

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 285**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6886** (2008.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61K 31/496** (2006.01)

**C07D 401/12** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2013 PCT/IB2013/056122**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14020502**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013 E 13773390 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2880447**

54 Título: **Marcadores asociados con la sensibilidad a inhibidores del doble minuto humano 2 (MDM2)**

30 Prioridad:

**31.07.2012 US 201261677859 P**

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

**13.02.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GAULIS, SWANN y  
JEAY, SEBASTIEN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 742 285 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

Marcadores asociados con la sensibilidad a inhibidores del doble minuto humano 2 (MDM2)

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la farmacogenómica y al uso de biomarcadores útiles para determinar la sensibilidad de un paciente antes del tratamiento, seguir la respuesta del paciente tras el tratamiento, la sensibilidad del cáncer y el cribado de compuestos.

10

Antecedentes

El p53, que también se conoce como proteína tumoral 53, es un gen supresor de tumores que participa en la prevención del cáncer, al cual se hace referencia a menudo como guardián o guarda del genoma (Levine, *Cell* 1997, 88:323-331). El gen p53 codifica un factor de transcripción que normalmente está quiescente y se activa cuando la célula es sometida a estrés o sufre algún daño, por ejemplo, cuando se produce un daño en el ADN debido a un mutágeno. Si la célula es sometida a estrés o sufre algún daño, el p53 actúa limitando el daño, o con esto, desencadena la vía apoptótica de modo que la célula dañada es eliminada y ya no supone un peligro para el organismo (Vogelstein *et al.*, *Nature* 2000, 408:307-310). Un análisis de diferentes tipos de cáncer mostró que el p53 está mutado en aproximadamente un 50% de los cánceres humanos (Hollstein *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1994, 22:3551-3555; Hollstein *et al.*, *Science* 1991, 253(5015): 49-53). Los seres humanos que son heterocigóticos para p53, con únicamente una sola copia funcional, desarrollarán tumores de forma prematura en la edad adulta, un trastorno denominado síndrome de Li-Fraumeni (Varley *et al.*, *Hum. Mutat.* 2003, 21(3):313-320). Sin embargo, a pesar de que el p53 regula el destino de la célula, el p53 está regulado por otra proteína conocida como MDM2.

25

La proteína doble minuto 2 (MDM2) fue descubierta como un regulador negativo de p53 (Fakharzadeh *et al.*, *EMBO J.* 1991, 10(6):1565-1565). MDM2 codifica una ligasa E3 que contiene un dominio de unión a p53 y una secuencia señal de exportación nuclear y, cuando se compleja con p53, lo saca del núcleo y lo somete a una ubiquitinilación, lo cual propicia la degradación de la proteína p53 mediante la vía de ubiquitina-proteosoma (Haupt *et al.*, *Nature* 1997, 387(6630):296-299; Piette *et al.*, *Oncogene* 1997 15(9):1001-1010). Además, MDM2 inhibe directamente la actividad de p53 uniéndose al dominio de transactivación de p53, lo que también impide la expresión génica mediada por p53 (Wu *et al.*, *Genes Dev.* 1993, 7:1126-1132). De este modo, MDM2 regula p53 de múltiples formas.

30

MDM2 se sobreexpresa en varios tipos de cáncer, por ejemplo, liposarcoma, glioblastoma y leucemia (Momand *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1998, 26(15):3453-3459). La sobreexpresión de MDM2 puede interferir con las actividades de p53, lo cual impide la apoptosis y la detención del crecimiento del tumor (de Rozieres *et al.*, *Oncogene* 2000, 19(13):1691-1697). La sobreexpresión de MDM2 se correlaciona con un diagnóstico desfavorable en glioma y leucemia linfocítica aguda (Onel *et al.*, *Mol. Cancer Res.* 2004, 2(1):1-8).

35

Debido a que MDM2 es un inhibidor de p53, los agentes terapéuticos que impiden la unión de MDM2 a p53 evitarían la degradación de p53, lo que permitiría que el p53 libre se uniera y mediara la expresión génica en células cancerosas, dando como resultado la apoptosis y la detención del ciclo celular. Existen informes previos sobre inhibidores de la interacción p53-MDM2 que son moléculas de bajo peso molecular (Vassilev *et al.*, *Science*, 2004, 303(5659):844-888; Zhang *et al.*, *Anticancer drugs*, 2009 20(6):416-424; Vu *et al.*, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 2011, 348:151-172).

40

También existe constancia del modo de unión de estos compuestos y una estructura cristalina del complejo MDM2 humana-Nutlina, así como también un atrapador y cavidades del sitio de unión de p53 sobre MDM2 (Vassilev, *supra*). El primer tipo de estos inhibidores de MDM2, que se conoce como Nutlinas, se une a MDM2 y ocupa la cavidad de unión a p53, de modo que impide la formación del complejo MDM2-p53. Esto conduce a una menor degradación de la proteína p53 y la expresión de los genes diana p53. Las líneas de células cancerosas tratadas con Nutlinas mostraron una detención del crecimiento y mayor apoptosis. Por ejemplo, la línea de osteosarcoma SJSA-1 contiene copias amplificadas del gen MDM2. El tratamiento de esta línea con Nutlina-3 redujo la proliferación e incrementó la apoptosis (Vassilev *et al.*, *Science*, 2004, 303(5659):844-888). La línea celular SJSA-1 se utilizó para crear xenoinjertos en ratón. La administración de Nutlina-3 redujo el crecimiento del xenoinjerto en un 90%. Para investigar el efecto que ejercían los compuestos de Nutlina sobre las células no cancerosas, se trataron fibroblastos normales humanos y de ratón con Nutlina-3 y, aunque la proliferación de las células se ralentizó, estas conservaron su viabilidad (Vassilev, *supra*).

45

El hecho de encontrar biomarcadores que indiquen qué paciente debería recibir un agente terapéutico resulta útil, especialmente en lo que se refiere al cáncer. Esto hace posible un tratamiento más agresivo y puntual en lugar de una estrategia de prueba y error. Además, también resulta útil el descubrimiento de biomarcadores que indican que las células siguen siendo sensibles a la terapia tras la administración. Estos biomarcadores se pueden utilizar para monitorizar la respuesta de los pacientes que reciben el agente terapéutico. Si los biomarcadores indican que el paciente se ha vuelto insensible al tratamiento, entonces la dosis administrada se puede incrementar, reducir, interrumpir completamente o se puede administrar un agente terapéutico adicional. En este sentido, resulta necesario

50

55

60

desarrollar biomarcadores asociados con los inhibidores de MDM2. Esta estrategia garantiza que los pacientes correctos reciben el tratamiento adecuado y durante el transcurso del tratamiento el paciente puede ser monitorizado para determinar la sensibilidad continuada al inhibidor de MDM2.

5 En el desarrollo de inhibidores de MDM2, biomarcadores específicos ayudarán a comprender el mecanismo de acción tras la administración. El mecanismo de acción puede implicar una cascada compleja de mecanismos reguladores en el ciclo celular y una expresión génica diferencial. Este análisis se lleva a cabo en el estadio preclínico del desarrollo del fármaco con el fin de determinar la sensibilidad particular de las células cancerosas al candidato inhibidor de MDM2 y la actividad del candidato. En la investigación farmacodinámica, resulta de particular interés la identificación de  
10 marcadores específicos de sensibilidad y actividad tales como los que se describen en la presente.

Los primeros métodos para predecir la sensibilidad a un inhibidor de MDM2 mediante la detección de la sobreexpresión del gen MDM2 ya se describieron en Tovar *et al.*, *PNAS*, 2006, 103(6): 1888-1893, y Vassilev, *Trends in Molecular Medicine*, 2006, 13(1): 23-31. A pesar de ello, sería deseable disponer de otros biomarcadores para  
15 predecir la sensibilidad a un inhibidor de MDM2.

#### Compendio de la invención

La invención se refiere al análisis de que una serie de genes identificados en la Tabla 2 actúan como biomarcadores  
20 específicos para determinar la sensibilidad de las células a inhibidores de MDM2 (en lo sucesivo «MDM2i»). La invención se refiere al análisis de que más de uno de los biomarcadores de la Tabla 2, donde un biomarcador seleccionado de la Tabla 2 es MDM2, proporciona una «firma génica» para MDM2i que presenta una mayor exactitud y especificidad a la hora de predecir qué células cancerosas son sensibles a MDM2i. El método analiza la expresión génica o nivel proteico de más de uno de los biomarcadores de la Tabla 2 en una muestra de cáncer extraída de un  
25 paciente que predice la sensibilidad de la muestra de cáncer a un MDM2i. El patrón de los cambios del nivel de expresión puede ser indicativo de una respuesta favorable o de una desfavorable. Además, la firma génica proporcionada en la Tabla 2 tiene un mayor valor predictivo debido a que también indica que la vía de p53 es funcional. Esto supone un resultado inesperado ya que muchos tumores contienen un p53 mutado y una vía no funcional que proporciona una ventaja de crecimiento al tumor. La invención es un ejemplo de «medicina personalizada» donde los  
30 pacientes se tratan basándose en una firma genómica funcional que es específica de ese individuo.

