizaciones, el conjugado de radionúclido tiene un radionúclido con una energía de entre 20 y 10.000 keV. El radionúclido puede ser un emisor Auger, con una energía de menos de 1000 keV, un emisor P con una energía de entre 20 y 5000 keV, o un emisor alfa o "a" con una energía de entre 2000 y 10.000 keV.

En algunas realizaciones, se proporcionan radioconjugados de diagnóstico que comprenden un radionúclido que es un emisor gamma, beta o de positrones. En algunas realizaciones, el radionúclido tiene una energía de entre 20 y 10.000 keV. En algunas realizaciones, el radionúclido se selecciona del grupo de ¹⁸F, ⁵¹Mn, ^{52m}Mn, ⁵²Fe, ⁵⁵Co, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ^{82m}Rb, ⁸³Sr, ⁸⁹Zr, ^{94m}Tc, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵¹Co, ⁵⁹Fe, ⁶⁷Ga, ⁷⁵Se, ⁹⁷Ru, ^{99m}Tc, ^{114m}In, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³Li y ¹⁹⁷Hg.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se conjugan con agentes de diagnóstico que son agentes fotoactivos o de contraste. Los compuestos fotoactivos pueden comprender compuestos tales como cromógenos o colorantes. Los agentes de contraste pueden ser, por ejemplo un ión paramagnético, en el que el ión comprende un metal seleccionado del grupo de cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II),

neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III). El agente de contraste también puede ser un compuesto radioopaco usado en técnicas de rayos X o tomografía computerizada, tal como un compuesto de yodo, iridio, bario, galio y talio. Los compuestos radioopacos pueden seleccionarse del grupo de bario, diatrizoato, aceite etiodizado, citrato de galio, ácido iocármico, ácido iocetámico, iodamida, iodipamida, iodoxámico, iogulamida, iohexol, iopamidol, ácido iopanoico, ácido ioprocémico, ácido iosefámico, ácido iosérico, iosulamida meglumina, ácido isosemético, iotasul, ácido iotétrico, ácido iotalámico, ácido iotróxico, ácido ioxáglico, ácido ioxotrizoico, ipodato, meglumina, metrizamida, metrizoato, propiliodona y cloruro taloso. En algunas realizaciones, los inmunoconjugados de diagnóstico pueden contener agentes potenciadores de ultrasonidos tales como un liposoma lleno de gas que está conjugado con un anticuerpo de la invención. Pueden usarse inmunoconjugados de diagnóstico para una variedad de procedimientos incluyendo, pero sin limitarse a, métodos intraoperatorios, endoscópicos o intravasculares de diagnóstico y detección de tumor o cáncer.

En algunas realizaciones se preparan conjugados de anticuerpo usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina tal como se describe en Vitetta *et al.* Science 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación de fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil a ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari *et al.* Cancer Research 52: 127-131 (1992)). Los agentes pueden unirse adicionalmente a los anticuerpos de la invención a través de resto hidrato de carbono.

En algunas realizaciones pueden prepararse proteínas de fusión que comprenden los anticuerpos de la invención y agentes citotóxicos, por ejemplo mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. En algunas realizaciones tales inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo anti-antígeno tumoral conjugado con un agente citotóxico se administran al paciente. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado y/o la proteína antigénica de células tumorales a la que se une se internalizan por la célula, dando como resultado un aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado en la destrucción de la célula cancerosa a la que se une. En algunas realizaciones, el agente citotóxico selecciona como diana o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Los ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos se conjugan con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el predireccionamiento al tumor en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y luego la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido).

En algunas realizaciones, los anticuerpos se conjugan con una molécula citotóxica que se libera dentro de un lisosoma de la célula diana. Por ejemplo, el fármaco monometil-auristatina E (MMAE) puede conjugarse por medio de un enlace valina-citrulina que se escindirá mediante la enzima lisosómica proteolítica cathepsina B tras la internalización del conjugado de anticuerpo (véase por ejemplo el documento WO03/026577 publicado el 3 de abril de 2003). En algunas realizaciones, el MMAE puede unirse al anticuerpo usando un ligador lábil a ácido que contiene una funcionalidad hidrazona como resto escindible (véase por ejemplo el documento WO02/088172 publicado el 11 de noviembre de 2002).

Kits

La invención también proporciona kits para evaluar si un sujeto tiene o corre el riesgo de desarrollar cáncer. Estos kits comprenden dispositivos y reactivos para medir la expresión génica y/o determinar los niveles de ARNm y/o péptido en una muestra de un sujeto e instrucciones para realizar el ensayo e interpretar los resultados. Tales kits contienen preferiblemente suficientes reactivos como para realizar una o más de tales determinaciones. Estos kits incluyen uno o más de los siguientes: un resto detectable, por ejemplo, un anticuerpo o sonda de PCR, que puede detectar IL-8, fosfo-ERK1/2 o fosfo-c-Jun; reactivos para obtener y/o preparar muestras para tinción; e instrucciones para su uso.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para el análisis de la expresión génica y/o los niveles de péptidos. Un kit de este tipo comprende preferiblemente dispositivos y reactivos para el análisis de al menos una muestra de prueba e instrucciones para realizar el ensayo. Opcionalmente los kits pueden contener uno o más medios para convertir la expresión génica y/o las cantidades de péptidos en un medio de evaluación de la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar cáncer en un sujeto. La comparación del patrón de expresión génica del sujeto, con los controles o patrones de referencia, indicará si el régimen de tratamiento contra el cáncer está

funcionando apropiadamente.

Los kits de la invención pueden comprender opcionalmente componentes adicionales útiles para realizar los métodos de la invención. A modo de ejemplo, los kits pueden comprender fluidos (por ejemplo, tampón de SSC) adecuados para aparear ácidos nucleicos complementarios o para unir un anticuerpo con una proteína con la que se une específicamente, uno o más compartimentos de muestras, un material de instrucciones que describe el funcionamiento de un método de la invención y controles/patrones específicos de tejido.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como adicionalmente limitativos.

Ejemplos

10 Identificación de IL-8 como biomarcador circulante para la inhibición de Hsp90

Materiales y métodos

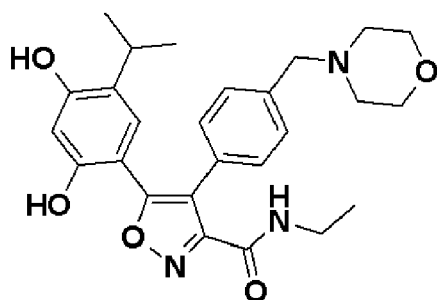
Cultivo celular

Se cultivaron una línea celular de melanoma maligno A375 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, EE.UU.) y una línea de células cancerosas gástricas, GTL-16 (Prof. Silvia Giordano, Institute of Cancer Research and Treatment, Turín, Italia) en RPMI 1640 complementado con el 10% de FBS y el 1% de penicilina-estreptomina a 37°C en el 5% de CO₂ (reactivos GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se determinaron los números de células mediante un analizador de viabilidad celular ViCell™ XR 2.03 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.). Se sembraron las células en placas recubiertas con poli-D-lisina (BIOCOAT Cell Environments, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.).

