

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 864**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013** **PCT/US2013/031531**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014** **WO14046730**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013** **E 13712120 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017** **EP 2898329**

54 Título: **Procedimiento para identificar cáncer de pulmón de células no pequeñas que responde al tratamiento usando quinasa de linfoma anaplásico (alk) como marcador**

30 Prioridad:

24.09.2012 US 201261704960 P

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

25.09.2017

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**GROGAN, THOMAS;
NITTA, HIRO;
BARNES, MICHAEL;
TOWNE, PENNY;
SINGH, SHALINI;
CLEMENTS, JUNE, F.;
SCHEMP, CRYSTAL y
ROBERTS, ESTEBAN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 633 864 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

Procedimiento para identificar cáncer de pulmón de células no pequeñas que responde al tratamiento usando quinasa de linfoma anaplásico (alk) como marcador

CAMPO

La presente solicitud se refiere a modos de realización de un procedimiento para identificar un sujeto que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) que probablemente responda al tratamiento con el inhibidor de quinasa de linfoma anaplásico crizotinib.

ANTECEDENTES

La proteína de quinasa de linfoma anaplásico (ALK) es un miembro de la super-familia del receptor de insulina de las tirosina quinasas receptoras. ALK es una glicoproteína de membrana de tipo I que normalmente se expresa sólo en el sistema nervioso. Se descubrió una inversión dentro del cromosoma 2p, que tenía como resultado la formación de un producto génico de fusión que comprendía partes del gen de tipo proteico 4 asociado a microtúbulos de equinodermo (EML4) y el gen ALK, en estirpes celulares de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y muestras de ensayo clínicas (Soda *et al.*, *Nature* 448: 561 - 566, 2007). ALK se reconoce ahora como un actor crítico en el NSCLC, y aunque EML4 es el socio de fusión predominante, se han identificado otros genes asociados de fusión. La incidencia de reordenamientos del gen de ALK parece variar del 2-7%, traduciendo alrededor de 6.000 pacientes positivos en ALK / año en los Estados Unidos y aproximadamente 40.000 pacientes / año en todo el mundo. Es importante destacar que los reordenamientos del gen ALK rara vez coinciden con las mutaciones EGFR, HER2 o KRAS, lo que demuestra que la positividad de ALK es un subtipo de enfermedad distinta.

Crizotinib (XALKORI, Pfizer) es un potente inhibidor de tirosina quinasa de receptor que inhibe ALK. En dos ensayos clínicos, los pacientes de NSCLC localmente avanzado o metastásico positivo en ALK que fueron tratados con crizotinib presentaron tasas de respuesta global del 50 % (N = 136; IC del 95 %: 42 %, 59 %) y 61 % (N = 19, IC del 95 %: 52 %, 70 %), respectivamente. Por lo tanto, la determinación del estado de ALK en pacientes con NSCLC es fundamental para dirigir los cuidados del paciente. Sin embargo, sigue existiendo una necesidad de un ensayo específico, sensible y estandarizado para el estado de ALK para identificar de forma rápida y precisa los pacientes con NSCLC que sean más susceptibles a responder al tratamiento con crizotinib.

Thunnissen *et al.* (Virchows Archiv, 2012, 461 (3): 245-257) analizan las metodologías de ensayo en el contexto de los reordenamientos del gen ALK y la respuesta al tratamiento con inhibidores específicos de tirosina quinasa. Se divulgan diversos sistemas de calificación de IHC en Thunnissen *et al.* en los que la tinción de ALK citoplásmica granular intensa o fuerte es el criterio para una calificación de "3", que debe considerarse con otros "grados" de tinción positiva para ALK, tales como tinción de ALK moderada (calificación "2") o tenue / débil (calificación "1").

Con respecto a la identificación de un sujeto que tiene NSCLC como susceptible de responder a un tratamiento con inhibidor de ALK, Yi *et al.* (Journal of Thoracic Oncology, 2011, 6 (3): 459-465) sugiere un algoritmo de calificación que es similar al aplicado a HER2, es decir, un algoritmo de calificación que requiere un análisis adicional por hidridación *in situ* de fluorescencia ("reflejo") (FISH) para confirmar muestras positivas para ALK.

SUMARIO

La invención se refiere generalmente a un procedimiento para identificar un sujeto que presenta carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) susceptible de responder al tratamiento con el inhibidor de la quinasa de linfoma anaplásico (ALK) crizotinib, que comprende poner en contacto una muestra que comprende células tumorales de NSCLC del sujeto con un anticuerpo anti-ALK; detectar la expresión de la proteína ALK en la muestra; calificar la muestra como positiva para ALK si la detección de la expresión de la proteína de ALK comprende detectar tinción citoplásmica granular intensa en una o más células tumorales de la muestra; o calificar la muestra como negativa para ALK si la detección de la expresión de la proteína de ALK no comprende detectar tinción citoplásmica granular intensa en una o más células tumorales de la muestra; e identificar al sujeto que presenta NSCLC susceptible de responder al tratamiento con el inhibidor de ALK crizotinib si la muestra se califica como positiva para ALK o identificar el sujeto que presenta NSCLC no susceptible de responder al tratamiento con el inhibidor de ALK crizotinib si la muestra se califica como negativa para ALK.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIGS. 1A e 1B son imágenes digitales de dos casos positivos para ALK a modo de ejemplo que muestran una expresión ALK por IHC homogénea sobre tinción anti-ALK (D5F3) (paneles de la izquierda) y tinción Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (paneles de la derecha).

Las FIGS. 2A-C son imágenes digitales de tres casos positivos para ALK a modo de ejemplo que muestran una expresión de ALK por IHC heterogénea sobre tinción anti-ALK (D5F3) (paneles de la izquierda) y tinción de Ig de

control negativo monoclonal de conejo coincidente (paneles de derecha). La tinción citoplásmica intensa está presente en las muestras teñidas anti-ALK, pero la intensidad varía.

La FIG. 3 es una imagen digital que muestra tinción granular punteada en células epiteliales glandulares en una muestra teñida con anticuerpo anti-ALK (D5F3) (panel izquierdo). Se observó una tinción menos evidente de las células epiteliales glandulares en el portaobjetos con Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (panel derecho). La tinción epitelial glandular estaba presente en elementos de tejido normal, pero no en células de cáncer y se excluyó en la interpretación del portaobjetos.

La FIG. 4A es una imagen digital que muestra la tinción de elementos de tejido neuronales evidentes en una muestra teñida con anticuerpo anti-ALK (D5F3) (panel izquierdo) y la falta de tinción en el portaobjetos con Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (panel derecho). La FIG. 4B es una imagen digital que muestra la tinción del tejido neural en una muestra teñida con anticuerpo anti-ALK (D5F3) (panel izquierdo) y en el portaobjetos con Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (panel derecho). La tinción se excluyó en la interpretación del portaobjetos, ya que estaba presente en elementos de tejido o células normales.

La FIG. 5 es una imagen digital que muestra punteado granular presente en macrófagos alveolares en una muestra teñida con anticuerpo anti-ALK (D5F3) (panel izquierdo) y la falta de tinción en el portaobjetos con Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (panel derecho). Esta tinción se excluyó en la interpretación de los portaobjetos, ya que estaba presente en las células normales, no en las células tumorales.

La FIG. 6A es una imagen digital que muestra tinción de mucina en una muestra teñida con anticuerpo anti-ALK (D5F3) (panel de la izquierda) y en el portaobjetos con Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (panel de la derecha). No hubo tinción en el tejido normal y las células tumorales, por lo tanto, esta muestra se interpretó como negativa para ALK. La FIG. 6B es una imagen digital que muestra la tinción de mucina en una muestra teñida con anticuerpo anti-ALK (D5F3) (panel de la izquierda) y en el portaobjetos con Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (panel de la derecha). Se interpretó que esta muestra era positiva para ALK porque el tejido normal era negativo, pero las células tumorales estaban teñidas.

Las FIGS. 7A y B son imágenes digitales que muestran tinción de algunos linfocitos en una muestra teñida con anticuerpo anti-ALK (D5F3) (paneles de la izquierda) y menos evidente (Fig. 7A) o negativo (Fig. 7B) en el portaobjetos con Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (paneles de la derecha). Esta tinción se excluyó en la interpretación de portaobjetos, ya que estaba presente en las células normales.

Las FIGS. 8A y B son imágenes digitales de dos casos negativos para ALK a modo de ejemplo que muestran ausencia de expresión de ALK por IHC en células tumorales en tinción anti-ALK (D5F3) (paneles de la izquierda) y tinción con Ig de control negativo monoclonal de conejo (paneles de la derecha).

Las FIGS. 9A y B son imágenes digitales de casos negativos para ALK a modo de ejemplo que muestran una tinción citoplásmica granular débil tanto en tinción anti-ALK (D5F3) (paneles de la izquierda) como en tinción con Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (panel de la derecha).

Las FIGS. 10A-D son imágenes digitales de casos negativos para ALK a modo de ejemplo que muestran tinción citoplásmica en tinción anti-ALK (D5F3) (paneles de la izquierda), que es más notable que en la tinción con Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (paneles de la derecha). Los casos se interpretaron como negativos para ALK debido a la falta de tinción citoplásmica intensa.

La FIG. 11 es una imagen digital de tinción de membrana/citoplasma en una muestra teñida con anticuerpo anti-ALK (D5F3) (panel de la izquierda) y el portaobjetos con Ig de control negativo monoclonal de conejo coincidente (panel de la derecha). Aunque la tinción fue más frecuente en el portaobjetos teñido con el anticuerpo anti-ALK que el control negativo, el resultado se interpretó como negativo para ALK porque no presentó tinción citoplásmica granular intensa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Abreviaturas

ALK	Quinasa de linfoma anaplásico
DAB	Tetracloridrato de 3,3'-diaminobencidina
FISH	hidridación <i>in situ</i> de fluorescencia
H&E	Hematoxilina y eosina
HQ	Ácido 3-hidroxiquinolín-2-carboxílico
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IHC	Inmunohistoquímica
NSCLC	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas

II. Condiciones

Las siguientes explicaciones de términos y procedimientos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente divulgación. Las formas singulares «un», «uno», «una» y «el», «la» se refieren a uno o más de uno, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "que comprende un anticuerpo" incluye anticuerpos individuales o múltiples y se considera equivalente a la frase "que comprende al menos un anticuerpo". El término "o" se refiere a un elemento individual de elementos alternativos comentados o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Tal como se usa aquí, "comprende" significa "incluye". De este modo, "que comprende A o B," significa "que incluye A, B, o A y B", sin excluir elementos adicionales. Las fechas de los números de acceso de GenBank a los que se hace referencia en el presente documento son las secuencias disponibles al menos desde el 24 de septiembre de 2012.

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por parte del experto en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Con el fin de facilitar la revisión de los diversos modos de realización de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Quinasa de linfoma anaplásico (ALK): Un miembro de la super-familia del receptor de insulina de las tirosina quinasa de receptor. ALK comprende un dominio extracelular, un dominio de transmembrana de una pasada individual y un dominio intracelular de tirosina quinasa. Los reordenamientos cromosómicos que dan lugar a genes de fusión de ALK se encuentran en diversos tipos de tumores, incluyendo linfoma anaplásico de células grandes, neuroblastoma y cáncer de pulmón de células no pequeñas. ALK / EML4 es la fusión más común del gen ALK; fusiones de ALK adicionales incluyen ALK / RANBP2, ALK / ATIC, ALK / TFG, ALK / NPM1, ALK / SQSTM1, ALK / KIF5B, ALK / CLTC, ALK / TPM4 y ALK / MSN.

Las secuencias de ALK se encuentran públicamente disponibles, por ejemplo a partir de bases de datos de secuencias GenBank® (por ejemplo, números de acceso NP 004295 (proteína) y NM 004304 (ácido nucleico)). Un experto en la materia puede identificar secuencias adicionales de proteína y ácido nucleico de ALK, incluyendo variantes de ALK y / o fusiones de genes de ALK.

Un **inhibidor de ALK** es una molécula que inhibe o disminuye la actividad de ALK, tal como la actividad de tirosina quinasa de ALK. En algunos ejemplos, un inhibidor de ALK puede ser una molécula pequeña, una proteína (tal como un anticuerpo), o un ácido nucleico (tal como una molécula antisentido). Un inhibidor de ALK puede inhibir o disminuir la unión de un ligando (tal como pleiotrofina) a ALK y de este modo disminuir la actividad de tirosina quinasa de ALK. Un inhibidor de ALK también puede inhibir o disminuir directamente la actividad de tirosina quinasa de ALK, por ejemplo, un inhibidor competitivo de ATP (tal como crizotinib). Las moléculas que disminuyen o inhiben la expresión de ALK, tales como moléculas antisentido, también son inhibidores de ALK. En algunos ejemplos, los inhibidores de ALK inhiben o disminuyen la actividad de un ALK genéticamente modificado, tal como una fusión de gen de ALK (que incluye, pero no se limita a, fusiones de genes ALK / EML4). El inhibidor de ALK puede inhibir específicamente la actividad de tirosina quinasa de ALK o puede inhibir otra actividad del receptor tirosina quinasa (tal como actividad de c-Met / HGFR), además de inhibir la actividad de tirosina quinasa de ALK.

El inhibidor de ALK en la invención reivindicada es crizotinib.

Anticuerpo: Moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno (tal como ALK). Los anticuerpos ejemplo incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales y humanizados.

Un anticuerpo de origen natural (tal como IgG, IgM, IgD) incluye cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término anticuerpo también incluye anticuerpos recombinantes producidos mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica una o más cadenas de anticuerpo en una célula (por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos nº 4.745.055, la Patente de Estados Unidos nº 4.444.487, los documentos WO 88/03565, EP 256.654, EP 120.694, EP 125.023, Faoukner *et al.*, *Nature* 298: 286, 1982, Morrison, *J. Immunol.* 123: 793, 1979; Morrison *et al.*, *Ann Rev. Immunol.* 2:239, 1984).

El término anticuerpo también incluye un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo natural o recombinante. Los ejemplos específicos no limitantes de fragmentos de unión abarcados por el término anticuerpo incluyen Fab, (Fab')₂, Fv, y Fv de cadena individual (scFv). Fab es el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión

a antígeno de una molécula de anticuerpo producida mediante digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada o equivalentemente mediante ingeniería genética. Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo obtenida tratando anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo. (Fab')₂ es el fragmento del anticuerpo obtenido por tratamiento del anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción subsiguiente o de forma equivalente mediante ingeniería genética. F(Ab')₂ es un dímero de dos fragmentos de Fab' unidos por enlaces disulfuro. Fv es un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas. El anticuerpo de cadena única ("SCA") es una molécula genéticamente modificada que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unida por un conector polipéptido adecuado como una molécula de cadena individual genéticamente fusionada. Los procedimientos para generar estos fragmentos son rutinarios en la técnica.

Cromógeno: Una sustancia capaz de convertirse en un producto coloreado, tal como un pigmento o un colorante. Ciertos cromógenos son donantes de electrones que, cuando se oxidan, se convierten en un producto coloreado. La generación de un producto coloreado, y la propiedad de volverse insoluble tras la conversión química, tal como por oxidación, hacen que los cromógenos sean útiles para IHC. Ejemplos particulares de compuestos cromogénicos incluyen, sin limitación, 3,3'-diaminobencidina (DAB), fosfato de 4-nitrofenilo (pNPP), Rojo Rápido, Azul Rápido, fosfato de bromocloroindolilo (BCIP), nitro azul tetrazolio (NBT), BCIP / NBT, Naranja de AP, Azul de AP, tetrametilbencidina (TMB), 2,2'-azino-di- [3-etilbenzotiazolina sulfonato] (ABTS), o-dianisidina, 4-cloronaftol (4-CN), nitrofenil- β-D-galactopiranosido (ONPG), o-fenilendiamina (OPD), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (X-Gal), metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido (MU-Gal), p-nitrofenil- α-D-galactopiranosido (PNP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β D-glucurónido (X-Gluc), 3-amino-9-etil-carbazol (AEC), Nueva Fucsina , iodonitrotetrazolio (INT), azul de tetrazolio y violeta de tetrazolio.

Contacto: Poner un agente en estrecha proximidad con otro agente, permitiendo así la interacción de los agentes. Por ejemplo, se puede aplicar un anticuerpo a un portaobjetos de microscopio u otra superficie que contenga una muestra biológica, permitiendo de este modo la detección de proteínas en la muestra que son reconocidas específicamente por el anticuerpo.

