

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 709**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2013** **PCT/US2013/034013**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13148775**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2013** **E 13769291 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018** **EP 2831282**

54 Título: **Biomarcador predictivo mediado por un inhibidor de CDK útil para la terapia contra el cáncer**

30 Prioridad:

30.03.2012 US 201261618087 P

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

10.10.2018

73 Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
07065-0907 Rahway , New Jersey , US

72 Inventor/es:

BOOHER, ROBERT NOLAN;
HIRSCH, HEATHER A.;
ZAWEL, LEIGH SCOTT y
FAWELL, STEPHEN ERIC

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 685 709 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

Biomarcador predictivo mediado por un inhibidor de CDK útil para la terapia contra el cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a la identificación de biomarcadores cuyos niveles de expresión son útiles para predecir la respuesta de un paciente al tratamiento con un agente antiproliferativo, en particular uno que sea sensible a un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDK). El nivel de expresión del biomarcador
10 identificado puede usarse para predecir un paciente que presente una afección cancerosa que esté mediada por la inhibición de la apoptosis y que probablemente responda al tratamiento con un inhibidor de CDK antes de la dosificación con el inhibidor de CDK.

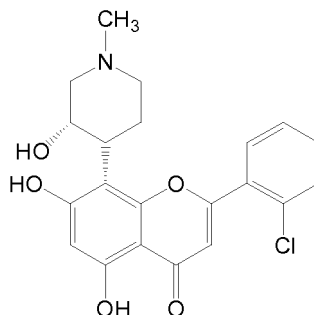
15 **Antecedentes de la invención**

Los inhibidores de proteína cinasa incluyen cinasas tales como, por ejemplo, los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina (CDK), la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK/ERK), la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3beta) y similares. Se describen inhibidores de proteína cinasa, por ejemplo, por M. Hale *et al.*, en el documento WO02/22610A1 y por Y. Mettey, *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2003, 46: 222236. Las cinasas dependientes de ciclina son serina/treonina proteína cinasas, que son la fuerza impulsora detrás del ciclo celular y la proliferación celular. Las CDK individuales, tales como CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6 y CDK7, CDK8 y similares, desempeñan funciones distintas en la progresión del ciclo celular y pueden clasificarse como enzimas de fase G1, S o G2M. La proliferación incontrolada es un sello distintivo de las células cancerosas y la mala regulación de la función de CDK se produce con alta frecuencia en muchos tumores sólidos importantes. CDK2 y CDK4 son de particular interés porque sus actividades frecuentemente están mal reguladas en una amplia diversidad de cánceres humanos. La actividad de CDK2 es necesaria para la progresión a través de G1 hasta la fase S del ciclo celular y CDK2 es uno de los componentes clave del punto de control G1. Los puntos de control sirven para mantener la secuencia adecuada de los eventos del ciclo celular y permiten que la célula responda a las lesiones o a las señales proliferativas, mientras que la pérdida del control adecuado del punto de control en las células cancerosas contribuye
30 a la oncogénesis.

La vía de CDK2 influye en la oncogénesis a nivel de la función supresora tumoral (por ejemplo, P52, RB y p27) y la activación de oncogenes (ciclina E). Muchos informes han demostrado que tanto el coactivador, ciclina E, como el inhibidor, p27, de CDK2 están ya sea sobreexpresados o subexpresados, respectivamente, en el cáncer de mama, de colon, de pulmón no microcítico, gástrico, de próstata, de vejiga y el linfoma no Hodgkin, el cáncer de ovarios y otros cánceres. Se ha demostrado que su expresión alterada se correlaciona con un aumento de los niveles de actividad de CDK2 y una supervivencia global escasa. Esta observación hace que CDK2 y sus vías reguladoras sean dianas convincentes para el desarrollo como agentes terapéuticos para trastornos antiproliferativos, tales como el cáncer.
35

Se han notificado en la bibliografía moléculas orgánicas pequeñas competitivas frente a adenosina 5'-trifosfato (ATP), así como péptidos, como inhibidores de CDK para el tratamiento potencial de diversos tipos de cáncer. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. 6.413.974, que describe diversos inhibidores de CDK y su relación con diversos tipos de cáncer.
40

Se conocen otros inhibidores de CDK. Por ejemplo, el flavopiridol, cuya estructura se muestra a continuación, es un inhibidor de CDK no selectivo que se está sometiendo a ensayos clínicos en seres humanos, A. M. Sanderowicz *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 1998, 16: 2986-2999.
45



Otros inhibidores de CDK conocidos incluyen, por ejemplo, olomoucina (J. Vesely *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1994, 224: 771-786) y roscovitina (L. Meijer, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1997, 243: 527-536). La Patente de los EE.UU. N.º 6.107.305 describe ciertos compuestos de pirazolo[3,4-b]piridina como inhibidores de CDK. K. S. Kim, *et al.*, *J. Med. Chem.* 2002, 45: 3905-3927 y el documento WO 02/10162 desvelan ciertos compuestos de aminotiazol como
55

inhibidores de CDK.

La proteína de leucemia de células mieloides (MCL)-1 es un miembro de la familia de BCL-2 antiapoptótico que posee características que lo hacen potencialmente útil como biomarcador predictivo de agentes terapéuticos antiproliferativos, tales como inhibidores de CDK, para su uso en el tratamiento de trastornos proliferativos tales como el cáncer (A. Mandelin y R. Pope, *Expert Opin. Ther. Targets*, 2007, 11 (3): 363-373). En particular, se ha notificado que MCL-1 se expresa en gran medida en leucemias y linfomas humanos y se cree que la supresión de MCL-1 promueve la apoptosis (Mandelin y Pope, 2007, 367-368). También se ha notificado que el aumento de la expresión de MCL-1 se asoció a la incapacidad de conseguir la remisión después del tratamiento con fludarabina y clorambucilo en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) (F.T. Awan, *et al.*, *Blood*, 2009, 113 (3): 535-537). GEORG FELDMANN ET AL, 2011 ("*Cyclin-dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft models*", *CANCER BIOLOGY & THERAPY*, volumen 12, n.º 7, 1 de octubre de 2011 (01-10-2011), páginas 598-609) desvela que la inmunotinción de Ki67 puede usarse como un marcador de respuesta a dinaciclib (véase la página 602, columna 1).

Existe la necesidad de biomarcadores que puedan usarse para predecir qué pacientes son susceptibles de tratamiento con terapias específicas, en particular para pacientes que no sean sensibles o se vuelven resistentes a terapias de primera línea. Es, por tanto, un objetivo de la presente invención proporcionar un biomarcador predictivo para seleccionar pacientes que probablemente respondan al tratamiento con un inhibidor de CDK.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere en general a la identificación de un biomarcador predictivo cuyo nivel de expresión es útil para evaluar y clasificar pacientes para el tratamiento con un inhibidor de CDK. En la invención, el biomarcador predictivo, la relación de MCL-1:BCL-xL, se usa para predecir la respuesta de un paciente diagnosticado con cáncer al tratamiento con un inhibidor de CDK, en el que el inhibidor de CDK es SCH 727965 (Dinaciclib). En otra realización, la invención es un método para identificar a un paciente diagnosticado con cáncer que se predice que responde al tratamiento con un inhibidor de CDK, en el que el inhibidor de CDK es SCH 727965 (Dinaciclib). También se describe un método para tratar a un paciente diagnosticado con un cáncer asociado a CDK mediante la administración de un inhibidor de CDK, en el que las células cancerosas de dicho paciente se caracterizan por un nivel de expresión génica de la relación de MCL-1:BCL-xL superior a un valor de referencia predeterminado. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el valor de referencia predeterminado se obtiene de células de pacientes que no se han diagnosticado con cáncer. La relación de niveles de expresión de los genes MCL-1:BCL-xL es el nivel de ARNm.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración gráfica de los múltiples mecanismos mediante los cuales el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), actúa contra complejos de CDK/ciclina cinasa.

La Figura 2 es una ilustración gráfica de la inhibición de la fosforilación de RNAPII CTD por inhibidores de CDK, tales como flavopiridol, SNS-032 y SCH 727965 (Dinaciclib), que inhibe la transcripción y disminuye la expresión de proteínas antiapoptóticas y pro-oncogénicas de vida corta que conducen a la apoptosis.

La Figura 3 es una ilustración gráfica de la actividad antiproliferativa del inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), en un amplio intervalo de estirpes celulares tumorales.

La Figura 4 es una ilustración gráfica que muestra la sensibilidad diferencial (viabilidad media) de dos estirpes celulares al inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), en puntos temporales variables para un respondedor.

Las Figuras 5A y 5B son ilustraciones gráficas de la sensibilidad diferencial a la exposición a corto plazo de un inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), correlacionada con la relación de ARNm de MCL1:BCL-xL en 8 horas (Figura 5A) (para tres estirpes celulares) o un ensayo de viabilidad de 18 horas (Figura 5B) (para 23 estirpes celulares tumorales). El porcentaje de viabilidad se correlaciona inversamente con la relación de ARNm de MCL1:BCL-xL, en el que una relación alta se correlaciona con la inducción de la apoptosis (H23 en la Figura 5A).

Las Figuras 6A y 6B son ilustraciones gráficas de la regulación negativa de la expresión del ARNm de MCL-1 en células de cáncer de ovario tratadas con 100 nM del inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib). La Figura 6A muestra los niveles de ARNm de cinco genes analizados cada hora durante 5 horas, mientras que la Figura 6A es una gráfica reescalada para cuatro de los transcritos menos abundantes de la Figura 6A. Los niveles de ARNm de MCL-1 disminuyeron drásticamente en las 3 horas siguientes a la adición del inhibidor de CDK.

Las Figuras 7A y 7B son ilustraciones del análisis por transferencia de Western del curso temporal durante el tratamiento continuo (Figura 7A) y el lavado posterior (Figura 7B) para el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib).

La Figura 8 es una ilustración del análisis por transferencia de Western de la respuesta de escisión de PARP diferencial al tratamiento a corto plazo con el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib). Las estirpes celulares que expresan la relación de MCL-1:BCL-xL más alta (lado izquierdo de la figura) presentaron niveles de PARP escindida más altos, es decir, una medición de la apoptosis y una mayor sensibilidad al inhibidor de CDK.

Las Figuras 9A y 9B son ilustraciones gráficas que muestran que la inducción de la apoptosis se correlaciona con la relación de MCL-1:BCL-xL cuando se trata con el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), ambas en

términos de escisión de PARP (Figura 9A) y de activación de caspasa-3/7 (Figura 9B).

La Figura 10 es una ilustración gráfica que muestra que altos niveles de expresión de ARNm de la relación MCL-1:BCL-xL se correlacionan con la sensibilidad a un inhibidor de CDK en hemo 387 (leucemia y linfoma) y estirpes celulares de tumor maligno sólido después de 24 horas de tratamiento con SCH 727965 (Dinaciclib). El coeficiente de correlación (r) como se muestra fue de -0,41 ($p = 5e-17$).

La Figura 11 es una ilustración del análisis por inmunotransferencia de la inducción de la apoptosis por un inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib) en un panel de xenoinjerto de tumor sólido para muestras tumorales con una relación alta de MCL-1:BCL-xL. El análisis farmacodinámico del xenoinjerto se realizó 6 horas después de la dosis (40 mg/kg) del inhibidor de CDK. Los análisis por inmunotransferencia de los extractos tumorales (dos muestras representativas) se muestran en el lado izquierdo y los tratamientos se muestran en el lado derecho de la transferencia. Estirpes celulares: H23 (cáncer de pulmón no microcítico); A2780 (ovario); Colo320DM (colon); 22Rv1 (próstata); JIMT-1 (cáncer de mama); MDA-MB-231 (cáncer de mama); SW480 (colon); y PC-3 (próstata).

Descripción detallada de la invención

Como reconocen diversos investigadores del cáncer, es cada vez más importante identificar un biomarcador o biomarcadores respondedores potenciales útiles para predecir la eficacia terapéutica de un agente antineoplásico, por ejemplo, inhibidor de CDK, en particular para su uso en ensayos clínicos y para el diseño de pautas de tratamiento. El análisis del biomarcador o biomarcadores respondedores a la expresión se considera más viable y representa una carga menor para los pacientes, porque el número de muestras necesarias para el análisis es menor en comparación con el análisis de biomarcadores convencionales, tales como, la detección de la fosforilación de proteínas con inmunohistoquímica o secuenciación de ADN para detectar una alteración genética.

La presente invención se relaciona con el descubrimiento de un biomarcador respondedor para el inhibidor selectivo de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), que tiene utilidad para predecir la respuesta de un paciente a un protocolo de tratamiento que comprende un inhibidor de CDK. Los solicitantes descubrieron que el nivel de expresión génica de MCL-1 y BCL-xL (también conocido como BCL2L1) y específicamente el nivel de expresión de MCL-1 en relación con BCL-xL, denominado en el presente documento como la relación de MCL-1:BCL-xL, fue predictivo de una respuesta apoptótica al inhibidor selectivo de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib). Esta correlación, es decir, la sensibilidad a SCH 727965 (Dinaciclib) y los altos niveles de expresión de la relación de MCL-1:BCL-xL se observó en la malignidad hemática (leucemia y linfoma) y en estirpes celulares de tumores malignos sólidos, tales como estirpes celulares tumorales de pulmón, de mama, de próstata, colorrectales y ováricas.

Definiciones

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para indicar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiera a alternativas solamente o que las alternativas sean mutuamente exclusivas, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere a alternativas solamente y a "y/o".

"Inhibidor de CDK" significa cualquier compuesto o agente que inhiba la actividad de una o más proteínas CDK o complejos de CDK/ciclina cinasa. El compuesto o agente puede inhibir la actividad de CDK mediante la interacción directa o indirecta con una proteína CDK o puede actuar evitando la expresión de uno o más genes de CDK. Los ejemplos de inhibidores de CDK de molécula pequeña se han descrito anteriormente. Además, el mecanismo de los inhibidores de CDK, flavopiridol y SNS-032, se describe en R. Chen, *et al.*, *Blood*, 2005, 106 (7): 2513-2519 y R. Chen, *et al.*, *Blood*, 2009, 113 (19): 4637-4645, respectivamente. El inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), que es el sujeto de los estudios en el presente documento, se describe en D. Parry, *et al.*, *Mol. Cáncer Ther.*, 2010 9 (8): 2344-235, W. Fu *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 2011, 10 (6): 1018-1027 y la Patente de los EE.UU. 7.119.200, que se incorporan en el presente documento *por referencia* como si se expusieran detalladamente.

"Marcador génico" o "marcador" significa un gen completo, o una porción del mismo, tal como un derivado EST de ese gen, cuya expresión o nivel cambia en ciertas condiciones. Cuando la expresión génica se correlaciona con una determinada afección, por ejemplo, un tratamiento farmacológico o una patología, el gen es un marcador de esa afección.

"Biomarcador predictivo" significa un marcador génico cuya expresión se correlaciona con una respuesta a un agente terapéutico dado o a una clase de agentes terapéuticos. Como se usa en el presente documento, la expresión se refiere a la proteína de leucemia de células mieloides (MCL)-1 y BCL-xL, cuya relación de expresión se correlaciona con el efecto terapéutico de un inhibidor de CDK. El inhibidor de CDK es SCH 727965 (Dinaciclib).

"Polinucleótidos derivados de marcador" significa el ARN transcrito a partir de un gen marcador, cualquier ADNc o ARNc producido a partir del mismo y cualquier ácido nucleico derivado del mismo, tal como un ácido nucleico sintético que tiene una secuencia derivada del gen correspondiente al gen marcador.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "control", "nivel de control", "nivel de referencia" o "nivel de referencia predeterminado" significan un nivel basal separado medido en una célula de control comparable, que puede estar o no libre de la enfermedad. Puede ser del mismo individuo o de otro individuo que sea normal o que no presente la misma enfermedad de la que se obtiene la enfermedad o la muestra de ensayo. Por tanto, el "valor de referencia" puede ser un valor absoluto, un intervalo de valores, un valor promedio, la mediana de un valor, un valor medio o un valor en comparación con un control particular o valor basal. Un valor de referencia puede basarse en un valor de muestra individual, tal como un valor obtenido a partir de una muestra de un individuo con un cáncer mediado por CDK, tal como una malignidad tumoral sólida, pero en un punto temporal anterior o antes del tratamiento o un valor obtenido de una muestra de un paciente diagnosticado con un cáncer mediado por CDK distinto del individuo que se sometió a un ensayo, o un individuo "normal", que es un individuo no diagnosticado con un cáncer mediado por CDK. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tales como las de pacientes diagnosticados con cáncer mediado por CDK, o individuos normales, o pueden basarse en un conjunto de muestras que incluya o excluya la muestra que se ha de analizar.

Un "valor de similitud" es un número que representa el grado de similitud entre dos cosas que se comparan. Por ejemplo, un valor de similitud puede ser un número que indique la similitud global entre el nivel de expresión génica de un paciente usando marcadores relacionados con fenotipos específicos y un control específico para ese fenotipo (por ejemplo, la similitud con un nivel de referencia de "buen pronóstico", cuando el fenotipo es un buen pronóstico). El valor de similitud puede expresarse como una métrica de similitud, tal como un coeficiente de correlación o, simplemente, puede expresarse como la diferencia de nivel de expresión, o el agregado de las diferencias de nivel de expresión, entre una muestra de paciente y un nivel de referencia.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "medir niveles de expresión", "medir el nivel de expresión génica" u "obtener un nivel de expresión" y similares, incluyen métodos que cuantifican el nivel de expresión génica diana ejemplificados por una transcripción de un gen, incluyendo microARN (miARN) o una proteína codificada por un gen, así como métodos que determinan si un gen de interés se expresa en absoluto. Por tanto, un ensayo que proporciona un resultado "sí" o "no" sin proporcionar necesariamente la cuantificación de una cantidad de expresión es un ensayo que "mide la expresión" como se usa ese término en el presente documento. Como alternativa, la expresión puede incluir cuantificar el nivel de expresión del gen diana expresado en un valor cuantitativo, por ejemplo, un factor de cambio en la expresión, hacia arriba o abajo, con respecto a un gen de control o con respecto al mismo gen en otra muestra, o una relación logarítmica de expresión, o cualquier representación visual de la misma, tal como, por ejemplo, un "mapa de calor" donde la intensidad del color es representativa de la cantidad de expresión génica detectada. Los métodos de ejemplo para detectar el nivel de expresión de un gen incluyen, pero no se limitan a, transferencia de Northern, transferencias puntuales o por ranuras, matriz del gen indicador (véase, por ejemplo, el documento US 5.569.588), protección de nucleasas, RT-PCR, perfil de micromatrices, pantalla diferencial, SAGE (Velculescu, *et al.*, *Science*, 1995, 270: 484-87), Sistema de Expresión Génica Digital (véase el documento WO2007076128; el documento WO2007076129), ensayo de ARNm múltiple (Tian, *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 2004, 32:el26), PMAGE (Kim, *et al.*, *Science*, 2007, 316: 1481-84), ensayo de hibridación, selección, extensión y ligadura mediado por ADNc (DASL, Bibikova, *et al.*, *AJP*, 2004, 165: 1799-807), ensayo de ADN ramificado múltiple (Flagella, *et al.*, *Anal. Biochem*, 2006, 352: 50-60), electroforesis en gel 2D, SELDI-TOF, ICAT, ensayo enzimático, ensayo de anticuerpos y similares.