20 Compuesto inhibidor de Hsp90, NVP-AUY922

NVP-AUY922 (nombre de la IUPAC: etilamida del ácido 5-(2,4-dihidroxi-5-isopropil-fenil)-4-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-isoxazol-3-carboxílico) se basa en un armazón de ácido isoxazol-3-carboxílico. La identificación y estructura de NVP-AUY922 se han descrito previamente. (Jensen, 2008) (Brough, PA, *et al.* (2008) J Med Chem, 51, 196-218) (publicación de patente WO04/72051). Para todos los experimentos *in vitro*, se prepararon disoluciones madre de 10 mM de NVP-AUY922 en el 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenaron a -20°C. Para experimentos *in vivo*, se disolvió una sal de NVP-AUY922 en D5 W y se administró por vía i.v. en un volumen de 10 ml/kg.

La estructura de NVP-AUY922 es tal como sigue:



Viabilidad celular

Se midió la viabilidad celular mediante el ensayo CellTiter-Glo (Promega U.S., Madison, WI, EE.UU.). Se hicieron crecer células GTL-16 y A375 en placas recubiertas con poli-D-lisina de 6 pocillos (BD Biosciences). Se trataron las células con NVP-AUY922. Se midió la viabilidad celular 16, 24, 48 y 72 h tras el tratamiento con inhibidor de Hsp90. En resumen, se retiraron los sobrenadantes y se lavaron las células con 3 ml de PBS, pH 7,4. Se añadió 1 ml de un reactivo CellTiter-Glo de dos componentes a cada pocillo y se agitaron las placas vigorosamente durante 2 min, seguido por una incubación de 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se registró la intensidad de la señal luminiscente con un tiempo de integración fijado entre 0,25 y 1 s/pocillo.

Modelos de xenoinjerto de ratón de GTL-16 y A375

Se llevó a cabo el estudio *in vivo* de conformidad estricta con la ley suiza para la protección de animales y se aprobó por la Oficina Veterinaria Cantonal de Suiza de Basel-Stadt. Se inocularon células GTL-16 (4×10^6) y A375 (5×10^6)

por vía subcutánea en el costado derecho en 200 µl de solución salina equilibrada Hanks (HBSS) o PBS, respectivamente. Se realizaron los procedimientos invasivos bajo anestesia con Forane. Se realizaron todos los experimentos en ratones hembra Harlan HsdNpa: atímicos desnudos nu (Laboratory Animal Services, Novartis Pharma AG, Basilea). Se mantuvieron los animales en condiciones higiénicas optimizadas con condiciones de 12 h de oscuridad, 12 h de luz. Se les proporcionó a los animales alimento y agua a voluntad. Se administró una única dosis de 75 mg/kg y 50 mg/kg de inhibidor de Hsp90, NVP-AUY922, a los ratones que portaban tumor de GTL-16 y A375, cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio de 200 mm³ - 500 mm³ de tamaño. A los ratones en el grupo control se les inyectó el vehículo (D5W). Se aisló suero y se diseccionaron los tumores a lo largo de un transcurso de tiempo de 0 -168 h. Se cortaron los tumores en dos mitades. Se embebió en parafina una mitad y la otra se sometió a congelación instantánea, y se almacenó a -80°C.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

Se midieron los niveles de IL-8 humana en sobrenadantes de cultivo celular de células GTL-16 y A375 mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de tipo sándwich (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.). Se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular de células tratadas con DMSO y NVP-AUY922 16, 24, 48 y 72 h tras el tratamiento y se almacenaron a -20°C.

Ensayo basado en perlas BioPlex

Se evaluaron inicialmente los niveles de IL-8 humana en sobrenadantes de cultivo celular tratados con NVP-AUY922 como parte de un panel multiplexado de citocinas basado en perlas (hu 27-plex panel I, Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) con un sistema de alineamiento de suspensión BioPlex (Bio-rad). Se midieron los niveles de IL-8 humana y KC de ratón en suero derivado de ratones que portaban tumor de GTL-16 y A375 tratados con NVP-AUY922 mediante un ensayo uniplexado basado en perlas de citocinas (Milliplex, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). El sistema BioPlex usa un alineamiento de suspensión líquida de perlas. Las perlas se alinean en una única fila a través de una célula de flujo en el detector, en donde se usan un láser de clasificación rojo a una longitud de onda de 635 nm y un láser indicador verde a una longitud de onda de 532 nm para identificar la ubicación espectral de cada perla y señal indicadora asociada, respectivamente.

PCR con transcripción inversa cuantitativa

Se extrajo el ARN celular total de las líneas celulares GTL-16 y A375 usando el kit RNeasy mini (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EE.UU.). Se llevó a cabo la cuantificación del ARN total usando un ensayo RiboGreen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se sometió a transcripción inversa 1 µg de ARN total usando transcriptasa inversa de VMA (kit de transcripción inversa, Promega U.S., Madison, WI, EE.UU.). Se prepararon 20 µl de cóctel de reacción tal como sigue; 1 µg de ARN total en 10 µl de H₂O libre de ARNasa y de ADNasa, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de tampón de transcriptasa inversa 10x, 2 µl de dNTP 10 mM, 1 µl de hexámeros al azar 500 µg ml⁻¹, 1,5 µl de 10 U ml⁻¹ y 0,5 µl de 40 U ml⁻¹ de inhibidor de ARNasa recombinante. Se realizó la PCR en tiempo real usando un sistema de PCR en tiempo real rápido 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) usando la mezcla maestra de PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems). Los cebadores para IL-8 y GAPDH fueron: IL-8 sentido: 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3' (SEQ ID NO: 3) e IL-8 antisentido: 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAACTTCT-3' (SEQ ID NO: 4); y GAPDH sentido: 5'-TTGTTGCCATCAATGACCCC-3' (SEQ ID NO: 5), y GAPDH antisentido: 5'-TGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3' (SEQ ID NO: 6). El proceso de amplificación implicó una etapa de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C. A esto le siguieron reacciones de apareamiento tanto IL-8 como para GAPDH, de 45 s a 95°C con 230 s a 68°C para 34 ciclos y 1 min a 95°C con 1 min a 60°C y 1 min a 72°C para 30 ciclos, respectivamente. La extensión final fue de 10 min a 72°C. Se usó el método de C_T comparativo para analizar los datos.

