

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 821**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2011 PCT/US2011/020080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO11087926**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2011 E 11700467 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2524231**

54 Título: **Un punto de corte en la expresión de la proteína PTEN que identifica tumores con precisión y es predictivo de la respuesta a fármacos a un inhibidor pan-ErbB**

30 Prioridad:

13.01.2010 US 294615 P

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

24.10.2017

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**COUGHLIN, CHRISTINA MARIE;
BERKENBLIT, ANNA;
FEINGOLD, JAY MARSHALL;
JOHNSTON, DANIEL STEPHEN;
STRAHS, ANDREW LOUIS y
ZACHARCHUK, CHARLES MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 638 821 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

Un punto de corte en la expresión de la proteína PTEN que identifica tumores con precisión y es predictivo de la respuesta a fármacos a un inhibidor pan-ErbB

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un inhibidor de la tirosina quinasa panErbB para usar en métodos para tratar el cáncer de mama. La presente invención se refiere además a métodos para determinar el tratamiento para un paciente de cáncer de mama. Más particularmente, la invención describe un punto de corte en un ensayo inmunohistoquímico cuantitativo para la expresión de la proteína PTEN que identifica tumores con precisión con dos
10 alelos inactivados del gen PTEN en muestras de biopsia de tumor humanos y que es predictiva de la respuesta a fármacos a un inhibidor pan-ErbB.

Antecedentes

El supresor de tumor PTEN es una fosfatasa de especificidad dual (lípidos y proteínas) que funciona como un controlador (o los "frenos") sobre el complejo de señalización PI3K. PTEN media la defosforilación del fosfatidilinositol-trifosfato (PIP₃) a fosfatidilinositol-difosfato (PIP₂), eliminando el sitio de unión a membrana para la
15 quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositido (PDK1) y la Akt/proteína quinasa B (PKB) y antagonizando así la actividad de PI3K. El gen *PTEN* (en el locus 10q23) se inactiva en una serie de tumores malignos humanos, que incluyen cánceres de mama, cerebro, endometrial, riñón, y próstata. La inactivación de *PTEN* se correlaciona con la progresión de la enfermedad y mal pronóstico, lo que sugiere un papel clave en la oncogénesis (Bose S, *et al* (2002) Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. *Hum. Pathol.* 33: 405-409; Rubin MA, *et al* (2000) 10q23.3 loss of heterozygosity is higher in lymph node-positive (pT2-3,N+) versus lymph node-negative (pT2-3, N0) prostate cancer, *Hum. Pathol.* 31: 504-508, y Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS (2001) Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer, *Mod. Pathol.* 14: 672-676).

25 En sistemas experimentales, se ha demostrado que la inactivación de *PTEN* conduce a la activación incontrolada de Akt/PKB. La actividad incontrolada de Akt/PKB conduce a la inhibición de la apoptosis, el crecimiento celular, y la proliferación aumentada, y posteriormente a un fenotipo oncogénico. La restauración de la expresión de *PTEN* en sistemas de *PTEN*-nulo conduce a la pérdida del fenotipo oncogénico.

En el cáncer de mama, se han demostrado múltiples mecanismos de pérdida de función de *PTEN*, que incluyen mutaciones, supresiones génicas, y regulación transcripcional a la baja a través miRNA o silenciamiento génico. La
30 mayoría de estos mecanismos de inactivación conducen a una reducción significativa en la cantidad de proteína PTEN que se produce en las células tumorales. En tumores que albergan dichos mecanismos de inactivación, se ha observado una reducción en los niveles de proteína PTEN en cáncer de mama usando diversas mediciones de proteína, que incluyen un método estándar usado en diagnóstico, inmunohistoquímico (IHC). Usando IHC, varios estudios han informado PTEN reducida en 15% al 48% de los pacientes. El espectro de mutaciones *PTEN*, supresiones génicas, y eventos epigenéticos como mecanismos de inactivación presentan un interesante estudio de biología tumoral, y las combinaciones variables de estos mecanismos de inactivación son propensos a contribuir a la heterogeneidad publicada en la literatura acerca de la reducción observada en la expresión de PTEN. Las mutaciones en el gen *PTEN* son bastante comunes en los tumores malignos, como el carcinoma de endometrio y el glioblastoma; sin embargo, tales mutaciones son relativamente raras en el cáncer de mama. Se encuentran mutaciones en el gen *PTEN* en aproximadamente el 5% de los pacientes y la mayoría representan mutaciones con desplazamiento de marco de lectura que pueden conducir a una proteína desestabilizada. Por el contrario, el principal mecanismo de inactivación de *PTEN* en cáncer de mama parece ser la supresión del gen *PTEN*. Se han identificado múltiples mecanismos adicionales de pérdida de *PTEN* más allá de la pérdida del gen o mutaciones. A nivel transcripcional, se ha descrito silenciamiento epigenético a través de la metilación del promotor o de la
45 expresión de miRNA (p. ej., miR-21). Otros mecanismos para reducir la expresión de PTEN implican pérdida de proteínas estabilizantes, como Rak, que fosforila PTEN, protegiéndola así de la degradación mediada por ubiquitina.