Como se usa en el presente documento, "sujeto" se refiere a un organismo, o a una muestra celular, muestra tisular o muestra de órgano derivadas del mismo, incluyendo, por ejemplo, estirpes celulares cultivadas, biopsia, muestra de sangre o muestra de fluido que contiene una célula. En muchos casos, el sujeto o la muestra derivada del mismo comprende una pluralidad de tipos celulares. En una realización, la muestra incluye, por ejemplo, una mezcla de células tumorales y células normales. En una realización, la muestra comprende al menos el 10 %, el 15 %, el 20 % y siguientes, el 90 % o el 95 % de células tumorales. En una realización, el organismo es un mamífero, tal como un ser humano, canino, murino, felino, bovino, ovino, porcino o caprino. En una realización particular, el organismo es un paciente humano.

"Paciente", como se usa ese término en el presente documento, se refiere al receptor que necesita la intervención o el tratamiento médicos. Se incluyen pacientes mamíferos y no mamíferos. En una realización, el paciente es un mamífero, tal como un ser humano, canino, murino, felino, bovino, ovino, porcino o caprino. En una realización particular, el paciente es un ser humano.

El término "tratar" en sus diversas formas gramaticales con respecto a la presente invención se refiere a prevenir (es decir, quimioprevención), curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos nocivos de una patología, la progresión de la enfermedad, el agente causal de la enfermedad (por ejemplo, bacterias o virus) u otra condición anormal. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar aliviar un síntoma (es decir, no todos los síntomas) de una enfermedad o atenuar la progresión de una enfermedad.

"Tratamiento del cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a inhibir, retrasar o prevenir parcial o totalmente la progresión del cáncer, incluyendo la metástasis del cáncer; inhibir, retrasar o prevenir la recurrencia del cáncer, incluyendo la metástasis del cáncer; o prevenir la aparición o el desarrollo de cáncer (quimioprevención) en un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Además, los métodos de la presente invención pueden ponerse en

práctica para el tratamiento de la quimioprevención de pacientes humanos con cáncer. Sin embargo, también es probable que los métodos también sean eficaces en el tratamiento del cáncer en otros mamíferos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tiene por objeto calificar la cantidad del tratamiento en una pauta terapéutica necesaria para tratar el cáncer. Esto incluye una terapia de combinación que implica el uso de múltiples agentes terapéuticos, tales como una cantidad combinada de un primer y un segundo tratamientos donde la cantidad combinada conseguirá la respuesta biológica deseada. La respuesta biológica deseada es la inhibición parcial o total, el retraso o la prevención de la progresión del cáncer, incluyendo la metástasis del cáncer; la inhibición, el retraso o la prevención de la reaparición del cáncer, incluyendo la metástasis del cáncer; o la prevención del inicio o el desarrollo del cáncer (quimioprevención) en un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "tratamiento de combinación", "terapia de combinación", "tratamiento combinado" o "tratamiento combinatorio", utilizados indistintamente, se refieren a un tratamiento de un individuo con al menos dos agentes terapéuticos diferentes. De acuerdo con la invención, el individuo se trata con un primer agente terapéutico, preferentemente un agente que daña el ADN y/o un inhibidor de CDK como se describe en el presente documento. El segundo agente terapéutico puede ser otro inhibidor de CDK o puede ser cualquier agente antineoplásico clínicamente establecido como se define en el presente documento. Un tratamiento combinatorio puede incluir un tercer agente terapéutico adicional o incluso más.

"Estado" significa un estado de expresión génica de un conjunto de marcadores genéticos cuya expresión está fuertemente relacionada con un fenotipo particular. Por ejemplo, "estado de p53" significa un estado de expresión génica de un conjunto de marcadores genéticos cuya expresión está fuertemente relacionada con la del gen p53, en el que el patrón de expresión de estos genes difiere de forma detectable entre tumores que expresan la proteína y tumores que no expresan la proteína.

"Buen pronóstico" significa que se espera que un paciente no tenga metástasis distantes de un tumor en los cinco años siguientes al diagnóstico inicial de cáncer.

"Mal pronóstico" significa que se espera que un paciente tenga metástasis distantes de un tumor en los cinco años siguientes al diagnóstico inicial de cáncer.

Realización o realizaciones de la invención

Un aspecto amplio de la divulgación se refiere a la identificación de un biomarcador predictivo, la relación de MCL-1:BCL-xL, cuyo nivel se correlaciona con una respuesta a un inhibidor de CDK, que puede usarse para identificar pacientes susceptibles de responder al tratamiento con un inhibidor de CDK. El inhibidor de CDK es SCH 727965 (Dinaciclib). En otro aspecto, la divulgación es un método para tratar pacientes diagnosticados con cáncer, en particular un cáncer mediado por CDK, con un inhibidor de CDK, que comprende administrar al paciente con cáncer un compuesto que es un inhibidor de CDK, en el que las células cancerosas de dicho paciente se caracterizan por un nivel de expresión génica de la relación de MCL-1:BCL-xL que está por encima de un valor de referencia predeterminado. El nivel de expresión génica de la relación de MCL-1:BCL-xL es el nivel de ARNm.

Relación de MCL-1:BCL-xL como biomarcador predictivo para un inhibidor de CDK

SCH 727965 (Dinaciclib) es un inhibidor potente y selectivo de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) 1, 2, 5 y 9 sometidas a ensayos clínicos frente a una gama de malignidades sólidas y hemáticas. Durante los estudios preclínicos, se ha realizado el perfil de más de 140 estirpes celulares para determinar la respuesta a SCH 727965 (Dinaciclib) en ensayos de viabilidad o clonogenia a largo plazo (≥ 72 horas), en los que más del 97 % de las estirpes presentaban una $CI_{50} \leq 25$ nM. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los solicitantes creen que esta potencia nanomolar uniformemente baja probablemente se debió a la represión tanto de la progresión del ciclo celular como de la transcripción, a través de la inhibición de CDK1/2 y CDK9, respectivamente. La fosforilación por CDK9 de la ARN pol II (ARNPII) en la Ser2 y a Ser5 es necesaria para el inicio y la elongación de la transcripción. Los solicitantes y otros han observado efectos rápidos dependientes de CDK9 sobre las células después de la exposición a corto plazo a inhibidores de CDK, tales como SCH 727965 (Dinaciclib), incluyendo la pérdida de la fosforilación en la Ser2 de RNAPII, seguida de la eliminación rápida de la proteína pro-supervivencia de vida media corta MCL-1 (Chen, *et al.*, *Blood*, 2005, 106: 2513-2519, Chen, *et al.*, *Blood*, 2009, 113: 4637-4645).

Se cree que la capacidad de una célula cancerosa para evitar la apoptosis depende del equilibrio de varios miembros de la familia antiapoptótica Bcl-2, que incluyen BCL-2, BCL-xL, BCL-w y MCL-1. Propiamente dicho, los solicitantes hipotetizaron que las estirpes celulares dependientes de MCL-1 serían más sensibles al tratamiento con un inhibidor selectivo de CDK, tal como SCH 727965 (Dinaciclib). Los solicitantes hipotetizaron adicionalmente que la sensibilidad diferencial de SCH 727965 (Dinaciclib) podría discriminarse de los efectos inhibitorios del ciclo celular a más largo plazo mediante la realización de ensayos de exposición a SCH 727965 (Dinaciclib) a corto plazo.

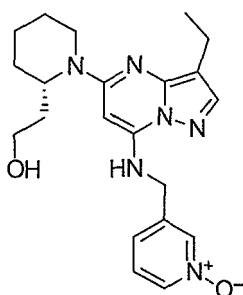
Los solicitantes han descubierto ahora que la actividad de un inhibidor selectivo de CDK, tal como SCH 727965 (Dinaciclib), indujo la apoptosis en un panel de 25 estirpes celulares de tumores sólidos humanos con niveles variables de dependencia de MCL-1. Se ha notificado que la dependencia de MCL-1 en estirpes celulares de tumores sólidos se correlaciona con la relación de ARNm de MCL-1:BCL-xL o el nivel de amplificación del gen MCL-1 (Beroukhi, *et al.*, *Nature*, 2010, 463: 899-905; Zhang, *et al.*, *Oncogene*, 2011, 30: 1963-1968). Los solicitantes evaluaron la viabilidad celular después de 18 horas de tratamiento con 100 nM de SCH 727965 (Dinaciclib) (Figura 5B), mientras que el compromiso de la diana y la inducción de la apoptosis se determinaron después de 8 horas (Figura 5A). Con una excepción, todas las estirpes celulares mostraron un potente compromiso de la diana de CDK9, según se determinó por la pérdida de la fosforilación en la Ser2 de RNAPII y los correspondientes niveles reducidos de proteína MCL-1 (Figura 8). Los solicitantes observaron que la pérdida de viabilidad celular, medida por el contenido de ATP, se correlacionaba directamente con la relación de ARNm de MCL-1:BCL-xL (Figuras 5A, 10 y 11). También se observó un aumento drástico en la escisión de PARP en estirpes celulares con la relación de ARNm de MCL-1:BCL-xL más alta (Figuras 8 y 9A). Adicionalmente, la extensión de la escisión de PARP se correlacionó con el nivel de actividad de la caspasa-3 o la caspasa-7 (Figura 9B), mientras que el nivel de BCL-2 (Figura 8) no tuvo un impacto significativo en la respuesta a SCH 727965 (Dinaciclib). Por tanto, en el nivel de ARNm (Figuras 5A y 5B) o en el nivel de proteína (Figura 8), la alta relación de expresión génica de MCL-1:BCL-xL, equivalente a altos niveles de apoptosis, se correlaciona con la sensibilidad al SCH 727965 (Dinaciclib). Esta relación se confirmó en un análisis de farmacodinamia por xenografía donde el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib) indujo la apoptosis en estirpes celulares tumorales de pulmón, ovario, colon y próstata que tenían una alta expresión de la relación de MCL-1:BCL-xL (Figura 11).

Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la relación MCL-1:BCL-xL puede usarse como un biomarcador predictivo para identificar pacientes diagnosticados con un tumor sólido o una malignidad maligna hemática, tal como la leucemia linfocítica crónica (LLC), que probablemente respondan al tratamiento con un inhibidor de CDK selectivo, tal como SCH 727965 (Dinaciclib).

Inhibidores de CDK

Las cinasas dependientes de ciclina (CDK) son reguladores positivos clave de la progresión del ciclo celular y son dianas atractivas en oncología. Sin embargo, debido al alto grado de homología estructural dentro de la familia de proteínas CDK, los inhibidores de CDK de molécula pequeña putativos pueden ejercer sus efectos mediante la inhibición combinatoria de múltiples CDK y otras serina/treonina cinasas estrechamente relacionadas, dando como resultado efectos adversos atribuibles a una inhibición no específica (D. Parry, *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 2010, 9 (8): 2344-2353).

Se ha demostrado anteriormente que el SCH 727965 (Dinaciclib), cuya estructura se muestra a continuación, inhibe CDK2, CDK5, CDK1 y CDK9 con valores de CI50 de 1, 1, 3 y 4 nM, respectivamente (Parry, *et al.*, 2010, 2347).



En comparación con el flavopiridol, SCH 727965 (Dinaciclib) es un inhibidor igualmente potente de CDK1 y CDK9, pero es un inhibidor de CDK2 y CDK5 12 veces y 14 veces más fuerte, respectivamente. También se descubrió que el compuesto era un replicador de ADN potente inhibidor de la incorporación de ADN de timidina bloqueada en células A2780 con una CI50 de 4 nM (Id.). Tomados en conjunto, el SCH 727965 (Dinaciclib) es un inhibidor más fuerte y más selectivo de las CDK, que se traduce en su inhibición más potente de la síntesis de ADN en comparación con el flavopiridol (datos no mostrados) (Id.).

Como se muestra en la Tabla 1 a continuación, D. Parry, *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 2010, 9 (8): 23442353, encontraron que los valores de CI50 (nM) para SCH 727965 (Dinaciclib) demostraron que este inhibidor de CDK era el más activo frente a las CDK 1,2, 5 y 9, mientras que era al menos de 10 a 100 veces menos activo frente a las CDK 4, 6 y 7. SCH 727965 (Dinaciclib) tenía una CI50 de más de 10 μ M frente a un panel Millipore de 50 cinasas diversas. Por tanto, es evidente que SCH 727965 (Dinaciclib) actúa a través de múltiples mecanismos (Figura 1).

Tabla 1

Complejo de CDK/Ciclina Cinasas	Valor de CI_{50} (nM)
Cdk2/E	1
Cdk2/A	1
Cdk1/B1	3
Cdk4/D1	100
Cdk5/p25	1
Cdk6/D3	60
Cdk7/H	70
Cdk9/T	4

Se sabe que los inhibidores de CDK, tales como flavopiridol, SNS-032 y SCH 727965 (Dinaciclib), actúan a través de CDK 7 y 9, lo que conduce a la inhibición de la fosforilación de CTD de RNAP II (R. Chen, *et al.*, *Blood*, 2005, 106 (7): 2513-2516; R. Chen, *et al.*, *Blood*, 2009, 113(19): 4637-4645; W. Fu. *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 2011, 10 (6): 1018-1027). Se ha demostrado que la inhibición de la fosforilación de CTD de RNAP II a su vez inhibe la transcripción y disminuye la expresión de proteínas antiapoptóticas y pro-oncogénicas de vida corta, tales como MCL-1 y C-Myc y ciclina D, respectivamente (Figura 2).

Más específicamente, el tratamiento con el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), presentó una actividad antiproliferativa potente frente a una amplia gama de estirpes celulares (Figura 3). La potencia celular de SCH 727965 (Dinaciclib) dio como resultado una inhibición del crecimiento del 50 % (CE_{50}) en un ensayo de viabilidad de 96 horas realizado en más de 511 estirpes celulares tumorales. SCH 727965 (Dinaciclib) presentó valores de CE_{50} en el intervalo de 5-45 nM para todas las estirpes celulares y una $CE_{50} < 20$ nM en más del 80 % de las estirpes celulares evaluadas.

El inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), también demostró una sensibilidad diferencial a las 24 horas en comparación con 96 horas (Figura 4). En la Figura 4, la estirpe celular A sería representativa de un respondedor en puntos temporales superiores a 4 horas a la concentración de interés, mientras que la estirpe celular B sería representativa de un respondedor a las 72 horas y 96 horas, pero no a las 24 horas. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la respuesta diferencial a SCH 727965 (Dinaciclib) en un punto temporal temprano sugiere que un mecanismo no de ciclo celular influye sobre la sensibilidad durante exposiciones cortas al agente terapéutico. Esto indica que incluso la exposición a corto plazo con un inhibidor de CDK, tal como SCH 727965 (Dinaciclib), puede tener un efecto diferencial sobre las células cancerosas dependiendo de la expresión de un biomarcador específico.

Además, la sensibilidad diferencial de la estirpe celular observada para la exposición a corto plazo de SCH 727965 (Dinaciclib) (Figura 4) se correlaciona con la relación de ARNm de MCL-1:BCL-xL (Figuras 5A y 5B). En la Figura 5B, las estirpes celulares de pulmón, mama, próstata, colorrectal y ovárica se trataron con 100 nM del inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), durante 18 horas y se sometió a ensayo su viabilidad mediante la cuantificación de ATP.

Habiendo observado que el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), presentaba actividad antiproliferativa en una amplia gama de estirpes celulares tumorales y que la sensibilidad de exposición diferencial a corto plazo correlacionaba la relación de MCL-1:BCL-xL, los solicitantes intentaron determinar qué efecto tendría SCH 727965 (Dinaciclib) sobre la expresión específica de diversos genes que se sabe que se asocian a la apoptosis, incluyendo MCL-1, Ciclina E1, BCL2L2, BCL-xL y BCL-2. Se trataron células de cáncer de ovario (A2780) con 100 nM de SCH 727965 (Dinaciclib) y los niveles de expresión de ARNm de los cinco genes se analizaron cada hora durante 5 horas. Se descubrió que SCH 727965 (Dinaciclib) reguló negativamente MCL-1 (Figura 6A).

De forma similar, se realizó un análisis por transferencia de Western para diversos marcadores asociados a la apoptosis en células de cáncer de ovario (A2780) tratadas continuamente durante un curso temporal de 5 horas con 100 nM de SCH 727965 (Dinaciclib) (Figura 7A). Los solicitantes observaron la rápida reducción en la expresión del sitio de fosforilación de CDK9 en CTD de RNAP II, la disminución en la expresión de las proteínas MCL-1 y c-MYC de corta duración y la inducción de la apoptosis medida mediante PARP escindida. Por el contrario, en un análisis de lavado, el tratamiento con el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), dio como resultado la inversión rápida de la inhibición de CDK9 y los niveles de MCL-1 e indujo algo de apoptosis medida mediante PARP escindida (Figura 7B). En el ensayo de lavado, se añadieron 100 nM de SCH 727965 (Dinaciclib) a las células A2780 en el inicio ($t = 0$), se lavaron a partir de tres muestras después de una exposición de 2 horas y después se analizaron a las 4, 6 y 8 horas después de $t = 0$.

Basándose en esta respuesta diferencial a corto plazo del inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), los solicitantes después evaluaron la inducción apoptótica medida mediante la escisión de PARP. Las estirpes celulares de pulmón, mama, próstata, colorrectal y ovárica se trataron con 100 nM de SCH 727965 (Dinaciclib) o DMSO durante 8 horas. En un análisis de transferencia de Western, los solicitantes observaron que la inducción apoptótica, medida mediante escisión de PARP (Figura 8), era análoga a la sensibilidad diferencial observada en el ensayo de

viabilidad de 18 horas (Figura 5B), que se correlacionaba con la relación de MCL1:BCL-xL. La expresión de ARNm de MCL-1 disminuyó rápidamente, mientras que el nivel de expresión de BCL-2 permaneció relativamente sin cambios, sugiriendo que era MCL-1 y no BCL-2 el que afectaba a la respuesta observada, es decir, la inducción de apoptosis, para el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib).