El valor predictivo de al menos un biomarcador de la Tabla 2 también se puede utilizar después del tratamiento con un MDM2i para determinar si el paciente sigue siendo sensible al tratamiento. Una vez se ha administrado el agente terapéutico MDM2i, los biomarcadores se utilizan para monitorizar la sensibilidad continuada del paciente al  
35 tratamiento con MDM2i. La divulgación también se refiere al aumento o la reducción de la expresión de los genes identificados después del tratamiento con MDM2i. Esto resulta útil a la hora de determinar que los pacientes reciben el curso correcto de tratamiento. La invención comprende un método para predecir y monitorizar la sensibilidad de un paciente a un tratamiento con MDM2i. El método incluye el paso de administrar un MDM2i al paciente y medir la expresión génica del biomarcador en una muestra biológica obtenida del paciente. La respuesta del paciente se evalúa  
40 basándose en la detección de la expresión génica de más de un biomarcador de la Tabla 2. La detección y/o alteración del nivel de expresión de más de un biomarcador es indicativa de la sensibilidad del paciente al tratamiento. El patrón del nivel de expresión puede ser indicativo de una respuesta favorable del paciente o de una desfavorable.

#### Descripción de los dibujos

45 La Figura 1A muestra la potencia *in vitro* del MDM2i a la hora de alterar la interacción p53-MDM2. La Figura 1B muestra la potencia *in vitro* del MDM2i sobre la proliferación de células cancerosas.

La Figura 2 muestra el estado de p53 (mutado o de origen natural) y la sensibilidad de las células cancerosas frente a MDM2i(2). El eje de las X es el punto de corte para la sensibilidad y el eje de las Y es el valor de Amáx. La Figura 2 muestra la sensibilidad de las células frente a MDM2i(2) y el estado mutacional de p53, mt (mutado) o de origen natural (wt). El panel mt presenta la sensibilidad frente a MDM2i(2) para líneas celulares CCLE con p53 mutado, el panel wt presenta los perfiles de sensibilidad frente a MDM2i(2) para líneas celulares CCLE con p53 de origen natural. Se define Amáx como el nivel de efecto máximo (la inhibición para la concentración de MDM2i(2) más alta evaluada,  
50 calibrada respecto a un inhibidor de referencia) y se define C<sub>50</sub> como la concentración  $\mu\text{M}$  en la que la respuesta a MDM2i(2) alcanzó una inhibición absoluta de -50 respecto al inhibidor de referencia. El recuento de la línea celular se desglosa en la sensibilidad química a MDM2i(2) y el estado mutacional de p53, y la estadística asociada. Los datos también se presentan como una tabla de contingencia con la estadística asociada.

60 La Figura 3 son biomarcadores que muestran el factor de cambio en la expresión y la significancia estadística del valor de sobreexpresión. La Figura 3 muestra biomarcadores predictivos de la sensibilidad química a MDM2i seleccionados y su estadística asociada. Las identidades de los genes son los símbolos HUGO oficiales. El prefijo «Expr» indica que estos biomarcadores son del tipo de expresión de transcritos.

La Figura 4 es una inmunotransferencia de Western de células representativas sensibles e insensibles tratadas con un MDM2i(1) durante 4 horas con varias concentraciones y a continuación utilizadas como sondas para genes diana p53 seleccionados como representantes de biomarcadores farmacodinámicos.

5 La Figura 5 es una gráfica que muestra el incremento en el valor predictivo de la firma génica en lugar de un conjunto más grande de biomarcadores. La Figura 5 muestra rendimientos de validación cruzada de modelos predictivos de la sensibilidad química frente a MDM2i(2). Los rendimientos de modelos derivados de tres conjuntos de características predictivas se evalúan utilizando la sensibilidad (fracción de líneas celulares sensibles previstas correctamente), especificidad (fracción de líneas celulares insensibles previstas correctamente), PPV (siglas en inglés referentes al valor predictivo positivo, fracción de líneas celulares sensibles previstas como tales) y NPV (siglas en inglés referentes al valor predictivo negativo, fracción de líneas celulares insensibles previstas como tales). Las barras de error son una desviación estándar de las medias de las 5 iteraciones de validaciones cruzadas de factor 5. El modelo que utiliza los 13 biomarcadores seleccionados representados en la Tabla 2 consigue una mejor predictibilidad de la sensibilidad química a MDM2i(2) y lo consigue de forma independiente a la medición del rendimiento, pero lo más sorprendente es que se consigue cuando se considera el PPV como indicador del rendimiento.

La Figura 6 es una lista de líneas celulares, analizada cada una de ellas para determinar la firma génica y la predicción de si la línea celular es sensible o insensible y el valor de  $CI_{50}$  cuando se trata con un MDM2i.

20 La Figura 7A-C muestra la inhibición dependiente de la dosis del crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto SJS-1 (se prevé que sea sensible según la firma génica) tras el tratamiento con MDM2i(1) y la inducción concomitante de la expresión de p21 (CDKN1A) como un biomarcador farmacodinámico representativo.

25 La Figura 8 muestra la expresión de p21 (CDKN1A) a nivel proteico tras el tratamiento de células sensibles a MDM2i(1) con dosis eficaces.

30 La Figura 9 es un modelo de muestras tumorales que se prevé que sean sensibles cuando se utiliza la firma génica de la base de datos OncExpress y el banco de tumores primarios. La Figura 9 muestra correlaciones específicas de linaje de las predicciones de sensibilidad química a MDM2i en colecciones de tumores primarios humanos y datos de líneas de células CCLE. El panel de la izquierda muestra la correlación entre las fracciones de muestras sensibles previstas de la colección de muestras de tumores primarios humanos y la relación de sensibilidad observada en los datos de la línea celular. El panel de la derecha muestra la correlación entre las fracciones de muestras sensibles previstas de la colección de muestras de tumores primarios humanos y las relaciones sensibles previstas en la colección de xenoinjertos de tumores primarios. Las muestras/xenoinjertos/líneas celulares se organizan según su linaje. La línea de puntos es la línea de identidad.

35 La Figura 10 representa los valores predictivos positivos (PPV) conseguidos con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), contruidos a partir de múltiples combinaciones de biomarcadores que se describen en la Tabla 2. La Figura 10 muestra los valores predictivos positivos (PPV) conseguidos con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), contruidos a partir de múltiples combinaciones de biomarcadores. Los PPV del modelo de un solo gen y del combinatorio se muestran como gráficas de caja y bigote, y se comparan con los PPV obtenidos con los dos estados de mutación de p53 y 13 modelos de biomarcadores (los bigotes se extienden 1.5 veces el intervalo intercuartil, la línea negra es la mediana, las marcas son una estimación del intervalo de confianza de la mediana, la amplitud de la caja es proporcional al número de puntos de datos, los datos anómalos no se muestran; «bm(s)»: biomarcador(es); «allExMt»: modelo de mutación de todos los exones de p53; «ex5to8mt»: modelo de mutación de los exones 5 a 8 de p53).

40 La Figura 11 representa las especificidades conseguidas con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), que se construyeron a partir de múltiples combinaciones de biomarcadores que se describen en la Tabla 2. La Figura 11 muestra las especificidades conseguidas con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), que se construyeron a partir de múltiples combinaciones de biomarcadores. Las especificidades del modelo de un solo gen y del combinatorio se muestran como gráficas de caja y bigote, y se comparan con los PPV obtenidos con los dos estados de mutación de p53 y 13 modelos de biomarcadores (los bigotes se extienden 1.5 veces el intervalo intercuartil, la línea negra es la mediana, las marcas son una estimación del intervalo de confianza de la mediana, la amplitud de la caja es proporcional al número de puntos de datos, los datos anómalos no se muestran; «bm(s)»: biomarcador(es); «allExMt»: modelo de mutación de todos los exones de p53; «ex5to8mt»: modelo de mutación de los exones 5 a 8 de p53).

45 La Figura 12 representa las sensibilidades conseguidas con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), que se construyeron a partir de múltiples combinaciones de biomarcadores que se describen en la Tabla 2. La Figura 12 muestra las sensibilidades conseguidas con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), que se construyeron a partir de múltiples combinaciones de biomarcadores. Las sensibilidades del modelo de un solo gen y del combinatorio se muestran como gráficas de caja y bigote, y se comparan con los PPV obtenidos con los dos estados de mutación de p53 y 13 modelos de biomarcadores (los bigotes se extienden 1.5 veces el intervalo intercuartil, la línea negra es la mediana, las marcas son una estimación del intervalo de confianza de la mediana, la amplitud de la caja es

proporcional al número de puntos de datos, los datos anómalos no se muestran; «bm(s)»: biomarcador(es); «allExMt»: modelo de mutación de todos los exones de p53; «ex5to8mt»: modelo de mutación de los exones 5 a 8 de p53).

La Figura 13 representa los PPV conseguidos con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), que se construyeron a partir de múltiples combinaciones de biomarcadores que se describen en la Tabla 2, junto con el estado de mutación de p53. La Figura 13 muestra los valores predictivos positivos (PPV) conseguidos con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), que se construyeron combinando los biomarcadores con el estado de mutación de p53. Para una descripción de la gráfica, consulte la Figura 10, 11 o 12; «bm(s)»: biomarcador(es); «mt»: mutaciones de los exones 5 a 8 de p53; «allExMt»: modelo de mutación de todos los exones de p53; «ex5to8mt»: modelo de mutación de los exones 5 a 8 de p53).

La Figura 14 representa las especificidades conseguidas con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), que se construyeron a partir de múltiples combinaciones de biomarcadores que se describen en la Tabla 2, junto con el estado de mutación de p53. La Figura 14 muestra las especificidades conseguidas con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), que se construyeron combinando los biomarcadores con el estado de mutación de p53. Para una descripción de la gráfica, consulte la Figura 10, 11 o 12; «bm(s)»: biomarcador(es); «mt»: mutaciones de los exones 5 a 8 de p53; «allExMt»: modelo de mutación de todos los exones de p53; «ex5to8mt»: modelo de mutación de los exones 5 a 8 de p53).