Se han publicado múltiples enfoques para IHC de PTEN con la tentativa de correlacionar la respuesta a fármacos (Véase por ejemplo, Berns K et al. (2007) A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer; *Cancer Cell* 12: 395-402; y Nagata Y et al (2004) PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients; *Cancer Cell* 6: 117-127).

Se ha mostrado que la pérdida de expresión de PTEN y la activación adicional de la ruta PI3K es un determinante principal de resistencia a trastuzumab en cáncer de mama. Los inhibidores de la tirosina quinasa pan-ErbB, como neratinib, se cree que inhiben la unión de PI3K a la porción intracelular de miembros de la familia de ErbB-como ErbB2- incluso con pérdida de expresión de PTEN y así estos tumores permanecen sensibles al tratamiento con neratinib.
55

Compendio de la invención

En la presente descripción se identifica un punto de corte en la expresión de proteína PTEN usando resultados cuantitativos. Este punto de corte permitirá la identificación precisa de pacientes que se beneficiarán de la terapia inhibidora de pan-ErbB. El punto de corte identifica con precisión tumores con dos alelos inactivados del gen PTEN en muestras de biopsias de tumores humanos y es predictivo de la respuesta a fármacos a un inhibidor pan-ErbB.

En una realización, la invención se refiere a un método para la determinación de tratar a un paciente con cáncer de mama. El método comprende obtener una célula tumoral y una célula no tumorigénica del paciente; determinar una medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN en la célula tumoral y en la célula no tumorigénica; y calcular un valor normalizado de expresión de proteína PTEN comparando estas dos medidas cuantitativas de la expresión de proteína PTEN. El paciente se trata con un inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB si el valor normalizado de la expresión de proteína PTEN es menor de 0,15. En algunas realizaciones de la invención, la célula no tumorigénica es una célula de estroma o una célula endotelial. En algunas realizaciones de la invención la célula tumoral y la célula no tumorigénica son de la misma muestra.

En algunas realizaciones de la invención el inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB previene la unión de PIK3CA a la porción intracelular de ErbB de una manera irreversible. En realizaciones particulares de la invención, el inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB es neratinib. En algunas realizaciones de la invención, la medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN comprende una o más de: matriz de proteínas en fase reversa, transferencia de Western, inmunohistoquímica semi-cuantitativa o cuantitativa (IHC). En realizaciones particulares de la invención, la medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN comprende IHC.

En algunas realizaciones, el método de la invención comprende determinar una medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN que comprende teñir la célula tumoral y la célula no tumorigénica. En algunas realizaciones de la invención, determinar una medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN comprende además obtener una imagen digital de las células teñidas. En realizaciones particulares de la invención, el valor de PTEN nulo es menor de 0,15.

En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB para usar en un método de tratamiento de cáncer en un paciente. El método comprende obtener una célula tumoral y una célula no tumorigénica del paciente; determinar una medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN en la célula tumoral y en la célula no tumorigénica; y calcular un valor normalizado de la expresión de proteína PTEN comparando estas medidas cuantitativas de expresión de la proteína PTEN. El paciente se trata con el inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB si el valor normalizado de la expresión de proteína PTEN comprende cualquier valor menor de 0,15.

Descripción detallada

La descripción proporciona un punto de corte, identificado usando resultados cuantitativos, que permite con precisión la identificación de pacientes que se beneficiarán de la terapia con inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB. En una realización, los resultados cuantitativos se obtienen usando IHC. Los pacientes con un valor normalizado de PTEN de menos de 0,15 (definido como "PTEN nulo") se tratarán con la terapia de inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB. En una realización, el valor normalizado de PTEN se calcula dividiendo el valor de la densidad óptica (DO) de la expresión de PTEN tumoral entre el valor de DO de expresión de PTEN del tejido no maligno.

En una realización, el método comprende generar dos valores de DO de expresión de PTEN usando imagen digital, un valor para las células tumorales y un valor para las células no malignas. Las células no malignas (p. ej. células de estroma o células endoteliales) y las células tumorales pueden estar contenidas en la misma sección de tejido. El valor PTEN normalizado global se calcula como la relación del valor de expresión DO PTEN obtenido para las células tumorales entre el valor de DO de expresión PTEN obtenido para las células normales, no malignas. El punto de corte definido por la invención permite que cada muestra del paciente sea identificada como PTEN inactivo (con un valor PTEN normalizado de 0), PTEN reducido (con un valor PTEN normalizado >0 pero menor de 0,15) y PTEN activado (con un valor de PTEN normalizado igual o superior a 0,15).