De forma similar, la inducción de apoptosis observada para SCH 727965 (Dinaciclib) se correlacionó con la relación de MCL-1:BCL-xL (Figuras 9A y 9B). En la Figura 9A, la escisión de PARP frente a la relación de MCL-1:Bcl-xL se cuantificó a partir de un análisis de transferencia de Western de 27 estirpes celulares de pulmón, mama, próstata, colorrectal y ovárica tratadas con 100 nM de SCH 727965 (Dinaciclib) durante 18 horas. En la Figura 9B, se midió el curso temporal de la activación de caspasa-3/7 durante un período de 24 horas después del tratamiento de estirpes celulares de pulmón, mama, próstata, colorrectal y ovárica con SCH 727965 (Dinaciclib). De acuerdo con la escisión de PARP, la activación de caspasa-3/7 se correlacionó con la relación de MCL-1:BCL-xL.

Esa relación de expresión de ARNm de MCL1-BCL-xL elevada se correlaciona con la sensibilidad a un inhibidor de CDK también fue evidente en la Figura 10, donde se muestra el porcentaje de viabilidad celular restante después de 24 horas de tratamiento para hemo 387 (leucemia y linfoma) y estirpes celulares de malignidades sólidas. Esta relación observada *in vitro* se conservó *in vivo* en un panel de xenoinjerto de tumor sólido, donde el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), indujo la apoptosis en tumores de pulmón, ovario, colon y próstata de alta relación de MCL-1:BCL-xL (Figura 11). El análisis farmacodinámico por xenoinjerto de 6 horas después de la dosificación (40 mg/kg) con el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), demostró que el inhibidor de CDK indujo la apoptosis (PARP escindida) en tumores con una relación alta de MCL1:BCL-xL.

Por tanto, los solicitantes han demostrado que SCH 727965 (Dinaciclib) es un inhibidor selectivo de las CDK 1, 2, 5 y 9, que se sabe que se asocia a la apoptosis. En protocolos de tratamiento a largo plazo (> 72 horas), SCH 727965 (Dinaciclib) presenta una alta potencia (CE50 de 5-45 nM) en un panel de más de 500 estirpes celulares en una amplia gama de tipos de tumores. El tratamiento a corto plazo (8-24 horas) con SCH 727965 (Dinaciclib) demuestra una viabilidad diferencial y respuestas apoptóticas que se correlacionan con la relación de MCL-1:BCL-xL. SCH 727965 (Dinaciclib) inhibe CDK9, que a su vez reduce la fosforilación de Ser2 de CTD de ARN Pol II y disminuye la expresión de MCL-1 y c-MYC. Tomados en conjunto, un experto habitual en la materia reconocería y apreciaría fácilmente que la relación de MCL-1:BCL-xL puede usarse como un biomarcador predictivo de una respuesta antineoplásica en malignidades tumorales sólidas.

Clasificación de una muestra de células que tiene sensibilidad a un inhibidor de CDK

Identificación de un biomarcador de predicción

La presente invención proporciona un biomarcador cuyo nivel se correlaciona con una respuesta a un inhibidor de CDK. En general, el biomarcador se identificó como se detalla en los Ejemplos que se exponen a continuación mediante la determinación de cuál de los genes apoptóticos tenía patrones de expresión que se correlacionaban con la respuesta al tratamiento.

Recogida de muestras

En la presente invención, se extraen moléculas de polinucleótidos diana de una muestra tomada de un individuo afectado por un cáncer. La muestra puede recogerse de cualquier manera clínicamente aceptable, pero debe recogerse de manera que se conserven polinucleótidos derivados de marcadores (es decir, ARN). El ARNm o los ácidos nucleicos derivados del mismo (es decir, ADNc o ADN amplificado) se marcan preferentemente de forma distinguible de las moléculas de polinucleótidos convencionales o de control y ambos se hibridan simultáneamente o independientemente a una micromatriz que comprende algunos o todos los marcadores o subconjuntos de marcadores descritos anteriormente. Como alternativa, el ARNm o los ácidos nucleicos derivados del mismo pueden marcarse con el mismo marcador que las moléculas de polinucleótidos patrones o de control, en los que se compara la intensidad de hibridación de cada uno en una sonda particular. Una muestra puede comprender cualquier muestra de tejido clínicamente pertinente, tal como una biopsia tumoral o aspiración con aguja fina o una muestra de fluido corporal, tal como sangre, plasma, suero, linfa, fluido ascítico, fluido quístico, orina o exudado de pezón. La muestra puede tomarse de un ser humano o, en un contexto veterinario, de animales no humanos tales como rumiantes, caballos, cerdos u ovejas o de animales domésticos de compañía tales como félidos y cánidos.

Los métodos para preparar ARN total y poli(A)+ son bien conocidos y se describen en general en Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL* (2ª ED.), volúmenes 1 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y Ausubel, et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, volumen 2, Current Protocols Publishing, Nueva York, 1994).

El ARN puede aislarse a partir de células eucariotas mediante procedimientos que implican la lisis de las células y la desnaturalización de las proteínas contenidas en las mismas. Las células de interés incluyen células de tipo silvestre (es decir, no cancerosas), células de tipo silvestre expuestas a fármacos, células tumorales o derivadas de tumores, células modificadas, células de estirpes celulares normales o tumorales y células modificadas expuestas a fármacos.

Se pueden emplear etapas adicionales para retirar el ADN. La lisis celular puede lograrse con un detergente no iónico, seguido de una microcentrifugación para retirar los núcleos y, por tanto, la mayor parte del ADN celular. En una realización, el ARN se extrae de células de los diversos tipos de interés usando lisis con tiocianato de guanidinio seguida de centrifugación con CsCl para separar el ARN del ADN (Chirgwin, *et al.*, *Biochemistry*, 1979, 18: 5294-5299). El ARN Poli(A)+ se selecciona mediante selección con celulosa oligo-dT (véase, Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL* (2ª ED.), volúmenes 1 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Como alternativa, la separación del ARN del ADN puede realizarse mediante extracción orgánica, por ejemplo, con fenol caliente o fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Si se desea, pueden añadirse inhibidores de ARNasa al tampón de lisis. Análogamente, para ciertos tipos celulares, puede ser deseable añadir una etapa de desnaturalización/digestión de proteínas al protocolo.

Para muchas aplicaciones, es deseable enriquecer preferentemente el ARNm con respecto a otros ARN celulares, tales como ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr). La mayoría de los ARNm contienen una cola de poli(A) en su extremo 3'. Esto les permite enriquecerse mediante cromatografía de afinidad, por ejemplo, usando oligo(dT) o poli(U) acoplado a un soporte sólido, tal como celulosa o medio SEPHADEX®. (véase Ausube, I *et al.*, *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, volumen 2, Current Protocols Publishing, Nueva York, 1994). Una vez unido, el ARNm poli(A)+ se eluye de la columna de afinidad usando EDTA 2 mM/SDS al 0,1 %.

La muestra de ARN puede comprender una pluralidad de moléculas de ARNm diferentes, cada molécula de ARNm diferente tiene una secuencia de nucleótidos diferente. En una realización específica, las moléculas de ARNm en la muestra de ARN comprenden al menos 100 secuencias de nucleótidos diferentes. Más preferentemente, las moléculas de ARNm de la muestra de ARN comprenden moléculas de ARNm correspondientes a cada uno de los genes marcadores. En otra realización específica, la muestra de ARN es una muestra de ARN de mamífero.

En una realización específica, se usa ARN total o ARNm de células en los métodos de la invención. La fuente del ARN puede ser células de una planta o animal, ser humano, mamífero, primate, animal no humano, perro, gato, ratón, rata, pájaro, levadura, eucariota, procariota, etc. En realizaciones específicas, el método de la invención se usa con una muestra que contiene ARNm total o ARN total de 1×10^6 células o menos. En otra realización, las proteínas pueden aislarse a partir de las fuentes anteriores, mediante métodos conocidos en la técnica, para su uso en el análisis de expresión a nivel de proteína.

Predicción de la sensibilidad/resistencia de una muestra celular al tratamiento con inhibidor de CDK

La invención proporciona un marcador génico, la relación de MCL-1:BCL-xL, cuya expresión se correlaciona con la respuesta de un sujeto a un tratamiento con un inhibidor de CDK. El inhibidor de CDK es dinaciclib y la relación es del nivel de ARNm. La invención también proporciona un método de uso de este biomarcador predictivo para seleccionar un paciente para el tratamiento con el inhibidor de CDK en el diagnóstico o la predicción anterior a la dosis.

El biomarcador predictivo, la relación de MCL-1:BCL-xL, proporcionado en el presente documento también puede usarse en combinación con otros marcadores para trastornos mediados por CDK tales como el cáncer, tales como malignidades tumorales sólidas o para cualquier otra afección clínica o fisiológica a la que se asocia CDK. La presente invención proporciona un marcador, la relación de MCL-1:BCL-xL, que puede usarse para predecir una muestra de células que tiene sensibilidad a una dosis biológicamente activa de un inhibidor de CDK, en particular al inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib). En algunos casos, es valioso determinar si una población celular particular es sensible o resistente a una dosis terapéutica de un inhibidor de CDK.

En algunas realizaciones, el biomarcador predictivo se evalúa con respecto a un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en las mediciones de expresión génica del biomarcador tomadas en muestras de control expuestas a un inhibidor de CDK. El valor de referencia predeterminado puede expresarse de varias maneras, incluyendo, pero no limitadas a, un factor de cambio, hacia arriba o hacia abajo, de 1,2 veces o más, 1,3 veces o más o 1,4 veces o más, o 1,5 veces o más, 1,6 veces o más, 1,7 veces o más, 1,8 veces o más, 1,9 veces o más, 2,0 veces o más o 3,0 veces o más. El factor de cambio de 2 veces significa regulación positiva 2 veces o regulación negativa de $\frac{1}{2}$ veces de los marcadores en muestras tratadas con inhibidor de CDK en comparación con muestras de control no tratadas. En una realización, la muestra de control procede de un paciente o individuo no canceroso y el valor de referencia predeterminado está regulado positivamente al menos de 1 a 2 veces, o cualquier nivel intermedio, en el paciente con cáncer o muestra individual, es decir, una muestra no controlada, en comparación con la de un paciente no canceroso o muestra individual. En una realización, la muestra de control procede de un paciente no canceroso y el valor de referencia predeterminado está regulado positivamente al menos de 1 a 2 veces en la muestra de paciente con cáncer en comparación con la muestra de un paciente no canceroso. En otra realización más, la muestra de control es de una muestra de un paciente o individuo no diagnosticado con un cáncer mediado por CDK y el valor de referencia predeterminado está regulado positivamente al menos de 1 a 2 veces, o cualquier nivel intermedio, en comparación con el de un paciente o individuo diagnosticado con un cáncer mediado por CDK.

En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan un biomarcador predictivo y métodos que son útiles para predecir la sensibilidad y/o resistencia de un sujeto al tratamiento con un inhibidor de CDK. El biomarcador predictivo se usa para hacer una predicción de la respuesta al fármaco basándose en los niveles de expresión génica medidos en una muestra celular que comprende células tumorales antes del tratamiento con inhibidor de CDK. El nivel de expresión del biomarcador de predicción, la relación de MCL-1:BCL-xL, se correlaciona con la sensibilidad de las células al tratamiento con inhibidor de CDK. Las muestras biológicas en las que el nivel de relación de MCL-1:BCL-xL aumenta en relación con un control antes del tratamiento con un inhibidor de CDK son aquellas que se espera que sean sensibles al tratamiento con un inhibidor de CDK.

La sensibilidad o la resistencia al inhibidor de CDK se predice en un sujeto que usa el biomarcador predictivo, la relación de MCL-1:BCL-xL. Un aspecto de la presente invención proporciona un método de uso de este biomarcador predictivo de inhibidor de CDK para predecir si un sujeto con cáncer responderá al tratamiento con un inhibidor de CDK. En otro aspecto, la invención proporciona un método de uso del biomarcador predictivo de inhibidor de CDK para predecir si un sujeto con cáncer responderá al tratamiento con SCH727965 (Dinaciclib).

En ciertas realizaciones, la invención comprende el uso de datos obtenidos a partir del biomarcador predictivo como un medio para determinar si un paciente debe continuar el tratamiento con un inhibidor de CDK o debe tratarse con un inhibidor de CDK en primer lugar. Por tanto, las muestras biológicas de pacientes que presentan un conjunto de datos favorable, por ejemplo, aquellos que son sensibles, pueden continuar el tratamiento con el inhibidor de CDK o iniciar el tratamiento con un inhibidor de CDK. Los métodos de la invención también pueden usarse para estratificar una población de pacientes en un grupo de tratamiento, por ejemplo, aquellos que pueden tratarse con un inhibidor de CDK y, por tanto, pueden inscribirse en una pauta terapéutica que emplea un inhibidor de CDK, o un grupo sin tratamiento, por ejemplo, aquellos que no son susceptibles de tratamiento con un inhibidor de CDK. Con este fin, los métodos de la invención también pueden usarse para identificar pacientes que pueden necesitar ser sacados de un protocolo terapéutico que comprende un inhibidor de CDK en el que los datos de biomarcadores no son positivos, por ejemplo, aquellos que son resistentes o no sensibles.

También se desvela un método que comprende:

(a) calcular una medida de similitud entre un primer nivel de expresión génica de una muestra de células y un nivel de referencia sensible (respondedor) al inhibidor de CDK o calcular la medida de similitud entre dicho nivel de expresión del primer gen y dicho nivel de referencia sensible (respondedor) al inhibidor de CDK y una segunda medida de similitud entre dicho nivel de expresión del primer gen y un nivel de referencia resistente (no respondedor) al inhibidor de CDK, comprendiendo dicho nivel de expresión del primer gen un nivel de expresión medido del biomarcador predictivo en una muestra celular obtenida de un sujeto, en el que dicha muestra celular comprende células cancerosas y se obtiene de dicho sujeto antes del tratamiento de dicho sujeto con un inhibidor de CDK, comprendiendo dicho nivel de referencia sensible (respondedor) al inhibidor de CDK un nivel de expresión medido de dicho biomarcador predictivo que es el nivel de expresión promedio del biomarcador en una primera pluralidad de muestras de células de control que son sensibles al tratamiento con dicho inhibidor de CDK, y dicho nivel de referencia de resistencia (no respondedor) al inhibidor de CDK que comprende un nivel de expresión medido de dicho biomarcador predictivo que es el nivel de expresión promedio del biomarcador en una segunda pluralidad de muestras de células de control que son resistentes al tratamiento con dicho inhibidor de CDK;

(b) predecir que dicho sujeto:

(i) será sensible al tratamiento con inhibidor de CDK si dicho nivel de expresión del primer gen tiene una gran similitud con dicho nivel de referencia sensible (respondedor) al inhibidor de CDK o tiene una mayor similitud con dicho nivel de referencia sensible (respondedor) al inhibidor de CDK que con dicho nivel de referencia resistente (no respondedor) al inhibidor de CDK, o

(ii) será resistente al tratamiento con inhibidor de CDK si dicho nivel de expresión del primer gen tiene una baja similitud con dicho nivel de referencia sensible (respondedor) al inhibidor de CDK o tiene una mayor similitud con dicho nivel de referencia resistente (no respondedor) al inhibidor de CDK que con dicho nivel de referencia sensible (respondedor) al inhibidor de CDK;

en el que dicho nivel de expresión del primer gen tiene una alta similitud con dicho nivel de referencia (respondedor) al inhibidor de CDK si la similitud con dicho nivel de referencia sensible (respondedor) al inhibidor de CDK está por encima de un umbral o valor de referencia predeterminado, o tiene una baja similitud con dicho nivel de referencia sensible (respondedor) al inhibidor de CDK si la similitud con dicho nivel de referencia sensible (respondedor) del inhibidor de CDK está por debajo de dicho umbral o valor de referencia predeterminado. El método propone adicionalmente tratar al paciente con un inhibidor de CDK basado en la predicción, por ejemplo, tratar pacientes que demuestran un perfil sensible y retirar pacientes de un protocolo de tratamiento que comprende un inhibidor de CDK si su nivel de expresión es el de un no respondedor, por ejemplo, no respondedor a un inhibidor de CDK.

Similitud entre un nivel de expresión génica y un valor de referencia sensible/resistente

El grado de similitud entre un nivel de expresión génica obtenido de una muestra celular y un nivel de referencia

puede determinarse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, Dai *et al.* describen una serie de formas diferentes de calcular niveles de expresión génica y biomarcadores génicos correspondientes útiles en la clasificación de pacientes con cáncer de mama (Patente de los EE.UU. 7.171.311, documento WO2002103320, documento WO2005086891, documento WO2006015312, documento WO2006084272). De forma similar, Linsley *et al.*, documento US 2003/0104426 y Radish *et al.*, documento US 20070154931, desvelan biomarcadores genéticos y métodos de cálculo de niveles de expresión génica útiles en la clasificación de pacientes con leucemia mielógena crónica.

En una realización, la referencia o control comprende moléculas de polinucleótidos diana derivadas de una muestra de una muestra de células no expuesta al inhibidor de CDK. En otra realización, la referencia o control es una agregación de moléculas de polinucleótidos diana. El grupo puede derivar de muestras recogidas de un número de individuos con cáncer. En ciertas realizaciones, la agregación comprende muestras tomadas de una serie de individuos que tienen cánceres que responden a un inhibidor de CDK. En otra realización, la agregación comprende una población de ácidos nucleicos generada artificialmente diseñada para aproximarse al nivel de ácido nucleico derivado para el biomarcador en una agregación de ácidos nucleicos derivados de biomarcadores derivados de muestras tumorales. En otra realización más, la agregación deriva de estirpes celulares de cáncer o muestras de estirpes celulares.

La comparación puede conseguirse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, los niveles de expresión de diversos marcadores pueden evaluarse mediante la separación de moléculas de polinucleótidos diana (por ejemplo, ARN o ADNc) derivadas de los marcadores en geles de agarosa o poli(acrilamida), seguida de hibridación con sondas de oligonucleótidos específicas de marcador. Como alternativa, la comparación puede conseguirse mediante el marcaje de moléculas de polinucleótidos diana seguido de la separación en un gel de secuenciación. Las muestras de polinucleótidos se colocan en el gel de manera que el paciente y el control o los polinucleótidos convencionales se encuentren en las calles adyacentes. La comparación de los niveles de expresión se consigue visualmente o por medio de un densitómetro. En una realización, la expresión del biomarcador se evalúa por hibridación con una micromatriz. En cada enfoque, el biomarcador se evalúa en relación con el de una muestra o control identificado como asociada con un cáncer que responde a un inhibidor de CDK.