Crizotinib: Un inhibidor de receptor tirosina quinasa que inhibe potentemente ALK. El crizotinib (también conocido como PF-02341066 o XALKORI, Pfizer) es un inhibidor selectivo de molécula pequeña competitiva de ATP de ALK y tirosina quinasas de c-Met/HGFR y sus variantes oncogénicas. Véase, *por ejemplo*, las Patentes de EE.UU. Nos. 7.230.098; 7.825.137; 7.858.643; 8.217.057. Crizotinib se puede utilizar para tratar pacientes con NSCLC positivo para ALK.

Detección: Determinar si un agente está presente o ausente. En algunos ejemplos esto puede incluir además la cuantificación. Por ejemplo, el uso de un anticuerpo específico para una proteína particular (*por ejemplo*, ALK) permite la detección de la proteína en una muestra, tal como una muestra que contiene tejido de NSCLC. En ejemplos particulares, se detecta una señal de emisión de un marcador detectable (tal como un aumento en la señal si el objetivo está presente). La detección puede ser en masa, de modo que se puede observar simultáneamente un número macroscópico de moléculas. La detección también puede incluir la identificación de señales a partir de moléculas individuales usando microscopía y técnicas tales como reflexión interna total para reducir el ruido de fondo.

Marcador: Un agente susceptible de detección, por ejemplo por espectrofotometría, citometría de flujo, o microscopía (tal como microscopía óptica). Por ejemplo, uno o más marcadores se pueden unir a un anticuerpo, permitiendo de este modo la detección de la proteína de diana. Ejemplos de marcadores incluyen isótopos radiactivos, fluoróforos, ligandos, agentes quimioluminiscentes, haptenos, enzimas y combinaciones de los mismos.

Carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC): Cualquier tipo de cáncer de pulmón que no sea el carcinoma de pulmón de células pequeñas. NSCLC incluye carcinoma de células escamosas (SQCC), adenocarcinoma (ADC) y carcinoma de células grandes. Tanto el ADC como el carcinoma de células grandes se clasifican como carcinoma de tipo no escamoso. El ADC puede agruparse en subclases, incluyendo carcinoma acinar, carcinoma papilar, carcinoma broncoalveolar (BAC), tumor sólido y subtipos mixtos (clasificación de tumores pulmonares 2004 de la Organización Mundial de la Salud, Beasley *et al.*, *Semin. Roentgenol.* 40:90-97 (2004). ADC representa aproximadamente el 40% de todos los cánceres de pulmón y es la forma más común de cáncer de pulmón entre las personas que nunca han fumado. ADC se clasifica como un tipo de células no escamosas de NSCLC. Histológicamente, ADC muestra formación de glándulas, estructuras papilares o crecimiento sólido con producción de mucina. El carcinoma de células grandes incluye las subclases de tumores de células gigantes, carcinoma de células claras, carcinoma adenoescamoso y carcinoma no diferenciado.

Células o tejidos normales: Células y tejidos no tumorales, no cancerígenos.

Muestra: Una muestra biológica que contiene ADN genómico, ARN (incluyendo ARNm), proteína, o combinaciones de los mismos, obtenida de un sujeto. Ejemplos incluyen una muestra que contiene al menos una célula de NSCLC

(una "muestra de NSCLC"), por ejemplo, una biopsia de tejido o tumor, aspiración con aguja fina, lavado broncoalveolar, líquido pleural, esputo, muestra de ensayo quirúrgico, ganglio linfático, metástasis de NSCLC, sangre periférica, o material de autopsia. En otros ejemplos, la muestra incluye una muestra de control, tal como una muestra de tejido o célula que no es NSCLC.

La muestra en la invención reivindicada comprende células tumorales de NSCLC.

Sensibilidad y especificidad: Mediciones estadísticas del rendimiento de un ensayo de clasificación binaria. La sensibilidad mide la proporción de positivos reales que se identifican correctamente (*por ejemplo*, el porcentaje de tumores de NSCLC que se identifican como positivos para ALK que se identifican como positivos para ALK por otro procedimiento, tal como FISH). La especificidad mide la proporción de negativos que se identifican correctamente (*por ejemplo*, el porcentaje de tumores de NSCLC identificados como negativos para ALK que se identifican como negativos para ALK por otro procedimiento, como FISH).

Sujeto: Organismos multicelulares vertebrados vivos, una categoría que incluye mamíferos humanos y no humanos, tales como sujetos veterinarios. En un ejemplo particular, un sujeto es aquel que tiene o se sospecha que tenga cáncer de pulmón, tal como NSCLC.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Una dosis suficiente para prevenir el avance, retrasar la progresión, o para causar la regresión de una enfermedad, o que es capaz de reducir los síntomas causados por la enfermedad, tal como cáncer, por ejemplo carcinoma de pulmón (tal como NSCLC).

Bajo condiciones suficientes para: Una frase que se utiliza para describir cualquier entorno que permita la actividad deseada. Un ejemplo incluye poner en contacto un anticuerpo con una muestra de NSCLC suficiente para permitir la detección de una o más moléculas de diana (*por ejemplo*, ALK) en la muestra.

III. Procedimientos para identificar un sujeto que presente un tumor susceptible de responder a los inhibidores de ALK

Se divulgan aquí modos de realización de un procedimiento para identificar un sujeto que presenta NSCLC que es susceptible de responder al tratamiento con el inhibidor de ALK crizotinib. Los modos de realización incluyen la identificación de un tumor de NSCLC como positivo para ALK o negativo para ALK usando inmunohistoquímica (IHC) y procedimientos de calificación divulgados en la presente memoria. Se identifica un sujeto que presenta NSCLC susceptible de responder al tratamiento con crizotinib si el tumor de NSCLC se identifica como positivo para ALK y se identifica que presenta un tumor de NSCLC no susceptible de responder al tratamiento con crizotinib si el tumor de NSCLC se identifica como negativo para ALK.

Los procedimientos actuales para escoger un sujeto con NSCLC para tratamiento con un inhibidor de ALK se basan en determinar si el tumor del sujeto es positivo para ALK utilizando un ensayo de hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH). Sin embargo, FISH presenta varias desventajas en comparación con los procedimientos divulgados en la presente memoria. Los ensayos FISH son más lentos, más caros y requieren una experiencia mucho más especializada para la interpretación de los resultados que los procedimientos IHC, como los divulgados en la presente memoria. Además, los procedimientos divulgados en la presente memoria proporcionan un procedimiento de puntuación "binario" que identifica tumores de NSCLC como positivos para ALK o negativos para ALK con alta sensibilidad y especificidad.

La identificación rápida y precisa de NSCLC positivo para ALK (*por ejemplo*, que tiene un reordenamiento del gen ALK y/o que expresa ALK en el tumor) es crítica para guiar el cuidado del paciente. Los sujetos con NSCLC positivo para ALK tratados con un inhibidor de ALK (crizotinib) presentaron tasas de respuesta global superiores al 50 % (*por ejemplo*, Kwak *et al*, *N. Engl. J. Med.* 363: 1693 - 1703, 2010; Shaw *y col.*, *Lancet Oncol.* 12:1004-1012, 2011). Se estima que el reordenamiento del gen ALK en NSCLC tiene una prevalencia de aproximadamente 2-7 %. Por lo tanto, la identificación exacta de NSCLC positivo para ALK es necesaria para escoger los sujetos más propensos a beneficiarse del tratamiento con inhibidores de ALK. Sin embargo, el ensayo de "ruptura" de FISH actualmente utilizado presenta desafíos significativos en cuanto a la interpretación de la muestra. Por ejemplo, los reordenamientos de genes intra-cromosómicos pueden producir una separación de señal sutil, difícil de detectar, lo que conduce a posibles resultados de falso negativo. Además, el ensayo FISH requiere la enumeración del patrón de señal para 50 núcleos. Si menos de 5 células de 50 son positivas, se considera que la muestra es negativa para ALK; si más de 25 células de 50 son positivas la muestra se considera positiva para ALK. Sin embargo, si están presentes 5-25 células positivas, la muestra es equívoca y se requiere un segundo lector; entonces, si el porcentaje medio de células positivas es ≥ 15 %, se considera que la muestra es positiva para ALK. Por lo tanto, el ensayo FISH puede producir un número significativo de resultados "equivocos", lo que requiere ensayos adicionales costosos y que requieren mucho tiempo. Además, las muestras no se someten a ensayo por FISH si no cumplen con el requisito mínimo de contenido tumoral de al menos 50 células, por lo que en muchos casos muestras como aspiraciones con aguja fina o muestras de citología FFPE nunca se someten a ensayo por FISH. Finalmente, FISH tiene una tasa de fallo de alrededor del 10-30 %, lo que significa que muchas muestras nunca tendrán un resultado de ALK y pueden perderse sujetos positivos para ALK y no obtener un tratamiento óptimo.

Por el contrario, los modos de realización divulgados utilizan la detección por IHC de ALK. Los procedimientos de IHC son rápidos y rutinarios en laboratorios de patología anatómica, utilizan microscopía óptica (en comparación con FISH, que requiere microscopía especializada de fluorescencia de campo oscuro), son menos costosos que FISH y no requieren experiencia especializada para la interpretación. Además, los modos de realización divulgados pueden automatizarse, lo que proporciona la tinción estandarizada y mejora además la sensibilidad y especificidad del ensayo. Otra ventaja de los procedimientos de IHC divulgados es que no hay requisito de contenido de células tumorales pre-especificado (mientras que el ensayo FISH requiere al menos 50 células tumorales). Además, el procedimiento de IHC divulgado permite al patólogo o lector evaluar la totalidad de la muestra de tejido (en contraste con los procedimientos FISH). Para FISH, sólo una parte de la muestra identificada que presenta tumor se pone en contacto con los reactivos de FISH. Por lo tanto, si el ALK está presente en una zona tumoral diferente en el tejido, no se identificará. Por el contrario, el procedimiento divulgado permite al lector ver todo el tumor sobre el portaobjetos, en el contexto de toda la muestra de tejido. Finalmente, los procedimientos de calificación divulgados en la presente memoria son "binarios" (positivos o negativos) y por lo tanto proporcionan resultados inequívocos. Incluso los procedimientos de IHC anteriores para detectar tumores NSCLC positivos para ALK produjeron resultados equívocos frecuentes que requerían ensayos adicionales (*por ejemplo*, Yi *et al.*, *J. Thorac. Oncol.* 6: 459 - 465, 2011) o la clasificación semicuantitativa utilizada de la intensidad de tinción y la estimación del porcentaje de células tumorales inmunorreactivas (*por ejemplo*, Mino - Kenudson *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 16:1561-1571, 2010). Sin embargo, el procedimiento de IHC y los procedimientos de calificación divulgados proporcionan una identificación sensible y específica de un tumor de NSCLC como positivo para ALK, aunque sólo unas pocas células tumorales (o incluso una sola célula tumoral) muestren tinción citoplásmica granular intensa con un anticuerpo ALK.

A. Detección de ALK

En ejemplos particulares, se analiza una muestra obtenida del sujeto para determinar si contiene proteína de ALK, tal como niveles detectables de proteína de ALK en una o más células tumorales. De este modo, la muestra puede analizarse para detectar o medir la presencia de proteína de ALK en la muestra, por ejemplo una medición cualitativa o semi-cuantitativa. En ejemplos particulares, los procedimientos divulgados utilizan la medición cualitativa de la presencia de proteína de ALK en células tumorales en la muestra.

Los modos de realización divulgados utilizan IHC para detectar la proteína de ALK en una muestra del sujeto. IHC es un procedimiento para determinar la presencia o distribución de un antígeno (tal como una proteína) en una muestra (tal como una muestra de NSCLC, por ejemplo, una parte o sección de tejido que incluye células tumorales o tejido de NSCLC) detectando la interacción de la antígeno con un agente de unión específico, tal como un anticuerpo. Se incuban una muestra que incluye un antígeno (tal como un antígeno de diana) con un anticuerpo en condiciones que permitan la unión anticuerpo-antígeno. La unión anticuerpo-antígeno puede detectarse por medio de un marcador detectable conjugado con el anticuerpo (detección directa) o por medio de un marcador detectable conjugado con un anticuerpo secundario, que se eleva contra el anticuerpo primario (*por ejemplo*, detección indirecta). En otros ejemplos de detección indirecta, se detecta la unión anticuerpo-antígeno por medio de un marcador detectable conjugado con un anticuerpo terciario que es capaz de unirse a un anticuerpo secundario (*por ejemplo*, se eleva frente al anticuerpo secundario o se eleva frente a una molécula conjugada al anticuerpo secundario, tal como un hapteno). Ejemplos de marcadores detectables que se pueden usar para IHC incluyen, sin limitarse a, isótopos radiactivos, fluorocromos (tales como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y rodamina), haptenos, enzimas (tales como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) y cromógenos (tales como 3,3'-diaminobencidina (DAB) o Rojo Rápido). En algunos ejemplos, la detección de la unión antígeno-anticuerpo también incluye amplificación de señal (tal como amplificación de señal de tiramida o procedimientos relacionados). El procedimiento de amplificación de señal puede incluir procedimientos descritos en la Patente de EE.UU. N°. Publ. 2012/0171668.

En algunos ejemplos, el agente de unión específico es un anticuerpo, tal como un anticuerpo policlonal o monoclonal, o fragmento del mismo. En algunos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Si se desea, el anticuerpo puede incluir un marcador detectable para permitir la detección y, en algunos casos, la cuantificación del complejo de proteína/anticuerpo de diana. En otros ejemplos, el anticuerpo se detecta con un anticuerpo secundario marcado apropiado. En ejemplos adicionales, el anticuerpo se detecta con un anticuerpo terciario marcado apropiado.

En algunos ejemplos, el anticuerpo para ALK se obtiene a partir de Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ). En ejemplos específicos, el anticuerpo es anticuerpo monoclonal anti-ALK D5F3 de conejo (Ventana, Catálogo n° 790-4794). Sin embargo, una persona de experiencia común en la técnica apreciará que se pueden usar otros anticuerpos en los procedimientos proporcionados en la presente memoria están comercialmente disponibles a partir de otras fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpo anti-ALK 5A4 (Abeam, Cambridge, MA, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anticuerpo anti-ALK ALK1 (Dako, Carpintería, CA) y anticuerpo anti-ALK D9E (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Un experto en la técnica puede escoger anticuerpos anti-ALK adicionales, incluyendo aquellos disponibles ahora o desarrollados en el futuro, que se pueden usar en los procedimientos descritos.

En algunos ejemplos, se obtiene una muestra de cáncer de pulmón (tal como una muestra que incluye tejido tumoral de NSCLC) y se procesa para IHC. Por ejemplo, la muestra se puede fijar e incrustar, por ejemplo con formalina y parafina. La muestra se puede entonces montar sobre un soporte, tal como un portaobjetos para microscopio de vidrio. Por ejemplo, la muestra se puede cortar en una serie de secciones delgadas (por ejemplo, usando un microtomo), y las secciones se montan en un portaobjetos para microscopio. En algunos ejemplos, un único portaobjetos incluye múltiples secciones de tejido de la misma muestra de cáncer de pulmón o se pueden colocar en diferentes portaobjetos secciones de la misma muestra de cáncer de pulmón. Se pueden marcar diferentes secciones de la muestra de cáncer de pulmón (*por ejemplo*, tumor de NSCLC) individualmente con diferentes anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo anti-ALK y un anticuerpo de control negativo (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a un antígeno endógeno en la muestra). Es decir, se puede marcar una sección con anticuerpo anti-ALK y se puede marcar otra sección con un anticuerpo de control negativo (tal como un anticuerpo que se une a una diana que no se produce de forma endógena en la muestra). En algunos ejemplos, el portaobjetos marcado con un anticuerpo anti-ALK (o un anticuerpo de control negativo) también se tiñe con hematoxilina y eosina (H&E) (por ejemplo, para proporcionar información morfológica o histológica, tal como para discriminar tipos de células en la muestra). En otros ejemplos, un portaobjetos separado del mismo sujeto está marcado con H&E (tal como una sección en serie de la misma muestra de NSCLC). En algunos ejemplos, se pueden detectar proteínas adicionales de interés en la misma o en otras muestras de tejido, por medio de marcaje con otros anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpos anti-RAS y / o anticuerpos anti-HER2). En algunos ejemplos, se puede utilizar un dispositivo automatizado de tinción de portaobjetos (tal como los instrumentos BENCHMARK de Ventana Medical Systems, por ejemplo los instrumentos BENCHMARK XT o BENCHMARK GX) para teñir y procesar los portaobjetos.