Un paciente con un valor PTEN normalizado que cae en la categoría de ya sea PTEN inactivo (valor de 0) o PTEN reducido (con un valor normalizado mayor que 0 pero menor que 0,15) se definirá como "PTEN nulo", y el paciente se tratará con un inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB. Si el valor PTEN normalizado es PTEN activado, el paciente se puede tratar con trastuzumab. En algunas realizaciones de la invención, el valor de DO de expresión PTEN es inferior al 15% del valor de DO de expresión del tejido normal, lo que da lugar a un valor PTEN normalizado de menos de 0,15 y una designación de PTEN reducido.

Está disponible la clasificación de los tumores según, p. ej., análisis de mutación, número de copias de ADN, estado de metilación, y patrones de expresión de genes o proteínas. Desde la aprobación del trastuzumab, casi la mitad de todos los nuevos compuestos aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos para tratar tumores se han asociado con alguna forma de biomarcador de selección de pacientes. Estos ejemplos se centran principalmente en la medición de la biología diana en muestras tumorales. Un desarrollo más reciente en la selección de los pacientes es la identificación de los mecanismos de resistencia a los fármacos en un esfuerzo para

distinguir aquellos pacientes que van a lograr un beneficio clínico de un agente específico de aquellos que no lo harán. Por ejemplo, el estado de mutación de [*KRAS*] del sarcoma de rata de Kirsten V-Ki-ras2 identifica aquellos pacientes que no se beneficiarán de la adición de inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) basados en anticuerpos en cáncer de colon (Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR et al (2009) American Society of Clinical Oncology opinión clínica provisional: testing for *KRAS* gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. J. Clin. Oncol. 27: 2091-2096).

Miembros de la familia RTK ErbB (*EGFR*, *HER2*, *HER3*, *HER4*) experimentan eventos genéticos que dan lugar a la activación de la señalización en múltiples tipos de cánceres humanos; aquellos que más a menudo se señalan en el cáncer de mama incluyen amplificaciones, mutaciones, y repeticiones intrónicas con un papel en la activación transcripcional. PI3K es una de las varias cascadas de señalización relacionadas con los complejos RTK oncogénicos en la membrana y puede representar una diana terapéutica clave (recientemente revisado por Engelman JA (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nat. Rev. Cancer 9: 550-562). El papel crítico de este nodo de señalización en el cáncer se pone de relieve por la proporción de tumores malignos humanos con lesiones genéticas en genes que codifican los componentes de la cascada, es decir *PIK3CA*, *PTEN*, *PDK1*, y *AKT*.

Las lesiones genéticas que dan lugar a la activación de la vía constitutiva en diversos tumores están en frentes opuestos. Por ejemplo, se observan mutaciones de ganancia de función o de activación en o la amplificación de la subunidad p110 α del gen *PIK3CA* en algunos tumores y actúan como los “aceleradores” de la cascada de señalización, mientras que los eventos de pérdida de función (es decir, supresión, metilación del promotor, o mutaciones) se ven generalmente para *PTEN* y actúan como los “frenos” en el sistema.

Los enfoques terapéuticos actuales en el cáncer de mama que se dirigen a esta vía incluyen inhibidores de vía ErbB (p. ej., trastuzumab, lapatinib, neratinib, BIBW2992), inhibidores de PI3K (p. ej., XL147, PX-866), inhibidores mTOR (p. ej., temsirolimus, everolimus), e inhibidores duales PI3K-mTOR (p. ej., BEZ235). La activación de la vía PI3K se ha asociado con la resistencia a la terapia dirigida por ErbB2 en cáncer de mama, así como a resistencia a citotóxicos. Dado que existen múltiples opciones terapéuticas y que la actividad PI3K predice la resistencia a fármacos en muchos entornos, surge la pregunta de si se pueden desarrollar los ensayos que permiten la predicción de la “vía PI3K” en muestras de tejido tumoral humano preservadas para el desarrollo clínico.

El neratinib (también llamado HKI-272) inhibe la fosforilación de los receptores ErbB y los sustratos corriente abajo; debido a esta actividad, se ha demostrado que el neratinib inhibe la fosforilación y activación del complejo PI3K en modelos preclínicos. Véase, p. ej., páginas 6-7 de la publicación PCT N° WO09/052264; párrafos 7 y 21 de la solicitud de publicación de patente de E.E.U.U. N° US20070104721; y Patente de E.E.U.U. N° 7.399.865.