La expresión del biomarcador predictivo de CDK identificado también puede usarse para identificar marcadores que pueden diferenciar tumores en tipos clínicos. En ciertas realizaciones, comenzando con una serie de muestras tumorales, pueden identificarse marcadores específicos de tumores calculando los coeficientes de correlación entre la categoría clínica o los parámetros clínicos y la transformación lineal, logarítmica o cualquiera de la relación de expresión en todas las muestras para cada gen individual. Específicamente, el coeficiente de correlación se calcula como:

$$\rho = (\vec{c} \cdot \vec{r}) / (\|\vec{c}\| \cdot \|\vec{r}\|)$$

donde $\vec{c}$ representa los parámetros o categorías clínicas y $\vec{r}$ representa la transformación lineal, logarítmica o cualquiera de la relación de expresión entre muestra y control. Los marcadores para los que el coeficiente de correlación supera un punto de corte se identifican como marcadores relacionados con cáncer de mama específicos para un tipo clínico particular. Un punto de corte o umbral de este tipo corresponde a un cierto significado de genes discriminantes obtenidos mediante simulaciones de Monte Carlo. El umbral depende del número de muestras utilizadas; el umbral puede calcularse como $3 \times 1/\sqrt{n-3}$, donde $1/\sqrt{n-3}$ es el ancho de distribución y n = el número de muestras. En una realización específica, los marcadores se eligen si el coeficiente de correlación es superior a aproximadamente 0,3 o inferior a aproximadamente -0,3.

A continuación, se calcula la significancia de la correlación. Esta significancia puede calcularse por cualquier medio estadístico mediante el cual se calcule dicha significancia. En un ejemplo, se genera un conjunto de datos de correlación usando una técnica de Monte-Carlo para aleatorizar la asociación entre la diferencia de expresión de un marcador particular y la categoría clínica. La distribución de frecuencias de los marcadores que satisfacen los criterios a través del cálculo de coeficientes de correlación se compara con el número de marcadores que satisfacen los criterios en los datos generados a través de la técnica de Monte-Carlo. La distribución de frecuencias de los marcadores que satisfacen los criterios en los ensayos de Monte-Carlo se usa para determinar si el número de marcadores seleccionados mediante correlación con datos clínicos es significativo.

Una vez que se identifica un conjunto de marcadores, los marcadores pueden ordenarse por importancia por orden de significancia de la discriminación. Una forma de orden por importancia es mediante la amplitud de correlación entre el cambio en la expresión génica del marcador y la condición específica que se discrimina. Otro medio preferido es usar una métrica estadística. En una realización, la métrica es una estadística de tipo Fisher:

$$t = \frac{(\langle x_1 \rangle - \langle x_2 \rangle)}{\sqrt{[\sigma_1^2(n_1-1) + \sigma_2^2(n_2-1)] / (n_1+n_2-1) \cdot (1/n_1 + 1/n_2)}}$$

En esta ecuación, $\langle x_1 \rangle$ es promedio ponderado de error de la relación logarítmica de mediciones de expresión de transcripción dentro de un primer grupo de diagnóstico (por ejemplo, ER(-), $\langle x_2 \rangle$ es el promedio ponderado de error de la relación logarítmica dentro de un segundo grupo de diagnóstico relacionado (por ejemplo, ER(+)), σ_1 es la varianza de la relación logarítmica dentro del grupo ER(-) grupo y n_1 es el número de muestras para las que hay disponibles mediciones válidas de relaciones logarítmicas. σ_2 es la varianza de relación logarítmica dentro del segundo grupo de diagnóstico (por ejemplo, ER(+)) y n_2 es el número de muestras para las que hay disponibles mediciones válidas de relaciones logarítmicas. El valor t representa la diferencia compensada por la varianza entre dos medias.

El conjunto de marcadores ordenados por importancia puede usarse para optimizar el número de marcadores en el conjunto utilizado para la discriminación. Esto se consigue generalmente en un método de "dejar uno fuera" de la siguiente manera: en una primera ejecución, un subconjunto, por ejemplo 5, de los marcadores de la parte superior de la lista ordenada por importancia se usa para generar un molde, donde, de X muestras, $X-1$ se usan para generar el molde y se predice el estado de la muestra restante. Este proceso se repite para cada muestra hasta que cada una de las X muestras se prediga una vez. En una segunda ejecución, se añaden marcadores adicionales, por ejemplo 5, de manera que ahora se genera un molde a partir de 10 marcadores y se predice el resultado de la muestra restante. Este proceso se repite hasta que se usa el conjunto completo de marcadores para generar el molde. Para cada una de las ejecuciones, se cuentan los errores de tipo 1 (falso negativo) y de tipo 2 (falso positivo); el número óptimo de marcadores es aquel número donde la tasa de error de tipo 1 o la tasa de error tipo 2 o, preferentemente, el total de la tasa de error de tipo 1 y de tipo 2 es la más baja.

Para los marcadores de pronóstico, la validación del conjunto de marcadores puede conseguirse mediante una estadística adicional, un modelo de supervivencia. Esta estadística genera la probabilidad de cáncer medida por, por ejemplo, la carga tumoral en función del tiempo desde el diagnóstico inicial. Puede usarse una serie de modelos, incluyendo Weibull, normal, log-normal, log logístico, log-exponencial o log-Rayleigh (Capítulo 12 "*Life Testing*", *S-PLUS 2000 GUIDE TO STATISTICS*, Vol. 2, página 368 (2000)). Para el modelo "normal", la probabilidad de metástasis distante P en el tiempo t se calcula como

$$P = \alpha x \exp(-t^2/\tau^2)$$

donde α es fijo e igual a 1 y τ es un parámetro que se ha de ajustar y mide la "vida útil esperada".

Véase la Patente de los EE.UU. 7.171.311 para cada una de las ecuaciones mencionadas anteriormente. El contenido completo de la patente anterior se incorpora *por referencia* en el presente documento.

Será evidente para los expertos en la materia que los métodos anteriores, en particular, los métodos estadísticos, descritos anteriormente, no se limitan a la identificación de marcadores asociados a un inhibidor de CDK o cáncer mediado por CDK, sino que pueden usarse para identificar un conjunto de genes marcadores asociados a cualquier fenotipo. El fenotipo puede ser la presencia o ausencia de una enfermedad tal como el cáncer, o la presencia o ausencia de cualquier afección clínica de identificación asociada a ese cáncer. En el contexto de la enfermedad, el fenotipo puede ser un pronóstico tal como un tiempo de supervivencia, la probabilidad de metástasis distante de una enfermedad, o la probabilidad de una respuesta particular a una pauta terapéutica o profiláctica. No es necesario que el fenotipo sea cáncer o una enfermedad; el fenotipo puede ser una característica nominal asociada a un individuo sano.

En una realización, la similitud se representa por un coeficiente de correlación entre el perfil de muestra y el molde. En otra realización, un coeficiente de correlación por encima de un umbral de correlación indica una gran similitud, mientras que un coeficiente de correlación por debajo del umbral indica una baja similitud. En algunas realizaciones, el umbral de correlación se establece como 0,3, 0,4, 0,5 o 0,6. En otra realización, la similitud entre un perfil de muestra y una plantilla está representada por una distancia entre el perfil de muestra y el molde. En una realización, una distancia por debajo de un valor dado indica una gran similitud, mientras que una distancia igual o mayor que el valor dado indica baja similitud.

Determinación de niveles de expresión de gen marcador

Métodos

Los niveles de expresión de los genes marcadores en una muestra pueden determinarse por cualquier medio conocido en la técnica. El nivel de expresión puede determinarse mediante el aislamiento y la determinación del nivel (es decir, la cantidad) de ácido nucleico transcrito a partir de cada gen marcador. Como alternativa o adicionalmente, puede determinarse el nivel de proteínas específicas codificadas por un gen marcador.

El nivel de expresión de genes marcadores específicos puede conseguirse mediante la determinación de la cantidad de ARNm o polinucleótidos derivados de los mismos, presentes en una muestra. Puede usarse cualquier método para determinar los niveles de ARN. Por ejemplo, el ARN se aísla de una muestra y se separa en un gel de agarosa.

El ARN separado se transfiere después a un soporte sólido, tal como un filtro. Después, las sondas de ácido nucleico que representan uno o más marcadores se hibridan con el filtro mediante hibridación de Northern y se determina la cantidad de ARN derivado de marcador. Dicha determinación puede ser visual o asistida por máquina, por ejemplo, mediante el uso de un densitómetro. Otro método de determinación de niveles de ARN es mediante el uso de una transferencia puntual o una transferencia por ranuras. En este método, el ARN o ácido nucleico derivado del mismo, de una muestra, se marca. El ARN o ácido nucleico derivado del mismo después se hibrida con un filtro que contiene oligonucleótidos derivados de uno o más genes marcadores, en el que los oligonucleótidos se colocan sobre el filtro en ubicaciones individuales fácilmente identificables. La hibridación, o la falta de la misma, del ARN marcado con los oligonucleótidos unidos al filtro se determina visualmente o mediante densitómetro. Los polinucleótidos pueden marcarse usando un marcador radiactivo o un marcador fluorescente (es decir, visible).

Estos ejemplos no tienen por objeto ser limitantes; se conocen en la técnica otros métodos de determinación de la abundancia de ARN.

Finalmente, la expresión de genes marcadores en una serie de muestras de ensayo de tejido puede caracterizarse usando una "matriz de tejidos" (Kononen, *et al.*, *Nat. Med.*, 1998, 4 (7): 844-847). En un conjunto de tejidos, se evalúan muestras de tejido múltiples en la misma micromatriz. Las matrices permiten la detección in situ de niveles de ARN y proteína; secciones consecutivas permiten el análisis de múltiples muestras simultáneamente.

Micromatrices

En algunas realizaciones, se usan micromatrices de polinucleótidos para medir la expresión de manera que el estado de expresión de cada uno de los marcadores en uno o más de los conjuntos de genes de la invención, que se describe en el presente documento, se evalúe simultáneamente. Las micromatrices de la invención comprenden preferentemente al menos 2, 3, 4, 5 o más marcadores, o todos los marcadores, o cualquier combinación de marcadores, identificados como informativos de clasificación dentro de un subconjunto sujeto. El número real de marcadores informativos que comprende la micromatriz variará dependiendo de la afección particular de interés, el número de marcadores identificados y, opcionalmente, el número de marcadores informativos que se encontró que dieron como resultado en al menos un error de Tipo I, un error de Tipo II o un error de Tipo I y un error de Tipo II en la determinación de un fenotipo de criterio de valoración. Como se usa en el presente documento, "error de Tipo I" significa un falso positivo y "error de Tipo II" significa un falso negativo; en el ejemplo de predicción de la respuesta terapéutica de un paciente a la exposición a un inhibidor de CDK, el error de Tipo I es la caracterización errónea de un individuo con una respuesta terapéutica a un inhibidor de CDK como no respondedor al tratamiento con inhibidor de CDK y el error de Tipo II es la caracterización errónea de un individuo sin respuesta al tratamiento con inhibidor de CDK como que tiene una respuesta terapéutica.

En realizaciones específicas, la invención proporciona matrices de polinucleótidos en las que los marcadores identificados para un subconjunto sujeto particular comprenden al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 98 % de las sondas en dicha matriz. En otra realización específica, la micromatriz comprende una pluralidad de sondas, en la que dicha pluralidad de sondas comprende sondas complementarias e hibridables con al menos el 75 % de los marcadores informativos de exposición/predicción de inhibidor de CDK identificados para un subconjunto particular de pacientes. Las micromatrices de la invención, por supuesto, pueden comprender sondas complementarias que son capaces de hibridarse con marcadores informativos de predicción/evaluación de inhibidores de CDK para una pluralidad de los subconjuntos sujeto, o para cada subconjunto sujeto, identificados para una afección particular. En fomento de la misma, una micromatriz de la invención comprende una pluralidad de sondas complementarias y que se hibridan con al menos el 75 % de los marcadores informativos de predicción/evaluación del inhibidor de CDK identificados para cada subconjunto sujeto identificado para la afección de interés y en la que dichas sondas, en total, son al menos el 50 % de las sondas en dicha micromatriz.

En otra realización específica más, la micromatriz es una micromatriz de ADNc disponible en el mercado que comprende al menos dos marcadores identificados mediante los métodos descritos en el presente documento. Preferentemente, una micromatriz de ADNc disponible en el mercado comprende todos los marcadores identificados mediante los métodos descritos en el presente documento como que son informativos para un subconjunto de pacientes para una afección particular. Sin embargo, una micromatriz de este tipo puede comprender al menos 1, 2, 3, 4 o 5 de dichos marcadores, hasta el número máximo de marcadores identificados.

Cualquiera de las micromatrices descritas en el presente documento puede proporcionarse en un recipiente sellado en un kit.

En otras realizaciones, la matriz comprende una pluralidad de sondas derivadas de marcadores enumerados en cualquiera de las Tablas 1 en combinación con una pluralidad de otras sondas, derivadas de marcadores no enumerados en ninguna de las Tablas 1, que se identifican como informativos para la predicción de la sensibilidad a un inhibidor de CDK, la evaluación de la respuesta terapéutica, etc.

Polinucleótidos utilizados para medir los productos de los biomarcadores de la invención

También se contemplan polinucleótidos capaces de unirse específica o selectivamente a los transcritos de ARNm que codifican los biomarcadores de polipéptidos de la invención. Por ejemplo: oligonucleótidos, ADNc, ADN, ARN, productos de PCR, ADN sintético, ARN sintético u otras combinaciones de nucleótidos naturales o modificados que se hibridan específicamente y/o selectivamente con uno o más de los productos de ARN del biomarcador de la invención son útiles de acuerdo con la invención.

En una realización preferida, se usan los oligonucleótidos, ADNc, ADN, ARN, productos de PCR, ADN sintético, ARN sintético u otras combinaciones de oligonucleótidos de nucleótidos naturales o modificados que se hibridan específica y selectivamente con uno o más de los productos de ARN del biomarcador de la invención.

Para determinar los niveles de expresión (aumentados o disminuidos) de genes en la práctica de la presente invención, puede usarse cualquier método conocido en la técnica. En una realización de la invención, se usa la expresión basada en la detección de ARN que se hibrida con los genes identificados y desvelados en el presente documento. Esto se realiza fácilmente mediante cualquier método de detección o amplificación de ARN conocido o reconocido como equivalente en la técnica, tal como, pero sin limitación, transcripción inversa-PCR y métodos para detectar la presencia o ausencia de secuencias estabilizadoras o desestabilizadoras de ARN.

Como alternativa, puede usarse la expresión basada en la detección del estado del ADN. La detección del ADN de un gen identificado como puede usarse para genes que tienen una expresión aumentada en correlación con un resultado particular. Esto puede realizarse fácilmente mediante métodos basados en PCR conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, Q-PCR. Por el contrario, la detección del ADN de un gen identificado como amplificado puede usarse para genes que tienen una expresión aumentada en correlación con un resultado de tratamiento particular. Esto puede realizarse fácilmente mediante métodos de hibridación in situ fluorescente (FISH) e hibridación cromosómica in situ (CISH) basados en PCR conocidos en la técnica.

Técnicas para medir los productos de ARN de los biomarcadores de la invención

PCR en tiempo real

En la práctica, un ensayo de expresión basado en la expresión génica basado en un pequeño número de genes, es decir, aproximadamente de 1 a 3000 genes puede realizarse con relativamente poco esfuerzo usando tecnología cuantitativa de PCR en tiempo real familiar para los laboratorios clínicos. La PCR cuantitativa en tiempo real mide la acumulación de productos de PCR a través de una sonda fluorogénica doblemente marcada. Puede usarse diversos métodos de normalización, tales como un competidor interno para cada secuencia diana, un gen de normalización contenido dentro de la muestra o un gen constitutivo. Puede aislarse suficiente ARN para la PCR en tiempo real a partir de cantidades bajas de miligramos de un sujeto. Ahora pueden usarse termocicladores cuantitativos con tarjetas microfluidicas precargadas con reactivos que hacen que el uso clínico habitual de ensayos basados en la expresión de múltiples genes sea un objetivo realista.

Los marcadores génicos de los diversos conjuntos de genes de la invención o un subconjunto de genes seleccionados entre los conjuntos de genes de la invención, que se someten a ensayo de acuerdo con la presente invención, están normalmente en forma de ARN total o ARNm o ARN total o ARNm transcritos de forma inversa. Se conocen bien en la técnica métodos generales para la extracción de ARN total y ARNm y se desvelan en libros de texto convencionales de biología molecular, incluyendo Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). El aislamiento del ARN también puede realizarse usando un kit de purificación, un conjunto de tampón y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen (Valencia, CA) y Ambion (Austin, TX), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La PCR cuantitativa en tiempo real de TAQman puede realizarse usando reactivos de PCR disponibles en el mercado (Applied Biosystems, Foster City, CA) y equipos, tales como el sistema de detección de secuencia ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sistema consiste en un termociclador, láser, dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés), cámara y ordenador. El sistema amplifica las muestras en un formato de 96 pocillos o de 384 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge en tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos y se detecta en el CCD. El sistema incluye software para ejecutar el instrumento y para analizar los datos.

Basándose en los conjuntos de genes marcadores identificados en la presente invención, puede usarse un ensayo TAQman de PCR en tiempo real para hacer mediciones de expresión génica y realizar los métodos de clasificación que se describen en el presente documento. Como es evidente para un experto en la materia, puede seleccionarse una amplia diversidad de cebadores oligonucleotídicos y sondas que son complementarios o se hibridan con los marcadores de la invención basándose en las secuencias de transcripción del marcador expuestas en el Listado de secuencias.

Hibridación de matriz

El polinucleótido utilizado para medir los productos de ARN de la invención puede usarse como miembros de ácido nucleico asociados de forma estable a un soporte para comprender una matriz de acuerdo con un aspecto de la

invención. La longitud de un miembro de ácido nucleico puede oscilar de 8 a 1000 nucleótidos de longitud y se eligen de manera que sean específicos para los productos de ARN de los biomarcadores de la invención. En una realización, estos miembros son selectivos para los productos de ARN de la invención. Los miembros de ácido nucleico pueden ser monocatenarios o bicatenarios y/o pueden ser oligonucleótidos o fragmentos de PCR amplificados a partir de ADNc. Preferentemente, los oligonucleótidos tienen aproximadamente 20-30 nucleótidos de longitud. Las ETS tienen preferentemente una longitud de 100 a 600 nucleótidos. Un experto en la materia entenderá que pueden usarse porciones de las regiones expresadas de los biomarcadores de la invención como una sonda en la matriz. Más en particular son útiles oligonucleótidos complementarios a los genes de la invención y ADNc o EST procedentes de los genes de la invención. Para las matrices basadas en oligonucleótidos, la selección de oligonucleótidos correspondientes al gen de interés que son útiles como sondas se entiende bien en la técnica. Más en particular, es importante elegir regiones que permitan la hibridación con los ácidos nucleicos diana. Son factores importantes factores tales como la Tm del oligonucleótido, el porcentaje de contenido de GC, el grado de estructura secundaria y la longitud del ácido nucleico. Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 6.551.784.

15 Construcción de una matriz de ácidos nucleicos

En los métodos propuestos, una matriz de miembros de ácido nucleico asociados de manera estable a la superficie de un soporte sustancialmente se pone en contacto con una muestra que comprende ácidos nucleicos diana en condiciones de hibridación suficientes para producir un patrón de hibridación de miembros de ácido nucleico complementarios/complejos diana en los que uno o más miembros de ácido nucleico complementarios en posiciones únicas en la matriz se hibridan específicamente con ácidos nucleicos diana. La identidad de ácidos nucleicos diana que se hibridan puede determinarse con referencia a la ubicación de los miembros de ácido nucleico sobre la matriz.