Extracción de proteínas

Se prepararon lisados de proteínas totales a partir de las células GTL-16 y A375 con tampón de lisis RIPA (Upstate, Millipore Corporation, Charlottesville, VA, EE.UU.). Se lavaron las células con PBS y se añadieron 500 µl de tampón RIPA enfriado con hielo, que contenía comprimido de cóctel inhibidor de proteasas (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemania) e inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EE.UU.), a cada placa en hielo. Después de 15 min se rasparon las células de la superficie de la placa y se centrifugaron a 16000 RPM durante 10 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se congeló a -80°C. Se prepararon fracciones de proteínas nucleares mediante el kit de extracción citoplasmática y nuclear NE-PER (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.). Se cuantificaron las proteínas mediante ensayo con ácido bicinonínico (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.) para la inmunotransferencia de tipo Western.

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Se adquirieron anticuerpos específicos para NFκB p65, cREL, p-ERK1/2 p-c-jun, ERK1 y Jun de Santa Cruz

Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EE.UU.) con la excepción de Hsp70 y TBP (control de carga nuclear), que se obtuvieron de StressGen (StressGen, Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, EE.UU.) y Abcam (Abcam Inc., Cambridge, MA, EE.UU.), respectivamente. Se cargaron geles desnaturalizantes, no reductores, de Bis-Tris SDS-PAGE al 4-12%, con 30 µg de proteína total, se utilizaron un patrón de proteína preteñida SeeBlue2Plus y tampón de corrida MES SDS para la separación electroforética en un instrumento XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen Corporation, Inc., Carlsbad, CA, EE.UU.). Se usó un apilamiento de PVDF de transferencia de gel iBlot™ con un sistema de transferencia de gel iBlot™ (Invitrogen). Se usó un sistema de obtención de imágenes por infrarrojos Odyssey para detectar el inmunocomplejo (Li-COR Biotechnologies, Inc., Lincoln, NE, EE.UU.). Se usó tampón de bloqueo Li-COR para limitar la reactividad cruzada. Se incubaron las membranas a 4°C durante la noche en el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo, seguido por 1 h de incubación a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario frente a IgG (colorante de IR Li-COR, Li-COR).

Inmunohistoquímica

Se tiñeron secciones de tejido embebidas en parafina y fijadas en formalina usando el sistema Ventana Discovery (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EE.UU.). Se realizaron la desparafinización de las secciones de tejido y la recuperación de epítomos inducida por calor usando disolución de acondicionamiento celular convencional 1 (Ventana Medical Systems) directamente en el sistema. Se preparó un anticuerpo de ratón anti-Hsp70 humano (Stressgen Bioreagents, MI, EE.UU.) en diluyente DAKO (DAKO, Carpinteria, CA) y se usó a la concentración de 10 µg/ml durante 60 min. Se incubaron los portaobjetos con un anticuerpo anti-IgG1 de ratón marcado con biotina (Research Diagnostic Inc, MA, EE.UU., ahora conocido como Fitzgerald Industries International, Concord, MA, EE.UU.) a una concentración de 1,25 µg/ml diluido en M.O.M. (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Se realizó la detección usando una reacción con 3,3-diaminobenzadina sobre la sección, usando el reactivo Ventana DAB Map para el anticuerpo frente a Hsp70 (Ventana Medical Systems). Posteriormente se sometió a contratinción cada sección de tejido con hematoxilina para garantizar la especificidad del anticuerpo. Se incubaron secciones de tejido consecutivas con inmunoglobulinas de isotipo coincidente normales (IgG1 de ratón, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, EE.UU.) usadas a una concentración equivalente a la del anticuerpo frente a Hsp70. Se cuantificó la inducción de Hsp70 en secciones de tejido teñidas utilizando sistema de exploración digital de portaobjetos ScanScope XT de Aperio (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA, EE.UU.) con el software Spectrum (versión 9.0.748.1518).

Resultados

Examen multiplexado de citocinas en sobrenadantes de cultivo de células tumorales

En un examen para detectar marcadores secretados candidatos de la inhibición de Hsp90, se recogieron sobrenadantes de cultivo celular de células de carcinoma gástrico GTL-16 y melanoma A375 que se lavaron y trataron durante 48 h con NVP-AUY922 1 µM en medio de cultivo nuevo. Se analizaron estas muestras mediante un ensayo multiplexado basado en perlas de citocinas que incluía un panel de 27 citocinas humanas, cuyos resultados se muestran en la figura 1. En cultivos de células GTL-16, el tratamiento con inhibidor dio como resultado una disminución de la acumulación de IL-1ra, IL-8, IL-17, eotaxina, GM-CSF, IP-10, PDGF-bb y VEGF, un aumento de la acumulación de IL-15, mientras que la acumulación de FGF básico y MIP-1b permanecían prácticamente sin cambios. En cultivos de células A375, se observaron una disminución en la acumulación de IL-1ra, IL-8, MCP-1 (MCAF) y VEGF, y un aumento de los niveles de IL-2, mientras que la acumulación de otras citocinas detectables permaneció sin cambios con el tratamiento. Lo más notablemente a partir de este ensayo multiplexado, la acumulación de IL-8 disminuyó en más del 80% y el 70% en cultivos de células GTL-16 y A375, respectivamente, lo que dio lugar a una investigación adicional de IL-8 como posible biomarcador de la inhibición de Hsp90 mediada por NVP-AUY922. Además de esta investigación empírica usando el panel de inmunoensayo basado en perlas, se emprendió la extracción de datos *in silico* para identificar proteínas secretadas que estaban reguladas por las proteínas cliente de Hsp90 notificadas anteriormente; esta investigación señaló a varios candidatos, incluyendo IL-8, lo que concuerda con los resultados empíricos.

Inhibición dependiente de la dosis y del tiempo *in vitro* de la acumulación de IL-8 en respuesta a NVP-AUY922

Para caracterizar mejor la relación entre el tratamiento con inhibidor de Hsp90 y los efectos sobre la producción de IL-8, se lavaron células GTL-16 y A375 y se trataron durante 24 h con nuevo medio que contenía diversas concentraciones de NVP-AUY922. Para esta duración de tiempo de tratamiento, la inhibición máxima de la acumulación de IL-8 parece alcanzarse a 0,3 µM medido mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas; esto es igual a reducciones del 80% y el 60% en los cultivos de GTL-16 y A375, respectivamente (figura 2A, B). La inhibición de la producción de IL-8 parece preceder a la pérdida manifiesta de viabilidad celular en estas condiciones, disminuyendo drásticamente en el plazo de 16 h de tratamiento (figura 2C, D), mientras que la viabilidad celular disminuye de manera regular a lo largo del tiempo de tratamiento de 72 h. Se observaron resultados similares en ambas líneas celulares tratadas con una concentración de 0,3 µM de 17AAG, lo que sugiere un vínculo mecanístico entre la inhibición de Hsp90 y la pérdida de producción de IL-8.