En algunos ejemplos, la detección de la proteína de ALK en la muestra incluye detección indirecta de la unión del anticuerpo anti-ALK a la muestra (por ejemplo, el anticuerpo anti-ALK (primario) no se marca de forma detectable). Por ejemplo, la muestra se pone en contacto con el anticuerpo anti-ALK (tal como anticuerpo anti-ALK D5F3) en condiciones suficientes para que el anticuerpo anti-ALK se una a la proteína de ALK en la muestra. La muestra se pone entonces en contacto con un anticuerpo secundario que puede unirse específicamente al anticuerpo anti-ALK (tal como un anticuerpo anti-conejo, si el anticuerpo anti-ALK es un anticuerpo de conejo) en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una al anticuerpo anti-ALK. El anticuerpo secundario se puede marcar de forma detectable. El marcador detectable se puede conjugar con el anticuerpo secundario. En algunos ejemplos, el marcador detectable conjugado con el anticuerpo secundario se puede detectar directamente (tal como un marcador fluorescente, o una enzima, que puede producir un producto de reacción detectable en presencia de un sustrato adecuado). En otros ejemplos, el anticuerpo secundario se conjuga con uno o más haptenos (tales como fluoresceína, dinitrofenilo, biotina o ácido 3-hidroxiquinolín-2-carboxílico (HQ)). La muestra se pone entonces en contacto con un anticuerpo terciario que puede unirse específicamente al anticuerpo secundario conjugado con hapteno (por ejemplo, un anticuerpo anti-hapteno, tal como un anticuerpo anti-HQ) en condiciones suficientes para que el anticuerpo terciario se una al hapteno. En algunos ejemplos, el anticuerpo terciario se conjuga con un marcador detectable, tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina (AP)). La muestra se pone entonces en contacto con uno o más reactivos que generan un producto de reacción detectable en presencia de la enzima. En algunos ejemplos, la muestra se pone en contacto con un sustrato de HRP (tal como agua oxigenada) y un cromógeno (tal como DAB) que genera un producto visualmente detectable en presencia de HRP. En algunos ejemplos, la detección de la proteína de ALK en la muestra se lleva a cabo utilizando el estuche de detección OPTIVIEW DAB IHC (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, número de catálogo 760-700).

En otros ejemplos, la detección de la proteína de ALK en la muestra incluye la detección indirecta incluyendo la amplificación de la señal. En algunos ejemplos, la amplificación de la señal permite la detección inequívoca de muestras de ensayo positivas para ALK que pueden mostrar únicamente una tinción débil sin amplificación de la señal. Los procedimientos de amplificación de señal para IHC se conocen por parte del experto en la técnica. En algunos ejemplos, la amplificación de señal incluye Catalyzed Reporter Deposition (CARD), también conocida como Tyramide Signal Amplification (TSA™). En una variación de este procedimiento, se une un anticuerpo secundario conjugado con enzima (tal como un anticuerpo secundario conjugado con HRP) al anticuerpo primario. A continuación, se utiliza un sustrato de tiramida sometida a tratamiento con biotina (tiramida es 4-(2-aminoetil)fenol), que presumiblemente se convierte en un radical libre cuando interactúa con la enzima HRP. El radical fenólico reacciona entonces rápidamente con el material circundante, depositando o fijando la biotina en las proximidades. Este procedimiento se repite proporcionando más sustrato (tiramida sometida a tratamiento con biotina) y formando biotina más localizada. Finalmente, se detecta el depósito de biotina "amplificado" con estreptavidina unida a una molécula fluorescente. Alternativamente, el depósito de biotina amplificado se puede detectar con complejo de avidina-peroxidasa, que se pone entonces en contacto con DAB para producir un color marrón.

En otros ejemplos, la amplificación de señal incluye poner en contacto la muestra con agua oxigenada y un conjugado de tiramida-HQ después de poner en contacto la muestra con un anticuerpo terciario conjugado con HRP en condiciones suficientes para depositar HQ en el sitio del anticuerpo primario unido a la muestra o cerca del mismo. La muestra se pone posteriormente en contacto con un anticuerpo conjugado con enzima (tal como un anticuerpo conjugado con HRP o AP) que se une específicamente a HQ. En algunos ejemplos, este anticuerpo conjugado con enzima es el mismo que el anticuerpo terciario conjugado con HRP. En otros ejemplos, el anticuerpo

conjugado con enzima es un anticuerpo diferente del anticuerpo terciario conjugado con HRP. La muestra se pone entonces en contacto con uno o más reactivos que generan un producto de reacción detectable en presencia de la enzima. En algunos ejemplos, la muestra se pone en contacto con un sustrato de HRP (tal como agua oxigenada) y un cromógeno (tal como DAB) que genera un producto visualmente detectable en presencia de HRP. En algunos ejemplos, la amplificación de la señal se lleva a cabo usando el estuche de amplificación OPTIVIEW (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, número de catálogo 760-099).

B. Puntuación de muestras como positivas para ALK o negativas para ALK

Para calificar las muestras como positiva para ALK o negativa para ALK, se utiliza una muestra de NSCLC con ALK marcado de forma que sea detectable (por ejemplo, uno o más portaobjetos, tales como 1, 2, 3, 4 o 5 portaobjetos). En algunos ejemplos, la muestra de NSCLC se puede marcar con un anticuerpo específico para ALK y anticuerpos secundarios y/o terciarios marcados de forma débil, por ejemplo, como se describe en la Sección A anterior. En un ejemplo no limitante, el estuche de detección OPTIVIEW DAB IHC y el estuche de amplificación OPTIVIEW se utilizan según las instrucciones del fabricante (Ventana Medical Systems, Inc., números de catálogo 760-700 y 760-099, respectivamente).

La muestra de NSCLC marcada con anti-ALK (o una imagen digital del mismo) se inspecciona visualmente (por ejemplo, con o sin microscopía óptica), por ejemplo, por un patólogo. En algunos ejemplos, se inspecciona visualmente una muestra completa (tal como una sección completa de tejido), por ejemplo usando microscopía óptica, por ejemplo, con una amplificación de aproximadamente 2 x 20x. En otros ejemplos, se inspecciona visualmente al menos un campo de visión (tal como por lo menos 2, 3, 4 o 5 campos de visión diferentes). Un campo de visión es un área de una muestra (por ejemplo, una sección de tejido) objeto de análisis por microscopía, que es más pequeña que la sección completa o la imagen digital completa de una sección. En algunos ejemplos, un campo de visión es un área de una muestra visible a una amplificación de 2x, 5x, 10x, 20x, 40x o 60x (tal como una amplificación de 2x a 20x).

Los procedimientos descritos se pueden usar para identificar (por ejemplo calificar) un tumor como positivo para ALK o negativo para ALK, por ejemplo para proporcionar información de pronóstico, tal como la capacidad de respuesta probable de NSCLC a un inhibidor de ALK. Las células tumorales (por ejemplo neoplásicas) se evalúan en cuanto a la presencia del marcador detectable (tinción), indicando la expresión de la proteína de ALK en las células tumorales. Una muestra que tiene presencia de tinción citoplásmica granular intensa en células tumorales (cualquier porcentaje de células tumorales) se identifica o se califica como positiva para ALK. La tinción citoplásmica granular intensa en al menos una célula tumoral (como 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más células tumorales) en una muestra marcada con un anticuerpo anti-ALK se califica como una muestra positiva para ALK. Por ejemplo, una tinción granular intensa en aproximadamente 1-100.000 células (tal como 10-100.000 células, 1000-100.000 células, 1000-50.000 células, 10.000-50.000 células, 10-50.000 células, 500-50.000 células, o aproximadamente 1000-10.000 Células) en una muestra marcada con un anticuerpo anti-ALK se califica como una muestra positiva para ALK. En algunos ejemplos, la tinción citoplásmica granular intensa se distribuye homogéneamente por todas las partes neoplásicas del tumor. En otros ejemplos, la tinción citoplásmica granular intensa se distribuye de forma heterogénea por todas las partes neoplásicas del tumor. En otro ejemplo, la presencia de tinción citoplásmica granular intensa en partes neoplásicas del tumor (*por ejemplo*, en al menos una o más células tumorales) se calificar como positiva para ALK.

Si la tinción citoplásmica granular intensa no está presente en al menos una célula tumoral en una muestra marcada con un anticuerpo anti-ALK, la muestra se califica como una muestra negativa para ALK. En algunos ejemplos, una muestra de NSCLC sin tinción citoplásmica (por ejemplo, sin tinción por encima de los niveles de fondo o control negativo), tinción citoplásmica débil y/o tinción citoplásmica moderada en células tumorales se califica como una muestra negativa para ALK, siempre y cuando ninguna de las células tumorales de la muestra presente tinción citoplásmica granular intensa. Una muestra con tinción citoplásmica débil y/o tinción citoplásmica moderada en cualquier número de células tumorales se califica como negativa para ALK, a menos que esté presente al menos una célula tumoral en la muestra con tinción citoplásmica granular intensa, en cuyo caso la muestra se califica como positiva para ALK.

Los procedimientos para determinar la intensidad de tinción (por ejemplo, procedimientos semicuantitativos de IHC) se conocen por parte del experto en la técnica. En algunos ejemplos, la tinción citoplásmica granular intensa incluye tinción en una o más células tumorales que se identificarían como intensidad de tinción "3+" por el experto en la técnica (por ejemplo, utilizando una escala de 0, sin tinción por encima del fondo, 1+ tinción de intensidad débil, 2+ tinción de intensidad moderada, y 3+ tinción de intensidad fuerte). Por lo tanto, en algunos ejemplos, se considera que la presencia de al menos una célula con intensidad de tinción citoplásmica de 3+ (*por ejemplo*, tinción intensa) es una muestra positiva para ALK. En algunos ejemplos, la presencia en una muestra de tinción citoplásmica que se identificaría como una intensidad de 1+ (*por ejemplo*, tinción débil) o 2+ (*por ejemplo*, tinción moderada) por el experto en la técnica en cualquier número de células tumorales se califica como una muestra negativa para ALK, a menos que haya también al menos una célula tumoral con tinción citoplásmica granular intensa (*por ejemplo*, intensidad de tinción 3+) presente en la muestra.

El experto en la técnica puede identificar partes de la muestra que sean neoplásicas (*por ejemplo*, células tumorales) y partes de la muestra que sean tejido o células normales, por ejemplo basándose en características morfológicas y/o histológicas. En algunos ejemplos, la muestra se tiñe con H&E (por ejemplo, la misma muestra que está marcada con el anticuerpo anti-ALK o una sección de tejido adyacente) para ayudar a identificar la morfología de tejidos y células.

En algunos ejemplos de los procedimientos descritos, una o más áreas tumorales necróticas pueden estar presentes en una muestra marcada. La tinción de áreas tumorales necróticas o células tumorales necróticas (por ejemplo, áreas tumorales con pérdida de núcleos e infiltrado inflamatorio con o sin contornos celulares conservados) con el anticuerpo anti-ALK no se considera tinción positiva de células tumorales y se excluye de la evaluación de la muestra para la tinción citoplásmica granular intensa de células tumorales. Se considera que las muestras con cualquier tinción de intensidad (incluyendo tinción de intensidad fuerte) de células o áreas tumorales necróticas son negativas para ALK, a menos que también exista al menos una célula tumoral con tinción citoplásmica granular intensa presente en la muestra.

En otros ejemplos de los procedimientos divulgados, la tinción de células no tumorales o elementos celulares normales, incluso una tinción citoplásmica granular intensa, no se considera que sea tinción positiva y se excluye de la evaluación de la muestra. Por ejemplo, se sabe que las células de origen neural (tales como células nerviosas y/o células ganglionares) expresan ALK (*por ejemplo*, Iwahara *et al.*, *Oncogene* 14: 439 - 449, 10997). Por lo tanto, la tinción de neuronas o ganglios (u otras células de origen neural) no se incluye en la evaluación de la muestra. Se considera que las muestras con cualquier tinción de intensidad de células de origen neural son negativas para ALK, a menos que haya también al menos una célula tumoral con tinción citoplásmica granular intensa presente en la muestra.

En ejemplos adicionales, no se considera que la tinción anti-ALK de las células de la mucosa normal o células epiteliales glandulares (incluso una tinción citoplásmica granular intensa) sea tinción positiva para ALK y se excluye de la evaluación de la muestra. Se considera que las muestras con cualquier tinción de intensidad de células de la mucosa normal o células epiteliales glandulares son negativas para ALK, a menos que haya también al menos una célula tumoral con tinción citoplásmica granular intensa presente en la muestra. De forma similar, no se considera la tinción anti-ALK de macrófagos alveolares (por ejemplo, punteado citoplásmico granular ligero) o linfocitos infiltrantes como tinción positiva para ALK y se excluye de la evaluación de la muestra. Se considera que las muestras con tinción de cualquier intensidad de macrófagos alveolares o linfocitos infiltrantes son negativas para ALK, a menos que también exista al menos una célula tumoral con tinción citoplásmica granular intensa presente en la muestra.

En otros ejemplos, la mucina se tiñe por parte del anticuerpo anti-ALK y no se considera que sea tinción positiva para ALK y se excluye de la evaluación de la muestra. Se considera que las muestras con tinción de cualquier intensidad de mucina son negativas para ALK, a menos que exista también al menos una célula tumoral con tinción citoplásmica granular intensa presente en la muestra.

En algunos ejemplos, el procedimiento de calificación también incluye comparar la muestra de NSCLC marcada con anti-ALK con uno o más controles marcados con el anticuerpo anti-ALK (por ejemplo, controles sometidos a ensayo en la misma operación de IHC que la muestra de NSCLC). En algunos ejemplos, el control incluye un control positivo, tal como una muestra que incluye células que se sabe que son positivas para ALK (por ejemplo, células H228). En otros ejemplos, el control incluye un control negativo, tal como una muestra que incluye células que se sabe que son negativas para ALK (por ejemplo, células Calu-3). En algunos ejemplos, las muestras de control positivas y/o negativas son controles a nivel de sistema para asegurar el funcionamiento apropiado de los reactivos e instrumentos de ensayo. En un ejemplo, los controles incluyen tanto un control positivo como un control negativo (por ejemplo, ALK 2 en 1 Control Slides, Ventana Medical Systems, Inc., Núm. De catálogo 781-4796).

En otros ejemplos, el control negativo incluye una muestra de NSCLC teñida con un anticuerpo de control negativo. En algunos ejemplos, el anticuerpo de control negativo es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de diana que no está presente de forma endógena en una muestra de NSCLC. En algunos ejemplos, el anticuerpo de control negativo es una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo monoclonal. La tinción con el anticuerpo de control negativo se puede usar para evaluar el nivel de tinción de fondo en una muestra del sujeto. En algunos ejemplos, la muestra de NSCLC teñida con el anticuerpo de control negativo es una muestra de NSCLC del mismo sujeto (tal como una sección adyacente o en serie de la muestra) cuando la muestra se tiñe con el anticuerpo anti-ALK. En otros ejemplos, la muestra de NSCLC teñida con el anticuerpo de control negativo es de un sujeto diferente que la muestra teñida con el anticuerpo anti-ALK.

C. Muestras

Los procedimientos para obtener una muestra biológica de un sujeto se conocen en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos para obtener tejido pulmonar o células pulmonares son rutinarios. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de un tumor de pulmón que contiene material celular mediante la extirpación quirúrgica de todo o parte del tumor, recogiendo un aspirado de aguja fina del tumor, así como otros procedimientos que se conocen en la técnica. En algunos ejemplos, la muestra se obtiene en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene NSCLC. En

ejemplos particulares, la muestra obtenida del sujeto incluye células tumorales de NSCLC, tales como al menos una porción de un tumor de NSCLC. En algunos ejemplos, la muestra del sujeto también incluye tejido o células normales (*por ejemplo*, no tumorales).