Los miembros de ácido nucleico pueden producirse usando técnicas establecidas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la transcripción inversa (RT). Estos métodos son similares a los actualmente conocidos en la técnica (véase, *PCR Strategies*, Michael A. Innis (Editor) *et al.*, (1995) y *PCR: Introduction to Biotechniques Series*, C. R. Newton, A. Graham (1997)). Los ácidos nucleicos amplificados se purifican mediante métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, purificación en columna o precipitación con alcohol). Un ácido nucleico se considera puro cuando se ha aislado de manera que esté sustancialmente libre de cebadores y productos incompletos producidos durante la síntesis del ácido nucleico deseado. Preferentemente, un ácido nucleico purificado también estará sustancialmente libre de contaminantes que puedan dificultar o enmascarar de otro modo la actividad de unión específica de la molécula.

Una matriz, de acuerdo con un aspecto de la invención, comprende una pluralidad de ácidos nucleicos unidos a una superficie de un soporte a una densidad que supera 20 ácidos nucleicos diferentes/cm², en la que cada uno de los ácidos nucleicos está unido a la superficie del soporte en una región preseleccionada no idéntica (por ejemplo, una micromatriz). Cada muestra asociada sobre la matriz comprende una composición de ácido nucleico, de identidad conocida, por lo general de secuencia conocida, como se describe en mayor detalle a continuación. Se puede emplear cualquier sustrato concebible en la invención.

En una realización, el ácido nucleico unido a la superficie del soporte es ADN. En una realización, el ácido nucleico unido a la superficie del soporte es ADNc sintetizado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por lo general, un miembro de ácido nucleico en la matriz, de acuerdo con la invención, tiene al menos 10, 25, 50, 60 nucleótidos de longitud. En una realización, un miembro de ácido nucleico tiene al menos 150 nucleótidos de longitud. Preferentemente, un miembro de ácido nucleico tiene menos de 1000 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, un miembro de ácido nucleico tiene menos de 500 nucleótidos de longitud.

En las matrices de la invención, las composiciones de ácido nucleico se asocian de forma estable a la superficie de un soporte, donde el soporte puede ser un soporte flexible o rígido. Por "asociado de forma estable" se entiende que cada miembro de ácido nucleico mantiene una posición única con respecto al soporte en condiciones de hibridación y lavado. Propiamente dicho, las muestras se asocian de forma estable no covalente o covalente a la superficie de soporte. Los ejemplos de asociación no covalente incluyen adsorción no específica, la unión basada en interacciones electrostáticas (por ejemplo, interacciones de pares iónicos), interacciones hidrófobas, interacciones de enlaces de hidrógeno, unión específica a través de un miembro de un par de unión específico unido covalentemente a la superficie de soporte y similares. Los ejemplos de unión covalente incluyen enlaces covalentes formados entre los ácidos nucleicos y un grupo funcional presente en la superficie del soporte rígido (por ejemplo, -OH), donde el grupo funcional puede existir de forma natural o estar presente como un miembro de un grupo de unión introducido, como se describe con mayor detalle a continuación.

La cantidad de ácido nucleico presente en cada composición será suficiente para proporcionar una hibridación y una detección adecuadas de secuencias de ácido nucleico diana durante el ensayo en el que se emplea la matriz. Generalmente, la cantidad de cada miembro de ácido nucleico asociado de manera estable al soporte de la matriz es de al menos aproximadamente 0,001 ng, preferentemente de al menos aproximadamente 0,02 ng y más preferentemente de al menos aproximadamente 0,05 ng, donde la cantidad puede ser tan alta como de 1000 ng o más alta, pero generalmente no excederá de aproximadamente 20 ng. Cuando el miembro de ácido nucleico "se

aplica puntualmente" sobre el soporte en una aplicación puntual que comprende una dimensión circular global, el diámetro de la "aplicación puntual" generalmente estará en el intervalo de aproximadamente 10 a 5.000 μm , por lo general de aproximadamente 20 a 2.000 μm y más por lo general de aproximadamente 100 a 200 μm .

- 5 Los miembros de ácido nucleico de control pueden estar presentes en la matriz incluyendo miembros de ácido nucleico que comprenden oligonucleótidos o ácidos nucleicos correspondientes a ADN genómico, genes constitutivos, secuencias de vector, secuencia de ácido nucleico vegetales, genes de control negativo y positivo y similares. Los miembros de ácido nucleico de control son genes de calibración o control cuya función no es decir si se expresa un gen "clave" particular de interés, sino más bien proporcionar otra información útil, tal como nivel de expresión de fondo o basal.

Otros ácidos nucleicos de control se aplican puntualmente sobre la matriz y se usan como ácidos nucleicos de control de la expresión diana y nucleótidos de control de apareamiento erróneo para controlar la unión no específica o la hibridación cruzada a un ácido nucleico en la muestra distinto de la diana a la que se dirige la sonda. Las sondas de apareamiento erróneo indican, por tanto, si una hibridación es específica o no. Por ejemplo, si la diana está presente, las sondas perfectamente apareadas deberían ser uniformemente más brillantes que las sondas apareadas erróneamente. Además, si están presentes todos los apareamientos erróneos de control, las sondas apareadas erróneamente se usan para detectar una mutación.

20 Pueden usarse numerosos métodos para la unión de los miembros de ácido nucleico de la invención al sustrato (un proceso denominado "aplicación puntual"). Por ejemplo, los ácidos nucleicos se unen usando las técnicas de, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 5.807.522, que se incorpora en el presente documento *por referencia*, para enseñar métodos de unión de polímero. Como alternativa, la aplicación puntual realizarse usando tecnología de impresión por contacto como se conoce en la técnica.

25 La medición de la expresión del producto de ARN de la invención puede realizarse mediante el uso de aquellos polinucleótidos que son específicos y/o selectivos para los productos de ARN de la invención para cuantificar la expresión del producto de ARN. En una realización específica de la invención, los polinucleótidos que son específicos y/o selectivos para los productos de ARN son sondas o cebadores. En una realización, estos polinucleótidos están en forma de sondas de ácido nucleico que pueden aplicarse puntualmente en una matriz para medir el ARN de la muestra de un individuo que se ha de medir. En otra realización, las matrices comerciales pueden usarse para medir la expresión del producto de ARN. En otra realización más, los polinucleótidos que son específicos y/o selectivos para los productos de ARN de la invención se usan en forma de sondas y cebadores en técnicas tales como RT PCR cuantitativa en tiempo real, usando, por ejemplo, SYBR®Green o usando las técnicas TaqMan® o Molecular Beacon, donde los polinucleótidos utilizados se usan en forma de un cebador directo, un cebador inverso, una sonda marcada con TaqMan o una sonda marcada con Molecular Beacon.

30 Cuando solo se han de analizar uno o dos genes, el ácido nucleico derivado de la o las células de muestra puede amplificarse preferentemente mediante el uso de cebadores apropiados de modo que solo los genes que se han de analizar se amplifiquen para reducir las señales de fondo de otros genes expresados en la célula de la muestra. Como alternativa y cuando se van a analizar múltiples genes o cuando se usan muy pocas células (o una célula), el ácido nucleico de la muestra puede amplificarse globalmente antes de la hibridación con los polinucleótidos inmovilizados. Por supuesto, el ARN o el homólogo de ADNc del mismo, puede marcarse directamente y usarse, sin amplificación, mediante métodos conocidos en la técnica.

45 Uso de una micromatriz

Una "micromatriz" es una matriz lineal o bidimensional de regiones preferentemente individuales, teniendo cada una un área definida, formada sobre la superficie de un soporte sólido tal como, pero no limitado a, vidrio, plástico o membrana sintética. La densidad de las regiones individuales en una micromatriz se determina mediante el número total de polinucleótidos inmovilizados que se han de detectar en la superficie de un único soporte en fase sólida, preferentemente al menos aproximadamente 50/cm², más preferentemente al menos aproximadamente 100/cm², incluso más preferentemente al menos aproximadamente 500/cm², pero preferentemente inferior a aproximadamente 1000/cm². Preferentemente, las matrices contienen menos de aproximadamente 500, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, aproximadamente 2500 o aproximadamente 3000 polinucleótidos inmovilizados en total. Como se usa en el presente documento, una micromatriz de ADN es una matriz de oligonucleótidos o polinucleótidos colocados sobre un chip u otras superficies utilizadas para hibridar con polinucleótidos amplificados o clonados a partir de una muestra. Puesto que la posición de cada grupo particular de cebadores en la matriz se conoce, las identidades de los polinucleótidos de una muestra pueden determinarse basándose en su unión a una posición particular en la micromatriz.

60 La determinación de los niveles de expresión génica puede conseguirse utilizando micromatrices. En general, las siguientes etapas pueden estar implicadas: (a) obtener una muestra de ARNm de un sujeto y preparar ácidos nucleicos marcados a partir de la misma (los "ácidos nucleicos diana" o "dianas"); (b) poner en contacto los ácidos nucleicos diana con una matriz en condiciones suficientes para que los ácidos nucleicos diana se unan a las sondas correspondientes sobre la matriz, por ejemplo, mediante hibridación o unión específica; (c) retirada opcional de dianas no unidas de la matriz; (d) detectar las dianas unidas y (e) analizar los resultados, por ejemplo, usando

métodos de análisis informáticos. Como se usa en el presente documento, "sondas de ácido nucleico" o "sondas" son ácidos nucleicos unidos a la matriz, mientras que "ácidos nucleicos diana" son ácidos nucleicos que se hibridan con la matriz.

- 5 Pueden obtenerse muestras de ácido nucleico de un sujeto que se ha de someter a ensayo usando medios de muestreo "invasivos" o "no invasivos". Se dice que un medio de muestreo es "invasivo" si implica la recogida de ácidos nucleicos desde el interior de la piel o los órganos de un animal (incluidos animales murinos, humanos, ovinos, equinos, bovinos, porcinos, caninos o felinos). Los ejemplos de métodos invasivos incluyen, por ejemplo, la extracción de sangre, la recolección de semen, la biopsia con aguja, la aspiración pleural, la biopsia de cordón umbilical. Los ejemplos de dichos métodos se analizan por Kim *et al.*, *J. Virol.* 1992, 66: 3879-3882, Biswas, *et al.*, *Ana. NY Acad. Sci.*, 1990, 590: 582-583 y Biswas, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29: 2228-2233.

- 15 Por el contrario, un medio de muestreo "no invasivo" es uno en el que las moléculas de ácido nucleico se recuperan de una superficie interna o externa del animal. Los ejemplos de medios de muestreo "no invasivos" incluyen, entre otros, "frotis" o la recogida de lágrimas, saliva, orina o material fecal.

- 20 En una realización de la presente divulgación, se obtienen una o más células del sujeto que se ha de analizar y el ARN se aísla de las células. En una realización, se obtiene una muestra de células del sujeto. También es posible obtener una muestra de células de un sujeto y después enriquecer la muestra para un tipo de célula deseado. Por ejemplo, las células pueden aislarse de otras células usando diversas técnicas, tales como aislamiento con un anticuerpo que se une a un epítipo sobre la superficie celular del tipo de célula deseado. Cuando las células deseadas están en un tejido sólido, pueden diseccionarse células particulares, por ejemplo, mediante microdissección o mediante microdissección por captura con láser (LCM, por sus siglas en inglés) (véase, Bonner, *et al.*, *Science*, 1997, 278: 1481; Emmert-Buck, *et al.*, *Science*, 1996, 274: 998; Fend, *et al.*, *Am. J. Path.*, 1999, 154: 61; y Murakami, *et al.*, *Kidney Int.*, 2000, 58: 1346).

- 30 El ARN puede extraerse de muestras de tejido o células mediante diversos métodos, por ejemplo, lisis de tiocianato de guanidinio seguida de centrifugación con CsCl (Chirgwin, *et al.*, *Biochemistry*, 1979, 18: 5294-5299). El ARN de células individuales puede obtenerse como se describe en los métodos para preparar bibliotecas de ADNc a partir de células individuales (véase, Dulac, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 1998, 36: 245; Jena, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1996, 190: 199).

- 35 La muestra de ARN puede enriquecerse aún más para una especie en particular. En una realización, por ejemplo, puede aislarse ARN poli(A)+ a partir de una muestra de ARN. En otra realización, la población de ARN puede enriquecerse para secuencias de interés mediante síntesis de ADNc específico de cebador o múltiples rondas de amplificación lineal basadas en la síntesis de ADNc y transcripción in vitro dirigida al molde (véase, Wang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 9717; Dulac, *et al.*, citado anteriormente, Jena, *et al.*, citado anteriormente). Además, la población de ARN, enriquecida o no en especies o secuencias particulares, puede amplificarse adicionalmente mediante diversos métodos de amplificación incluyendo, por ejemplo, PCR; reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, Wu y Wallace, *Genomics*, 1989, 4: 560; Landegren, *et al.*, *Science*, 1988, 241: 1077); replicación de secuencia autosustentable (SSR) (véase, Guatelli, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87: 1874); amplificación de la secuencia basada en ácido nucleico (NASBA) y amplificación de la transcripción (véase, Kwok, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 1173). Los métodos para la tecnología de PCR son bien conocidos en la técnica (véase, *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, ed. HA Erlich, Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, editores Innis *et al.*, Academic Press, San Diego, Calif., 1990; Mattila, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 19: 4967, 1991; Eckert, *et al.*, *PCR Methods and applications*, 1991, 1: 17; PCR, eds. McPherson *et al.*, IRL Press, Oxford); y la patente de los EE.UU. N.º 4.683.202). Se describen métodos de amplificación, por ejemplo, por Ohshima, *et al.*, *BioTechniques*, 2000, 29: 530; Luo, *et al.*, *Nat. Med.*, 1999, 5: 117; Hegde, *et al.*, *BioTechniques*, 2000, 29: 548; Kacharina, *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 1999, 303: 3; Livesey, *et al.*, *Curr. Biol.*, 2000, 10:301; Spirin, *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999, 40: 3108; y Sakai, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 2000, 287: 32). La amplificación de ARN y la síntesis de ADNc también pueden realizarse en células in situ (véase, Eberwine, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1992, 89: 3010).

- 55 En otra realización más de la invención, toda o parte de una secuencia marcadora desvelada puede amplificarse y detectarse mediante métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y variaciones de los mismos, tales como, pero sin limitación, PCR cuantitativa (Q-PCR), PCR de transcripción inversa (RT-PCR) y PCR en tiempo real, opcionalmente RT-PCR en tiempo real. Dichos métodos utilizarían uno o dos cebadores que son complementarios a porciones de una secuencia desvelada, donde los cebadores se usan para cebador la síntesis de ácidos nucleicos.

- 60 Los ácidos nucleicos recién sintetizados están opcionalmente marcados y pueden detectarse directamente o mediante hibridación con un polinucleótido de la invención.

- 65 Las moléculas de ácido nucleico pueden marcarse para permitir la detección de la hibridación de las moléculas de ácido nucleico con una micromatriz. Es decir, la sonda puede comprender un miembro de un sistema de producción de señal y, por tanto, es detectable, ya sea directamente o mediante una acción combinada con uno o más

miembros adicionales de un sistema de producción de señal. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden marcarse con un dNTP marcado fluorescentemente (véase, Kricka, *Nonisotopic DNA Probe Technics*. Academic Press San Diego, CA, 1992), dNTP biotinilados o rNTP seguido de la adición de estreptavidina marcada, marcadores quimioluminiscentes o isótopos. Otro ejemplo de marcadores incluye "balizas moleculares" como se describe en Tyagi y Kramer, *Nature Biotech.*, 1996, 14: 303. Los ácidos nucleicos recién sintetizados pueden ponerse en contacto con polinucleótidos (que contienen secuencias) de la invención en condiciones que permiten su hibridación. La hibridación también puede determinarse, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón (véase, Thiel, *et al.*, *Anal. Chem.*, 1997, 69: 4948).

En una realización, se marca una pluralidad, por ejemplo, dos conjuntos de ácidos nucleicos diana, y se usan en una reacción de hibridación (análisis "múltiple"). Por ejemplo, un conjunto de ácidos nucleicos puede corresponder al ARN de una célula y otro conjunto de ácidos nucleicos puede corresponder al ARN de otra célula. La pluralidad de conjuntos de ácidos nucleicos puede marcarse con diferentes marcadores, por ejemplo, marcadores fluorescentes diferentes (por ejemplo, fluoresceína y rodamina) que tengan espectros de emisión distintos para que puedan distinguirse. Los conjuntos pueden mezclarse e hibridarse simultáneamente en una micromatriz (véase, Shena, *et al.*, *Science*, 1995, 270: 467-470).

Los expertos en la materia conocen una serie de configuraciones y métodos de micromatrices diferentes para su producción y se desvelan en las Patentes de los EE.UU. N.º: 5.242.974; 5.384.261; 5.405.783; 5.412.087; 5.424.186; 5.429.807; 5.436.327; 5.445.934; 5.556.752; 5.405.783; 5.412.087; 5.424.186; 5.429.807; 5.436.327; 5.472.672; 5.527.681; 5.529.756; 5.545.531; 5.554.501; 5.561.071; 5.571.639; 5.593.839; 5.624.711; 5.700.637; 5.744.305; 5.770.456; 5.770.722; 5.837.832; 5.856.101; 5.874.219; 5.885.837; 5.919.523; 6.022.963; 6.077.674; y 6.156.501; Shena, *et al.*, *Tibtech*, 1998, 16: 301; Duggan, *et al. Nat. Genet.*, 1999, 21: 10; Bowtell, *et al.*, *Nat. Genet.*, 1999, 21:25; Lipshutz, *et al.*, *Nature Genet.* 1999, 21:20-24; Blanchard, *et al.*, *Biosensors y Bioelectronics*, 11:687-690, 1996; Maskos, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1993, 21: 4663-4669; Hughes, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 2001, 19: 342; cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento *por referencia*. Las patentes que describen métodos para usar matrices en diversas aplicaciones incluyen: la patente de los EE.UU. N.º: 5.143.854; 5.288.644; 5.324.633; 5.432.049; 5.470.710; 5.492.806; 5.503.980; 5.510.270; 5.525.464; 5.547.839; 5.580.732; 5.661.028; 5.848.659; y 5.874.219; cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia.