Efecto de NVP-AUY922 sobre la expresión de ARNm de IL-8 y reguladores conocidos de la transcripción génica de IL-8

Puesto que pruebas sustanciales indican que los sitios principales de expresión de IL-8 están al nivel de la expresión de ARNm, se midió la expresión de ARNm después del tratamiento con NVP-AUY922 en células GTL-16 y A375. (Mukaida N, *et al.* (1994) J. Leukocyte Biol., 56, 554-558) (Mukaida N, *et al.* (1990) J. Biol. Chem., 265, 21128-21133). Para ambas líneas celulares, se observa una disminución drástica en los niveles de ARNm de IL-8 después del tratamiento con NVP-AUY922 0,3 μ M. A las 16 h, los niveles de ARNm de IL-8 son un 95% menores en células A375 tratadas frente a no tratadas (figura 3A), lo que concuerda con los cambios observados en la acumulación de proteína IL-8 en sobrenadantes de cultivo. Se observa una respuesta similar en células GTL-16 a las 16 h, en las que se observa una disminución del 85% en la expresión de ARNm de IL-8 (figura 3B). Estos resultados sugieren que a la respuesta a NVP-AUY922 subyace una expresión de ARNm de IL-8 alterada.

La expresión génica de IL-8 se activa mediante los factores de transcripción NF κ B y AP-1. (Roebuck KA (1999) J Interfer. Cyto. Res., 19, 429-438). NF κ B se considera esencial, mientras que AP-1 conjuntamente con NF κ B potencia la expresión de IL-8. p65 y c-REL son los dos miembros principales de la familia de NF κ B que activan la transcripción de IL-8. (Kunsch C, *et al.* (1993) Mol. Cell. Biol., 6137-6146). Con el fin de entender mejor si NVP-AUY922 afecta a la actividad de AP-1 o NF κ B mediante tratamiento con NVP-AUY922, se prepararon extractos de proteínas totales tanto GTL-16 como para A375 a 16 h y 24 h tras el tratamiento con NVP-AUY922 0,3 μ M y se evaluaron las proteínas de señalización asociadas con estos dos factores de transcripción mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Como control para la actividad del compuesto, se observó inducción de Hsp70 en las líneas celulares tanto GTL-16 como A375 tratadas con NVP-AUY922 0,3 μ M (figura 3C y D), lo que concuerda con la inhibición eficaz de Hsp90. A partir de la figura 3C y D, es evidente que los niveles celulares totales de los dos miembros principales de la familia de NF κ B, p65 y c-REL, permanecen esencialmente sin cambios después del tratamiento con NVP-AUY922 0,3 μ M.

Las proteínas MAP cinasa que participan principalmente en la regulación de la actividad de AP-1 incluyen las proteína cinasas N-terminales ERK, p38 y Jun. (Hoffman E, *et al.* (2002) J. Leukocyte Biol., 72, 847-855) (Karin M (1995) J Biol Chem, 270(28), 16483-16486) (Silvers AL, *et al.* (2003) Neoplasia, 5(4), 319-329). JNK es la ruta de señalización de MAPK más relevante y bien entendida que regula la actividad de AP-1; además, la activación de ERK conduce a una actividad de AP-1 elevada por medio de inducción de c-fos. (Chen RH, *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90, 10952-10956). Se evaluaron los efectos de NVP-AUY922 sobre mediadores de la ruta de señalización de MAPK mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Los niveles de ERK y c-Jun totales no parecen verse afectados después de 16 h y 24 h de tratamiento con NVP-AUY922 0,3 μ M. Sin embargo, los niveles de fosfo-ERK1/2 y fosfo-c-Jun disminuyen significativamente en células tanto GTL-16 como A375 tras el tratamiento. Estos resultados concuerdan con la posibilidad de que la inhibición de las rutas de MAPK ERK y JNK dé como resultado una pérdida drástica de actividad AP-1, que conduciría a una pérdida de transcripción génica de IL-8.

Aunque el tratamiento con NVP-AUY922 no tuvo ningún efecto evidente sobre los niveles celulares totales de miembros clave de la familia de NF κ B que se cree que regulan la transcripción génica de IL-8, es posible que cambios en los niveles de NF κ B nucleares puedan verse afectados por la inhibición de Hsp90. Con el fin de evaluar esta posibilidad, se prepararon fracciones de proteínas nucleares para células GTL-16 tratadas con NVP-AUY922 0,3 μ M durante 16 h y 24 h; y se realizó análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar NF κ B p65 así como para detectar fosfo-c-Jun. Se observó una disminución moderada en los niveles de NF κ B p65 nucleares en las células después del tratamiento con NVP-AUY922 (figura 4A), aunque esta disminución se elimina cuando se normalizan los niveles de NF κ B con respecto al control de carga de proteína nuclear, proteína de unión a TATA (TBP). Es posible que los niveles de TBP también puedan verse afectados por la inhibición de Hsp90; se utilizaron los niveles de proteínas totales como control sustituto para la normalización de los niveles de NF κ B p65 y fosfo-c-Jun tal como se presenta en tabla en la figura 4C. Usando esta normalización, se observó una disminución moderada (~26%) en los niveles de NF κ B p65 nucleares, mientras que es evidente una disminución más drástica en los niveles de fosfo-c-Jun nucleares (~83%) (figura 4A, B). Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que la pérdida de actividad de AP-1 es el mecanismo predominante de la pérdida de transcripción génica de IL-8 mediada por NVP-AUY922 en las líneas celulares tanto A375 como GTL-16.

Evaluación *in vivo* de IL-8 circulante, derivada de tumor, como biomarcador farmacodinámico de la inhibición de Hsp90

Para establecer que los hallazgos *in vitro* se trasladan a un entorno *in vivo*, se trataron ratones que portaban tumor de GTL-16 y A375 con dosis individuales de 75 y 50 mg/kg de NVP-AUY922, respectivamente, y se midieron los niveles de IL-8 en suero de ambos modelos a lo largo de 168 h. Para confirmar la actividad de NVP-AUY922, se midió la expresión de Hsp70, en lisados de proteínas totales aislados a partir de muestras de tejido tumoral sometidas a congelación instantánea, mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 5 A) e inmunohistoquímica (figura 5B), puesto que la inducción de Hsp70 es un efecto posterior de la inhibición de Hsp90.