5 Las muestras se procesan después de la recogida mediante fijación y en algunos ejemplos están intercaladas en cera (*por ejemplo*, parafina). Los fijadores para las preparaciones de células y tejidos montados se conocen bien en la técnica e incluyen, sin limitación, fijador de formalina, fijador de Bouin alcohólico al 95 %; fijador de alcohol al 95 %; fijador B5, fijador de Bouin, fijador de Karnovsky (glutaraldehído), fijador de Hartman, fijador de Hollande, solución de Orth (fijador de dicromato) y fijador de Zenker (véase, *por ejemplo*, Carson, *Histotechnology: A Self-Instructional Text*, Chicago: ASCP Press, 1997). La intensidad de tinción de ALK puede disminuir si se utilizan fijadores particulares (tales como alcohol al 95 %, AFA, B5 o Prefer). La tinción con ALK también puede disminuir si las muestras de tejido no se fijan en un corto periodo de tiempo de recogida o no se fijan durante un período de tiempo suficiente. En ejemplos particulares, la muestra se fija en formalina tamponada neutra (tal como formalina tamponada neutra al 10 %) o formalina de cinc. En algunos ejemplos, la muestra se fija durante al menos 15 aproximadamente 6 horas (*por ejemplo*, aproximadamente 6-48 horas, 12-24 horas o aproximadamente 6, 12, 16, 18, 24, 36 o 48 horas). En ejemplos adicionales, la muestra se coloca en un fijador a partir de aproximadamente 6 horas desde la recogida (*por ejemplo*, en aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 horas).

20 En algunos ejemplos, la muestra puede ser una muestra de tejido pulmonar fijado, intercalado en cera, tal como una muestra de tejido pulmonar fijado, intercalado en cera que incluye un tumor de NSCLC. En algunos ejemplos, la muestra es una sección de tejido pulmonar que incluye un tumor de NSCLC que se tiñe con hematoxilina y eosina (H&E). En algunos ejemplos, la muestra es una sección de tejido pulmonar que incluye un tumor NSCLC marcado con un anticuerpo primario específico para ALK, que puede marcarse directa o indirectamente (*por ejemplo*, con un anticuerpo secundario marcado), que en algunos ejemplos se tiñe adicionalmente con H&E.

25 En algunos ejemplos, la muestra (o una fracción de la misma) está presente sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos portan la muestra biológica y permiten la detección apropiada de los componentes (*por ejemplo*, proteínas) de la muestra. Los soportes o sustratos a modo de ejemplo incluyen portaobjetos de microscopio (*por ejemplo*, portaobjetos de microscopio de vidrio o portaobjetos de microscopio de plástico), cubreobjetos (*por ejemplo*, cubreobjetos de vidrio o cubreobjetos de plástico), placas de cultivo de tejidos, placas de pocillos múltiples, membranas (*por ejemplo* nitrocelulosa o poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF)) o chips BIACORE™.

D. Procedimientos de tratamiento

35 Los modos de realización divulgados pueden incluir además la selección de sujetos para tratamiento con un inhibidor de ALK, *por ejemplo* si la muestra del sujeto se califica como positiva para ALK.

40 En algunos ejemplos, el inhibidor de ALK es un inhibidor de molécula pequeña, tal como crizotinib (Pfizer, Nueva York, NY), AP26113 (Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, MA), CH5424802 (Chugai Pharmaceutical, Tokio, Japón), LDK378 (Novartis, Basel, Suiza), ASP3026 (Astellas Pharma, Northbrook, IL), X-396 (Xcovery, West Palm Beach, FL) o retaspimicina (Infinity Pharmaceuticals, Cambridge, MA). Los inhibidores de ALK adicionales incluyen 3-39 (Novartis), GSK1838705A (GlaxoSmithKline, Boston, MA), y CEP-28122 (Cephalon, Frazer, PA). En otro ejemplo, el inhibidor de ALK es un anticuerpo anti-ALK, tal como un anticuerpo anti-ALK humanizado.

45 Los procedimientos y dosis terapéuticas de dichos agentes y tratamientos se conocen por parte de los expertos en la técnica, y *por ejemplo*, se pueden determinar por parte del médico experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de crizotinib puede ser de aproximadamente 50-2000 mg/día (tal como aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 mg/día), administrada por vía oral en una o dos dosis por día. Las dosificaciones y posología de crizotinib para un sujeto se 50 pueden determinar por parte del médico experto, teniendo en cuenta factores adicionales tales como el ubicación del tumor, la etapa del tumor, el grado del tumor, el historial del tratamiento del paciente, el comportamiento del paciente y el estado nutricional, problemas de salud concomitantes, factores sociales y logísticos, tumores primarios previos y preferencia del paciente. Crizotinib puede administrarse según posología continua o durante uno o más ciclos (*por ejemplo*, uno o más ciclos de 21-28 días). El tratamiento puede repetirse cada 21-28 días si se administra en ciclos.

55 Los agentes quimioterapéuticos adicionales incluyen, pero sin limitarse a, agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno (*por ejemplo*, clorambucilo, clormetina, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalán), nitrosoureas (*por ejemplo*, carmustina, fotemustina, lomustina y estreptozocina), compuestos de platino (*por ejemplo*, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y BBR3464), busulfán, dacarbazina, mecloretamina, procarbazona, temozolomida, tiotepa y uramustina; antimetabolitos, tales como ácido fólico (*por ejemplo*, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed), purina (*por ejemplo* cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina y tioguanina), pirimidina (*por ejemplo*, capecitabina), citarabina, fluorouracilo y gemcitabina; alcaloides de plantas, tales como podofilo (*por ejemplo*, etopósido y tenipósido), taxano (*por ejemplo*, docetaxel y paclitaxel), vinca (*por ejemplo*, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina); antibióticos citotóxicos / antitumorales, tales como miembros de la familia de las antraciclinas (*por ejemplo*, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona y valrubicina), bleomicina, rifampicina, hidroxiurea y mitomicina; inhibidores de la topoisomerasa, tales como topotecán e irinotecán; anticuerpos

monoclonales, tales como alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, rituximab, panitumumab, pertuzumab y trastuzumab; fotosensibilizadores, tales como ácido aminolevulínico, aminolevulinato de metilo, porfímero sódico y verteporfina; y otros agentes tales como alitretinoína, altretamina, amsacrina, anagrelida, trióxido de arsénico, asparaginasa, axitinib, bexaroteno, bevacizumab, bortezomib, celecoxib, denileucina difitox, erlotinib, estramustina, gefitinib, hidroxicarbamida, imatinib, lapatinib, pazopanib, pentostatina, masoprocol, mitotano, pegaspargasa, tamoxifeno, sorafenib, sunitinib, vemurafmib, vandetanib y tretinoína. La selección y las dosificaciones terapéuticas de dichos agentes se conocen por parte de los expertos en la técnica y se pueden determinar por parte del médico experto.

La presente divulgación se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Protocolo de Inmunohistoquímica de ALK

Este ejemplo describe procedimientos de ALK por IHC para identificar muestras NSCLC positivas para ALK.

Se tiñeron secciones tisulares de NSCLC intercaladas en parafina y fijadas con formalina con anticuerpo monoclonal anti-ALK D5F3 de conejo (Ventana Medical Systems, Catálogo nº 790-4794). Se tiñó una sección tisular separada de cada muestra de NSCLC con Ig de control negativo monoclonal de conejo (Ventana, nº de catálogo 790-4795). Se tiñeron también los portaobjetos con hematoxilina y eosina (H&E) para distinguir la morfología. Se usaron 2 ALK en 1 portaobjetos de control (Ventana nº de catálogo 781-4796) como controles positivo y negativo a nivel de sistema. Se tiñeron los portaobjetos usando un dispositivo automatizado de tinción de portaobjetos Ventana BENCHMARK XT y el estuche de detección OPTIVIEW DAB IHC (Ventana, nº de catálogo 760-700) y el estuche de amplificación OPTIVIEW (nº de catálogo Ventana 760-099) con el protocolo de tinción mostrado en la Tabla 1. También se sometieron a ensayo el mismo protocolo y reactivos usando un dispositivo automatizado de tinción de portaobjetos Ventana BENCHMARK GX.

Tabla 1. Protocolo de tinción para anti-ALK (D5F3) y Ig de control negativo monoclonal de conejo con el estuche de detección OPTIVIEW DAB IHC y el estuche de amplificación OPTIVIEW

Tipo de procedimiento	Procedimiento
Eliminación de parafina	Elección
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	Acondicionamiento celular 1 92 Minutos, 100 ° C
Inhibidor de la peroxidasa pre-primaria	Elección
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 ° C
Conector universal OPTIVIEW HQ	12 minutos
Multímero OPTIVIEW HRP	12 minutos
Amplificación OPTIVIEW	Elección
OV AMP H202, Amplificador de OV	8 minutos
Multímero OV AMP	8 minutos
Contratinción	Hematoxilina II, 4 minutos
Contratinción posterior	Azulado, 4 minutos

Ejemplo 2

Evaluación de Resultados Inmunohistoquímicos

Este ejemplo describe procedimientos a modo de ejemplo de evaluación o calificación de resultados de ALK por IHC para determinar si una muestra de NSCLC es positiva o negativa para ALK.

Se llevó a cabo ALK por IHC con el anticuerpo anti-ALK D5F3 como se describe en el Ejemplo 1. Las células neoplásicas marcadas con el ensayo ALK por IHC se evaluaron en cuanto a la presencia o ausencia de señal DAB. Se utilizó el portaobjetos de control negativo adaptado para evaluar la tinción de fondo no específica y el grado de tinción de fondo conocido que se producía debido en elementos tisulares específicos (macrófagos alveolares, células neurales, células epiteliales glandulares, células en infiltrado linfocítico). Se determinó que las muestras eran positivas o negativas para ALK basándose en el algoritmo de calificación de la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios de calificación para la determinación del estado de ALK en NSCLC

Interpretación clínica	Descripción de la tinción
Positivo para ALK	Presencia de tinción citoplásmica granular intensa en células tumorales

	(cualquier porcentaje de células tumorales positivas). Se deben <i>excluir los</i> elementos de tinción conocidos , incluyendo: • punteado citoplásmico ligero en macrófagos alveolares • células de origen neural (células nerviosas y ganglionares) • tinción epitelial glandular • células del interior del infiltrado linfocítico También se puede observar una tinción de fondo dentro de la mucosa normal en NSCLC (incluyendo mucina) y en zonas de tumor necrótico, las cuales también deben excluirse de la evaluación clínica
Negativo para ALK	Ausencia de tinción citoplásmica granular intensa en células tumorales

Positivo para ALK: Los casos positivos teñidos con el ensayo IHC descrito en el Ejemplo 1 muestran típicamente una señal citoplásmica granular intensa. Cualquier muestra que tuviese tinción citoplásmica intensa (tal como tinción 3+ en calificación IHC convencional) en cualquier número de células tumorales se calificó como positiva. En la mayoría de los casos positivos, la señal se distribuyó de forma homogénea, con un nivel uniforme de intensidad a lo largo de las porciones neoplásicas del tumor. En algunos casos positivos, la señal fue más heterogénea en la intensidad de tinción. Se muestran ejemplos de expresión homogénea de ALK por IHC en las Figs. 1A y B. Se muestran ejemplos de expresión heterogénea de ALK por IHC en las Figs. 2A-C

Se observó una tinción de fondo en la mucosa normal en muestras de NSCLC, así como en áreas tumorales necróticas. Esta tinción no se evaluó como tinción positiva para ALK. Además, se observó tinción en células neurales (incluyendo células nerviosas o ganglionares), células epiteliales glandulares, macrófagos alveolares y células en infiltración linfocítica o metástasis pulmonar en los ganglios linfáticos. También se observó tinción de mucina en algunas muestras. Todos estos factores se excluyeron al determinar si la muestra era positiva para ALK. Se muestran ejemplos de estos tipos excluidos de tinción con ALK en las Figs. 3 (tinción de células epiteliales glandulares), 4A y B (tinción de células neurales), 5 (tinción de macrófagos alveolares), 6A y B (tinción de mucina) y 7A y B (tinción de linfocitos).

Negativo para ALK: La mayoría de los casos negativos para ALK mostraron una ausencia de señal DAB por encima de la tinción de fondo del portaobjetos de control negativo coincidente (Fig. 8A y B). Sin embargo, una minoría de casos negativos mostraron un patrón citoplásmico granular débil y difuso que se detectó por encima de la tinción de fondo observada en el portaobjetos de control negativo coincidente (Fig. 9A y B). Se estimó que estos casos representaban alrededor del 1-2 % de los casos negativos a ALK y eran negativos por el análisis de FISH de confirmación.

En algunos casos, la tinción citoplásmica en el portaobjetos teñido con el anticuerpo anti-ALK (D5F3) fue más notable que en el portaobjetos de control negativo. Sin embargo, estos casos no presentaron tinción citoplásmica intensa, y por lo tanto se determinó que eran negativos para ALK (Fig. 10A-D). En otro caso, se observó tinción de membrana/citoplasma en un portaobjetos teñido con el anticuerpo anti-ALK (Fig. 11). Se determinó que esta muestra era negativa para ALK debido a la falta de tinción citoplásmica granular intensa.

Ejemplo 3

Concordancia de resultados inmunohistoquímicos con FISH

Este ejemplo demuestra la concordancia del procedimiento de calificación de ALK por IHC descrito en el Ejemplo 2 con FISH de separación de ALK para determinar el estado de ALK de muestras de NSCLC.

Se usaron tres cohortes para comparar los resultados de tinción del anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-ALK (D5F3) con FISH para ALK en términos de estado clínico de ALK. Las cohortes incluyeron una serie de muestras de tejido de NSCLC humano de tumores primarios y metastásicos, incluyendo resecciones, biopsias con aguja, biopsias bronquiales y bloques celulares fijados con formalina, intercalados en parafina (FFPE) de aspirados con aguja fina. Se llevó a cabo IHC como se ha descrito en el Ejemplo 1. Todos los estudios se calificaron utilizando el algoritmo de calificación del Ejemplo 2 (descrito en la Tabla 2). Los datos de FISH de separación se obtuvieron usando el estuche de sonda FISH de separación VYSIS ALK (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Estudio de concordancia 1

Se realizó un estudio en un laboratorio externo comparando el anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-ALK (D5F3) con los datos de FISH de separación de ALK retrospectivos (Cleveland Clinic Foundation). La ubicación externa tiñó aproximadamente 100 casos de NSCLC usando el anticuerpo monoclonal de conejo anti-ALK (D5F3) en un instrumento BenchMark XT. El ensayo anti-ALK por IHC demostró una concordancia > 98 % con los datos retrospectivos de FISH de separación de ALK en esta cohorte de muestras de NSCLC. Los resultados se detallan en las Tablas 3 y 4. De los 100 casos, 86 tenían disponibles datos de FISH y suficiente tumor presente para la comparación con el resultado de ALK por IHC. La preparación de las muestras de ensayo tisulares para el presente estudio no se verificó en cuanto a las condiciones de fijación (tiempo de fijación después de la recogida, tiempo de fijación).

Tabla 3. Anti-ALK D5F3 por IHC en comparación con FISH de separación

Anti-D5F3	FISH de separación		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	10	0	10
Negativo	1	75	76
Total	11	75	86

Tabla 4. Porcentaje global, positivo y negativo de las tasas de concordancia para anti-ALK D5F3 por IHC en comparación con FISH de separación

Tasa	n/N	%	95 % CI ^a
Porcentaje global de concordancia	85/86	98,8	93,7, 99,8
Porcentaje de concordancia positiva	10/11	90,9	62,3, 98,4
Porcentaje de concordancia negativa	75/75	100,0	95,1, 100,01

^a Intervalo de confianza expandido de 95 % calculado usando el procedimiento de calificación

Estudio de concordancia 2

Anticuerpo primario monoclonal con datos de FISH de separación de ALK en 73 casos de NSCLC (corte dentro de una semana de tinción). La ubicación externa tiñó los casos usando el anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-ALK (D5F3) en un instrumento BenchMark XT como se describe en el Ejemplo 1. El ensayo de VENTANA ALK por IHC demostró una concordancia > 93 % de porcentaje global con los datos retrospectivos de FISH de separación de ALK en esta cohorte de muestra de NSCLC. Los resultados se detallan en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Anti-ALK D5F3 por IHC en comparación con FISH de separación

Anti-D5F3	FISH de separación		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	2	4	6
Negativo	0	56	56
Total	2	60	62

Tabla 6. Porcentaje global, positivo y negativo de las tasas de concordancia para anti-ALK D5F3 por IHC en comparación con FISH de separación

Tasa	n/N	%	95 % CI ^a
Porcentaje global de concordancia	58/62	93,5	84,6-97,5
Porcentaje de concordancia positiva	2/2	100	34,2-100,0
Porcentaje de concordancia negativa	56/60	93	84,1-97,4

^a Intervalo de confianza expandido de 95 % calculado usando el procedimiento de calificación

De los cuatro casos discordantes (FISH negativos, ALK por IHC positivo), se sometieron a ensayo portaobjetos adicionales no teñidos con otro ensayo de ALK por IHC (diferente clon y sistema de detección). Tres de los cuatro casos concordaban con el ensayo de anti-ALK (D5F3) por IHC en términos de tinción de ALK por IHC detectado.