En una realización, puede sintetizarse una matriz de oligonucleótidos sobre un soporte sólido. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen vidrio, plásticos, polímeros, metales, metaloides, materiales cerámicos, compuestos orgánicos, etc. Usando tecnologías de enmascaramiento de chips y química fotoprotectora, es posible generar matrices ordenadas de sondas de ácidos nucleicos. Estas matrices, que son conocidas, por ejemplo, como "chips de ADN" o matrices de polímeros inmovilizados a gran escala (matrices "VLSIPS®"), pueden incluir millones de regiones de sonda definidas sobre un sustrato que tiene un área de aproximadamente 1 cm a varios cm², incorporando de este modo de algunas a millones de sondas (véase, la Patente de los EE.UU. N.º 5.631.734).

Para comparar los niveles de expresión, los ácidos nucleicos marcados pueden ponerse en contacto con la matriz en condiciones suficientes para la unión entre el ácido nucleico diana y la sonda en la matriz. En una realización, las condiciones de hibridación pueden seleccionarse para proporcionar el nivel deseado de especificidad de hibridación; es decir, condiciones suficientes para que se produzca la hibridación entre los ácidos nucleicos marcados y las sondas sobre la micromatriz.

La hibridación puede realizarse en condiciones que permitan una hibridación esencialmente específica. La longitud y el contenido de GC del ácido nucleico determinarán el punto de fusión térmica y, por tanto, las condiciones de hibridación necesarias para obtener la hibridación específica de la sonda con el ácido nucleico diana. Estos factores son bien conocidos por un experto en la materia y también pueden analizarse en ensayos. Se puede encontrar una extensa guía de hibridación de ácido nucleico en Tijssen, *et al.*, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: *Hybridization with Acid Nucleic Probes*, P. Tijssen, ed., Elsevier, NY, 1993.

Los métodos descritos anteriormente darán como resultado la producción de patrones de hibridación de ácidos nucleicos diana marcados sobre la superficie de la matriz. Los patrones de hibridación resultantes de los ácidos nucleicos marcados pueden visualizarse o detectar sede varias formas, seleccionándose la manera particular de detección basándose en el marcador particular del ácido nucleico diana. Los medios de detección representativos incluyen recuento de centelleo, autorradiografía, medición de fluorescencia, medición calorimétrica, medición de emisión de luz, dispersión de luz y similares.

Uno de estos métodos de detección utiliza un escáner de matriz que está disponible en el mercado (Affymetrix, Santa Clara, California), por ejemplo, el 417® Arrayer, el 418® Array Scanner o el Agilent GeneArray® Scanner. Este escáner se controla desde un ordenador del sistema con una interfaz y herramientas de software fáciles de usar. Los resultados pueden importarse directamente o pueden leerse indirectamente mediante diversas aplicaciones de software. Se describen dispositivos de exploración a modo de ejemplo, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.143.854 y 5.424.186.

Administración de inhibidores de CDK

El biomarcador predictivo de la presente invención puede usarse para identificar pacientes con cáncer que se predice que son respondedores al tratamiento con un inhibidor de CDK. Los pacientes diagnosticados con cáncer en los que el cáncer es un trastorno proliferativo mediado por CDK o uno en el que la célula cancerosa y el tumor expresan señalización aberrante de CDK y, como tales, susceptibles de tratamiento con un inhibidor de CDK incluyen, pero no se limitan a, leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica, sarcoma de Kaposi; cánceres de mama; cánceres de huesos, cánceres cerebrales, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de vesícula biliar y de conductos biliares, cánceres de retina, cánceres de esófago, cánceres gástricos, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer de endometrio, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, sarcomas, tumor de Wilms, cáncer de cuello del útero, cáncer de piel, carcinoma nasofaríngeo, liposarcoma, carcinoma epitelial, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de vesícula biliar, adenocarcinoma de parótida y sarcoma endometrial.

El inhibidor de CDK puede administrarse mediante cualquier método de administración conocido por un experto en la materia. Los ejemplos de vías de administración incluyen, pero no se limitan a, vía oral, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, sublingual, intramuscular, rectal, transbucal, intranasal, liposómica, por inhalación, vaginal, intraocular, mediante administración local mediante catéter o estent, subcutánea, intraadiposa, intraarticular, intratecal o en una forma de dosificación de liberación lenta.

Los inhibidores de CDK o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos, pueden administrarse de acuerdo con cualquier dosis y pauta de dosificación que consiga una dosis eficaz para tratar el cáncer. Por ejemplo, los inhibidores de CDK pueden administrarse en una dosis diaria total de hasta 1000 mg, preferentemente por vía oral, una, dos o tres veces al día, de manera continua (todos los días) o intermitentemente (por ejemplo, 3-5 días a la semana).

Un inhibidor de CDK también puede administrarse en combinación con un agente antineoplásico, en el que la cantidad de CDK y la cantidad del agente antineoplásico juntas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz. La terapia de combinación puede proporcionar una ventaja terapéutica en vista de la toxicidad diferencial asociada a las dos modalidades de tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento con inhibidores de CDK puede conducir a una toxicidad particular que no se ve con el agente antineoplásico y viceversa. Como tal, esta toxicidad diferencial puede permitir que cada tratamiento se administre a una dosis en la que dichas toxicidades no existan o son mínimas, de modo que juntas la terapia de combinación proporcionan una dosis terapéutica mientras se evitan las toxicidades de cada uno de los constituyentes de los agentes de combinación. Además, cuando los efectos terapéuticos conseguidos como resultado del tratamiento de combinación se potencian o son sinérgicos, por ejemplo, significativamente mejores que los efectos terapéuticos aditivos, las dosis de cada uno de los agentes pueden reducirse adicionalmente, disminuyendo de este modo las toxicidades asociadas a un efecto en mayor medida.

El inhibidor de CDK puede combinarse con quimioterapia y radioterapia. El inhibidor de CDK también se combina con un agente antineoplásico, pero se combina preferentemente con agentes que dañan el ADN. Los ejemplos de dicho agente antineoplásico utilizado en un tratamiento de combinación con inhibidores de CDK son, por ejemplo, pero sin limitación, gemcitabina, cisplatino, carboplatino, 5-fluorouracilo, pemetrexed, doxorubicina, camptotecina y mitomicina. Un inhibidor de CDK puede administrarse en una composición farmacéutica, preferentemente adecuada para la administración oral. Un inhibidor de CDK puede administrarse por vía oral en una cápsula de gelatina, que puede comprender excipientes tales como celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica y estearato de magnesio.

Los inhibidores de CDK pueden administrarse en una dosis diaria total que puede variar de paciente a paciente y pueden administrarse a diferentes pautas de dosificación. Las dosificaciones adecuadas son la dosificación diaria total de entre aproximadamente 25-4000 mg/m² administrados por vía oral una vez al día, dos veces al día o tres veces al día, continuos (todos los días) o intermitentemente (por ejemplo, 3-5 días a la semana). Las composiciones también pueden administrarse en ciclos, con períodos de descanso entre los ciclos (por ejemplo, tratamiento de dos a ocho semanas con un período de descanso de hasta una semana entre tratamientos). Otras combinaciones de tratamiento y pautas de dosificación adecuados se exponen en el documento WO 2007/126122, el documento WO2007/126128 y el documento WO 2008/133866.

Un experto en la materia reconocerá y apreciará que una o más de las dosificaciones específicas y las pautas de dosificación enumeradas para un inhibidor de CDK de la presente invención también pueden ser aplicables para su uso en combinación con uno o más de los agentes antineoplásicos. Un experto en la materia también reconocerá y apreciará que la dosificación específica y el programa de dosificación del agente antineoplásico pueden variar y que la dosis óptima, la pauta de dosificación y la vía de administración se determinarán en función del agente antineoplásico específico que se está usando en combinación.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Materiales y métodos

A. Reactivos

10 Se disolvió SCH 727965 (Dinaciclib) en dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich, San Luis, MO) a 10 mmol/l y se almacenaron alícuotas a -80°C.

B. Cultivo celular

15 Se obtuvieron estirpes celulares de la American Type Culture Collection, la European Collection of Cell Cultures o la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Las estirpes celulares se cultivaron usando técnicas convencionales en medio RPMI 1640, DMEM, F-12K o L-15 suplementados con FBS al 10 % (Invitrogen™, Life Technologies™, Grand Island, NY) y/o HEPES, L-glutamina, glucosa o bicarbonato de sodio.

20 C. Transferencia de Western y cuantificación de la banda

25 Se sembraron células en placas de cultivo celular de 10 cm, se cultivaron a una confluencia del 60-90 % y se trataron con SCH 727965 50 nM o 100 nM (Dinaciclib). Se usó DMSO como control negativo solamente de solvente. Después de los tiempos de tratamiento especificados, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco enfriada a 4 °C (DPBS) y se lisaron en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación enfriada con hielo (RIPA) (Cell Signaling Technology®, Beverly, MA) que contenía inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics (Applied Biosciences, Indianápolis, IN), comprimido completo mini libre de EDTA) y cócteles de inhibidor de fosfatasa (Roche Diagnostics (Applied Biosciences, Indianapolis, IN), comprimido PhosSTOP). Los lisados celulares se recogieron usando un elevador de células (Costar®, Sigma Aldrich, San Luis, MO), se transfirieron a tubos de microcentrífuga, se sometieron a ultrasonido brevemente y el material no soluble se retiró mediante microfuga a 12 kpm, 4 °C, 10 min. En los casos de desprendimiento de células inducidas por SCH 727965 (Dinaciclib), se recogieron los medios de cultivo y el lavado con DPBS y las células se recogieron mediante centrifugación y se combinaron con el lisado de RIPA en placa.

35 Se separaron cantidades iguales o diluciones proporcionales de proteínas electroforéticamente en NuPAGE 4 a geles de poliacrilamida Bis-Tris al 12 % (Invitrogen™, Life Technologies™, Grand Island, NY). Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (Invitrogen™, Life Technologies™, Grand Island, NY) y se bloquearon con tampón StartingBlock (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

40 Se usaron anticuerpos primarios (Cell Signaling Technology®, Beverly, MA) dirigidos contra las siguientes proteínas: PARP escindida (9541), MCL-1 (5453), MYC (5605), alfa-Tubulina (3873), BCL-xL (2765) y BCL-2 (2870). Los anticuerpos contra ARN pol II (8WG16) y fosfoserina 2 de ARN pol II (H5) fueron de Covance, Princeton, NJ (MPY-127R). Las membranas se sondaron con anticuerpos primarios y secundarios en StartingBlock y se lavaron con TBS-Tween-20 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los anticuerpos secundarios unidos a HRP (Cell Signaling Technology®, Beverly, MA) se detectaron usando SuperSignal West Pico o sustrato quimioluminiscente Femto (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) con película de autorradiografía (Kodak, BioMax MR, Sigma Aldrich, San Luis) y las bandas se cuantificaron usando ImageQuant TL 7.0 (GE Healthcare Life Sciences).

D. Cuantificación de ARN

50 Se realizó la cuantificación de ARN como se muestra en las Figuras 6A y 6B de la siguiente manera. Las células se sembraron en placas de cultivo celular de 10 cm, se cultivaron hasta una confluencia del 80-90 % y se trataron con dinaciclib 100 nM. Se usó DMSO como control negativo solamente de solvente. Después de los tiempos de tratamiento especificados, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con DPBS a temperatura ambiente, se disociaron de las placas usando tripsina (Invitrogen) y se diluyeron con medio de crecimiento recién preparado. Se recogieron 1,5 x 10⁵ células en 0,4 ml de medio de crecimiento en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Se preparó Mezcla de Lisis de Trabajo y se lisaron células de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el kit de procesamiento de muestras QuantiGene (Affymetrix, Panomics, Santa Clara, CA). Los niveles de ARN se cuantificaron mediante Assay QuantiGene Plex 2.0 (Affymetrix, Panomics, Santa Clara, CA) usando una arandela de placa magnética de acuerdo con las instrucciones del Manual del usuario. Se usó el conjunto de sondas específicas de diana 11837, se usó 311836-105 humano para cuantificar los transcritos expresados a partir de TUBA1B, MCL1, BCL2, GAPDH, CCNE1, BCL2L1 y BCL2L2.

E. Viabilidad celular y ensayos de caspasa-3/7

65 Se sembraron células en placas de 96 pocillos a densidades subconfluentes. Al día siguiente, las células se trataron durante tiempos específicos con dinaciclib a 25, 50 o 100 nM. Se usó DMSO como control negativo solamente de

solvente. La viabilidad celular se determinó a partir de un mínimo de tres pocillos que contenían células por tratamiento sobre un mínimo de dos placas independientes usando el sistema de ensayo CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI). La inducción apoptótica se determinó a partir de un mínimo de tres pocillos que contenían células por tratamiento usando el sistema de ensayo Caspase-Glo 3/7 (Promega, Madison, WI). Se calcularon cambios en la viabilidad celular o la actividad caspasa-3/7 intracelular como un porcentaje con respecto al control de DMSO. El análisis estadístico se realizó usando GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA).

F. Relación de MCL-1:BCL-xL ARNm

- 10 Los niveles de expresión de MCL-1 y BCL-xL de estirpe celular ($\log_{10}$) se obtuvieron de Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE).

Ejemplo 2

- 15 Sensibilidad de las estirpes celulares de cáncer al tratamiento a corto plazo con un inhibidor de CDK

Se trataron 23 estirpes celulares de pulmón, mama, ovario, colorrectales y de próstata, con niveles de expresión génica variables para la relación de MCL-1:BCL-xL, con el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib), durante 18 horas como se muestra en Materiales y Métodos, Ejemplo 1. La viabilidad de las estirpes celulares se midió mediante un ensayo citotóxico. Como se muestra en la Figura 5B, la viabilidad celular entre las estirpes celulares tratadas durante 18 horas con SCH 727965 (Dinaciclib) fue variable, variando del 23 % al 102 %, con respecto a un tratamiento de control negativo para DMSO. Como se muestra gráficamente en la Figura 5B, se observó una correlación significativa entre la viabilidad celular y el nivel de expresión génica de la relación de MCL-1:BCL-xL.

Ejemplo 3

Inducción de la apoptosis en estirpes celulares de cáncer para el tratamiento a corto plazo con un inhibidor de CDK

- 30 Se trataron 27 estirpes celulares de pulmón, mama, ovario, colorrectales y de próstata, con niveles de expresión génica variables para la relación de MCL-1:BCL-xL, con el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib) durante 8 horas. El nivel de inducción apoptótica se determinó midiendo el producto de escisión de PARP mediante transferencia de Western como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados del tratamiento de 8 horas con SCH 727965 (Dinaciclib) se muestran en las Figuras 8 y 9A, en los que la inducción apoptótica entre las estirpes celulares tratadas fueron variables. Como se muestra gráficamente en la Figura 9A, se observó una correlación significativa entre la inducción apoptótica, medida mediante la escisión de PARP y el nivel de expresión génica para la relación de MCL-1:BCL-xL.

Ejemplo 4

- 40 Correlación de sensibilidad del inhibidor de CDK a la alta relación de expresión de ARNm de MCL-1:BCL-xL

Una alta relación de expresión de ARNm de MCL-1:BCL-xL se correlaciona con la sensibilidad a un inhibidor de CDK, como se muestra en la Figura 10 mediante los coeficientes de correlación y los valores de p para el porcentaje de células que permanecen viables con respecto al nivel de expresión génica para la relación de MCL-1:BCL-xL para hemo 387 (leucemia y linfoma) y estirpes celulares de tumores sólidos (como una medida de la apoptosis) después del tratamiento durante 24 horas con el inhibidor de CDK, SCH 727965 (Dinaciclib). La medición de la viabilidad celular y la expresión de ARNm para la relación se determinó como se describe en Materiales y Métodos, Ejemplo 1. Como se muestra, el coeficiente de correlación (r) fue de -0,41 ($p = 5e-17$), indicativo de la correlación estadística de estos valores

Ejemplo 5

Inducción de la apoptosis en xenoinjertos de tumores sólidos de la alta relación de MCL-1:BCL-xL

- 55 Se formuló Dinaciclib en hidroxipropil beta-ciclodextrina al 20 % (HPBCD) en agua desionizada (vehículo). Los solicitantes (NCI-H23 y COLO-320DM) y el Piedmont Research Center (Morrisville, NC) (A2780, 22Rv1, SW480, JIMT-1, MDA-MB-231 y PC3) realizaron estudios de tumores de xenoinjerto en el laboratorio. Todos los estudios con animales se realizaron de acuerdo con las directrices establecidas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de cada institución.

Se realizaron estudios de xenoinjerto mediante la implantación de 1×10^7 células de A2780 en PBS, 5×10^6 células de MDA-MB-231 en PBS, aproximadamente 1 mm^3 de fragmentos de tumores de SW480 o aproximadamente 1 mm^3 de fragmentos de tumores PC3 en los flancos de ratones desnudos atímicos hembra (CrI:NU(NCr)-Foxn1nu, Charles River Laboratories); 5×10^6 NC1-H23 en Matrigel al 50 % (BD Biosciences), 5×10^6 células COLO-320DM en Matrigel al 50 % o 1×10^7 células JIMT-1 en Matrigel al 50 % en los flancos de ratones SCID hembra (Fox Chase

- SCID, CB-17/lcr-Prkdcscid, Charles River Laboratories); y 1×10^7 células 22Rv1 en Matrigel al 50 % en los flancos de ratones desnudos atímicos macho (nu/nu, Harlan). Se recogieron muestras tumorales 6 horas después de la dosificación de los animales en dos grupos de muestreo ($n = 5$), que recibieron una dosis de vehículo o SCH 727965 (Dinaciclib) 40 mg/kg cuando el volumen medio del tumor alcanzó de 300 a 400 mm³. La Figura 11 es el análisis de
- 5 dos lisados tumorales representativos de los 5 tumores recogidos por cohorte de tratamiento. Cada tumor se dividió en tres partes. Se congelaron rápidamente dos partes en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. La tercera parte se conservó en formol tamponado neutro al 10 % durante 24 horas y después se almacenó en etanol al 70 % a temperatura ambiente.
- 10 Se prepararon lisados de células completas a partir de una parte congelada de forma instantánea mediante disrupción/homogeneización a 4 °C en un tubo de microcentrifuga de extremo cónico de 2 ml que contenía dos perlas de acero inoxidable (5/32", grado 25, Ball Supply Corp) y 0,4 ml de tampón de lisis [Triton X-100 al 1 %, Tris pH 7,4 30 mM, EDTA 1 mM y proteasa (completa, mini, sin EDTA, Roche) e inhibidores de cóctel fosfatasa
- 15 RIPA (tecnología de señalización celular) que contenía inhibidores de cóctel de proteasa y fosfatasa al homogeneizado, se hicieron rotar a 4 °C durante 10 minutos y se microcentrifugaron a 12 kpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se retiró, se normalizó para el contenido de proteína usando un kit de BCA (Pierce, Rockford, IL) y se almacenó a -80 °C. Para transferencias de Western, se sometieron 5 µg de lisado a SDS-PAGE, excepto para el análisis de PARP escindida, que requirió la carga de 0,5 µg de lisado.
- 20 Los anticuerpos policlonales de conejo frente a MCL-1 (n.º 5453) y PARP escindida (n.º 9541), anticuerpo monoclonal de conejo (mAbs) frente a BCL-xL (n.º 2764) y mAb de ratón frente a α -tubulina (n.º 3873) fueron de Cell Signaling (Beverly, MA). Se usaron anticuerpos anti-ratón de caballo (n.º 7076) y anti-conejo de cabra marcados con HRP secundarios (Cell Signaling, Beverly, MA) junto con SuperSignal West Pico o Femto Chemiluminescent
- 25 Substrate (Thermo Scientific) para la detección de proteínas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación de un paciente con cáncer que probablemente responda al tratamiento con un inhibidor de CDK, que comprende:

- (a) medir el valor de un biomarcador predictivo de un inhibidor de CDK en una muestra biológica obtenida de un paciente con cáncer;
- (b) comparar el valor del biomarcador con un valor de referencia predeterminado para determinar si el valor está por encima o por debajo del valor de referencia predeterminado; e
- (c) identificar un paciente susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de CDK, en donde el biomarcador predictivo es la relación de expresión del gen de MCL-1:BCL-xL y el paciente sensible tiene un valor superior al valor de referencia predeterminado, en donde el inhibidor de CDK es (S)-(-)-2-(1-{3-etil-7-[(1-oxi-piridin-3-ilmetil)]amino}pirazolo [1,5a]pirimidin-5-il)piperidin-2-il)etanol) (dinaciclib) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la relación de expresión del gen de MCL-1:BCL-xL es del nivel de ARNm.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un paciente que tiene una relación de expresión del gen de MCL-1:BCL-xL por debajo del valor de referencia se identifica como un paciente que probablemente no responderá al tratamiento con un inhibidor de CDK.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el valor de referencia predeterminado es la relación de expresión del gen MCL-1:BCL-xL obtenida a partir de una muestra biológica que comprende células de uno o más pacientes que no han sido diagnosticados con cáncer.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el valor de referencia predeterminado es la relación de expresión del gen de MCL-1:BCL-xL obtenida a partir de una muestra biológica que comprende células de uno o más pacientes sin enfermedad o cuyas células no presentan señalización de CDK aberrante.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica, sarcoma de Kaposi, cáncer de mama, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vesícula biliar y de conductos biliares, cáncer de retina, cánceres de esófago, cáncer gástrico, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer uterino, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer de endometrio, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, sarcomas, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, carcinoma nasofaríngeo, liposarcoma, carcinoma epitelial, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de vesícula biliar, adenocarcinoma de parótida y sarcoma endometrial.