La Figura 15 representa las sensibilidades conseguidas con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), que se construyeron a partir de múltiples combinaciones de biomarcadores que se describen en la Tabla 2, junto con el estado de mutación de p53. La Figura 15 muestra las sensibilidades conseguidas con los modelos predictivos de sensibilidad a MDM2i(2), que se construyeron combinando los biomarcadores con el estado de mutación de p53. Para una descripción de la gráfica, consulte la Figura 10, 11 o 12; «bm(s)»: biomarcador(es); «mt»: mutaciones de los exones 5 a 8 de p53; «allExMt»: modelo de mutación de todos los exones de p53; «ex5to8mt»: modelo de mutación de los exones 5 a 8 de p53).

La Figura 16 es una gráfica que muestra la respuesta de modelos de xenoinjertos primarios humanos a MDM2i(1) y su sensibilidad/insensibilidad prevista. La Figura 16 representa modelos de xenoinjertos primarios humanos que se prevé que sean sensibles a MDM2i, utilizando los biomarcadores que se describen en la Tabla 2 se confirma que son sensibles a una dosis diaria de 100 mg/kg de MDM2i(1), lo cual está a favor del uso del modelo predictivo descrito en poblaciones de pacientes con cáncer (HMEX=melanoma; HCOX=cáncer colorrectal; HSAX=liposarcoma; HKIX=carcinoma de células renales; CHLI o HLIX=cáncer hepático; HBRX=cáncer de mama; HPAX=cáncer pancreático; HLUX=cáncer de pulmón).

La Figura 17 es una gráfica que muestra las respuestas a MDM2i(1) de modelos de xenoinjertos primarios humanos que han sido preseleccionados para p53 de origen natural y a continuación se ha previsto que serán sensibles/insensibles. La Figura 17 muestra modelos de xenoinjertos primarios humanos con p53 de origen natural que se prevé que sean sensibles a MDM2i, utilizando los biomarcadores que se describen en la Tabla 2 se confirma que son sensibles a una dosis diaria de 100 mg/kg de MDM2i(1), lo cual está a favor del uso del modelo predictivo descrito en poblaciones de pacientes con cáncer preseleccionadas con p53 de origen natural (HMEX=melanoma; HCOX=cáncer colorrectal; HSAX=liposarcoma; HKIX=carcinoma de células renales; CHLI=cáncer hepático; HPAX=cáncer pancreático; HLUX=cáncer de pulmón).

#### Descripción de la invención

Los aspectos, características y realizaciones de la presente invención se resumen en los siguientes artículos y se pueden utilizar, respectivamente, solos o combinados:

1. Un método para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de doble minuto humano 2 (MDM2i), comprendiendo el método: evaluar la expresión génica de más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en una muestra de cáncer obtenida del paciente, donde un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 es MDM2, y la expresión génica de dicho más de un biomarcador indica que el paciente es sensible al tratamiento con un MDM2i.

2. Un MDM2i para su uso en un método de tratamiento de un paciente con cáncer con sensibilidad a un MDM2i, donde dicha sensibilidad a un MDM2i se indica mediante la presencia de más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 cuando se evalúa la expresión génica de dicho más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en una muestra de cáncer obtenida de dicho paciente con cáncer, donde un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 es MDM2.

En la presente se describen adicionalmente los siguientes artículos:

3. Un MDM2i para su uso en un método de tratamiento de un paciente con cáncer que comprende:

evaluar la expresión génica de más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en una muestra de cáncer obtenida del paciente, donde un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 es MDM2; la presencia de más de un biomarcador indica la sensibilidad del paciente a un MDM2i; y administrar al paciente un MDM2i.

5 4. Un método para predecir la sensibilidad de una célula cancerosa a un inhibidor de doble minuto humano 2 (MDM2i), comprendiendo el método: evaluar la expresión génica de más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en la célula cancerosa obtenida de una muestra de cáncer del paciente y la expresión génica de dicho más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 indica que la célula cancerosa es sensible al tratamiento con un MDM2i.

10 5. Un método para predecir la sensibilidad de una célula cancerosa a un inhibidor de doble minuto humano 2 (MDM2i), comprendiendo el método: medir la expresión génica de más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en la célula; y la expresión génica de dicho más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 indica que la célula cancerosa es sensible al tratamiento con un MDM2i.

15 6. Un método para cribar candidatos a MDM2i, comprendiendo el método:

a) poner en contacto una célula con un candidato a MDM2i;

20 b) medir la expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en la célula que se ha puesto en contacto con el candidato a MDM2i y la expresión de dicho al menos un biomarcador indica la sensibilidad a un MDM2i; y

25 c) comparar la reducción en la proliferación celular de la célula que se ha puesto en contacto con el candidato a MDM2i con la reducción en la proliferación celular de una célula que se ha puesto en contacto con un MDM2i obtenido a partir de la Tabla 1 y la proliferación celular de una célula tratada con placebo o no tratada.

30 7. Un método para determinar la sensibilidad de una célula cancerosa a un inhibidor de doble minuto humano 2 (MDM2i), comprendiendo el método: a) poner en contacto una célula cancerosa con al menos un MDM2i; b) medir la expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en la célula que se ha puesto en contacto con el MDM2i; c) comparar la proliferación celular de las células cancerosas tratadas con al menos un MDM2i con una célula cancerosa tratada con placebo o no tratada, donde se produce una reducción de la proliferación celular de la célula cancerosa tratada cuando se compara con la célula cancerosa tratada con placebo o no tratada.

35 La presente invención (y la presente divulgación, indicándose los artículos de la divulgación con las referencias de los artículos entre paréntesis) proporciona además los siguientes artículos:

40 8. El método de los artículos 1 (4 o 5), o un MDM2i para su uso de acuerdo con los artículos 2 (o 3), donde al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce o los trece biomarcadores se seleccionan a partir de la Tabla 2.

45 9. El método de cualquiera de los artículos 1 (4 o 5), o un MDM2i para su uso de acuerdo con los artículos 2 (o 3), donde el p53 se selecciona como un biomarcador además de cualquier biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2.

En la presente se describen adicionalmente los siguientes artículos:

50 10. El método de cualquiera de los artículos 1 a 9, donde la comparación de la expresión génica de dicho al menos un biomarcador con la expresión génica de una muestra de control indica una vía del gen p53 funcional.

La presente invención (y la presente divulgación, indicándose los artículos de la divulgación con las referencias de los artículos entre paréntesis) proporciona además los siguientes artículos:

55 11. El método de cualquiera de los artículos 1 (4 o 5), o un MDM2i para su uso de acuerdo con los artículos 2 (o 3), donde la muestra de cáncer se selecciona del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfoide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.

60 12. El método de cualquiera de los artículos 1 (4 o 5), donde se mide un ARNm o proteína de al menos un biomarcador

En la presente se describen adicionalmente los siguientes artículos:

65 13. El método de cualquiera de los artículos 1, 2 o 5 a 9, donde la expresión de dicho más de un biomarcador se incrementa en la muestra de cáncer cuando se compara con un control.

14. El método de cualquiera de los artículos 1 a 13, donde el MDM2i se selecciona a partir de la Tabla 1.
15. El método de cualquiera de los artículos 1 a 14, donde el MDM2i es un compuesto que se une a la cavidad de unión a p53 de MDM2.
- 5 16. El método de cualquiera de los artículos 1 a 14, donde el MDM2i es un compuesto que se une a sustancialmente la misma cavidad de unión a p53 de MDM2 que la Nutlina-3a o el MDM2i de la Tabla 1.
- 10 17. El método de cualquiera de los artículos 1 a 16, donde el MDM2i es un compuesto que impide la interacción proteína-proteína entre p53 y MDM2.
18. El método de cualquiera de los artículos 1 a 17, donde el MDM2i es un compuesto que inhibe la proliferación celular induciendo la actividad de la vía de p53.
- 15 19. El método de cualquiera de los artículos 2 a 18 que comprende además obtener una muestra biológica del paciente antes de la administración del MDM2i.
20. El método de cualquiera de los artículos 2 a 19, donde el MDM2i se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 20 21. El método de cualquiera de los artículos 4 a 12 o 14 a 20, donde la expresión de dicho al menos un biomarcador se incrementa en la célula cancerosa.
- 25 22. El método de cualquiera de los artículos 3 a 5 o 7 a 21, donde el valor de  $CI_{50}$  de la célula cancerosa que se ha puesto en contacto con al menos un MDM2i es inferior a 1  $\mu$ M.
23. El método de cualquiera de los artículos 3 a 5 o 7 a 22, donde la célula se pone en contacto con el MDM2i en al menos dos puntos temporales diferentes.
- 30 24. El método de cualquiera de los artículos 3 a 5 o 7 a 23, donde la célula se pone en contacto con dos MDM2i diferentes.
25. El método del artículo 24, donde la célula se pone en contacto con los dos MDM2i diferentes a la vez.
- 35 26. El método del artículo 25, donde la célula se pone en contacto con dos MDM2i diferentes en puntos temporales diferentes.
27. El método de cualquiera de los artículos 1 a 26, donde el MDM2i es una isoquinolinona.
- 40 28. Un método para cribar candidatos a MDM2i, comprendiendo el método: a) poner en contacto una célula con un candidato a MDM2i; b) medir la expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en la célula que se ha puesto en contacto con el candidato a MDM2i; c) la expresión génica de dicho al menos un biomarcador indica sensibilidad a un MDM2i; y d) comparar la reducción en la proliferación celular de la célula que se ha puesto en contacto con el candidato a MDM2i con la reducción en la proliferación celular de una célula que se ha puesto en contacto con un MDM2i obtenido a partir de la Tabla 1 y la proliferación celular de una célula tratada con placebo o no tratada.
- 45 29. El método del artículo 28, donde la expresión génica del candidato a MDM2i se compara con la expresión génica de un MDM2i seleccionado a partir de la Tabla 1.
- 50 30. El método del artículo 28 o 29, donde el candidato a MDM2i incrementa la expresión génica de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce o los trece biomarcadores de la Tabla 2.
- 55 31. El método de cualquiera de los artículos 28 a 30, donde la célula es una célula cancerosa seleccionada del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfoide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.
- 60 32. El método de cualquiera de los artículos 28 a 31, donde se mide la expresión de un ARNm o proteína de al menos un biomarcador de la Tabla 2.
33. El método de cualquiera de los artículos 28 a 32, que comprende los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN.
- 65

La presente invención proporciona además los siguientes artículos:

- 5 34. Una composición que comprende un MDM2i para su uso en el tratamiento del cáncer en una población seleccionada de pacientes con cáncer, donde dicha población de pacientes con cáncer se define por que muestra una expresión génica de más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en una muestra de células cancerosas obtenida de dichos pacientes, donde un biomarcador es MDM2.