Se ha asociado una disminución de la expresión de la proteína PTEN con la resistencia al tratamiento del cáncer de mama Her2+ con trastuzumab. Usando el ensayo de inmunohistoquímica semicuantitativo (IHC), se han asociado estos cambios con la resistencia a trastuzumab en cáncer de mama (véase Berns K, et al. (2007) Cancer Cell (4): 395-402).

La pérdida de PTEN se ha estudiado de forma rutinaria en la clínica usando enfoques de IHC estándar, generalmente con un anticuerpo que reconoce un epítipo C-terminal de la proteína. Usando un anticuerpo dirigido frente al extremo C-terminal de la proteína dará lugar a poca o ninguna señal generada en tumores que albergan mutaciones que producen formas truncadas de la proteína. Existen en la literatura varios ejemplos de concordancia frente a discordancia entre los eventos de pérdida genética conocidos y la expresión de PTEN por IHC; esto puede dar lugar a algunos problemas en la interpretación de la biología subyacente (Bose S, et al. (2002) Reduced expression of PTEN corelates with breast cancer progression, Hum. Pathol. 33: 405-409, y Bettendorf O, et al. (2008) Chromosomal imbalances, loss of heterozygosity, and immunohistochemical expression of TP53, RB1, and PTEN in intraductal cancer, intraepithelial neoplasia, and invasive adenocarcinoma of the prostate, Genes Chromosomes Cancer 47: 565-572). Existen varias explicaciones potenciales para la discordancia entre el porcentaje de pacientes con lesiones genéticas y aquellos con niveles de proteína disminuidos. Sin pretender imponer ninguna teoría, los métodos IHC pueden ser cualitativos o semicuantitativos y las diferencias en la interpretación pueden dar lugar a resultados diferentes. Los métodos IHC detectan todas las especies de proteína de longitud completa (funcionales o disfuncionales) y niveles “bajos” de proteína pueden derivar de cualquiera de las mutaciones desestabilizantes, expresión de miRNA, o proteínas estabilizadoras co-expresadas, mientras que se puede observar un complemento completo de la proteína PTEN con una mutación puntual en el dominio fosfatasa (Mahema T (2007) PTEN: its deregulation and tumorigenesis. Biol. Pharm. Bull. 30: 1624-1627, y Yim EK, Peng G, Dai H et al (2009) Rak functions as a tumor supresor by regulating PTEN protein stability and function, Cancer Cell 15: 304-314).

En algunas realizaciones, el neratinib se administra a un sujeto a una dosis entre 100 y 500 mg por día, entre 200 y 400 mg por día, y a una dosis de aproximadamente 250 mg por día.

En algunas realizaciones, la invención proporciona neratinib para usar en un método de tratamiento del cáncer de mama con neratinib en conjunción con otro tratamiento para el cáncer de mama. Tratamiento o tratamientos

adicionales pueden incluir cirugía, radiación o agentes quimioterápicos adicionales seleccionados entre uno o más de los siguientes: inhibidores de la aromatasas, que incluyen letrozol (Femara), anastrozol (Arimidex) y exemestano (Aromasin); goserelina (Zoladex); antraciclinas, que incluyen doxorubicina (Adriamicina), epirubicina (Ellence), y doxorubicina liposomal (Doxil); taxanos, que incluyen docetaxel (Taxotere), paclitaxel (Taxol), y paclitaxel unido a proteína (Abraxane), Ciclofosfamida (Cytoxan); Capecitabina (Xeloda) y 5 fluorouracilo (5 FU), Vinorelbina (Navelbine); Gemcitabina (Gemzar); y Trastuzumab (Herceptin).

El término “tratar” como se usa en esta memoria, a menos que se indique lo contrario, significa revertir, aliviar, o inhibir el progreso del trastorno o afección a la que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección. El término “terapia” y “tratamiento”, como se usa en esta memoria, a menos que se indique lo contrario, se refiere al acto de tratar como se acaba de definir “tratar”. Como se usa en esta memoria, “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente.

“No maligno” y “no tumorigénico” se usan indistintamente en esta memoria.

En una realización, se usan métodos IHC estándar para teñir tumores para la expresión de la proteína PTEN. Se obtienen imágenes digitales y se obtienen valores numéricos de DO tanto para expresión de PTEN de tejido normal (p. ej. célula de estroma o endotelial), así como para compartimentos PTEN tumorales. El valor de PTEN normalizado de las muestras se calcula como el valor de DO de expresión de PTEN tumoral dividido por el valor de DO de expresión de PTEN de tejido normal (o no maligno). Este proceso de normalización de la DO de PTEN específica de tumor con la DO de tejido normal, no maligno permite la corrección de las diferencias de tinción usando el control interno de la tinción de tejido no maligno para cada muestra.