También hubo 10 casos en que los resultados de FISH fueron indeterminados o no se realizaron. Cuatro de estos casos fueron positivos por el ensayo de anti-ALK (D5F3) por IHC y el otro clon de ALK, y seis fueron negativos para ALK por IHC. Hubo un caso que fue positivo por FISH pero no se dispuso de muestra suficiente para la tinción con IHC.

Estudio de concordancia 3

En este estudio, se tiñeron aproximadamente 300 casos de un estudio clínico global en curso de pacientes de NSCLC positivo para ALK inscritos en el estudio de muestra de FISH de separación de ALK, con el ensayo de anticuerpo monoclonal de conejo anti-ALK (D5F3). De los aproximadamente 300 casos, algunos fueron clasificados como "no informativos" por FISH o "ensayo FISH no realizado" y se tiñeron y calificaron con fines exclusivamente informativos. Los datos de FISH de las muestras se obtuvieron a partir de laboratorios centrales que participaron en el estudio clínico.

Se mantuvo el anonimato de los casos en cuanto al estado de FISH, se aleatorizaron y se proporcionaron a dos lectores, que calificaron los resultados de la tinción. Los resultados se compararon con el estado de FISH obtenido del estudio clínico global. Los resultados de la comparación de ALK por IHC con FISH de separación de ALK se muestran en la Tabla 7. La preparación de las muestras de ensayo tisulares para el presente estudio no se verificó en cuanto a las condiciones de fijación (tiempo de fijación después de la recogida, tiempo de fijación).

Tabla 7. Concordancia de anti-ALK D5F3 por IHC con FISH de separación de ALK evaluado por dos patólogos.

Anti-D5F3		FISH de separación de ALK		Total
Lector		Positivo	Negativo	
Lector 1	Positivo	37	13	50
	Negativo	11	223	234
	Total	48	236	284
Lector 2	Positivo	37	12	49
	Negativo	11	225	236
	Total	48	237	285
Lector		n/N	Por ciento	95 % de confianza

				Intervalo
Lector 1	Concordancia general	260/284	91,5	87,7, 94,3
	Concordancia positiva	37/48	77,1	63,5, 86,7
	Concordancia negativa	223/236	94,5	90,8, 96,8
Lector 2	Concordancia general	262/285	91,9	88,2, 94,6
	Concordancia positiva	37/48	77,1	63,5, 86,7
	Concordancia negativa	225/237	94,9	91,4, 97,1

Casos discrepantes que fueron ALK por IHC positivo, ALK por FISH negativo:

- Se evaluaron cuatro casos por parte de al menos un lector como ALK por IHC positivo, por FISH negativo. Después de la revisión de consenso, se determinó que debían evaluarse como IHC negativo. Estos casos presentaron tinción citoplásmica/membrana focal y se considera que son negativos, como se describe en el Ejemplo 2.

- Hubo nueve casos negativos de ALK por IHC positivo, ALK por FISH negativos que se consideraron casos verdaderamente discrepantes.

De los nueve casos discordantes, siete presentaron portaobjetos sin manchas que estuvieron disponibles para ensayos adicionales de diagnóstico de ALK (ensayos moleculares y de IHC usando un clon diferente y un sistema de detección). Estos resultados de los ensayos adicionales indicaron que la mayoría de los casos discrepantes favorecieron la evaluación positiva por IHC para el estado de ALK cuando ALK por FISH era negativo. Los portaobjetos de estos casos se cortaron más de tres meses antes de la tinción, lo que puede disminuir la sensibilidad del ensayo de IHC.

Casos discrepantes que fueron ALK por IHC negativo, FISH de ALK positivo:

- Hubo 11 casos que fueron positivos por FISH pero negativos por el ensayo anti-ALK por IHC. Diez de estos casos presentaban portaobjetos sin tinción que estuvieron disponibles para los ensayos adicionales de diagnóstico de ALK con técnicas moleculares e IHC. Estos resultados de las pruebas adicionales indicaron que la mayoría de los casos que eran negativos por el ensayo de anti-ALK D5F3 por IHC también fueron negativos para ALK por otro sistema IHC, pero fueron positivos por uno o más ensayos moleculares. Los portaobjetos de estos casos se cortaron más de tres meses antes de la tinción, lo que puede disminuir la sensibilidad del ensayo de IHC.

• Hubo 14 casos en esta cohorte que no fueron informativos por FISH (no se obtuvo resultado). De estos, tres fueron se evaluaron como positivos por ambos lectores por el anti-ALK por ensayo IHC. Además, hubo 19 casos en los que no se pudo realizar el análisis de FISH, basado en el portaobjetos de H&E (generalmente debido a que el contenido tumoral fue insuficiente). De estos, ambos lectores evaluaron los resultados de tinción de ALK por IHC como positivos en cuatro casos. Por lo tanto, en promedio, el 21 % de los casos en que no se obtuvieron resultados de FISH tuvo un estado de ALK positivo en el ensayo anti-ALK (D5F3) por IHC.

Se determinó la reproducibilidad del estado de ALK obtenido del ensayo anti-ALK por IHC. Se comparó el estado de ALK obtenido por cada lector para los aproximadamente 300 casos. Los resultados indican que el ensayo anti-ALK por IHC y el algoritmo de valoración fueron altamente reproducibles entre lectores, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Precisión inter-lector de interpretación de calificación

Comparación de lectores		FISH de separación de ALK		
Lector 2 vs. Lector 1		Positivo	Negativo	Total
Anti-ALK D5F3 por IHC	Positivo	56	0	56
	Negativo	1	251	252
	Total	57	251	308
Comparación de lectores		n/N	Por ciento	Intervalo de Confianza del 95 %
Lector 2 vs. Lector 1	Porcentaje global de concordancia	307/308	99,7	98,2, 99,9
	Concordancia positiva promedio	112/113	99,1	97,01, 00,0
	Concordancia negativa promedio	502/503	99,8	99,4, 100,0

Conclusión

IHC con el anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-ALK (D5F3) fue reproducible en cuanto a sus resultados de tinción para el estado clínico de ALK en las plataformas BENCHMARK XT y BENCHMARK GX. El algoritmo de calificación binario fue altamente reproducible entre los lectores. El ensayo fue concordante con el FISH de separación de ALK para el estatus de ALK.

Ejemplo 4

Efecto de las condiciones de procesamiento de tejidos en el ensayo por IHC

Este ejemplo describe el efecto de variación de las condiciones de procesamiento de tejidos en el ensayo por IHC.

Se usó la estirpe celular H228 (positiva para ALK) para generar tumores de xenoinjerto en ratones SCID. Los tumores se recogieron y se fijaron con diferentes fijadores durante diversos tiempos y se tiñeron con el anticuerpo anti-ALK D5F3 como se describe en el Ejemplo 1.

Los tejidos fijados con formalina tamponada neutra al 10 % durante al menos 6 horas produjeron resultados óptimos de tinción con ALK por IHC. La fijación con formalina de zinc durante al menos 6 horas también produjo una tinción de ALK por IHC aceptable. El tiempo de fijación de menos de 6 horas en formalina tamponada neutra o formalina de zinc dio como resultado una intensidad de tinción significativamente reducida para ALK. También se sometieron a ensayo fijadores adicionales (AFA, B5, Prefer, y etanol al 95 %) y el resultado fue una reducción significativa de la intensidad de tinción de ALK en todos los instantes de tiempo.

Se recogieron las muestras de xenoinjerto y se dejaron sin fijación durante intervalos de tiempo comprendidos entre 30 minutos y 24 horas, y después se fijaron durante 12 horas en formalina neutra tamponada. Se redujo la intensidad de tinción de ALK si el tiempo hasta fijación se retrasaba más de 6 horas.

Se evaluaron las secciones cortadas, pero no teñidas, durante diversos periodos de tiempo en cuanto a tinción de ALK por IHC. La intensidad de tinción de ALK disminuyó en las secciones cortadas más de 3 meses antes de la tinción y almacenadas a temperatura ambiente. A pesar de la intensidad de tinción menor, ninguno de los casos positivos para ALK cambió de estado a negativo para ALK.

Basándose en estos datos, se recomienda la fijación de muestras en un plazo de aproximadamente 6 horas desde la recogida en formalina tamponada neutra al 10 % o formalina de cinc durante al menos 6 horas para obtener resultados óptimos de tinción de ALK. Además, la tinción es óptima si las secciones se tiñen en aproximadamente 3 meses a partir del corte, cuando se almacenan a temperatura ambiente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar un sujeto que tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) susceptible de responder al tratamiento con el inhibidor de quinasa de linfoma anaplásico (ALK) crizotinib, que comprende:
 - poner en contacto una muestra que comprende células tumorales de NSCLC del sujeto con un anticuerpo anti-ALK;
 - detectar la expresión de la proteína de ALK en la muestra;
 - marcar la muestra como positiva para ALK si la detección de la expresión de la proteína de ALK comprende detectar tinción citoplásmica granular intensa en una o más células tumorales de la muestra; o
 - marcar la muestra como negativa para ALK si la detección de la expresión de la proteína de ALK no comprende detectar una tinción citoplásmica granular intensa en una o más células tumorales en la muestra; e
 - identificar al sujeto que presenta NSCLC susceptible de responder al tratamiento con el inhibidor de ALK crizotinib si la muestra se califica como positiva para ALK o identificar el sujeto que presenta NSCLC no susceptible de responder al tratamiento con el inhibidor de ALK crizotinib si la muestra se califica como negativa para ALK.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la calificación de la muestra como positiva o negativa para ALK comprende además excluir la detección de la expresión de la proteína de ALK en células normales o elementos o áreas tumorales necróticas en la muestra.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que las células normales de la muestra comprenden células no tumorales, células de origen neural, macrófagos alveolares, células epiteliales glandulares o linfocitos, o en las que los elementos normales comprenden mucina.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra comprende una biopsia de tejido, aspiración con aguja fina, lavado broncoalveolar, líquido pleural o esputo.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la biopsia de tejido comprende una sección de tejido.
6. El procedimiento de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la muestra se fija durante al menos aproximadamente 6 horas en formalina tamponada neutra o formalina de cinc en aproximadamente 6 horas a partir de la recogida de la muestra.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-ALK es un anticuerpo anti-ALK D5F3 de conejo.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la detección de la expresión de la proteína de ALK en la muestra comprende la detección directa o indirecta de la unión del anticuerpo anti-ALK a la muestra.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además una etapa de amplificación de señal.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el contacto de la muestra con un anticuerpo anti-ALK y la detección de la expresión de la proteína de ALK en la muestra se realizan con un dispositivo automatizado de tinción de tejidos.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la calificación de la muestra como positiva o negativa para ALK comprende inspección visual, en la que opcionalmente la inspección visual se lleva a cabo utilizando microscopía óptica.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la detección de la calificación de la muestra como positiva o negativa para ALK comprende la inspección visual de al menos un campo de visión.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además escoger el sujeto para tratamiento con el inhibidor de ALK si la muestra del sujeto se califica como positiva para ALK.
14. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la detección de la expresión de la proteína de ALK en la muestra comprende:
 - (A) poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado con ácido 3-hidroxi-quinolín-2-carboxílico que se une al anticuerpo anti-ALK;

(B) poner en contacto la muestra con un anticuerpo terciario conjugado con peroxidasa de rábano picante que se une al ácido 3-hidroxiinoxalin-2-carboxílico;

5 (C) poner en contacto la muestra con agua oxigenada y tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina; y

(D) detectar el precipitado de DAB utilizando microscopía óptica.

10 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la detección de la expresión de la proteína de ALK en la muestra comprende además después de la etapa (b):

poner en contacto la muestra con agua oxigenada y ácido 3-hidroxiinoxalin-2-carboxílico conjugado con tiramida en condiciones suficientes para la deposición del ácido 3-hidroxiinoxalina-2-carboxílico en la proteína de ALK o cerca de la misma; y

15 poner en contacto la muestra con el anticuerpo terciario que se une al ácido 3-hidroxiinoxalin-2-carboxílico.

20 16. El procedimiento de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, que comprende además escoger el sujeto para tratamiento con crizotinib si la muestra del sujeto se califica como positiva para ALK.

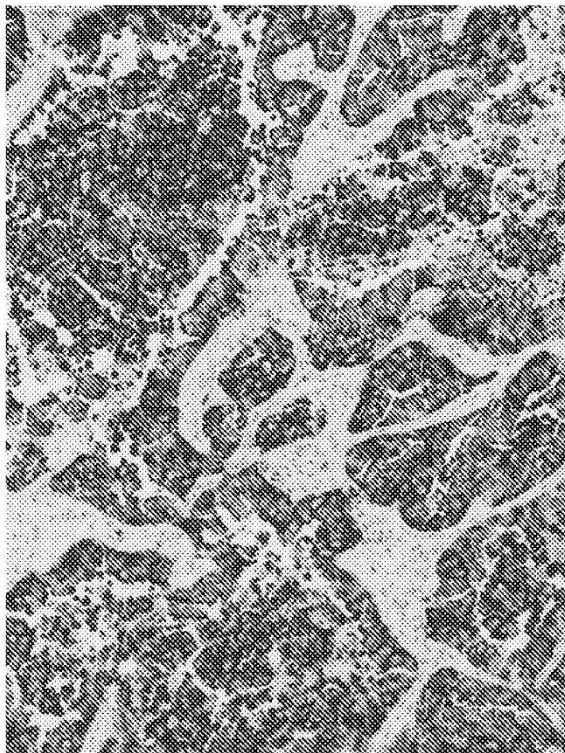
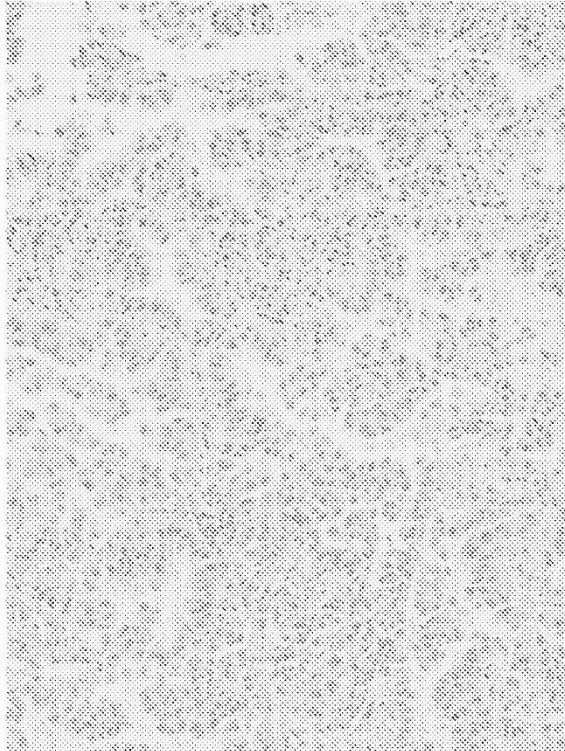