En la presente se describen adicionalmente los siguientes artículos:

- 10 35. La composición del artículo 34, donde al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce o los trece biomarcadores se seleccionan a partir de la Tabla 2.

15 La presente invención (y la presente divulgación, indicándose los artículos de la divulgación con las referencias de los artículos entre paréntesis) proporciona además los siguientes artículos:

36. La composición de los artículos 34 (o 35), donde el p53 se selecciona como un biomarcador además de cualquier biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2.

20 En la presente se describen adicionalmente los siguientes artículos:

37. La composición de cualquiera de los artículos 34 a 36, donde el biomarcador es MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y/o AEN.

- 25 38. La composición de cualquiera de los artículos 36 a 39, donde el MDM2i se selecciona a partir de la Tabla 1.

39. La composición de cualquiera de los artículos 36 a 40, donde el MDM2i es un compuesto que se une a la cavidad de unión a p53 de MDM2.

- 30 40. La composición de cualquiera de los artículos 36 a 41, donde el MDM2i es un compuesto que se une a sustancialmente la misma cavidad de unión a p53 de MDM2 que la Nutlina-3a o el MDM2i de la Tabla 1.

41. La composición de cualquiera de los artículos 36 a 42, donde el MDM2i es un compuesto que impide la interacción proteína-proteína entre p53 y MDM2.

- 35 42. La composición de cualquiera de los artículos 36 a 43, donde el MDM2i es un compuesto que inhibe la proliferación celular induciendo la actividad de la vía de p53.

40 43. La composición de cualquiera de los artículos 36 a 44, donde el MDM2i es una isoquinolinona.

La presente invención proporciona además los siguientes artículos:

- 45 44. La composición del artículo 34, donde la muestra de células cancerosas se selecciona del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfoide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.

50 45. La composición de los artículos 34 o 44, donde la expresión génica es una expresión génica de los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN.

En la presente se describen adicionalmente los siguientes artículos:

- 55 46. La composición de cualquiera de los artículos 34, 35 o 37 a 45 para su uso en el tratamiento de un cáncer en una población seleccionada de pacientes con cáncer, donde la población de pacientes con cáncer se selecciona a partir de una población preseleccionada de pacientes con cáncer con p53 de origen natural.

60 47. Un kit para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de doble minuto humano 2 (MDM2i) que comprende: i) medios para detectar la expresión de cualquiera de los biomarcadores de la Tabla 2, preferentemente más de uno, particularmente al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce o los trece biomarcadores seleccionados a partir de la Tabla 2; y ii) instrucciones sobre cómo utilizar dicho kit.

65 48. El kit del artículo 47, donde los biomarcadores son MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y/o AEN.

49. El kit del artículo 47 o 48 que comprende además medios para detectar la expresión de p53.

50. El uso del kit de acuerdo con el artículo 47 a 49 para cualquiera de los métodos de los artículos 1 a 32.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para analizar al menos uno de los biomarcadores identificados en la Tabla 2 en una muestra que contiene células cancerosas, donde la expresión de al menos un biomarcador indica si la célula cancerosa será sensible al tratamiento con MDM2i. El patrón de los cambios de la expresión puede ser indicativo de una respuesta favorable del paciente o de una desfavorable y los pacientes se pueden seleccionar o rechazar basándose en la expresión de al menos un biomarcador de la Tabla 2. Como alternativa, se pueden evaluar todos los biomarcadores de la Tabla 2 como un solo grupo.

10 Después del tratamiento con un MDM2i, la divulgación proporciona métodos para analizar al menos uno de los biomarcadores identificados en la Tabla 2 en una muestra que contiene células cancerosas donde la expresión del biomarcador después del tratamiento con MDM2i indica que el paciente sigue siendo sensible al tratamiento con MDM2i. La detección y/o alteración del nivel de expresión de más de un biomarcador es indicativa de la sensibilidad a MDM2i y esto se correlaciona con una respuesta del paciente al tratamiento. Como alternativa, se pueden evaluar todos los biomarcadores de la Tabla 2 como un solo grupo. El patrón de expresión puede ser indicativo de una respuesta favorable del paciente o de una desfavorable.

15 Por consiguiente, la divulgación proporciona un método para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de doble minuto humano 2 (MDM2i), comprendiendo el método: evaluar la expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en una muestra de cáncer obtenida del paciente; y la expresión génica de dicho al menos un biomarcador indica que el paciente es sensible al tratamiento con un MDM2i.

20 El método donde más de un biomarcador se selecciona a partir de la Tabla 2.

25 El método que comprende evaluar la expresión génica de los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN.

30 El método donde se evalúa p53 en busca de una mutación antes de evaluar dicho al menos un biomarcador y la presencia de una mutación en p53 indica una menor sensibilidad a un MDM2i.

35 El método donde la muestra de cáncer se selecciona del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfóide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.

El método donde se mide un ARNm o proteína de al menos un biomarcador.

40 El método donde el MDM2i es una isoquinolinona.

El método donde el MDM2i se selecciona a partir de la Tabla 1.

45 Un método para tratar un paciente con cáncer que comprende: evaluar la expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en una muestra de cáncer obtenida del paciente; la presencia de dicho al menos un biomarcador indica la sensibilidad del paciente a un MDM2i; y administrar un MDM2i al paciente.

El método donde más de un biomarcador se selecciona a partir de la Tabla 2.

50 El método que comprende evaluar los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN.

55 El método donde se evalúa p53 en busca de una mutación antes de evaluar dicho al menos un biomarcador y la presencia de una mutación en p53 indica una menor sensibilidad a un MDM2i.

60 El método que comprende además obtener una muestra biológica del paciente antes de la administración del MDM2i y comparar la expresión génica diferencial de al menos un biomarcador de la Tabla 2 en la muestra de cáncer no tratada con MDM2i con una muestra de cáncer tratada con MDM2i, donde una mayor expresión génica indica una sensibilidad continuada del paciente.

65 El método donde la muestra de cáncer se selecciona del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfóide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.

El método donde el MDM2i es una isoquinolinona.

- El método donde el MDM2i se selecciona a partir de la Tabla 1.
- 5 El método donde el MDM2i se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- Un método para predecir la sensibilidad de una célula cancerosa a un inhibidor de doble minuto humano 2 (MDM2i), comprendiendo el método: evaluar la expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en la célula cancerosa obtenida de una muestra del paciente y la expresión génica de dicho al menos un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 indica que la célula cancerosa es sensible al tratamiento con un MDM2i.
- 10 El método donde más de un biomarcador se selecciona a partir de la Tabla 2.
- El método que comprende evaluar los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN.
- 15 El método donde se evalúa p53 en busca de una mutación antes de evaluar dicho al menos un biomarcador y la presencia de una mutación en p53 indica una menor sensibilidad a un MDM2i.
- El método donde la muestra de cáncer se selecciona del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfóide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.
- 20 El método donde se mide un ARNm o proteína de al menos un biomarcador.
- 25 El método donde el MDM2i es una isoquinolinona.
- El método donde el MDM2i se selecciona a partir de la Tabla 1.
- El método donde el MDM2i se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 30 Un método para determinar la sensibilidad de una célula cancerosa a un inhibidor de doble minuto humano 2 (MDM2i), comprendiendo el método: a) poner en contacto una célula cancerosa con al menos un MDM2i; b) medir la expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en la célula que se ha puesto en contacto con el MDM2i y la expresión de al menos un biomarcador indica la sensibilidad a un MDM2i; c) comparar la proliferación celular de las células cancerosas tratadas con al menos un MDM2i con una célula cancerosa tratada con placebo o no tratada; donde se produce una reducción de la proliferación celular de la célula cancerosa tratada cuando se compara con la célula cancerosa tratada con placebo o no tratada.
- 35 El método donde la reducción de la proliferación celular de la célula cancerosa que se ha puesto en contacto con al menos un MDM2i presenta un valor de CI50 inferior a 1  $\mu$ M.
- El método donde el MDM2i es una isoquinolinona.
- 40 El método donde el MDM2i se selecciona a partir de la Tabla 1.
- 45 El método donde la célula se pone en contacto con el MDM2i en al menos dos puntos temporales diferentes.
- El método donde la célula se pone en contacto con dos MDM2i diferentes en el paso a).
- 50 El método donde la célula se pone en contacto con los dos MDM2i diferentes a la vez.
- El método donde la célula se pone en contacto con dos MDM2i diferentes en puntos temporales diferentes.
- 55 El método donde la célula cancerosa se selecciona del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfóide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.
- El método donde se mide un ARNm o proteína de al menos un biomarcador.
- 60 El método que comprende evaluar los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN.
- El método donde los pasos b) y c) se repiten en puntos temporales seleccionados del grupo constituido por: 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana, 1 mes y varios meses después de la administración de cada dosis de MDM2i.
- 65

Un método para cribar candidatos a MDM2i, comprendiendo el método:

5 a) poner en contacto una célula con un candidato a MDM2i;

b) medir la expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en la célula que se ha puesto en contacto con el candidato a MDM2i y la expresión de dicho al menos un biomarcador indica sensibilidad a un MDM2i; y c) comparar la reducción en la proliferación celular de la célula que se ha puesto en contacto con el candidato a MDM2i con la reducción en la proliferación celular de una célula que se ha puesto en contacto con un MDM2i obtenido a partir de la Tabla 1 y la proliferación celular de una célula tratada con placebo o no tratada.