Una disminución en el valor de PTEN normalizado significa una disminución de los niveles de proteína PTEN en comparación con los niveles de proteína PTEN vistos en células normales, no malignas o no tumorigénicas (p. ej. células de estroma o endoteliales). Las células de estroma o endoteliales pueden estar presentes en la misma sección de tejido como las células tumorales.

“Neratinib” es un inhibidor irreversible 4-anilinoquinolina-3-carbonitrilo 6,7-disustituido disponible por vía oral del receptor de tirosina quinasa HER-2 con potencial actividad antineoplásica. El neratinib se une al receptor HER-2 irreversiblemente, reduciendo de este modo la autofosforilación en las células, aparentemente orientando un residuo de cisteína en el bolsillo de unión de ATP del receptor. El tratamiento de las células con este agente da lugar a una inhibición de los eventos de transducción de señal corriente abajo y las vías reguladoras del ciclo celular; detención de la transición a la fase G1-S (Gap 1/síntesis de ADN) del ciclo de división celular; y, por último, disminución de la proliferación celular. El neratinib también inhibe la quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la proliferación de las células dependientes de EGFR.

“Trastuzumab” y “Herceptin” se refieren a un anticuerpo monoclonal que se une al dominio de membrana externo del receptor HER2/Neu. Los receptores ErbB/HER son proteínas que están embebidas dentro de la membrana celular y comunican señales moleculares desde fuera de la célula hacia dentro de la célula, y activan y desactivan genes. Las proteínas ErbB/HER regulan las funciones de crecimiento, supervivencia, adhesión, migración, y diferenciación celulares que se amplifican o se debilitan en las células cancerosas.

La inmunohistoquímica cuantitativa se usa para evaluar la expresión de proteína de la proteína PTEN en muestras preservadas de tumores humanos de pacientes. Los niveles de proteína PTEN se miden usando sistemas de imagen digital que son capaces de cuantificar los niveles de expresión de proteína (p. ej. como el Aperio Digital Pathology Environment (Vista, California) o el Automated Quantitative Analysis (AQUA; HistoRx, New Haven, Connecticut). Estos sistemas para análisis de imagen usan píxeles para determinar el valor numérico de IHC cuantitativa para la DO de las células que se seleccionan para el análisis.

Un “valor de PTEN normalizado” se define como la relación de la expresión de proteína PTEN en una muestra de tejido tumoral dividido entre la expresión de proteína PTEN en una muestra de tejido no tumorigénico. Las muestras de tejido no tumorigénico y las muestras de tejido tumoral se pueden encontrar en la misma sección de tejido de mama.

El “valor de PTEN” se calcula como la relación de valor de DO de expresión de PTEN de la célula tumoral, normalizado (dividido por) el valor de DO de expresión de PTEN del tejido normal. La expresión de tejido normal se puede definir como el valor de DO de expresión de PTEN en células de estroma o células endoteliales (o cualquier otra célula de tejido normal que están teñidas). Las células de tejido no tumorigénico y las células de tejido tumoral se pueden teñir en la misma sección de tejido.

Como se usa en esta memoria, los valores de PTEN normalizados se pueden definir como PTEN nulo o PTEN activado. El PTEN nulo comprende el grupo de pacientes con valores de PTEN de PTEN inactivado y de PTEN reducido. El valor PTEN de *PTEN inactivado* corresponde a una muestra de tejido con expresión de proteína PTEN no detectable (valor de DO de expresión de PTEN de 0). Esta muestra de tejido tendrá un valor PTEN normalizado de 0. Un valor PTEN de *PTEN reducido* corresponde a una muestra de tejido con un intervalo detectable de expresión de proteína PTEN (es decir, el valor de DO de expresión de PTEN tumoral es >0 pero menos de 15% del valor total para el tejido no tumorigénico). En una realización, la denominación de PTEN reducido se origina cuando

una muestra de paciente demuestra un valor de PTEN normalizado de más de 0 pero menos que 0,15. En una realización, la denominación de PTEN reducido se origina a partir de una muestra de paciente con un valor de PTEN normalizado de más de 0 pero menor que igual a 0,10. Un valor PTEN normalizado igual a o mayor que 0,15 corresponde a *PTEN ACTIVADO*. Una denominación de *PTEN ACTIVADO* se define como un valor de PTEN donde se detecta al menos un alelo de PTEN funcional, normal en ensayos genéticos. Un valor de PTEN nulo es un valor de PTEN normalizado de menos de 0,15. El valor de PTEN nulo puede ser cualquier número entre 0 y 0,15, por ejemplo 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, o cualquier porción del mismo.