FIG. 1A

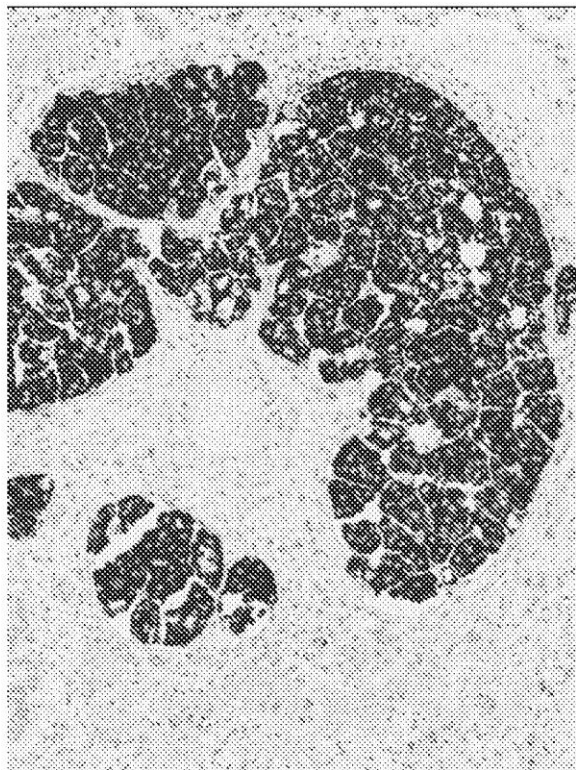
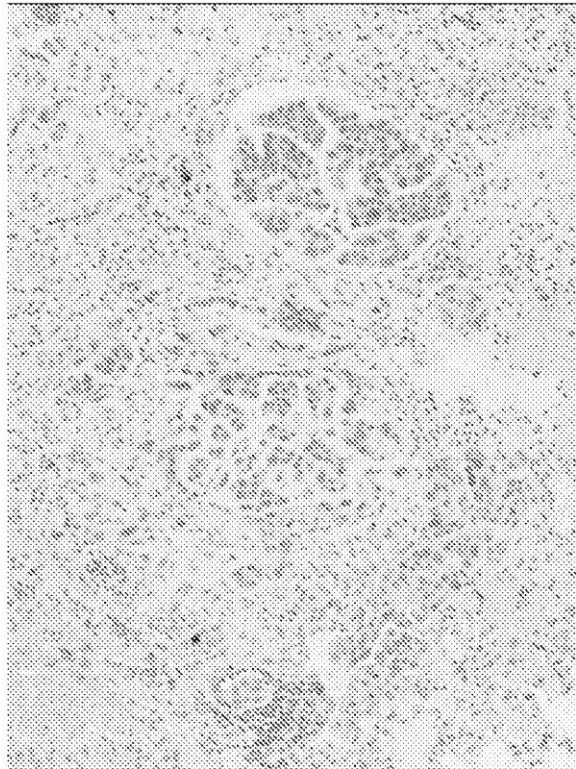


FIG. 1B

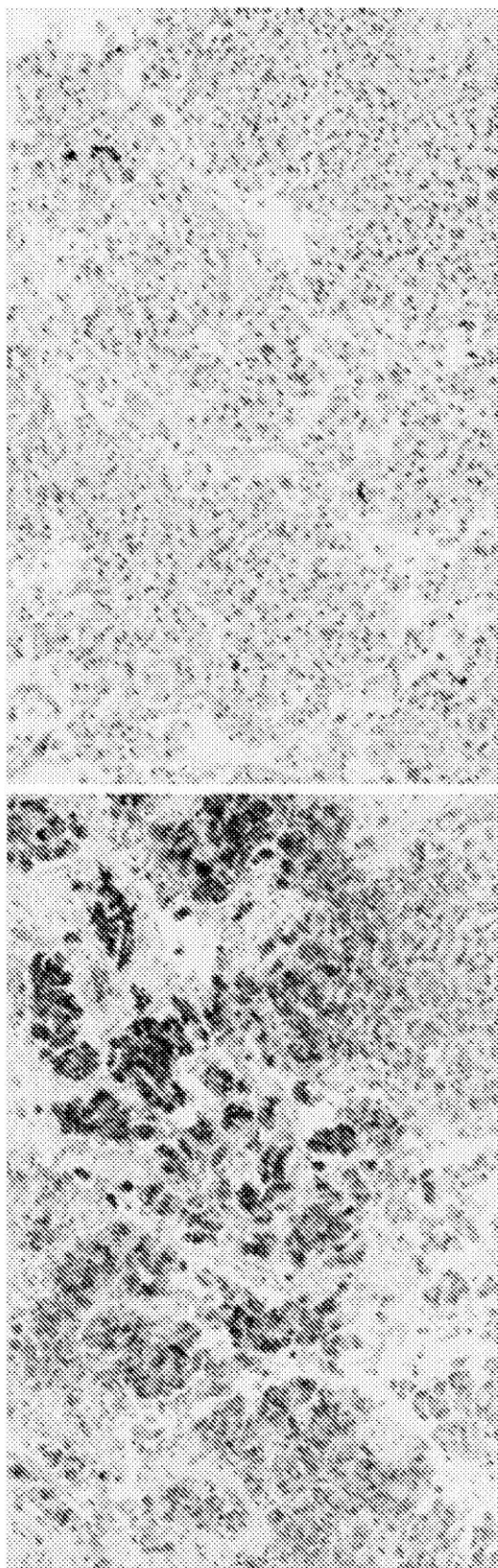


FIG. 2A

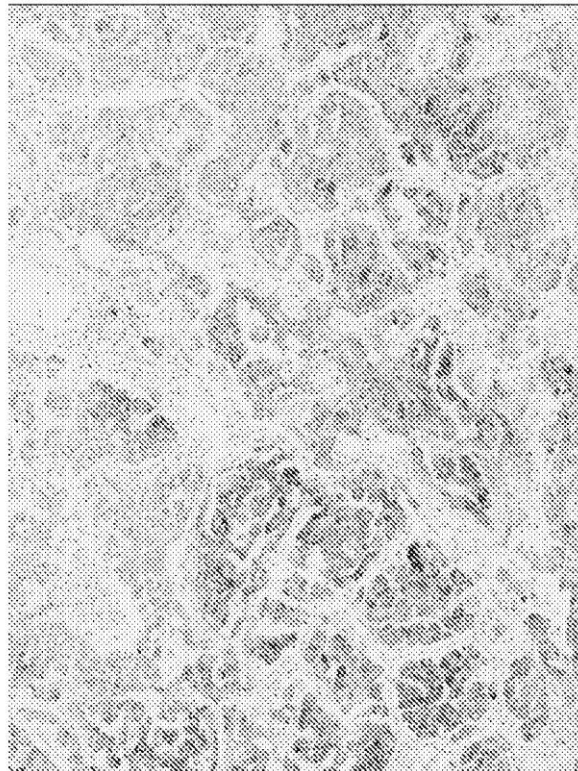


FIG. 2B

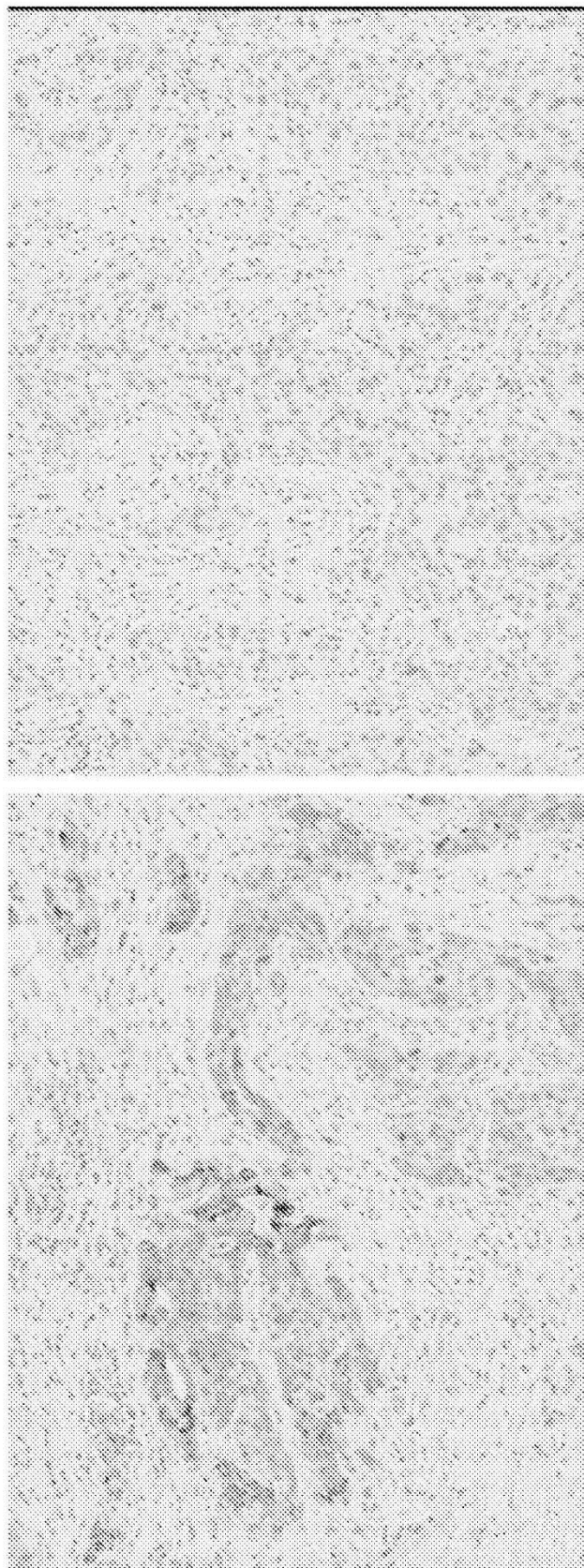


FIG. 2C

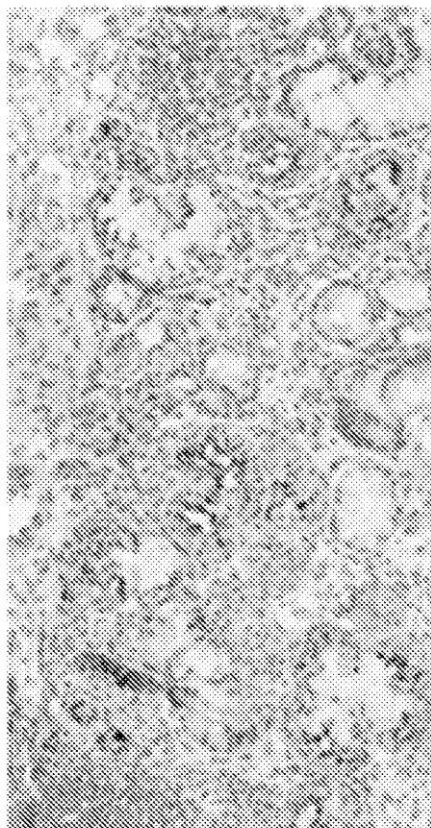
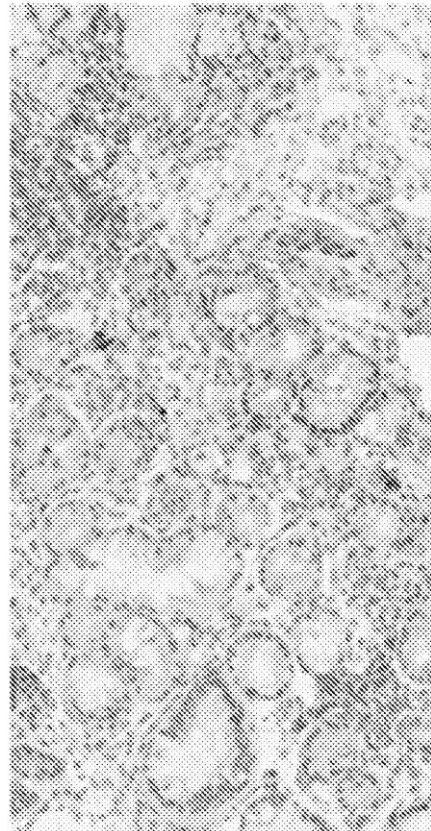


FIG. 3

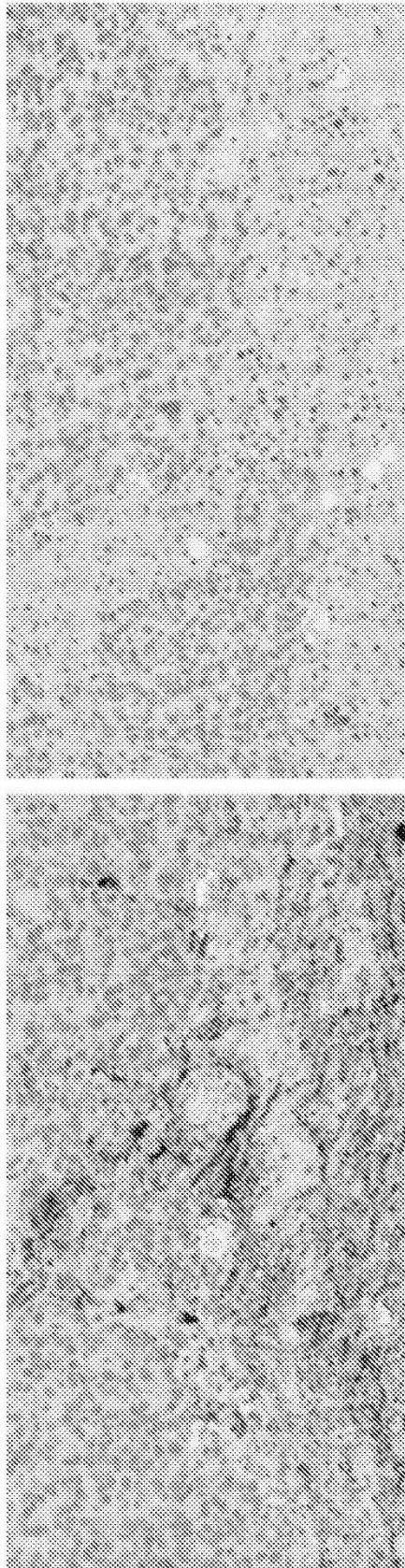


FIG. 4A

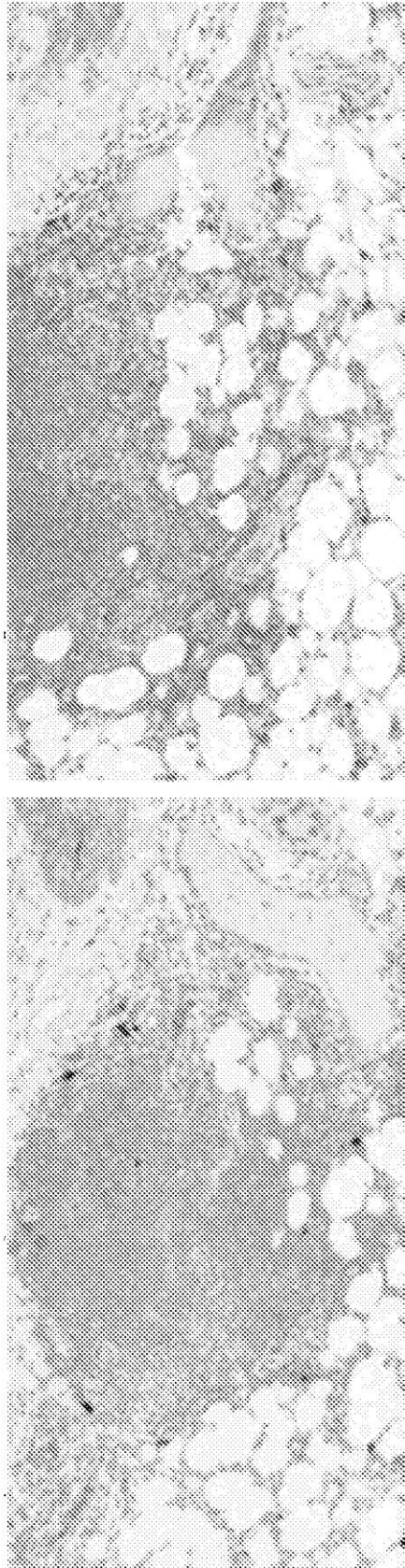


FIG. 4B

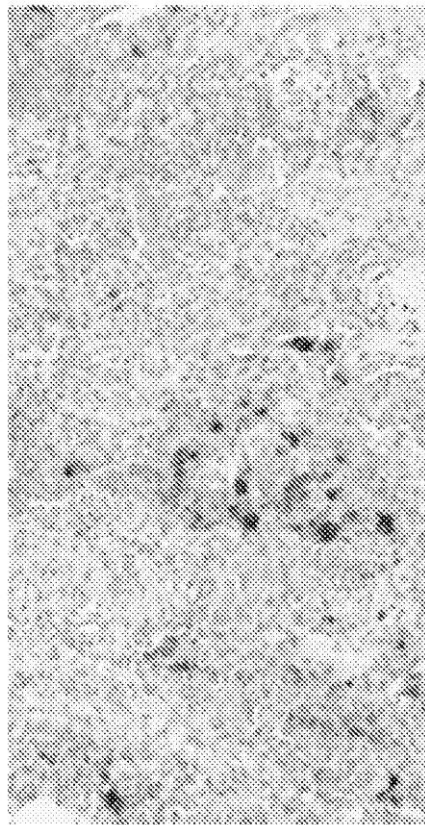
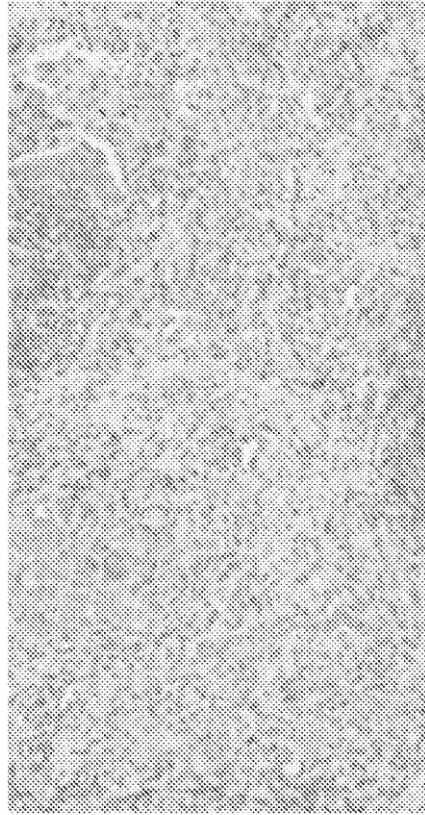