15 El método donde se evalúan los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN.

El método donde el candidato a MDM2i incrementa la presión génica de al menos un biomarcador de la Tabla 2.

20 El método donde la célula es una célula cancerosa seleccionada del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfoide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.

El método donde se mide la expresión de un ARNm o proteína de al menos un biomarcador de la Tabla 2.

25 El método que comprende evaluar los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN.

30 Una composición que comprende un MDM2i para su uso en el tratamiento del cáncer en una población seleccionada de pacientes con cáncer, donde la población de pacientes con cáncer se selecciona basándose en que muestre la expresión génica de al menos un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en una muestra de células cancerosas obtenida de dichos pacientes.

35 La composición donde la muestra de células cancerosas se selecciona del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfoide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.

La composición donde los pacientes se seleccionan basándose en la expresión génica de los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN.

40 Un kit para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de doble minuto humano 2 (MDM2i) que comprende

i) medios para detectar la expresión de los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN; y ii) instrucciones sobre cómo utilizar dicho kit.

45 El uso del kit para cualquiera de los métodos enumerados anteriormente.

#### Definiciones

50 La forma del singular «un/a» y «el/la», tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluye las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión «una célula» incluye una pluralidad de células, incluidas sus mezclas.

55 Todas las designaciones numéricas, p. ej., pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluidos los intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 0.1. Se debe sobreentender, aunque no siempre se mencione explícitamente, que todas las designaciones numéricas van precedidas del término «aproximadamente». También se debe sobreentender, aunque no siempre se mencione explícitamente, que los reactivos descritos en la presente son meramente ilustrativos y que en la técnica se conocen equivalentes de estos.

60 Los términos «marcador» o «biomarcador» se utilizan indistintamente en la presente. Un biomarcador es un ácido nucleico o polipéptido y la presencia, ausencia o expresión diferencial del ácido nucleico o polipéptido se utiliza para determinar la sensibilidad a cualquier MDM2i. Por ejemplo, CDKN1A es un biomarcador.

«MDM2» se refiere a una ubiquitina-ligasa proteica E3 que regula la ubiquitilación de p53, permite el transporte nuclear de p53 y desencadena la degradación de p53. A menos que se mencione específicamente lo contrario, MDM2, tal

como se utiliza en la presente, se refiere a MDM2 humana - números de acceso NM\_002392 / NP\_002383 (SEQ ID NO. 1/ SEQ ID NO. 2).

5 «P53» se refiere a la proteína supresora de tumores y se refiere a p53 humana (números de acceso de p53: ADN - NM\_000546, proteína - NP\_000537).

10 Una célula es «sensible» o presenta «sensibilidad» para la inhibición con un MDM2i cuando al menos uno de los biomarcadores descritos en la Tabla 2 se expresa de forma diferencial. Como alternativa, una célula es «sensible» para la inhibición con un MDM2i cuando todos los biomarcadores descritos en la Tabla 2 como un grupo se expresan de forma diferencial. En una realización, una célula es «sensible» o presenta

«sensibilidad» o es «sensible al tratamiento» cuando el valor de CI50 de un MDM2i para reducir la proliferación celular es inferior a 10  $\mu\text{M}$ , preferentemente inferior a 1  $\mu\text{M}$ .

15 Una «célula de control», un «tejido de control» y una «muestra de control» se refieren a un control de referencia, o una célula, tejido o muestra de cáncer, respectivamente, que es insensible a MDM2i (es decir, el valor de CI50 de un MDM2i para reducir la proliferación celular es superior a 10  $\mu\text{M}$ ; o cuando «sensible» se define con un valor de CI50 de un MDM2i para reducir la proliferación celular que es inferior a 1  $\mu\text{M}$ , entonces «insensible» denota que un valor de CI50 de un MDM2i para reducir la proliferación celular es superior a 1  $\mu\text{M}$ ).

20 Una «muestra normal» se refiere a una célula o tejido no canceroso.

25 Las expresiones «ácido nucleico» y «polinucleótido» se utilizan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos o análogos de estos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de un gen (por ejemplo, una sonda, cebador, marca SAGE o EST), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos, y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones de la estructura del nucleótido se pueden conferir antes o después del acoplamiento del polímero. La secuencia de los nucleótidos se puede interrumpir con componentes que no sean nucleótidos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de su polimerización tal como mediante conjugación con un componente marcador. El término también se refiere a moléculas tanto mono- como bicatenarias. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de esta invención que sea un polinucleótido engloba tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que se sabe o prevé que constituirán la forma bicatenaria.

40 Un «gen» se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) que es capaz de codificar un polipéptido o proteína particular después de ser transcrito y traducido. Se puede utilizar una secuencia de un polinucleótido para identificar fragmentos más grandes o secuencias codificantes de longitud completa del gen con el cual se asocian. Los métodos para aislar secuencias de fragmentos más grandes son conocidos por los expertos en la técnica.

45 La «expresión génica» o, como alternativa, un «producto génico» se refiere a los ácidos nucleicos o aminoácidos (p. ej., péptido o polipéptido) que se generan cuando un gen se transcribe y traduce.

50 El término «polipéptido» se utiliza indistintamente con el término «proteína» y, en su sentido más amplio, se refiere a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos o miméticos peptídicos. Las subunidades pueden estar conectadas mediante enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar conectada mediante otros enlaces, p. ej., éster, éter, etc.

55 El término «aminoácido», tal como se utiliza en la presente, se refiere tanto a aminoácidos naturales como no naturales o sintéticos, y a ambos isómeros ópticos D y L, análogos de aminoácidos y miméticos peptídicos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina de forma común oligopéptido si la cadena del péptido es corta. Si la cadena del péptido es larga, el péptido se denomina de forma común polipéptido o proteína.

60 El término «aislado» significa separado de otros constituyentes, celulares y de otro tipo, con los que el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o su(s) fragmento(s), se asocia normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, un polinucleótido aislado está separado de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con los que está asociado normalmente en su entorno nativo o natural, p. ej., en el cromosoma. Como resulta evidente para los expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o su(s) fragmento(s) no requiere «aislamiento» para distinguirlo de su homólogo de origen natural. Además, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o su(s) fragmento(s) «concentrado», «separado» o «diluido» se distingue de su homólogo de origen natural en el hecho de que la concentración o el número de moléculas por volumen es superior en una versión «concentrada» o inferior

65

que en una versión «separada» en comparación con la de su homólogo de origen natural. Un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o su(s) fragmento(s) que difiere del homólogo de origen natural en su secuencia primaria o, por ejemplo, en su patrón de glicosilación, no es necesario que esté presente en su forma aislada, ya que se distingue de su homólogo de origen natural por su secuencia primaria o, como alternativa, por otra característica tal como el patrón de glicosilación. Por lo tanto, un polinucleótido de origen no natural se proporciona como una realización separada del polinucleótido de origen natural aislado. Una proteína producida en una célula bacteriana se proporciona como una realización separada de la proteína de origen natural aislada de una célula eucariota en la que se produce en la naturaleza.

Una «sonda», cuando se utiliza en el contexto de la manipulación de polinucleótidos, se refiere a un oligonucleótido que se proporciona como reactivo para detectar una diana potencialmente presente en una muestra de interés mediante la hibridación con la diana. Normalmente, una sonda comprenderá una marca o un medio a través del cual se pueda unir una marca, ya sea antes o después de la reacción de hibridación. Las marcas adecuadas incluyen, sin carácter limitante, radioisótopos, fluorocromos, compuestos quimioluminiscentes, colorantes y proteínas, incluidas las enzimas.

Una «sonda» es un polinucleótido corto, generalmente con un grupo 3'-OH libre que se une a una diana o «modelo» potencialmente presente en una muestra de interés mediante la hibridación con la diana y posteriormente fomenta la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana. Una «reacción en cadena de la polimerasa» («PCR») es una reacción en la que se obtienen copias replicadas de un polinucleótido diana utilizando un «par de cebadores» o un «conjunto de cebadores» constituido por un cebador «en dirección 3'» y uno «en dirección 5'», y un catalizador de polimerización, tal como una ADN-polimerasa, y normalmente una enzima polimerasa térmicamente estable. Los métodos para la PCR son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *PCR: A Practical Approach*, M. MacPherson *et al.*, IRL Press en Oxford University Press (1991). Todos los procesos para producir copias replicadas de un polinucleótido, tales como la PCR o la clonación de genes, se denominan de forma colectiva en la presente «replicación». Un cebador también se puede utilizar como sonda en reacciones de hibridación tales como los análisis de inmunotransferencia de Northern o Southern (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> edición (1989)).

El término «expresión», tal como se utiliza en la presente, se refiere al proceso mediante el cual el ADN se transcribe en ARNm y/o el proceso mediante el cual el ARNm transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se obtiene a partir de ADN genómico, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARNm en una célula eucariota.