Ambas mediciones muestran que se induce Hsp70 tan pronto como 6 h tras el tratamiento con NVP-AUY922 con inducción de Hsp70 estable hasta 48 h, momento en el cual los niveles disminuyen hasta un nivel inicial a lo largo del transcurso de tiempo; esto concuerda con los datos publicados previamente. (Jensen, 2008). Se estableció el mismo patrón de inducción de Hsp70 en ratones que portaban tumor de A375 tratados con NVP-AUY922. Puesto que la inducción de Hsp70 se considera un método de referencia para establecer que se ha inhibido el complejo de chaperona Hsp90, los autores estaban convencidos de que NVP-AUY922 tenía un efecto inhibitor sobre los tumores de GTL-16 y A375 directamente, y que si IL-8 era de hecho un biomarcador farmacodinámico de la inhibición de Hsp90, tal como sugieren los hallazgos *in vitro*, eso se reflejaría en la medición de IL-8 *in vivo* en suero derivado de estos ratones que portaban tumor.

Se observó una disminución significativa en los niveles de IL-8 en suero derivado de ratones que portaban tumor de GTL-16 tan pronto como 6 h después de la administración de NVP-AUY922. Se alcanzó una disminución máxima de aproximadamente el 70% a las 12 h tras el tratamiento y a las 72 h IL-8 se recupera hasta niveles anteriores al tratamiento, lo que es típico de un régimen de dosis individual tal como se muestra en la figura 5C. Resulta evidente una varianza entre ratones en los niveles en suero de IL-8 en los datos de muestras individuales, mientras que los niveles de IL-8 y sus pesos tumorales respectivos se representaron gráficamente (figura 5D). En particular, dos puntos de datos a 18 h y 24 h parecen desviarse de la tendencia global de IL-8. Los niveles en suero de IL-8 derivados de ratones que portaban tumor de A375 disminuyeron aproximadamente un 40% a las 48 h tras el tratamiento con una dosis individual de 60 mg/kg de NVP-AUY922 y se recuperaron hasta su nivel antes del tratamiento a las 168 h tras el tratamiento. La diferencia relativa en el porcentaje de disminución en los niveles de IL-8 entre los dos modelos de xenoinjerto puede explicarse por el uso diferentes dosificaciones de compuesto y los diferentes entornos tumorales. Se encontró que los niveles de IL-8 murina, medidos indirectamente como mu KC, permanecían sin cambios, lo que indica que las disminuciones en IL-8 humana que se midieron en el suero resultaron directamente del tumor y no de ningún efecto del huésped. En conclusión, se suprimió la acumulación de IL-8 en suero de ratones que portaban tumor en respuesta a la inhibición de Hsp90 dentro del entorno tumoral y esto apoya los hallazgos *in vitro* en sobrenadantes derivados de células GTL-16 y A375.

Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar, usando tan sólo experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes se engloben por las siguientes reivindicaciones. Se contempla que cualquier combinación de las realizaciones dadas a conocer en las reivindicaciones dependientes estén dentro del alcance de la invención.

Lista de secuencias

<110> Bowden, Michaela

Guy, Chantale

Buckler, Alan

<120> BIOMARCADORES DE RESPUESTA FARMACODINÁMICA TUMORAL

<130> Documento PAT053623

<160> 5

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 99

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Phe	Leu	Ile	Ser
1				5					10					15	
Ala	Ala	Leu	Cys	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Ser	Ala	Lys	Glu	Leu
			20					25					30		
Arg	Cys	Gln	Cys	Ile	Lys	Thr	Tyr	Ser	Lys	Pro	Phe	His	Pro	Lys	Phe
		35					40					45			
Ile	Lys	Glu	Leu	Arg	Val	Ile	Glu	Ser	Gly	Pro	His	Cys	Ala	Asn	Thr
	50					55					60				
Glu	Ile	Ile	Val	Lys	Leu	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu	Leu	Cys	Leu	Asp	Pro
65					70					75				80	
Lys	Glu	Asn	Trp	Val	Gln	Arg	Val	Val	Glu	Lys	Phe	Leu	Lys	Arg	Ala
				85					90					95	
Glu	Asn	Ser													

<210> 2

<211> 1666

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ctccataaagg	cacaaaacttt	cagagacagc	agagcacaca	agcttctagg	acaagagcca	60
ggaagaaacc	accggaagga	accatctcac	tgtgtgtaaa	catgacttcc	aagctggccg	120
tggctctctt	ggcagccttc	ctgatttctg	cagctctgtg	tgaagggtgca	gttttgccaa	180
ggagtgtctaa	agaacttaga	gttcagtgc	taaagacata	ctccaaacct	ttccacccca	240
aatttatcaa	agaactgaga	gtgattgaga	gtggaccaca	ctgcgccaac	acagaaatta	300
ttgtaaagct	ttctgatgga	agagagctct	gtctggaccc	caaggaaaac	tgggtgcaga	360
gggttgtgga	gaagtttttg	aagagggctg	agaattcata	aaaaaattca	ttctctgtgg	420
tatccaagaa	tcagtgaaga	tgccagtga	acttcaagca	aatctacttc	aacacttcat	480
gtattgtgtg	ggtctgttgt	agggttgcc	gatgcaatac	aagattcctg	gttaaatttg	540
aatttcagta	aacaatgaat	agtttttcat	tgtaccatga	aatatccaga	acatacttat	600
atgtaaagta	ttattttatt	gaatctacaa	aaaacaacaa	ataattttta	aataaagga	660
ttttcctaga	tattgcacgg	gagaatatac	aaatagcaaa	attgaggcca	agggccaaga	720
gaatatccga	actttaattt	caggaattga	atgggtttgc	tagaatgtga	tatttgaagc	780
atcacataaa	aatgatggga	caataaattt	tgccataaag	tcaaatttag	ctggaaatcc	840
tggatttttt	tctgttaaat	ctggcaaccc	tagtctgcta	gccaggatcc	acaagtcctt	900
gttccactgt	gccttggttt	ctcctttatt	tctaagtgga	aaaagtatta	gccaccatct	960
tacctcacag	tgatgttgtg	aggacatgtg	gaagcacttt	aagttttttc	atcataacat	1020
aaattatttt	caagtgtaac	ttattaacct	atttattatt	tatgtattta	tttaagcatc	1080
aaatatttgt	gcaagaattt	ggaaaaatag	aagatgaatc	attgattgaa	tagttataaa	1140
gatgttatag	taaattttatt	ttatttttaga	tattaaatga	tgttttatta	gataaatttc	1200
aatcaggggt	tttagattaa	acaaacaaac	aattgggtac	ccagttaaat	tttcatttca	1260
gataaacaac	aaataatttt	ttagtataag	tacattattg	tttatctgaa	attttaattg	1320
aactaacaat	cctagtttga	tactcccagt	cttgtcattg	ccagctgtgt	tggtagtgt	1380
gtgttgaatt	acggaataat	gagttagaac	tattaaaaca	gccaaaactc	cacagtcaat	1440
attagtaatt	tcttgctggt	tgaaacttgt	ttattatgta	caaataagatt	cttataatat	1500
tattttaaag	actgcatttt	taaatacaag	gctttatatt	tttaacttta	agatgttttt	1560
atgtgctctc	caaatttttt	ttactgtttc	tgattgtatg	gaaatataaa	agtaaatatg	1620
aaacatttaa	aataataatt	gttgtcaaag	taaaaaaaaa	aaaaaa		1666