Como se usa en la especificación y las reivindicaciones, la forma singular de “un”, “una”, y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Los valores de DO de expresión de PTEN tumoral varían generalmente de 0 a 30 (usando la imagen digital y la DO). En una realización, usando métodos IHC estándar, semi-cuantitativos, una intensidad 3+ (o valor muy alto) se representa generalmente mediante valores de DO de expresión de 20 o mayores. Un valor de DO de expresión de gama media sería generalmente de 5-20 (generalmente intensidad de 1+ a 2+ usando métodos semi-cuantitativos) y bajo de 0-5 (que probablemente representa una mezcla de 0 e intensidad 1+ usando IHC semi-cuantitativo estándar). Todos estos valores de DO de expresión se normalizan después con un valor de DO de expresión de PTEN de “tejido normal” generalmente en el intervalo 20-25 en el ensayo actual que se está usando que es una mancha marrón de IHC estándar con el sistema de imagen digital Aperio. El sistema de imagen digital Aperio genera una densidad óptica (DO) para el tejido y parámetro de tinción seleccionado.

Un punto de corte en el valor de PTEN normalizado que identifica el grupo “PTEN nulo” de tumores selecciona de forma fiable los tumores con proteína PTEN no funcional. El punto de corte se determinará como ese valor de expresión de PTEN normalizado que identifica de manera fiable las muestras de tumores de pacientes con desregulación de ambos alelos de PTEN. Además, los pacientes con tumores que caen dentro del grupo de “PTEN nulo” se prevé que sean aquellos con respuesta clínica superior a un inhibidor pan-ErbB.

Enfoques semi-cuantitativos anteriores han dividido los pacientes en múltiples segmentos basados en la tinción inmunohistoquímica de PTEN. La mayoría de estos estudios no han encontrado que los diferentes niveles de PTEN observados en muestras tumorales de pacientes se correlacionan con la respuesta al fármaco. Se han demostrado diferentes resultados con respecto a la información pronóstica proporcionada por la tinción de PTEN en el cáncer renal. Véase por ejemplo, Pantuck AJ et al. (2007) Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy, *Cancer* 109(11): 2257-2267; y Hager M et al. (2007) PTEN expression in renal cell carcinoma and oncocytoma and prognosis, *Pathology* 39(5): 482-485.

Existen dos alelos de PTEN en el locus 10q23. En muchos tumores, ambos loci se ven afectados por uno de varios mecanismos de inactivación como metilación del promotor, supresión génica, o mutación. Un punto de corte en la expresión de proteína PTEN determinará que se identifiquen de forma fiable aquellos tumores con dianas en ambos alelos del gen PTEN y por lo tanto, proteína PTEN mínima o no funcional.

En el cáncer de mama, se han demostrado múltiples mecanismos de pérdida de función de *PTEN*, que incluyen mutaciones, supresiones génicas, y regulación transcripcional a la baja a través de miRNA o silenciamiento génico. Se observa reducción en los niveles de proteína PTEN en cáncer de mama usando inmunohistoquímica (IHC); varios estudios han informado PTEN reducida en el 15% a 48% de los pacientes (Depowski PL, Rosenthal SI, y Ross JS (2001) Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer, *Mod. Pathol.* 14: 672-676; Bose S, et al (1998) Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas, *Oncogene* 17: 123-127.34; Perez-Tenorio G, et al (2007) PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 13: 3577-3584; Saal LH, et al (2005) PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma, *Cancer Res.* 65: 2554-2559; y Perren A, et al (1999) Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast, *Am. J. Pathol.* 155: 1253-1260).

El espectro de mutaciones, supresiones génicas, y eventos epigenéticos de *PTEN* como mecanismos de inactivación presentan un estudio interesante de biología tumoral, y las combinaciones de variables de estos mecanismos de inactivación son propensos a contribuir a la heterogeneidad publicada en la literatura a cerca de la reducción observada en la expresión de PTEN. Las mutaciones en el gen *PTEN* son bastante comunes en tumores malignos, como carcinoma endometrial y glioblastoma; sin embargo, tales mutaciones se encuentran en sólo aproximadamente el 5% de los pacientes de cáncer de mama. La mayoría de estas mutaciones representan mutaciones de desplazamiento del marco de lectura, que si el gen retiene la capacidad de ser traducido, conduce a menudo a una proteína desestabilizada. Por el contrario, el principal mecanismo de inactivación de *PTEN* en el cáncer de mama parece ser la supresión del gen *PTEN*. Se han identificado múltiples mecanismos adicionales de pérdida de *PTEN* más allá de la pérdida génica o mutaciones, que representan a menudo el mecanismo de desregulación del segundo alelo, no suprimido en tumores. A nivel transcripcional, se ha descrito silenciamiento epigenético a través de metilación del promotor o expresión de miRNA (p. ej., miR-21). Otros mecanismos para reducir la expresión de PTEN implican la pérdida de proteínas estabilizadoras, como Rak, que fosforila PTEN,

protegiéndola así de la degradación mediada por ubiquitina.