FIG. 5

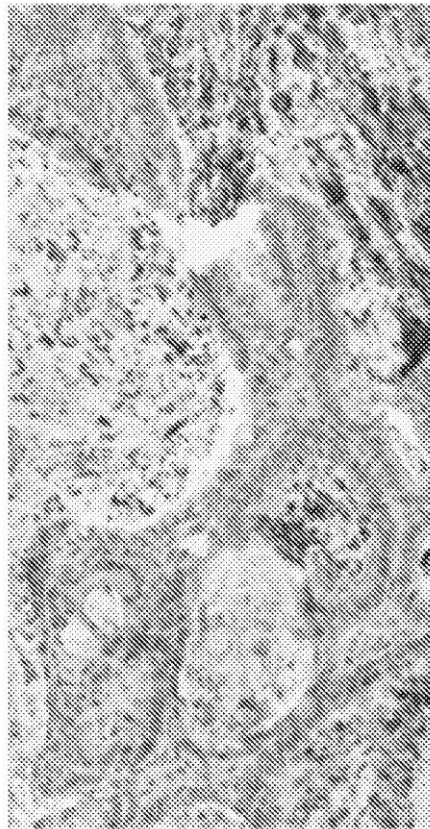
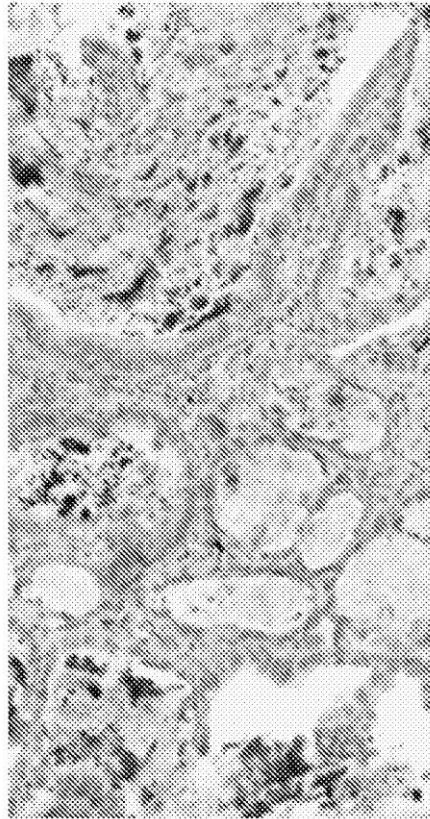


FIG. 6A

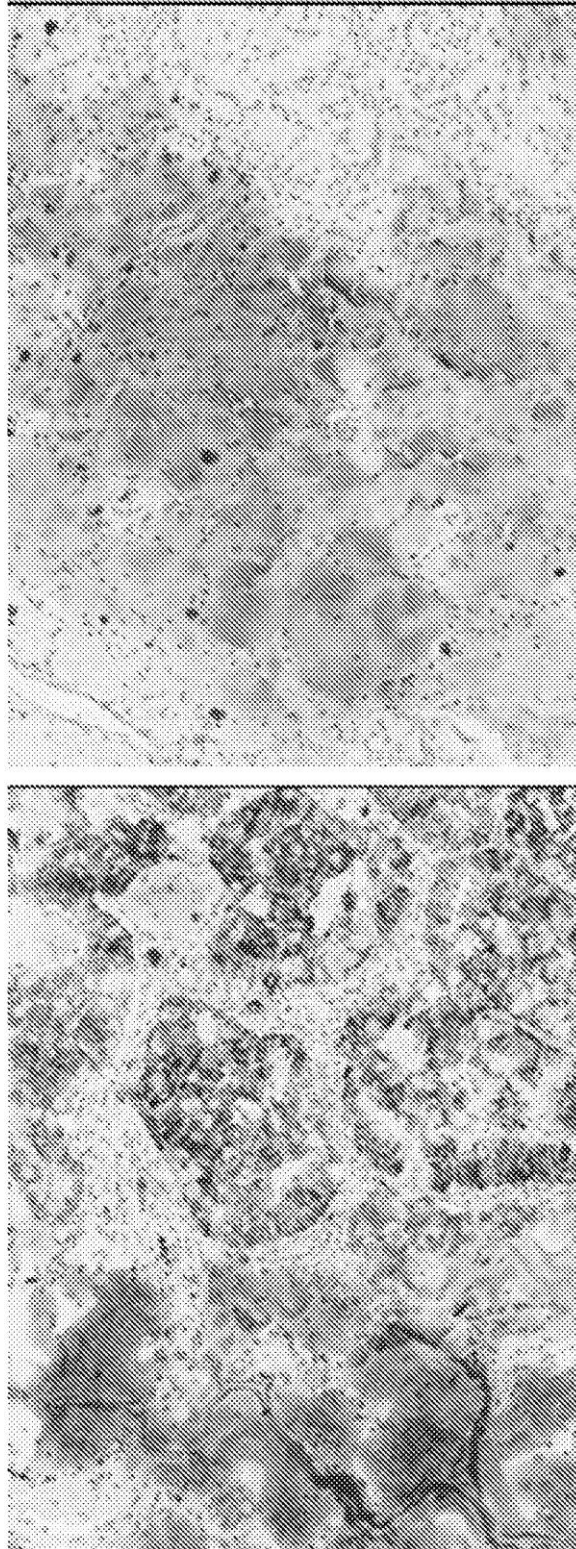


FIG. 6B

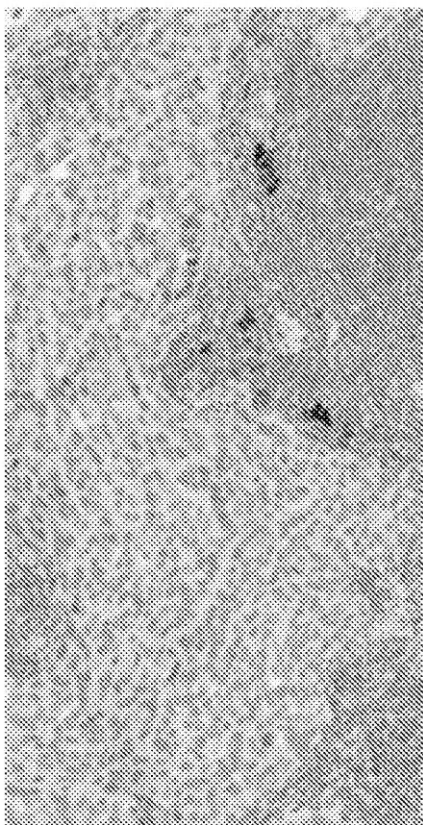
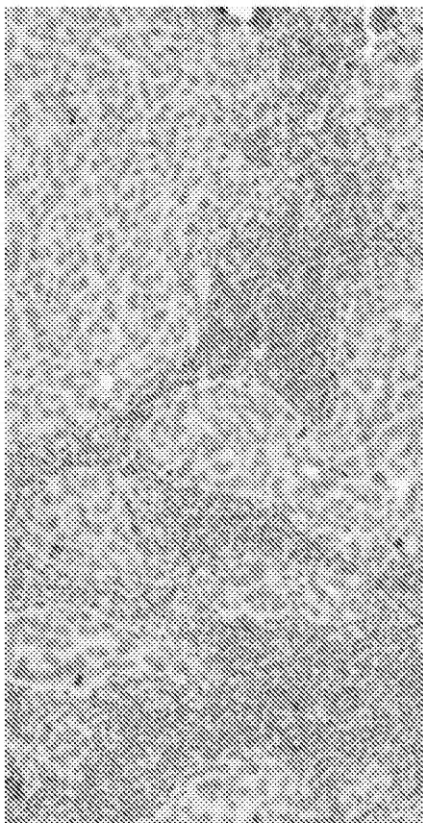


FIG. 7A

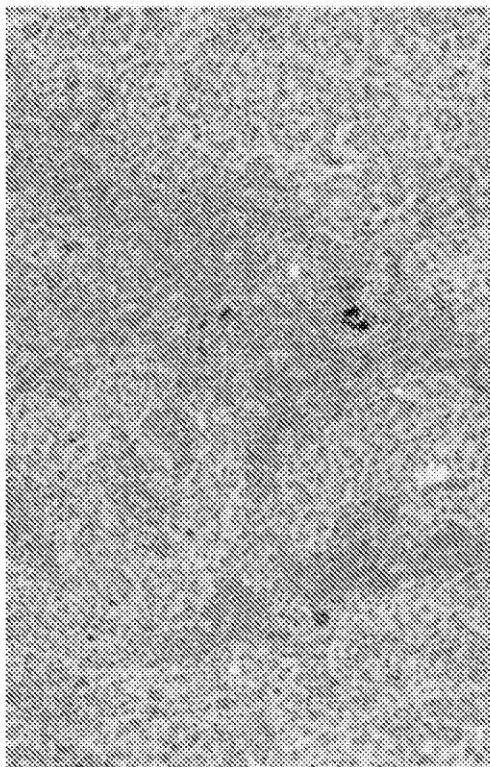
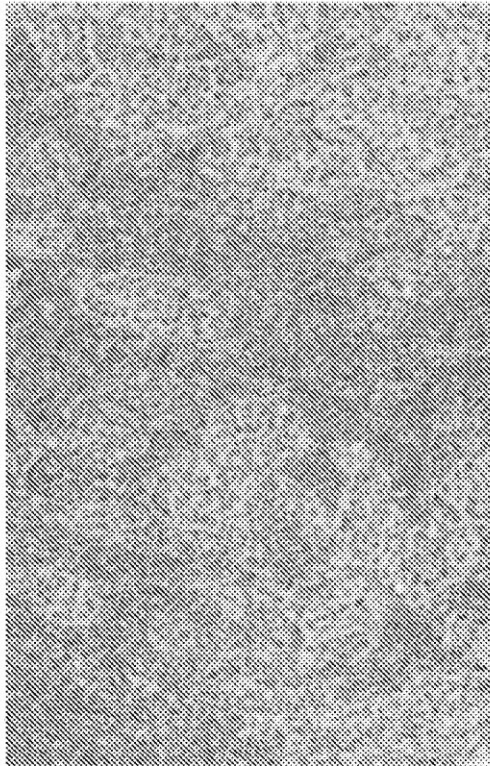