El término «expresado de forma diferencial», cuando se aplica a un gen, se refiere a la producción diferencial del ARNm transcrito y/o traducido a partir del gen o el producto proteico codificado por el gen. Un gen expresado de forma diferencial puede estar sobreexpresado o infraexpresado en comparación con el nivel de expresión de una célula de control. A pesar de ello, según se utiliza en la presente, la sobreexpresión es un incremento de la expresión del gen y por lo general es una expresión 1.25 veces o, como alternativa, al menos 1.5 veces o, como alternativa, al menos 2 veces o, como alternativa, al menos 3 veces o, como alternativa, al menos 4 veces superior a la detectada en una célula o tejido homólogo de control. La infraexpresión, tal como se utiliza en la presente, es una reducción de la expresión del gen y por lo general es una expresión 1.25 veces o, como alternativa, al menos 1.5 veces o, como alternativa, al menos 2 veces o, como alternativa, al menos 3 veces o, como alternativa, al menos 4 veces inferior a la detectada en una célula o tejido homólogo de control. El término «expresado de forma diferencial» también se refiere al caso en que la expresión en una célula cancerosa o tejido canceroso se detecta y está presente pero la expresión en una célula de control es indetectable.

Un nivel de expresión elevado del gen se puede producir debido a una sobreexpresión del gen o un incremento en el número de copias del gen. El gen también se puede traducir en unos niveles mayores de proteína debido a una desregulación o ausencia de un regulador negativo.

Un «perfil expresión génica» se refiere a un patrón de expresión de al menos un biomarcador que reaparece en múltiples muestras y que refleja una propiedad compartida por esas muestras, tal como el tipo de tejido, la respuesta a un tratamiento particular o la activación de una vía o proceso biológico particular en las células. Además, un perfil de expresión génica puede diferenciar muestras que comparten esa propiedad común y las que no con mayor exactitud que la que se conseguiría probablemente asignando las muestras a los dos grupos de forma aleatoria. Un perfil de expresión génica se puede utilizar para predecir si muestras de estado desconocido comparten esa propiedad común o no. Cabe esperar cierta variación entre los niveles de al menos un biomarcador y el perfil típico, pero la similitud global de los niveles de expresión respecto al perfil típico es tal que es estadísticamente improbable que la similitud se observase por casualidad en muestras que no compartieran la propiedad común que refleja el perfil de expresión.

El término «ADNc» se refiere a ADN complementario, es decir, moléculas de ARNm presentes en una célula u organismo que se convierten en ADNc con una enzima tal como la transcriptasa inversa. Una «genoteca de ADNc» es una colección de todas las moléculas de ARNm presentes en una célula u organismo, convertidas todas ellas en moléculas de ADNc con la enzima transcriptasa inversa e insertadas a continuación en «vectores» (otras moléculas

de ADN que pueden seguir replicándose tras la adición de ADN exógeno). Los vectores ilustrativos para las genotecas incluyen un bacteriófago (también conocido como «fago»), virus que infectan bacterias, por ejemplo, un fago lambda. A continuación, la genoteca se puede analizar con una sonda para determinar el ADNc específico ( y, por lo tanto, el ARNm) de interés.

Las expresiones «soporte de fase sólida» o «soporte sólido», que se emplean indistintamente, tal como se utilizan en la presente, no se limitan a un tipo específico de soporte. Por el contrario, existe una amplia gama de soportes disponibles y estos son conocidos por el experto en la técnica. Los soportes de fase sólida incluyen geles de sílice, resinas, películas de plástico derivatizado, microesferas de vidrio, microesferas de plástico, geles de alúmina, micromatrices y chips. La expresión «soporte sólido», tal como se utiliza en la presente, también incluye liposomas, células y matrices sintéticas que presentan antígenos. Un soporte de fase sólida adecuado se puede seleccionar en función del uso final deseado y la idoneidad para varios protocolos. Por ejemplo, para la síntesis de péptidos, el soporte de fase sólida se puede referir a resinas tales como poliestireno (p. ej., la resina PAM obtenida de Bachem Inc., Peninsula Laboratories), resina polyHIPE(R)<sup>TM</sup> (obtenida de Aminotech, Canadá), resina de poliamida (obtenida de Peninsula Laboratories), resina de poliestireno con injerto de polietilenglicol (TentaGelR<sup>TM</sup>, Rapp Polymere, Tubingen, Alemania) o resina de polidimetilacrilamida (obtenida de Milligen/Biosearch, California).

También se puede unir un polinucleótido a un soporte sólido para su uso en ensayos de cribado de alto rendimiento. El documento PCT WO 97/10365, por ejemplo, describe la construcción de chips de oligonucleótidos de alta densidad. Remítase también a las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 405 783, 5 412 087 y 5 445 934. Utilizando este método, las sondas se sintetizan en una superficie de vidrio derivatizado para formar las matrices del chip. Se acoplan fosforamiditos de nucleósidos fotoprotectidos a la superficie del vidrio, se desprotegen selectivamente mediante fotólisis a través de una máscara fotolitográfica y se hacen reaccionar con un segundo fosforamidito de nucleósido protegido. El proceso de acoplamiento/desprotección se repite hasta que se completa la sonda deseada.

A modo de ejemplo, se puede evaluar la actividad de transcripción midiendo los niveles de ARN mensajero utilizando un chip génico tal como Affymetrix® HG-U133-Plus-2 GeneChips. De este modo, es posible la cuantificación de ARN de alto rendimiento a tiempo real de un gran número de genes de interés en un sistema reproducible.

La expresión «condiciones rigurosas de hibridación» se refiere a condiciones en las que una sonda de ácido nucleico se hibridará específicamente con su subsecuencia diana y no con otras secuencias. Las condiciones que determinan la rigurosidad de la hibridación incluyen: temperatura, fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturizantes tales como la formamida. La variación de uno de estos factores puede influir sobre otro factor y un experto en la técnica apreciará los cambios en las condiciones necesarios para mantener el nivel deseado de rigurosidad. Un ejemplo de una hibridación muy rigurosa es: cloruro de sodio 0.015 M, citrato de sodio 0.0015 M a 65-68 °C o cloruro de sodio 0.015M, citrato de sodio 0.0015 M y un 50% de formamida a 42 °C (remítase a Sambrook, *supra*). Un ejemplo de una hibridación «moderadamente rigurosa» son las condiciones de: cloruro de sodio 0.015 M, citrato de sodio 0.0015 M a 50-65 °C o cloruro de sodio 0.015 M, citrato de sodio 0.0015 M y un 20% de formamida a 37-50 °C. Las condiciones moderadamente rigurosas se utilizan cuando se desea una cantidad moderada de apareamientos erróneos del ácido nucleico. Un experto en la técnica apreciará que el lavado forma parte de las condiciones de hibridación. Por ejemplo, las condiciones de lavado pueden incluir 0.2X-0.1X de SSC/0.1% de SDS y temperaturas de 42-68 °C, donde el hecho de incrementar la temperatura incrementa la rigurosidad de las condiciones de lavado.

Cuando la hibridación se produce en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos monocatenarios, la reacción se denomina «anelación» y se describe que esos polinucleótidos son «complementarios». Un polinucleótido bicatenario puede ser «complementario» u «homólogo» respecto a otro polinucleótido, si se puede producir la hibridación entre una de las hebras del primer nucleótido y el segundo. La «complementariedad» u «homología» (el grado en que un polinucleótido es complementario respecto a otro) es cuantificable en lo que se refiere a la proporción de bases en hebras opuestas que cabe esperar que formen puentes de hidrógeno las unas con las otras, de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases aceptadas generalmente.

El hecho de que un polinucleótido o una región de un polinucleótido (o un polipéptido o una región de un polipéptido) tenga un cierto porcentaje (por ejemplo 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) de «identidad secuencial» respecto a otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son las mismas cuando se comparan las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad secuencial se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los que se describen en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, (1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, se utilizan los parámetros por defecto para la alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, utilizando los parámetros por defecto. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP, utilizando los siguientes parámetros por defecto: código genético=estándar; filtro=ninguno; hebra=ambas; corte=60; expect=10; matriz=BLOSUM62; descripciones=50 secuencias; clasificación según=HIGH SCORE; bases de datos=no redundantes.

La expresión «trastornos proliferativos celulares» deberá incluir la desregulación de la función fisiológica normal caracterizada por una división y/o crecimiento celular anómalo o pérdida de función. Los ejemplos de «trastornos

proliferativos celulares» incluyen, sin carácter limitante, hiperplasia, neoplasia, metaplasia y varios trastornos inmunitarios, p. ej., los caracterizados por la desregulación de la apoptosis de los linfocitos T.

Las expresiones «células neoplásicas», «enfermedad neoplásica», «neoplasia», «tumor», «células tumorales», «cáncer» y «células cancerosas» (empleadas indistintamente), tal como se utilizan en la presente, se refieren a células que exhiben un crecimiento relativamente autónomo, de modo que exhiben un fenotipo de crecimiento caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular (es decir, una división celular desregulada). Las células neoplásicas pueden ser malignas o benignas. Una célula o tejido metastásico se refiere a que la célula puede invadir y destruir estructuras corporales cercanas.

El término «cáncer» se refiere a enfermedades cancerosas que incluyen, por ejemplo, de mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfoide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.

El término «PBMC» se refiere a células mononucleares de sangre periférica e incluye «PBL» - linfocitos de sangre periférica.