6. Un inhibidor de CDK para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer identificado como susceptible de responder mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el inhibidor de CDK es ((S)-(-)-2-(1-{3-etil-7-[(1-oxi-piridin-3-ilmetil)]amino}pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-il)piperidin-2-il)etanol)) (dinaciclib) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

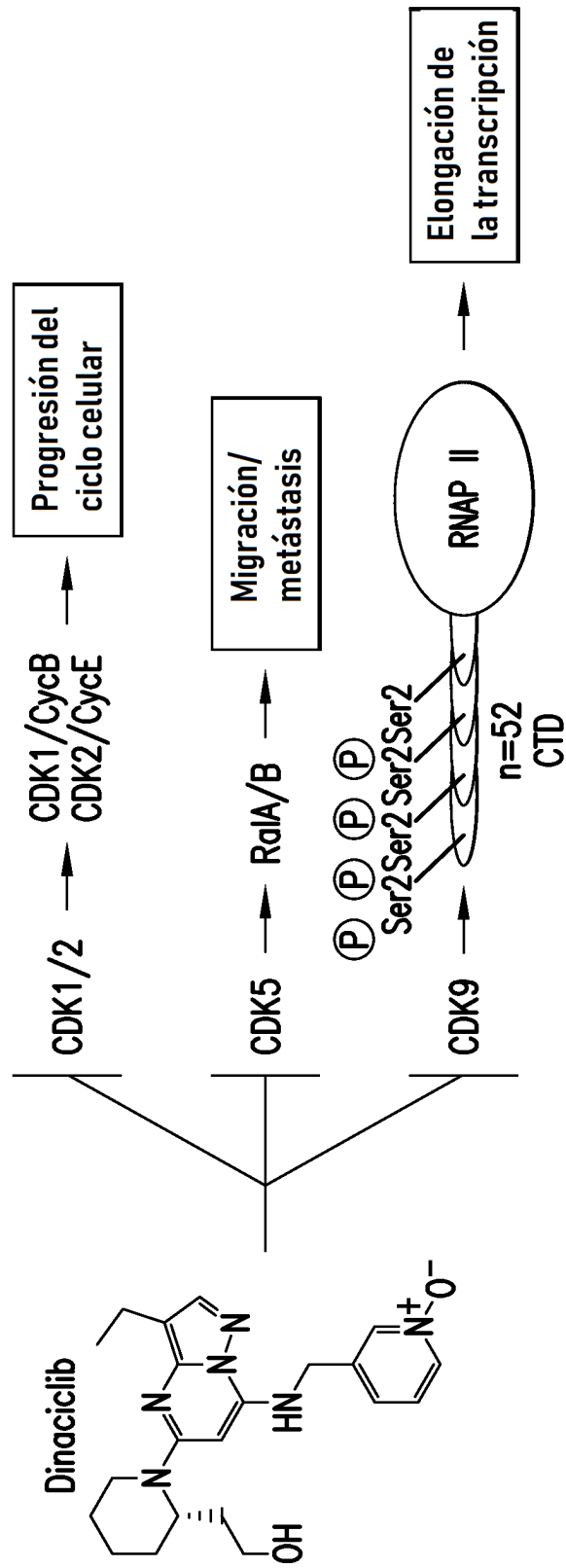


FIG.1

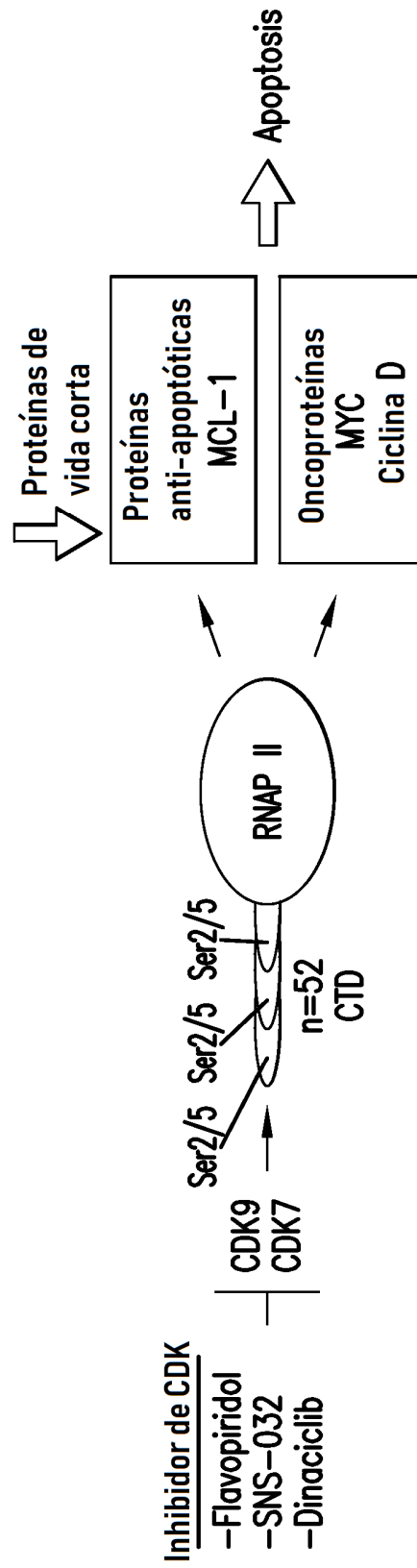
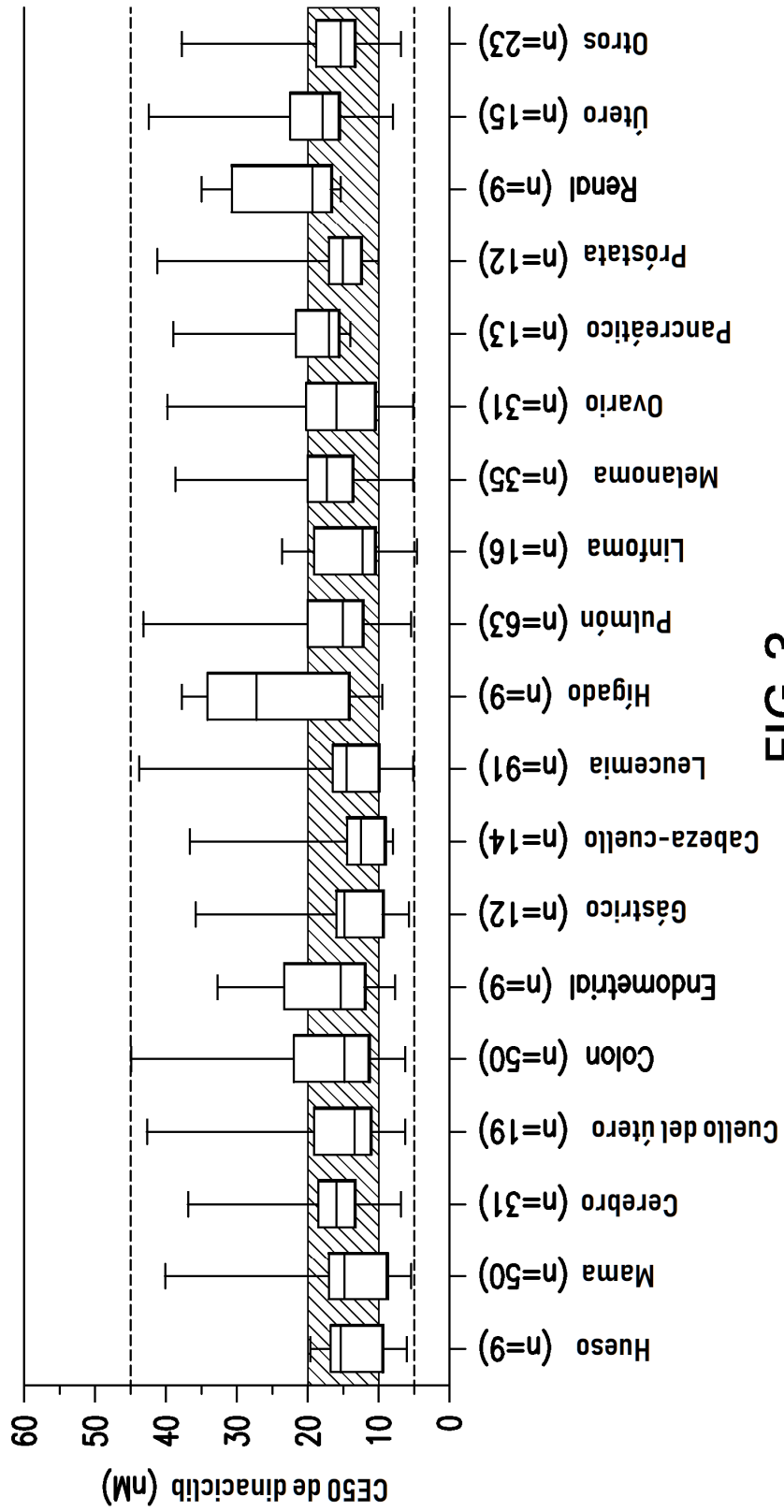