Se contemplan métodos alternativos para evaluar la expresión de proteína PTEN para usar en la práctica de la invención. Métodos cuantitativos, como tecnología de microarrays de proteínas en fase inversa o un método IHC cuantitativo, pueden permitir la detección de mínimos cambios en los niveles de proteína que no se detectan mediante IHC estándar. Estos métodos han mostrado una mejor concordancia entre la interpretación de los niveles de proteína PTEN y la genética (Yim EK, et al (2009) Rak functions as a tumor supressor by regulating PTEN protein stability and function, Cancer Cell 15: 304-314; Stemke-Hale K, et al (2008) An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer, Cancer Res. 68: 6084-6091; Zhou J, et al (2007) Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104: 16158-16163). Estas nuevas mediciones cuantitativas de proteína son aplicables en muestras preservadas y como ensayos son potencialmente más fiables en el estudio de la biología de la vía subyacente en comparación con la IHC estándar. Métodos cuantitativos alternativos como el RPPA también requerirán el desarrollo del punto de corte para el valor de expresión de proteína PTEN.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

La presente invención se refiere a métodos para determinar el tratamiento de un paciente con cáncer de mama. Se obtiene una sección de tejido entero de un paciente y se tiñe usando inmunohistoquímica (IHC), para la expresión de proteína PTEN usando un anticuerpo que reconoce el dominio C-terminal de la proteína. Se obtiene una imagen digital del tejido teñido para identificar las células tumorales y las células de tejido normal en la muestra. Se obtiene el valor de DO de expresión de proteína PTEN de la célula tumoral y se obtiene el valor de DO de expresión del normal, no maligno. Una comparación de la DO de expresión de proteína PTEN en células tumorales con la DO de expresión de proteína PTEN en células de tejido normal proporciona un valor de PTEN normalizado (DO de PTEN de célula tumoral/ DO de PTEN de tejido normal).

Los valores de PTEN normalizados varían generalmente de 0 a 1. En base a los valores de PTEN normalizados, el paciente se clasifica como PTEN inactivado, PTEN reducido, o PTEN activado. Pacientes con un valor de PTEN normalizado de 0 se colocan en la categoría de PTEN inactivado. La denominación clínica de "PTEN nulo" incluye aquellos pacientes sin expresión de la proteína PTEN y aquellos pacientes con un valor de DO de expresión de proteína PTEN tan bajo que no es detectable por IHC (valor de PTEN normalizado de 0 o PTEN inactivado). Los pacientes con un valor de PTEN normalizado mayor que 0 pero menor que 0,15 (o que tienen un valor de DO de expresión de PTEN tumoral que es menor de 15% del valor de DO de expresión del tejido normal) se colocan dentro de la clasificación de PTEN reducido. Los grupos de PTEN inactivado y PTEN reducido se correlacionan ambos con una pérdida casi completa de la función génica de PTEN a través de alcances a los dos alelos del gen de PTEN. La función apropiada de al menos uno de los dos alelos de PTEN produce un valor normalizado de al menos 0,15. Los pacientes con un valor de PTEN normalizado de al menos 0,15 se colocan dentro de la clasificación de PTEN ACTIVADO.

Los pacientes identificados como "PTEN nulo" (en la categoría de cualquiera de PTEN inactivado o PTEN reducido, o que tienen un valor de PTEN normalizado de menos de 0,15) se tratan con neratinib y los pacientes identificados como PTEN ACTIVADO se pueden tratar con una terapia diferente.

Ejemplo 2

Se determinaron los valores manuales de PTEN de estroma (no maligno) y de PTEN tumoral por un patólogo usando métodos estándar, semi-cuantitativos. Se determinaron los valores de DO de PTEN de estroma y de PTEN tumoral usando imagen digital, como el sistema de imagen digital Aperio. El sistema de imagen digital Aperio genera una densidad óptica (DO) para el tejido y parámetro de tinción seleccionados. Las células no malignas (es decir, células de estroma) y las células tumorales están normalmente contenidas en la misma sección de tejido. El valor de la relación PTEN (normalizado) se calculó como el valor de DO de PTEN obtenido para las células tumorales dividido por el valor de DO de PTEN obtenido de células de estroma. Se proporcionan los valores de PTEN y las relaciones para un grupo de 27 pacientes en la Tabla A:

Número de sujeto	Valor manual de PTEN de estroma	Valor de DO de PTEN de estroma	Valor manual de PTEN tumoral	Valor de DO de PTEN tumoral	Valor de la relación de PTEN
1	3+	21	0	0	0,00*
2	2+	12	2+	10	0,83
3	2+	13	0	0	0,00*
4	2+	17	0	0	0,00*