La «supresión» del crecimiento tumoral indica una reducción en el crecimiento de las células tumorales cuando se ponen en contacto con un MDM2i en comparación con el crecimiento tumoral sin el contacto con un compuesto de tipo MDM2i. El crecimiento de las células tumorales se puede evaluar mediante cualesquiera medios conocidos en la técnica, que incluyen, sin carácter limitante, medir el tamaño del tumor, determinar si las células tumorales están proliferando utilizando un ensayo de incorporación de 3H- timidina, medir la captación de glucosa mediante la formación de imágenes por FDG-PET (tomografía de emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa) o contar las células tumorales. La «supresión» del crecimiento de las células tumorales se refiere a todos o uno cualquiera de los siguientes estados: ralentización, retraso y detención del crecimiento del tumor, así como también el encogimiento del tumor.

Una «composición» es una combinación de agente activo y otro portador, p. ej., un compuesto o composición, inerte (por ejemplo, una marca o agente detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizante, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservante, adyuvante o similares. Los portadores también pueden incluir aditivos y excipientes farmacéuticos, por ejemplo, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (p. ej., azúcares, que incluyen monosacáridos y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcares), que pueden estar presentes de forma individual o combinados, comprendiendo por sí solos o combinados un 1-99.99% en peso o volumen. Los excipientes de tipo carbohidrato incluyen, por ejemplo, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos tales como lactosa, sacarosa, trealosa, celobiosa y similares; polisacáridos tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

Los excipientes de tipo proteína ilustrativos incluyen albúmina de suero tal como albúmina de suero humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y similares. Los componentes de tipo anticuerpo/aminoácido representativos, que también pueden actuar en capacidad tamponante, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares.

El término «portador» incluye además un tampón o un agente para ajustar el pH; habitualmente, el tampón es una sal preparada a partir de una base o ácido orgánico. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales del ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; tampones de fosfato o Tris, clorhidrato de trometamina. Otros portadores incluyen aditivos/excipientes poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficolos (un azúcar polimérico), dextratos (p. ej., ciclodextrinas tales como 2-hidroxipropil-cuadratura-ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes saborizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, surfactantes (p. ej., polisorbatos tales como TWEEN 20™ y TWEEN 80™), lípidos (p. ej., fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides ( p. ej., colesterol) y agentes quelantes (p. ej., EDTA).

La expresión «portador farmacéuticamente aceptable», tal como se utiliza en la presente, engloba cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y varios tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes y cualquiera de los portadores mencionados anteriormente con la condición adicional de que sean aceptables para su uso *in vivo*. Para consultar ejemplos de portadores, estabilizantes y adyuvantes, remítase a *Remington's Pharmaceutical Science*, 15.<sup>a</sup> Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y *Physician's Desk Reference*, 52.<sup>a</sup> ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998).

Una «cantidad eficaz» es una cantidad suficiente para ejercer resultados deseados o beneficiosos. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosis.

Un «sujeto», «individuo» o «paciente» se utiliza indistintamente en la presente y se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferente un ser humano. Los mamíferos incluyen, sin carácter limitante, ratones, simios, seres humanos, animales de granja, animales que participan en deportes y animales de compañía.

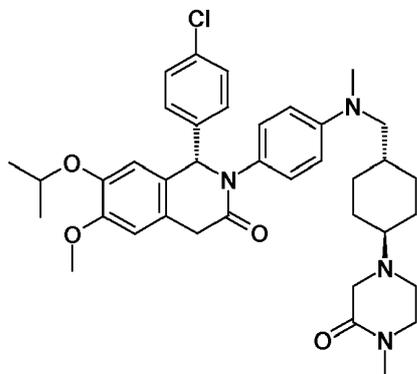
Un «inhibidor» de MDM2, tal como se utiliza en la presente, reduce la asociación de p53 y MDM2. Esta inhibición puede incluir, por ejemplo, la reducción de la asociación de p53 y MDM2 antes de que estos se unan entre sí o la reducción de la asociación de p53 y MDM2 después de que estos se hayan unido entre sí, con lo que se liberan ambas moléculas.

En la actualidad se han identificado una serie de genes como biomarcadores para MDM2i. La presencia o reducción o incremento de la expresión génica de uno o más de los biomarcadores identificados en la presente y en la Tabla 2 se puede utilizar para determinar la sensibilidad de un paciente a cualquier MDM2i, por ejemplo, la expresión de un biomarcador indica que un paciente con cáncer es sensible y respondería de forma favorable a la administración de un MDM2i. A modo de otro ejemplo, después del tratamiento con un MDM2i, se puede obtener una muestra del paciente y se puede evaluar la muestra para determinar la sensibilidad con el fin de descubrir si el paciente sigue siendo sensible al tratamiento con MDM2i. Como alternativa, se pueden evaluar todos los biomarcadores de la Tabla 2 como un solo grupo.

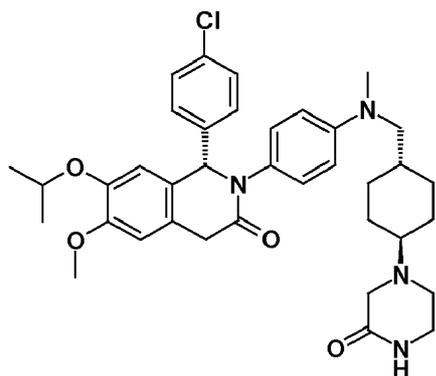
Los inhibidores de MDM2 (MDM2i) son compuestos que son inhibidores de la asociación p53 - MDM2 y son útiles junto con los métodos o usos de la invención. Los MDM2i son útiles en composiciones farmacéuticas para uso humano o veterinario donde se indica la inhibición de la asociación p53 - MDM2, p. ej., en el tratamiento de tumores y/o crecimiento celular canceroso. En particular, tales compuestos son útiles en el tratamiento del cáncer humano, ya que la evolución de estos tipos de cáncer puede ser dependiente al menos parcialmente de la anulación de la función de «guardián» de p53, por ejemplo, la sobreexpresión de MDM2. Los compuestos de tipo MDM2i son útiles a la hora de tratar, por ejemplo, carcinomas (p. ej., de mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfoide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura. En la Tabla 1 se encuentra una lista de compuestos de tipo MDM2i ilustrativos (remítase al documento WO 2011076786). Los compuestos de tipo MDM2i que se encuentran en la Tabla 1 son de la clase de moléculas isoquinolinona. En los métodos o usos de la invención, también se pueden aplicar otros MDM2i que se unen a una cavidad de unión a p53 de MDM2, en particular a sustancialmente la misma cavidad de unión a p53 de MDM2 que la Nutlina-3a o sustancialmente donde se une el MDM2i ilustrativo de la Tabla 1. El MDM2i utilizado de acuerdo con las realizaciones de la presente puede estar relacionado estructuralmente con el que se describe en la Tabla 1 (es decir, MDM2i(1) y MDM2i(2)) o con la Nutlina 3a, tal como, por ejemplo, isoquinolinonas sustituidas o quinazolinonas. Los métodos incluidos en la presente también se pueden utilizar con otros compuestos tales como oxindoles espiránicos, imidazolilindol y *cis*-imidazolina (remítase a Shangary *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 2008 7(6): 1533-1542; Furet *et al.*, *Bioorg.Med.Chem. Let.* 2012 22:3498-3502 y Carol *et al.*, *Pediatr. Blood Cancer* 2012 páginas 1-9, publicado en línea el 2 de julio de 2012, antes de su inclusión en la revista). El MDM2i tal como se utiliza en la presente impide la interacción proteína-proteína entre p53 y MDM2 y/o inhibe la proliferación celular induciendo la actividad de la vía de p53.

Tabla 1 - Compuestos de tipo MDM2i

MDM2i(1)



MDM2i(2)



### Medición de la expresión génica

- 5 La detección de la expresión génica se puede realizar mediante cualquier método adecuado, que incluye, por ejemplo, detectar la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen o la cantidad de ADNc producido a partir de la transcripción inversa del ARNm transcrito a partir del gen o la cantidad del polipéptido o proteína codificada por el gen. Estos métodos se pueden llevar a cabo de muestra en muestra o se pueden modificar para realizar un análisis de alto rendimiento. Por ejemplo, utilizando chips de micromatrices Affymetrix™ U133.
- 10 En un aspecto, la expresión génica se detecta y cuantifica mediante la hibridación con una sonda que se hibrida específicamente con la sonda adecuada para ese biomarcador. Las sondas también se pueden unir a un soporte sólido para su uso en ensayos de cribado de alto rendimiento utilizando métodos conocidos en la técnica. El documento WO 97/10365 y las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 405 783, 5 412 087 y 5 445 934, por ejemplo, describen la construcción de chips de oligonucleótidos de alta densidad que pueden contener una o más de las secuencias descritas en la presente. Utilizando los métodos descritos en
- 15 las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 405 783, 5 412 087 y 5 445 934, las sondas de esta invención se sintetizan sobre una superficie de vidrio derivatizado. Se acoplan fosforamiditos de nucleósidos fotoprotectidos a la superficie del vidrio, se desprotegen selectivamente mediante fotólisis a través de una máscara fotolitográfica y se hacen reaccionar con un segundo fosforamidito de nucleósido protegido. El proceso de acoplamiento/desprotección se repite hasta que se completa la sonda deseada.
- 20 En un aspecto, el nivel de expresión de un gen se determina mediante la exposición de una muestra de ácido nucleico al chip modificado con la sonda. El ácido nucleico extraído se marca, por ejemplo, con una marca fluorescente, preferentemente durante un paso de amplificación. La hibridación de la muestra marcada se lleva a cabo con un nivel adecuado de rigurosidad. El grado de hibridación de la sonda-ácido nucleico se mide cuantitativamente utilizando un dispositivo de detección Remítase a las Pat. de EE. UU. N.ºs 5 578 832 y 5 631 734.
- 25 Como alternativa, cualquiera de entre la traducción, transcripción o número de copias del gen se puede determinar utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, un método de amplificación tal como la PCR puede resultar útil. Los procedimientos generales para la PCR se describen en MacPherson *et al.*, *PCR: A Practical Approach* (IRL Press en Oxford University Press (1991)). A pesar de ello, las condiciones de PCR utilizadas para cada reacción de aplicación se determinan empíricamente. Una serie de parámetros influyen sobre el éxito de una reacción. Entre ellos, se encuentran el tiempo y la temperatura de la anelación, el tiempo de extensión, la concentración de Mg<sup>2+</sup> y/o ATP, el pH y la concentración relativa de cebadores, moldes y desoxirribonucleótidos. Después de la amplificación, los fragmentos de ADN resultantes se pueden detectar mediante electroforesis en gel de agarosa seguida de una visualización con tinción de bromuro de etidio e iluminación ultravioleta.
- 30 En una realización, los ácidos nucleicos hibridados se detectan mediante la detección de una o más marcas unidas a los ácidos nucleicos de la muestra. Las marcas se pueden incorporar mediante cualquiera de entre una serie de medios muy conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, en un aspecto, la marca se incorpora simultáneamente durante el paso de amplificación en la preparación del ácido nucleico de la muestra. De este modo, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores marcados o nucleótidos marcados proporcionará un producto de amplificación marcado. En una realización separada, la amplificación de la transcripción, según se ha descrito anteriormente, utilizando un nucleótido marcado (p. ej., CTP y/o UTP marcado con fluoresceína) incorpora una marca en los ácidos nucleicos transcritos.
- 35 Como alternativa, se puede añadir una marca directamente a la muestra de ácido nucleico original (p. ej., ARNm, poliA, ARNm, ADNc etc.) o al producto de amplificación después de que se complete la amplificación. Los medios para unir marcas a ácidos nucleicos son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el desplazamiento de mella o marcaje terminal (p. ej., con un ARN marcado) mediante la acción de una cinasa sobre el ácido nucleico y
- 40
- 45
- 50