<210> 3

10 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 3

atgactcca agctggccgt ggct 24

5 <210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de cebador

<400> 4

ttgtgcat caatgacccc 20

<210> 5

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 5

20 tgacaaagt gtcgttgagg 20

REIVINDICACIONES

1. Método de evaluación de la eficacia de un régimen de tratamiento que comprende administrar el inhibidor de Hsp90 NVP-AUY922 para tratar melanoma o cáncer gástrico en un sujeto, comprendiendo el método:
 - 5 a) poner en contacto una primera muestra de suero o tumor obtenida de dicho sujeto antes de administrar NVP-AUY922 al sujeto con un reactivo que puede detectar IL-8;
 - b) poner en contacto una segunda muestra de suero o tumor obtenida de dicho sujeto tras la administración de NVP-AUY922 con un reactivo que puede detectar IL-8; y
 - c) comparar los niveles de IL-8 de la primera y segunda muestras de suero o tumor,
- 10 en el que un nivel elevado de IL-8 presente en la primera muestra de suero o tumor, en relación con la segunda muestra de suero o tumor, es una indicación de que el régimen de tratamiento es eficaz para tratar melanoma o cáncer gástrico en el sujeto.
2. Método según la reivindicación 1, en el que se detectan los niveles de ARNm de IL-8.
3. Método según la reivindicación 1, en el que se detectan los niveles o la actividad de la proteína IL-8.