FIG. 7B

FIG. 8A

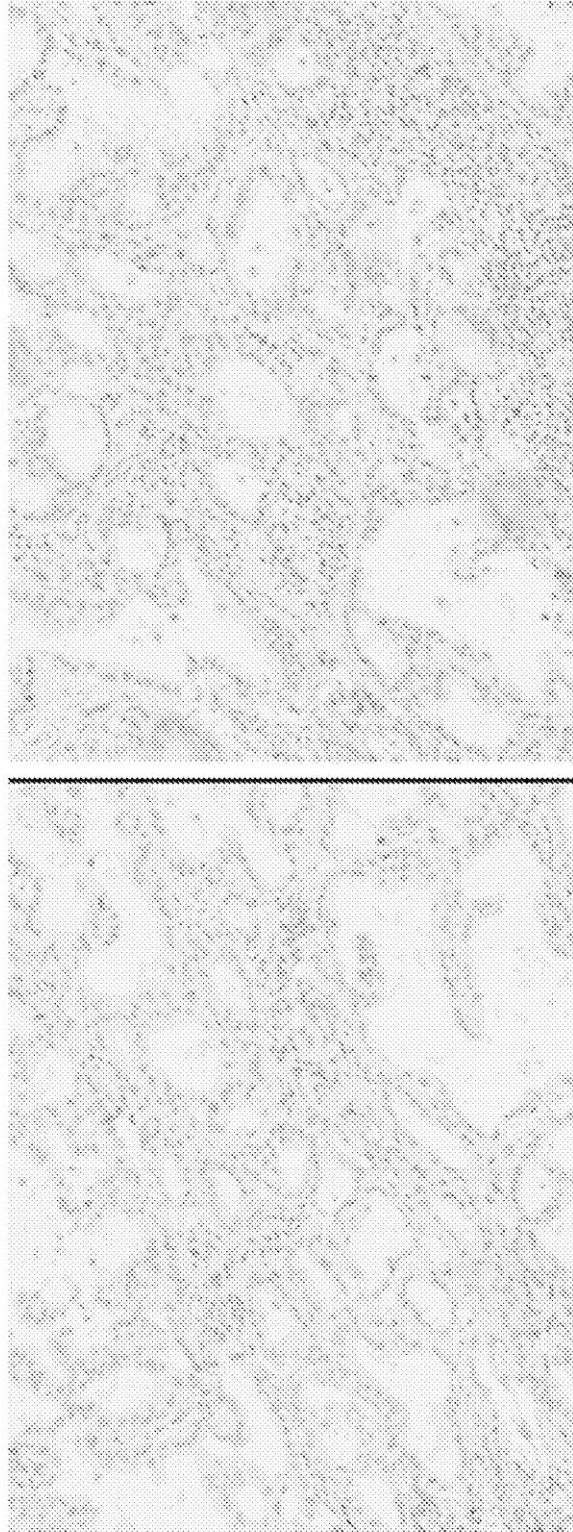


FIG. 8B

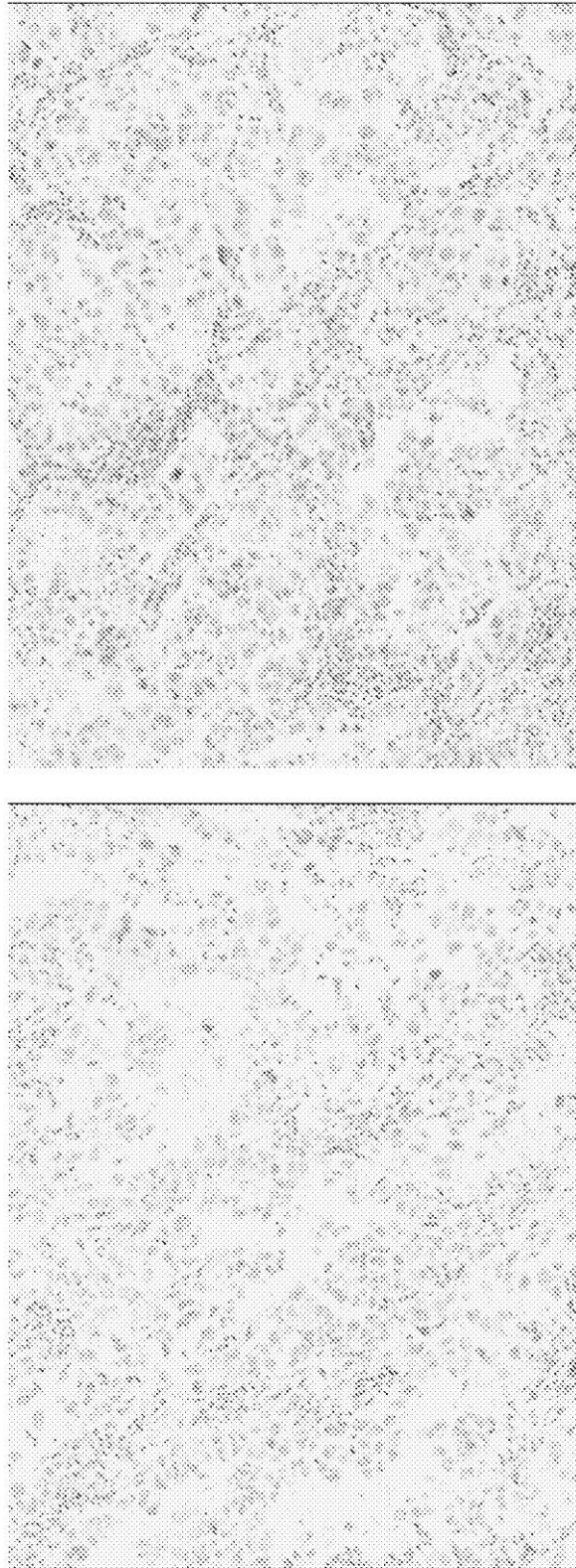
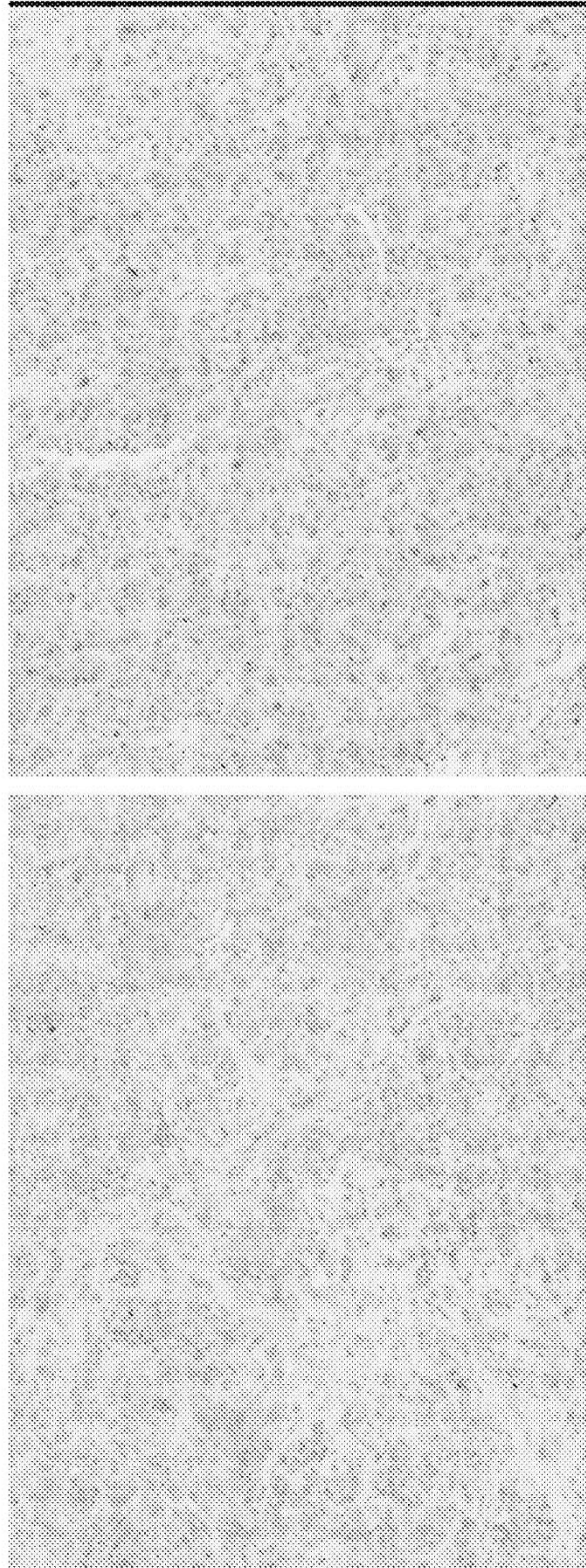


FIG. 9A



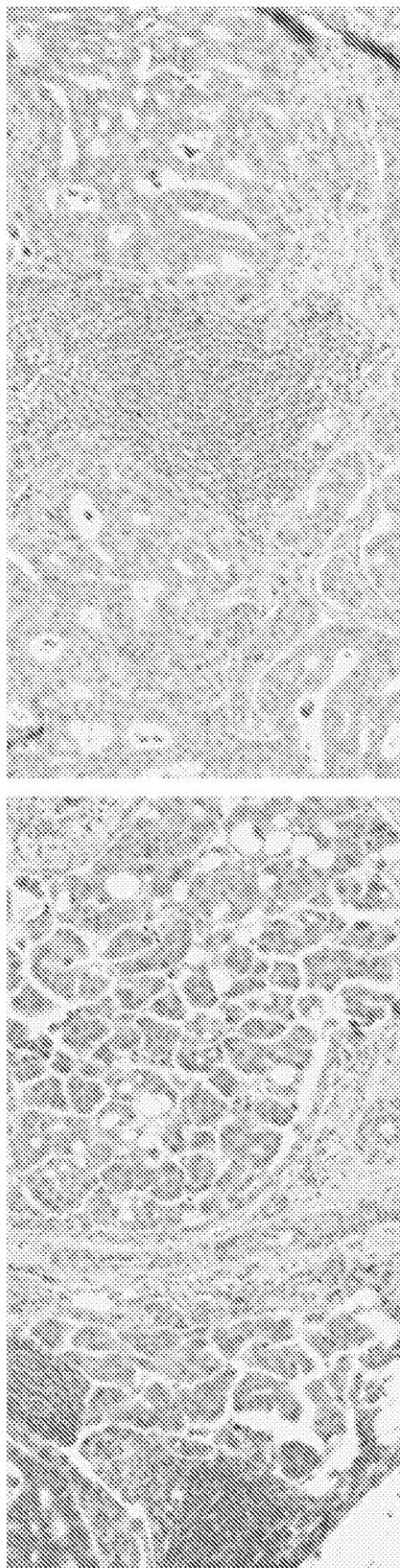


FIG. 9B

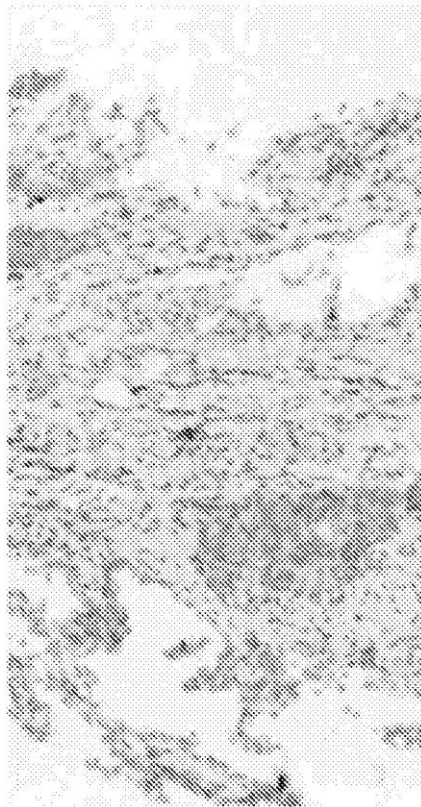


FIG. 10A

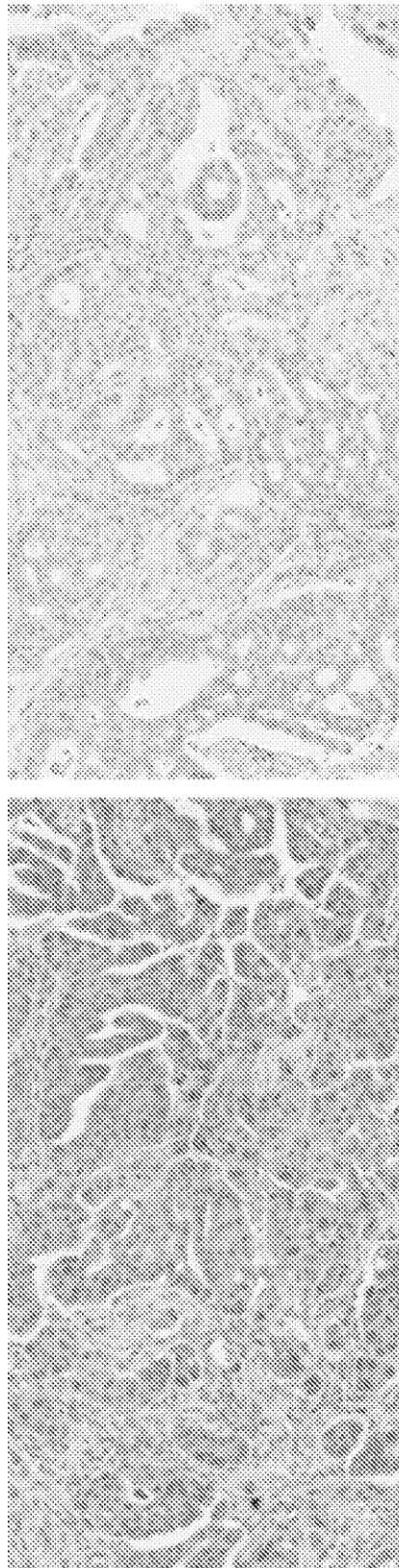


FIG. 10B

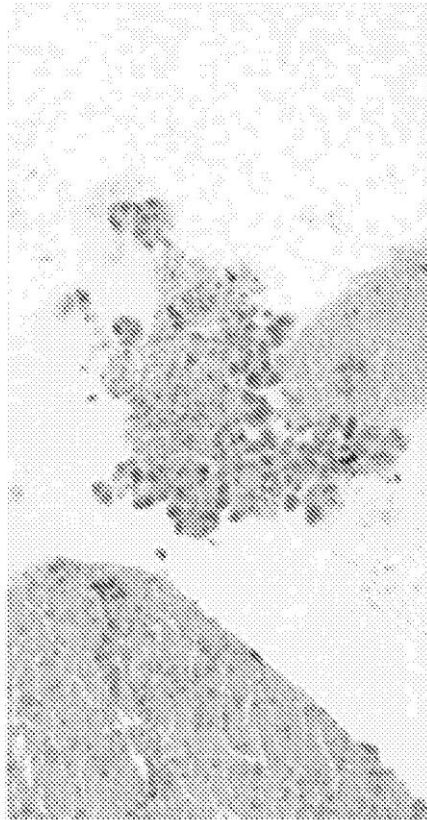
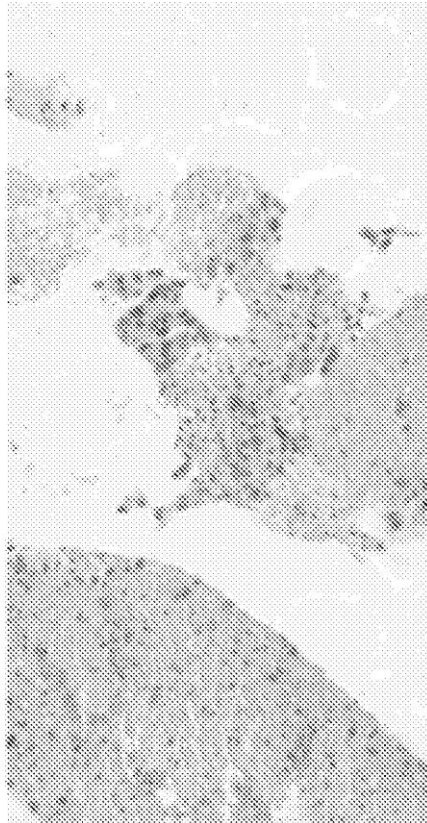
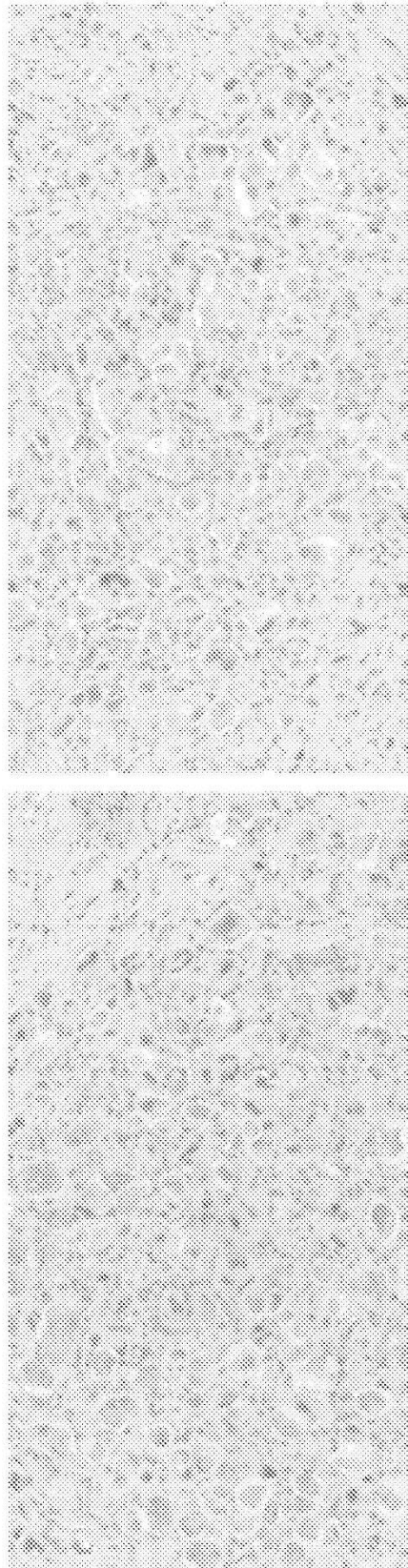


FIG. 10C

FIG. 10D



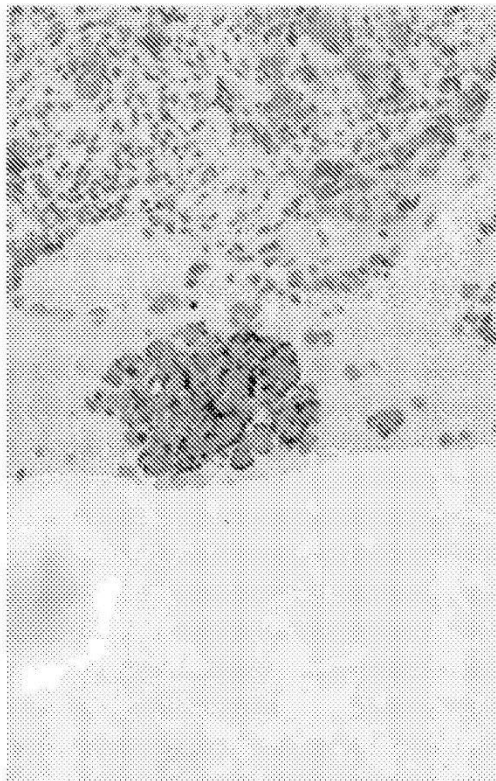
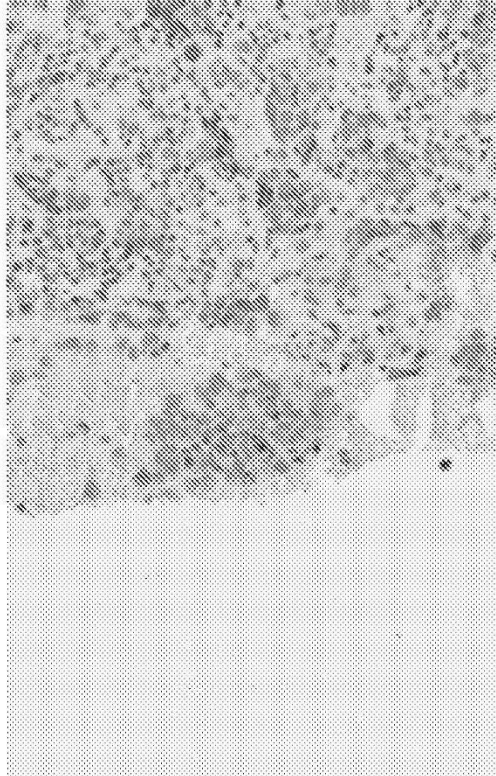


FIG. 11