ES 2 638 821 T3

5	1+	18	2+	19	1,06
6	2+	17	1+	9	0,53
7	2+	18	2+	16	0,89
8	3+	20	2+	12	0,60
9	2+	21	2+	22	1,05
10	2+	15	2+	12	0,80
11	2+	18	2+	10	0,56
12	3+	24	3+	21	0,88
13	3+	21	2+	14	0,67
14	2+	21	2+	21	1,00
15	1+	16	2+	13	0,81
16	2+	23	1+	15	0,65
17	3+	23	3+	21	0,91
18	3+	16	1+	12	0,75
19	2+	20	2+	26	1,30
20	2+	18	0	0	0,00*
21	3+	21	0	0	0,00*
22	2+	11	2+	10	0,91
23	1+	11	2+	14	1,27
24	2+	11	2+	13	1,18
25	3+	17	2+	19	1,12
26	2+	16	0	0	0,00*
27	2+	19	2+	13	0,68

5 El punto de corte definido por la invención permite que cada muestra de paciente sea identificada como PTEN inactivado (con un valor de la relación PTEN de 0), PTEN reducido (con un valor de la relación PTEN >0 pero menos de 0,15) y PTEN ACTIVADO (con un valor de la relación PTEN igual a o más de 0,15). Los pacientes identificados como "PTEN nulo" (en la categoría de cualquiera de PTEN inactivado o de PTEN reducido o que tiene un valor de la relación PTEN de menos de 0,15- identificados en la Tabla A con "*") se tratan con un inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB como neratinib. (Los pacientes identificados como PTEN ACTIVADO se pueden tratar con una terapia diferente, p. ej. trastuzumab).

10 Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la especificación son indicativas del nivel de aquellos expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el tratamiento para un paciente con cáncer de mama que comprende:
 obtener una célula tumoral y una célula no tumorigénica del paciente;
 5 determinar una medida cuantitativa de la expresión de la proteína PTEN en la célula tumoral y en la célula no tumorigénica;
 calcular un valor de expresión de proteína PTEN normalizado comparando la medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN en la célula tumoral con la medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN en la célula no tumorigénica; y
 10 determinar tratar al paciente con un inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB si el valor de expresión de proteína PTEN es menor de 0,15.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la célula no tumorigénica es una célula de estroma o una célula endotelial.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la célula tumoral y la célula no tumorigénica son de la misma muestra.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB previene la unión de PIK3CA a la porción intracelular de ErbB de una forma irreversible.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB es neratinib.
- 20 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN comprende uno o más de: matriz de proteínas en fase reversa, transferencia de western, e inmunohistoquímica (IHC) semi-cuantitativa o cuantitativa.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde determinar una medida cuantitativa de expresión de proteína PTEN comprende teñir la célula tumoral y la célula no tumorigénica, y en donde dicha determinación de una medida cuantitativa de expresión de proteína PTEN comprende opcionalmente obtener una imagen digital de las células teñidas.
- 25 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN es un valor de densidad óptica de expresión de PTEN.
9. Un inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB para usar en un método para tratamiento del cáncer en un paciente que comprende:
 30 obtener una célula tumoral y una célula no tumorigénica del paciente;
 determinar una medida cuantitativa de expresión de proteína PTEN en la célula tumoral y en la célula no tumorigénica;
 calcular un valor normalizado de la expresión de proteína PTEN comparando la medida cuantitativa de expresión de proteína PTEN en la célula tumoral con una medida cuantitativa de la expresión de proteína PTEN en la célula no tumorigénica; y
 35 tratar al paciente con el inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB si el valor normalizado de la expresión de proteína PTEN comprende cualquier valor de menos de 0,15.
10. El inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB para uso de la reivindicación 9, en donde la célula no tumorigénica es una célula de estroma o una célula endotelial.
- 40 11. El inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB para uso de la reivindicación 9 o 10, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB previene la unión de PIK3CA a la porción intracelular de ErbB de una forma irreversible.
12. El inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB para uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB es neratinib.
- 45 13. El inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB para uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 o 12, en donde la medida cuantitativa de expresión de proteína PTEN comprende una o más de: matriz de proteínas en fase reversa, transferencia de western, e inmunohistoquímica (IHC) semi-cuantitativa o cuantitativa.
14. El inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB para uso de las reivindicaciones 9 a 13, en donde la célula

tumoral y la célula no tumoral son de la misma muestra.

5 **15.** El inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB para uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 o 14, en donde determinar una medida cuantitativa de expresión de proteína PTEN comprende teñir la célula tumoral y la célula no tumoral, y en donde dicha determinación de una medida cuantitativa de expresión de proteína PTEN comprende opcionalmente una imagen digital de las células teñidas.

16. El inhibidor de la tirosina quinasa pan-ErbB para uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en donde la medida cuantitativa de expresión de proteína PTEN es un valor de densidad óptica de expresión de PTEN.