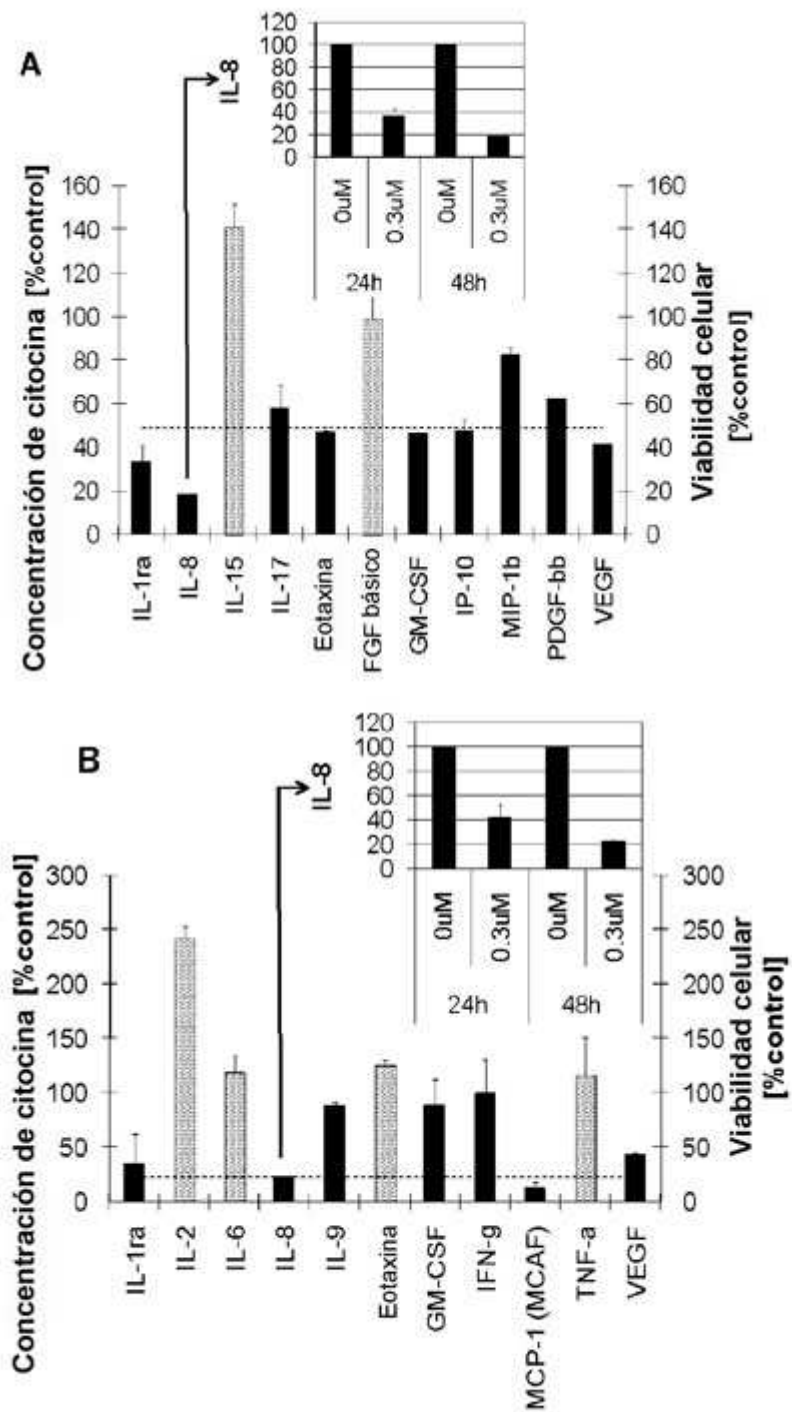


Figura 1

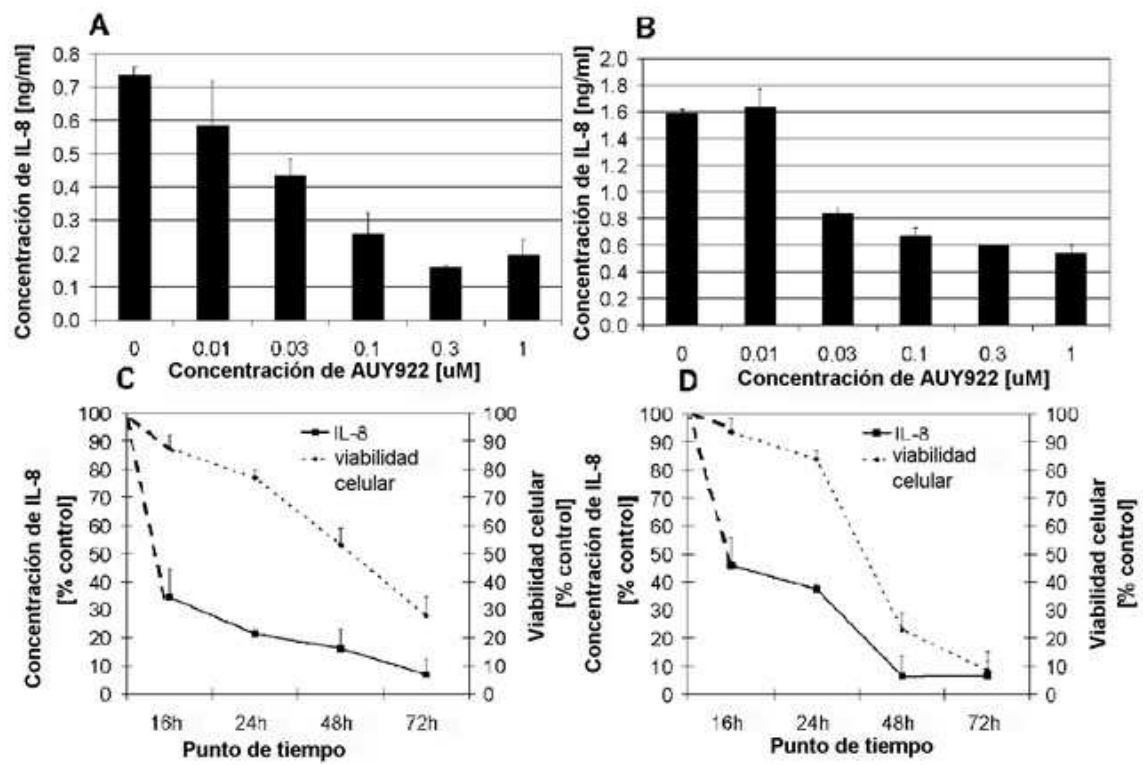


Figura 2

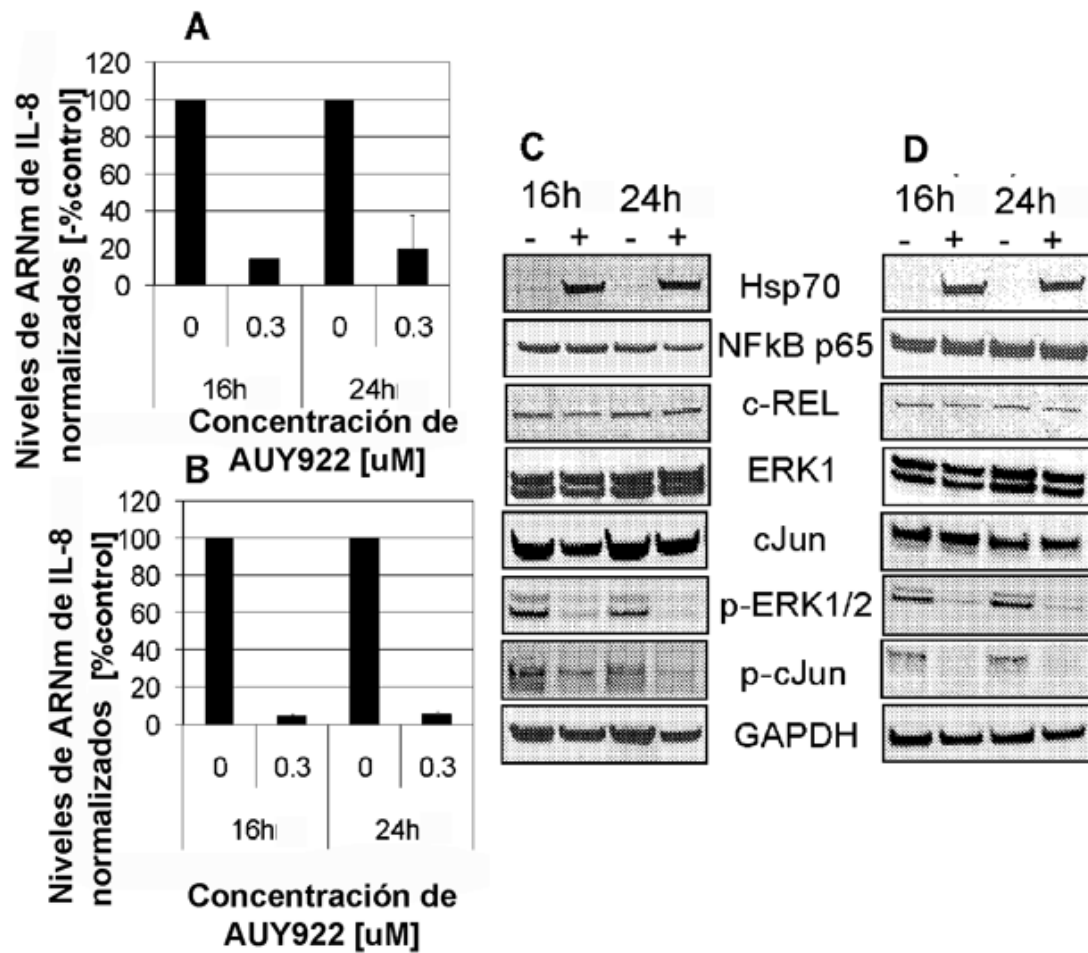


Figura 3