FIG.2



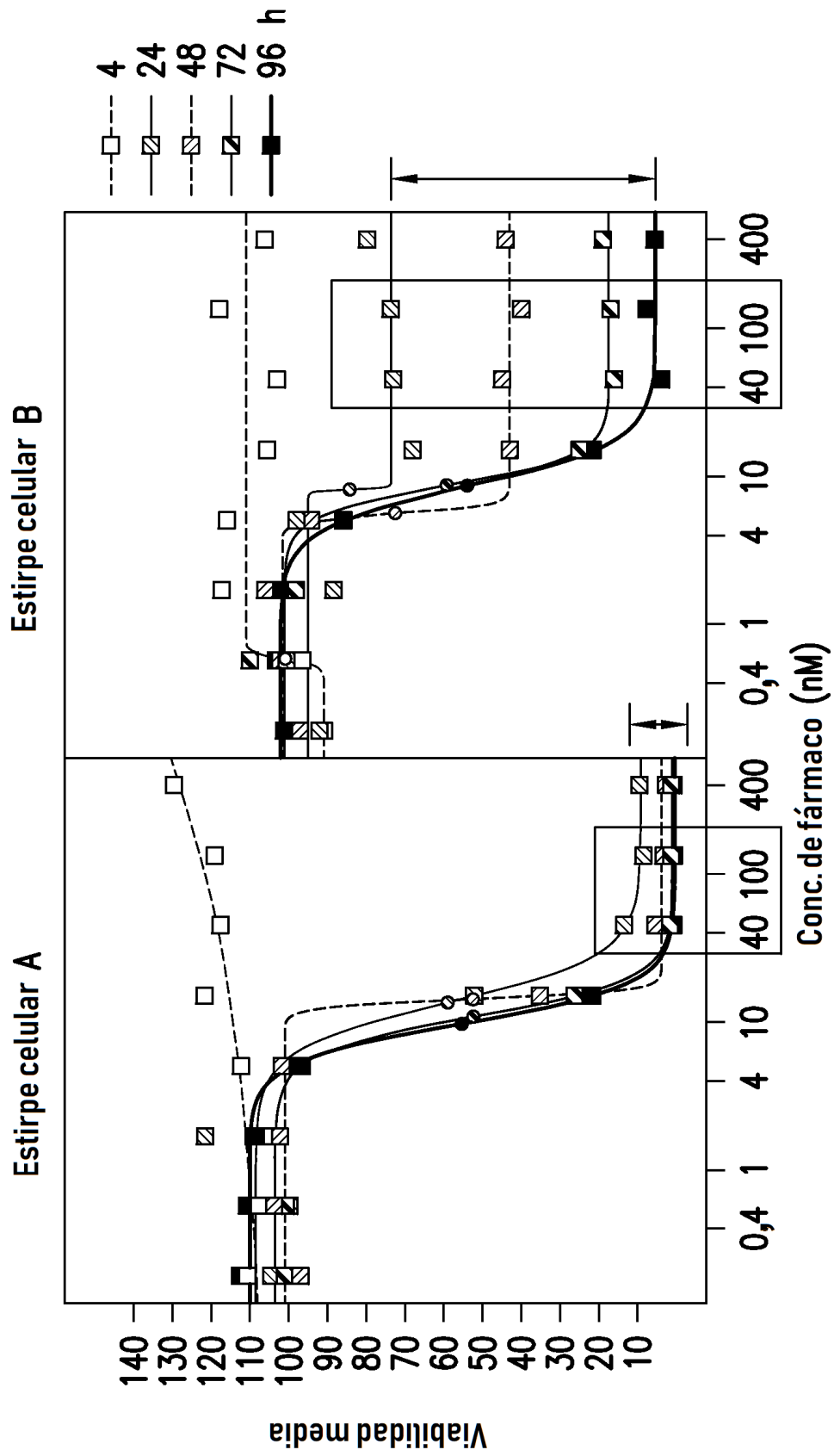


FIG.4

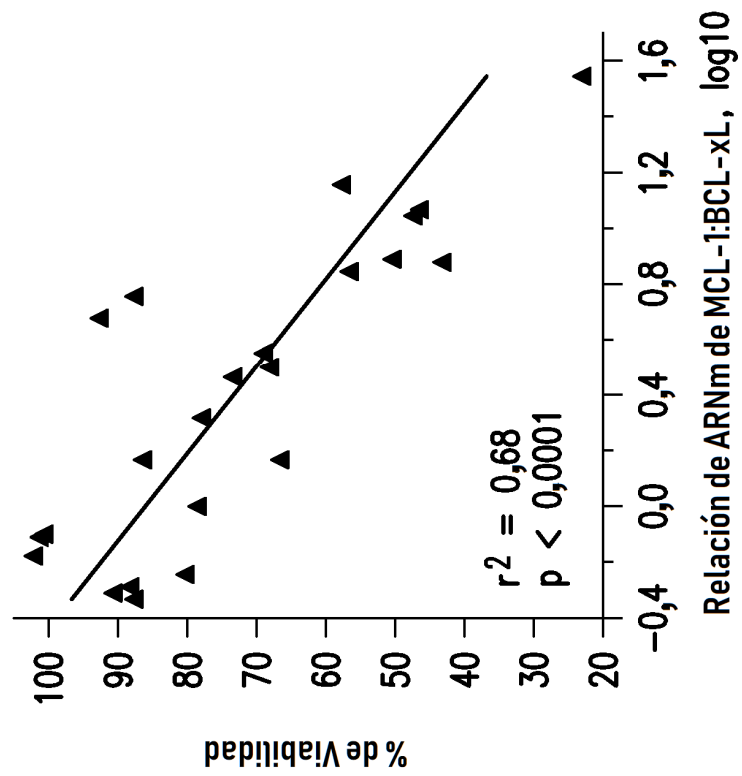


FIG. 5B

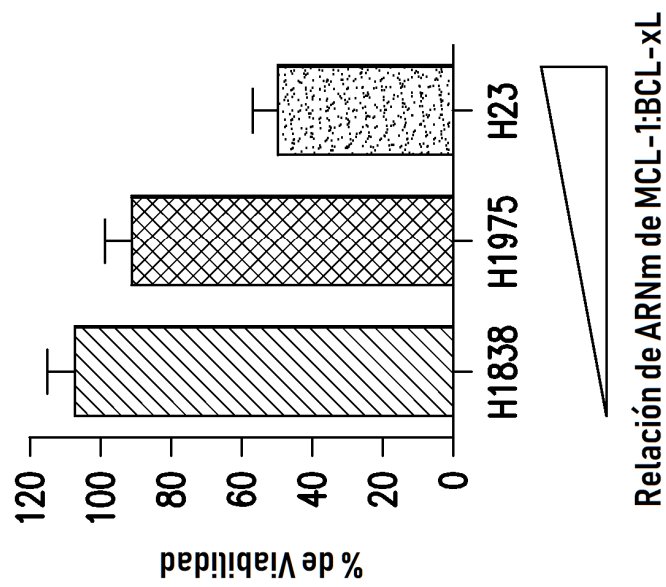


FIG. 5A

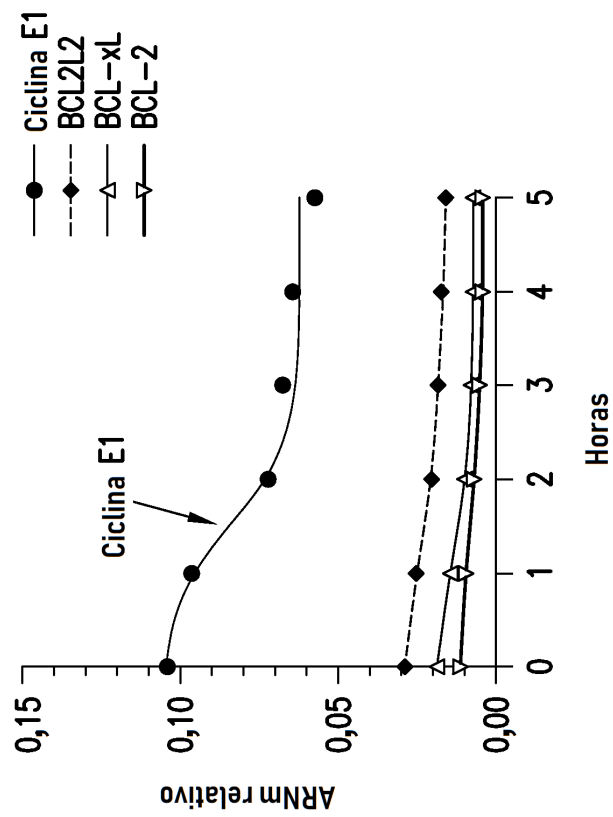


FIG. 6A

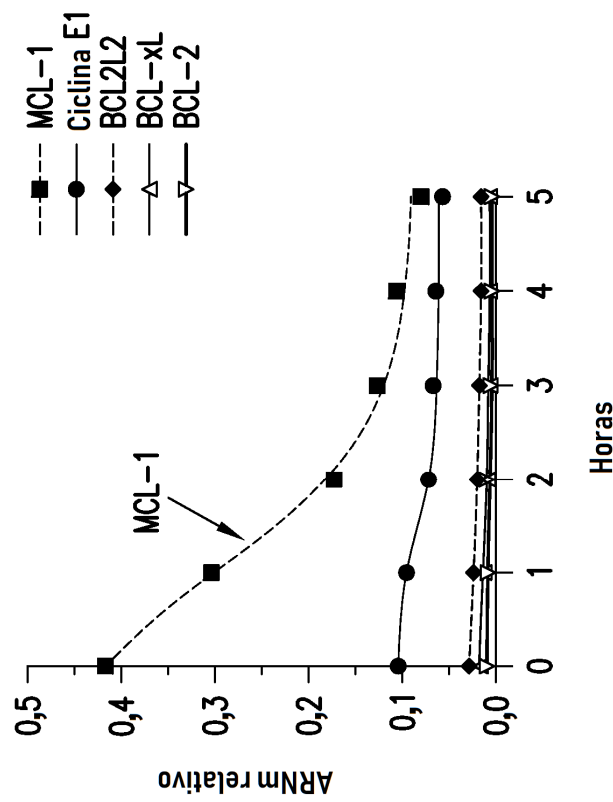


FIG. 6B

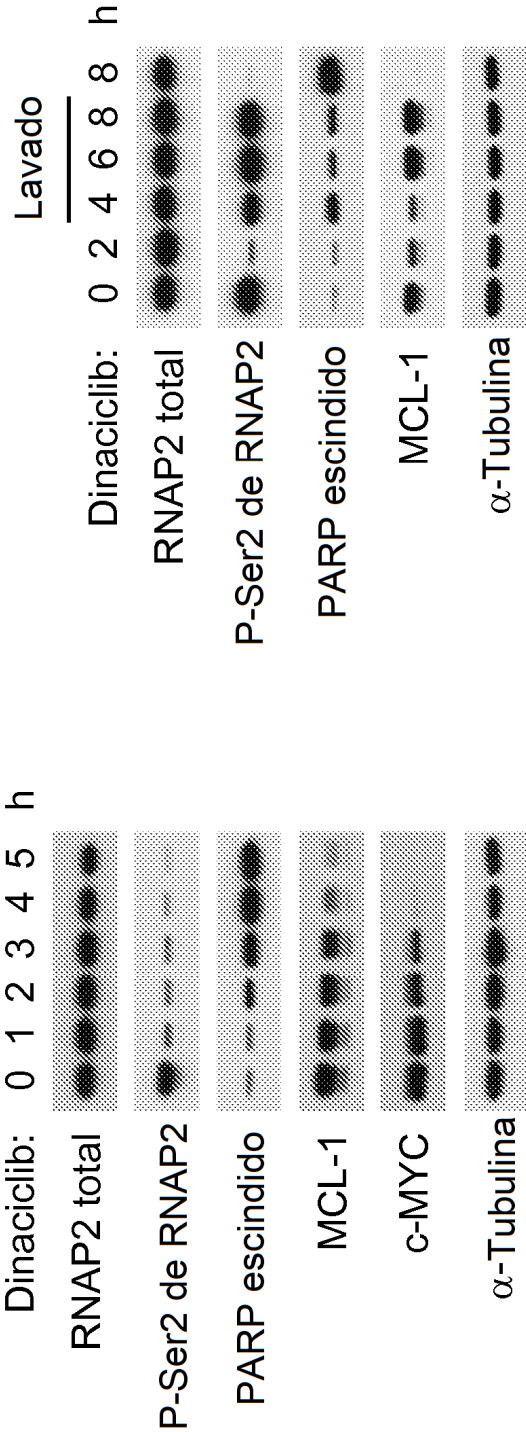


FIG.7A

FIG.7B

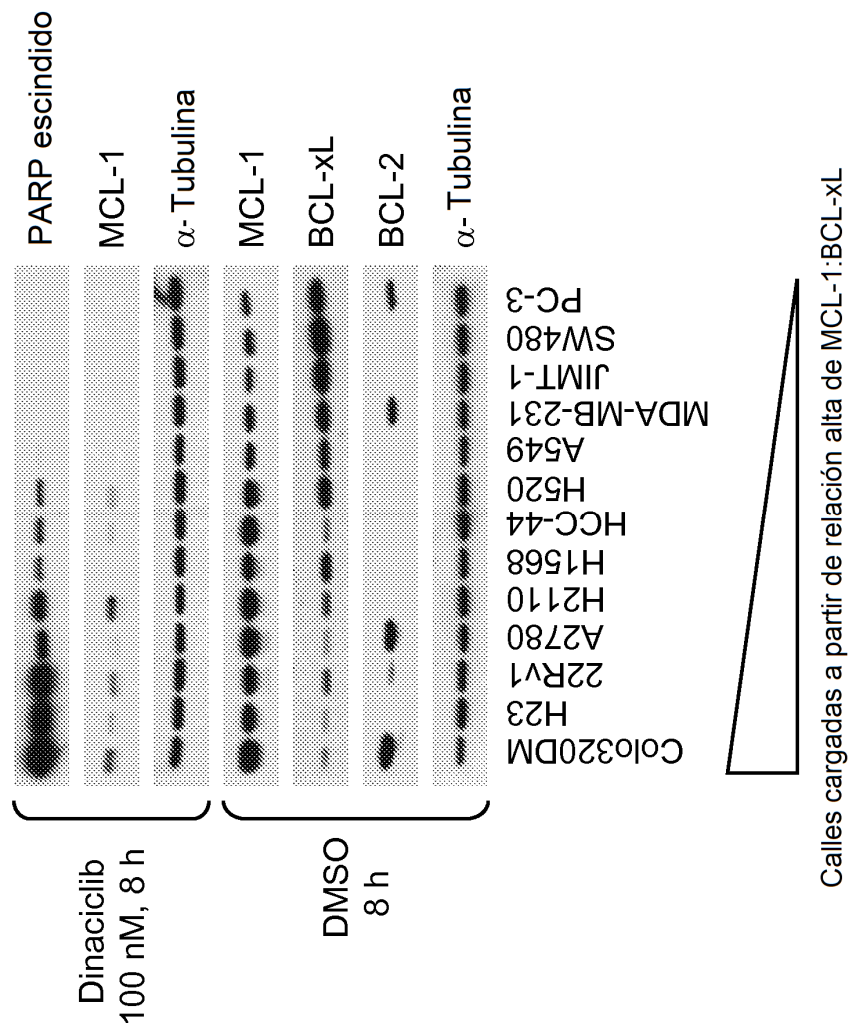


FIG.8

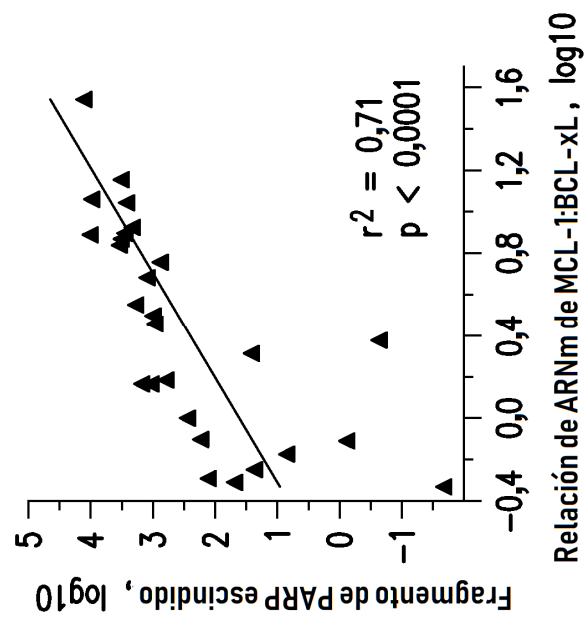


FIG.9A

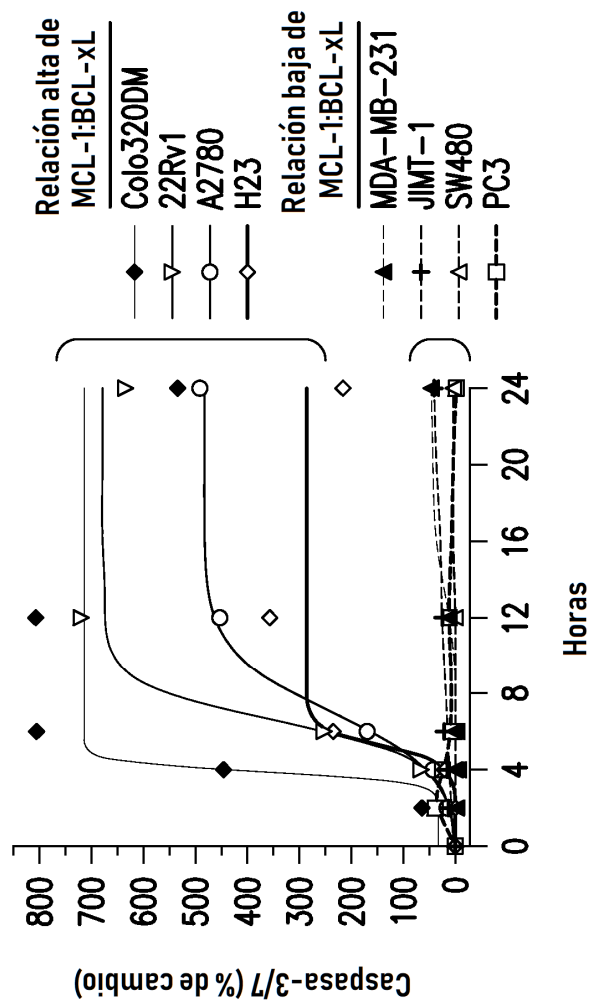


FIG.9B

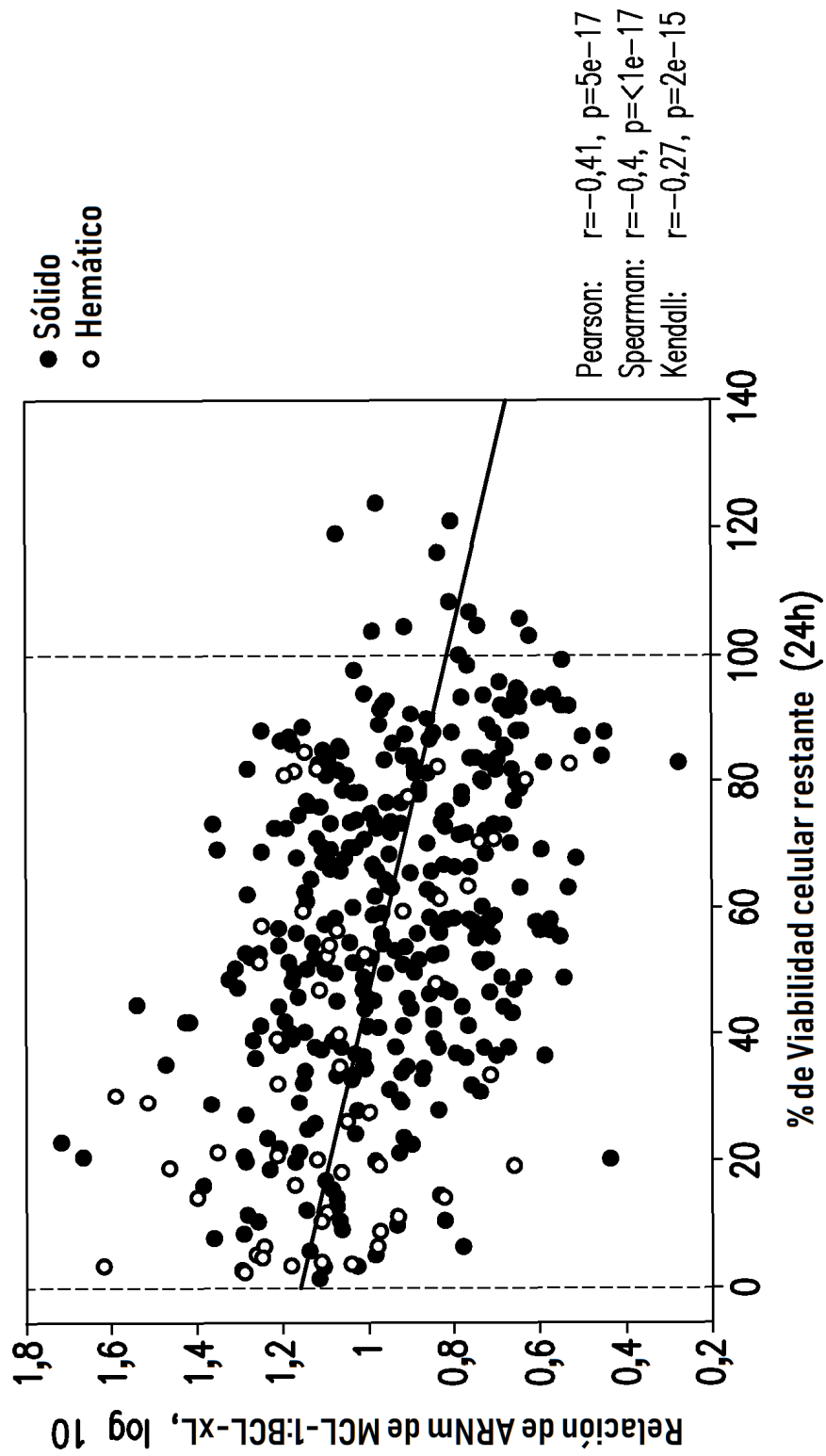


FIG.10

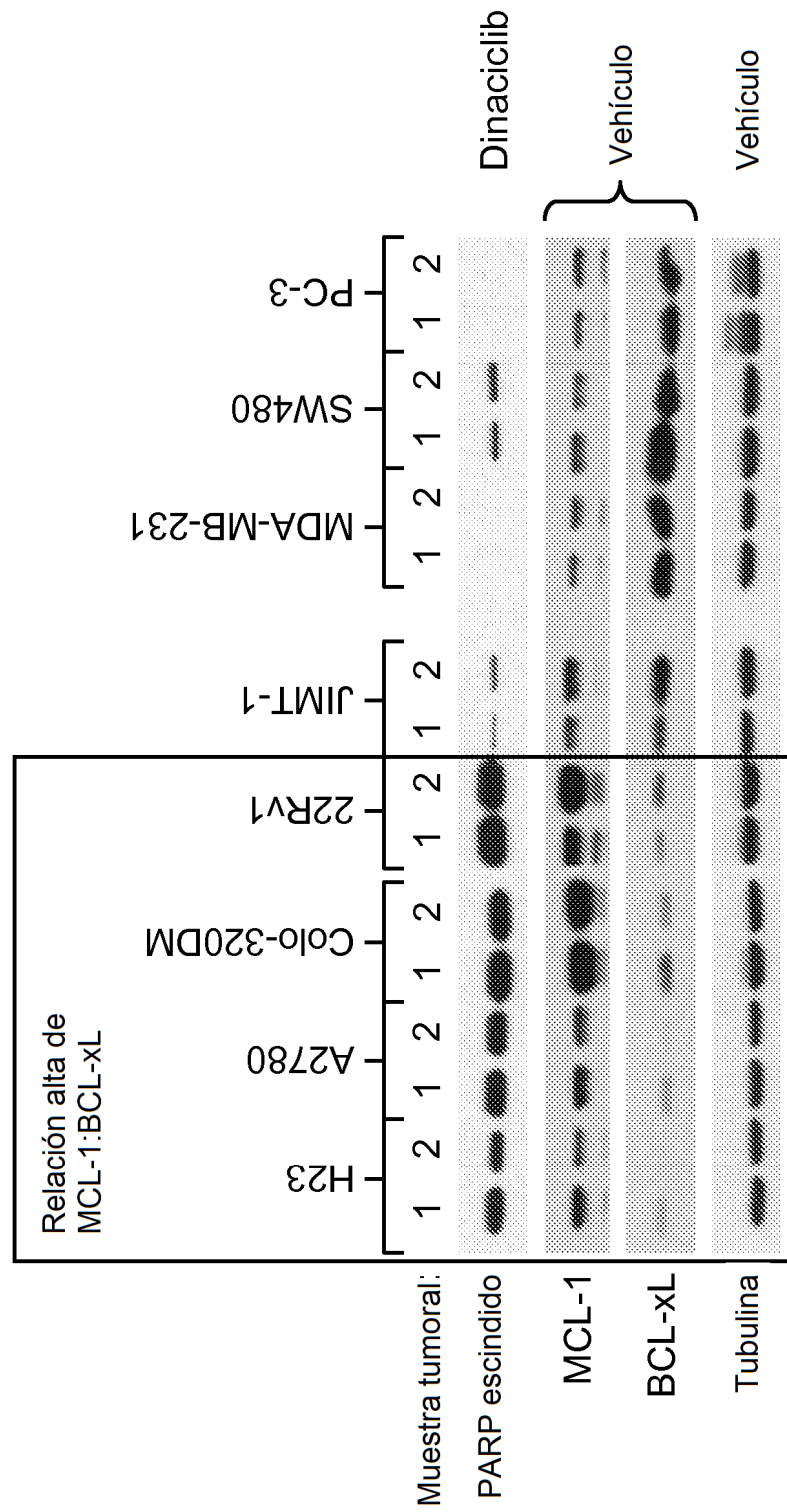


FIG.11