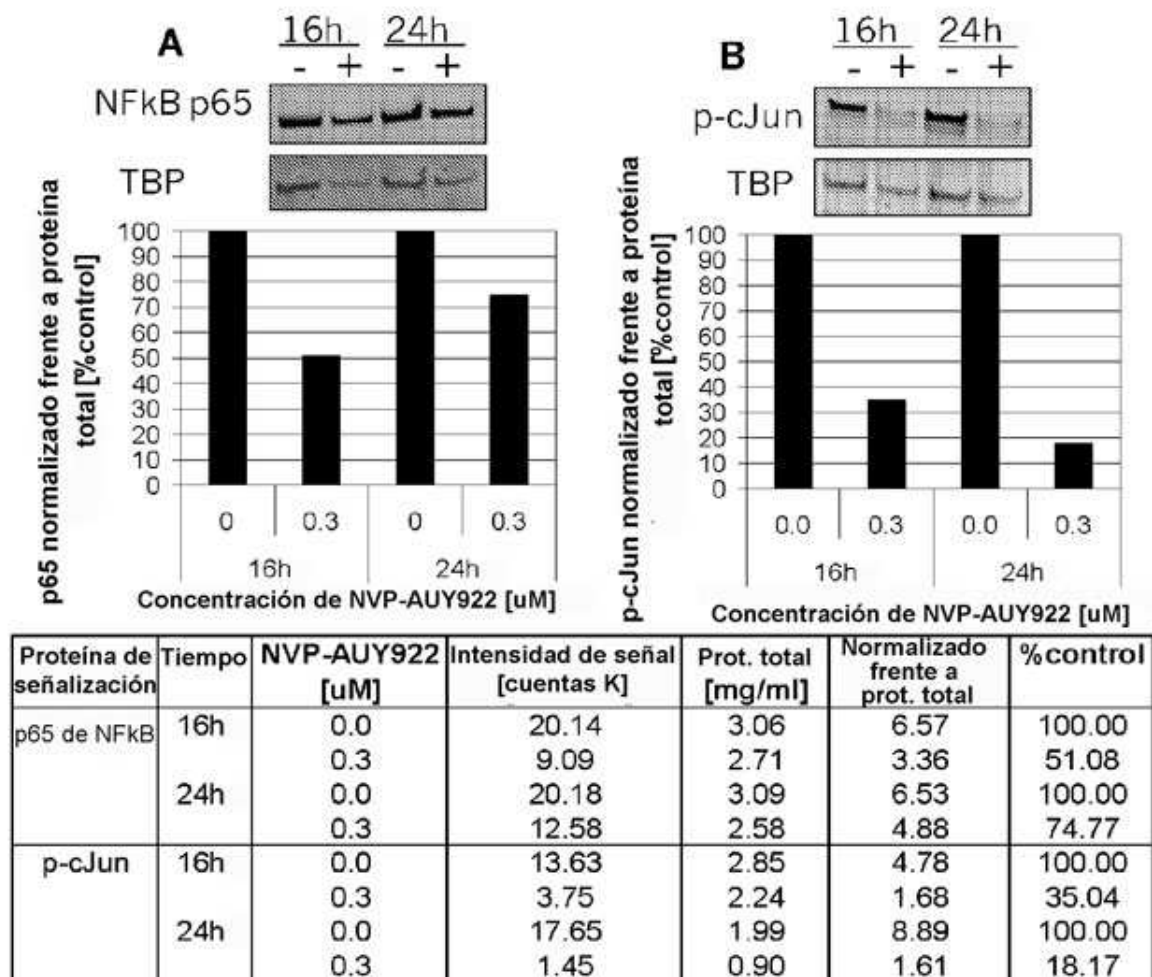


Figura 4

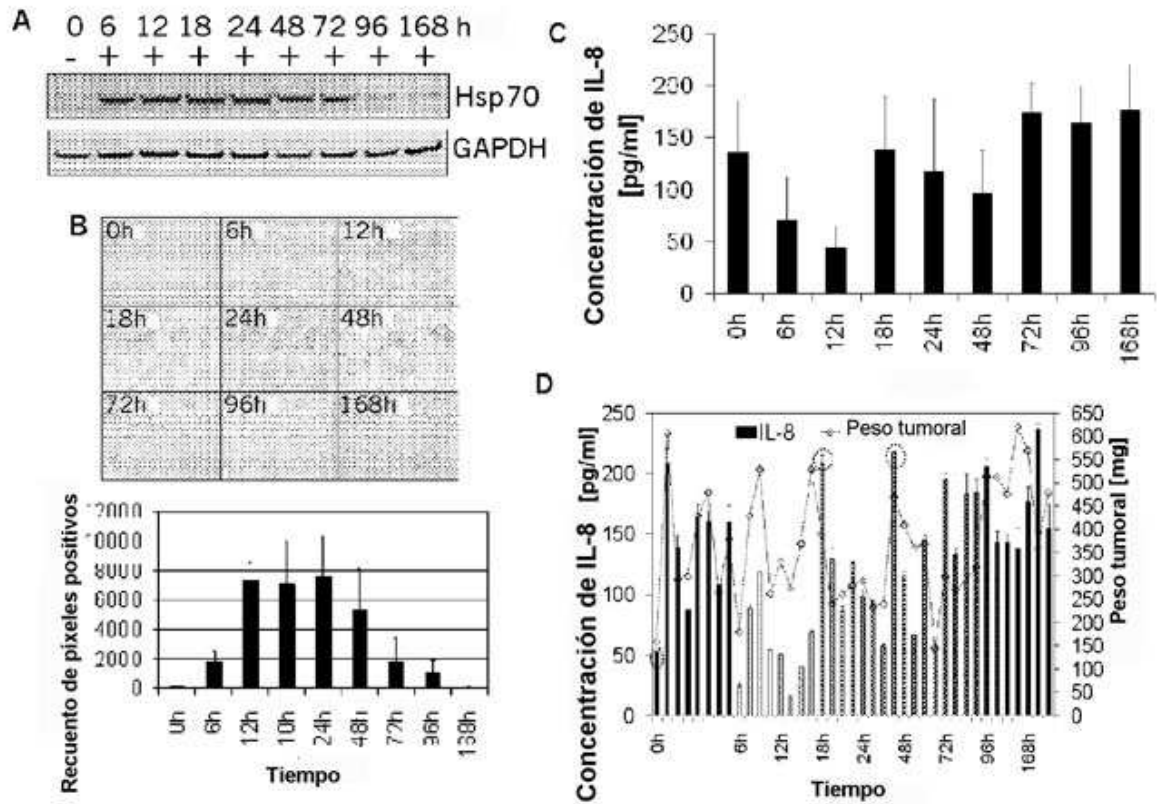


Figura 5

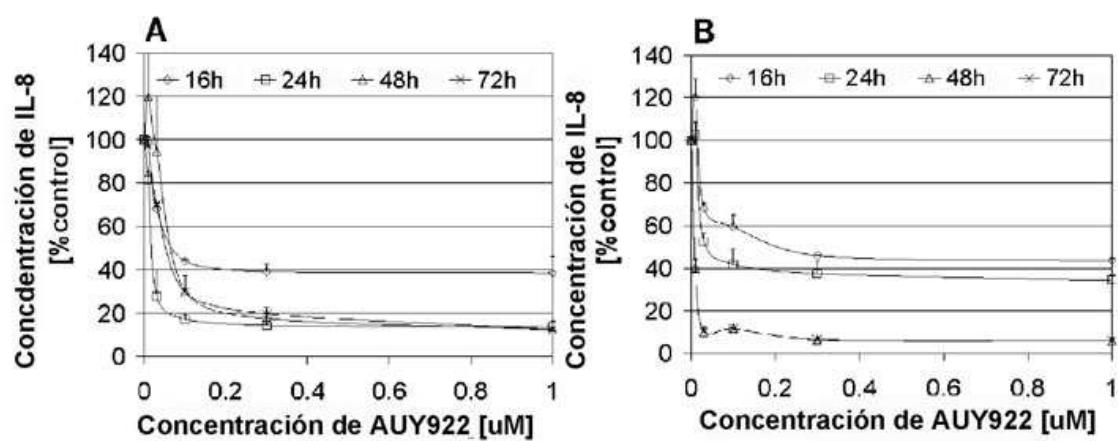


Figura 6