la unión posterior (ligación) de un conector del ácido nucleico que une el ácido nucleico de la muestra a una marca (p. ej., un fluoróforo).

Las marcas detectables adecuadas para su uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las marcas útiles en la presente invención incluyen la biotina para tinción con un conjugado de estreptavidina marcado, microesferas magnéticas (p. ej., Dynabeads™), tintes fluorescentes (p. ej., fluoresceína, rojo de Texas, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radiomarcas (p. ej., 3H, 125I, 35S, 14C o 32P), enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras utilizadas habitualmente en un ELISA) y marcas calorimétricas tales como microesferas de oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (p. ej., poliestireno polipropileno, látex, etc.). Las patentes que describen el uso de tales marcas incluyen las Pat. de EE. UU. N.ºs 3 817 837, 3 850 752, 3 939 350, 3 996 345, 4 277 437, 4 275 149 y 4 366 241.

La detección de las marcas es muy conocida por los expertos en la técnica. De este modo, por ejemplo, las radiomarcas se pueden detectar utilizando una película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes se pueden detectar utilizando un fotodetector para detectar la luz emitida. Las marcas enzimáticas se detectan habitualmente proporcionando la enzima con un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las marcas calorimétricas se detectan simplemente visualizando la marca coloreada.

La marca detectable se puede añadir al ácido o ácidos nucleicos diana (muestra) antes o después de la hibridación, tal como se describe en el documento WO 97/10365. Estas marcas detectables se unen directamente o se incorporan al ácido nucleico diana (muestra) antes de la hibridación. Por el contrario, las «marcas indirectas» se unen al dúplex híbrido después de la hibridación. Por lo general, la marca indirecta se conecta a un resto de unión que se ha conectado con el ácido nucleico diana antes de la hibridación. Por ejemplo, el ácido nucleico diana se puede biotinilar antes de la hibridación. Después de la hibridación, un fluoróforo conjugado con avidina se enlazará con los dúplex híbridos portadores de biotina para proporcionar una marca que se detecta fácilmente. Para consultar un artículo de revisión detallado sobre los métodos para marcar ácidos nucleicos y detectar ácidos nucleicos hibridados marcados, remítase a *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

#### Detección de polipéptidos

El nivel de expresión del biomarcador también se puede determinar examinando la expresión proteica o el producto proteico en al menos uno de los biomarcadores enumerados en la Tabla 2. La determinación del nivel proteico implica medir la cantidad de cualquier unión inmuno-específica que se produce entre un anticuerpo que reconoce y se une selectivamente al polipéptido del biomarcador en una muestra obtenida de un paciente y comparar esta con la cantidad de unión inmuno-específica de al menos un biomarcador en una muestra de control. La cantidad de expresión proteica del biomarcador se puede incrementar o reducir cuando se compara con una expresión de control. Como alternativa, se pueden evaluar todos los biomarcadores de la Tabla 2 como un solo grupo.

En la materia existen varias técnicas disponibles para el análisis de proteínas. Estas incluyen, sin carácter limitante, ensayos radioinmunológicos, ELISA (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas), inmunoensayos de tipo «sándwich», ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos *in situ* (utilizando, p. ej., marcas de oro coloidal, enzimas o radioisótopos), análisis por inmunotransferencia de Western, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos inmunofluorescentes, citometría de flujo, inmunohistoquímica, microscopía confocal, ensayos enzimáticos, resonancia de plasma de superficies y PAGE-SDS.

#### Evaluación de biomarcadores y tratamiento con MDM2i

Una vez que se ha previsto que un paciente es sensible a un MDM2i, la administración de cualquier MDM2i a un paciente se puede efectuar en una dosis, de forma continua o intermitente a lo largo del transcurso del tratamiento. Los métodos para determinar el medio y la dosis de administración más eficaces son muy conocidos por el experto en la técnica y variarán según la composición utilizada para la terapia, el propósito de la terapia, la célula diana que se esté tratando y el sujeto que se esté tratando. Se pueden llevar a cabo administraciones múltiples o únicas, siendo seleccionados el patrón y el nivel de las dosis por el médico a cargo. Las formulaciones de las dosis y los métodos para administrar los agentes adecuados se pueden ajustar empíricamente.

Se puede evaluar al menos uno de los biomarcadores proporcionados en la Tabla 2 después de la administración de MDM2i con el fin de determinar si el paciente sigue siendo sensible al tratamiento con MDM2i. Además, se puede evaluar al menos un biomarcador en múltiples puntos temporales después de una única administración de MDM2i. Por ejemplo, se administra un bolo inicial de un MDM2i y se evalúa al menos un biomarcador de la Tabla 2 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después del primer tratamiento. Como alternativa, se pueden evaluar todos los biomarcadores de la Tabla 2 como un solo grupo.

Dicho al menos un biomarcador de la Tabla 2 se puede evaluar después de cada administración de MDM2i, de modo que si se realizan múltiples administraciones de MDM2i, entonces se puede evaluar al menos un biomarcador después de cada administración para determinar la sensibilidad continuada del paciente. El paciente podría someterse a múltiples administraciones de MDM2i y entonces los biomarcadores se podrían evaluar en diferentes puntos temporales. Por ejemplo, un curso de tratamiento puede requerir la administración de una dosis inicial de MDM2i, una segunda dosis en un periodo de tiempo especificado posterior e incluso una tercera dosis horas después de la segunda dosis. Se podría evaluar al menos un biomarcador de la Tabla 2 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración de cada dosis de MDM2i. Como alternativa, se pueden evaluar todos los biomarcadores de la Tabla 2 como un solo grupo.

También se contempla en el alcance de la invención el hecho de que se evalúen diferentes biomarcadores en diferentes puntos temporales. Sin pretender limitarse a ninguna teoría, debido al mecanismo de acción del MDM2i o del biomarcador, la respuesta del MDM2i se retrasa y al menos un biomarcador de la Tabla 2 se evalúa en cualquier momento después de la administración para determinar si el paciente sigue siendo sensible a la administración de MDM2i. Una evaluación de al menos un biomarcador de la Tabla 2 después de cada administración de MDM2i proporcionará una guía sobre el medio, la dosis y el curso de tratamiento. Como alternativa, se pueden evaluar todos los biomarcadores de la Tabla 2 como un solo grupo.

Finalmente, hay la administración de diferentes MDM2i y el seguimiento evaluando al menos un biomarcador de la Tabla 2. En esta realización, se selecciona más de un MDM2i y se administra al paciente. A continuación, se puede evaluar al menos un biomarcador de la Tabla 2 después de la administración de cada MDM2i diferente. Este ensayo también se puede llevar a cabo en múltiples puntos temporales después de la administración de los diferentes MDM2i. Por ejemplo, se podría administrar un primer MDM2i al paciente y evaluar al menos un biomarcador 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración. A continuación, se podría administrar un segundo MDM2i y se podría evaluar al menos un biomarcador nuevamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 3 días, 1 semana o 1 mes o varios meses después de la administración del segundo MDM2i. En cada caso, se pueden evaluar todos los biomarcadores de la Tabla 2 como un solo grupo.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método para evaluar los niveles de dosis adecuados de un MDM2i, que comprende monitorizar la expresión diferencial de al menos uno de los genes identificados en la Tabla 2 después de la administración del MDM2i. Por ejemplo, tras la administración de un primer bolo de MDM2i, se analiza al menos un biomarcador de la Tabla 2 y, basándose en éste resultado, se recomienda un incremento o una reducción en la dosis de MDM2i. Después de la administración de la dosis ajustada de MDM2i, el análisis de al menos un biomarcador determinará si el paciente sigue siendo sensible a la dosis ajustada y que la dosis ajustada esté proporcionando el beneficio esperado, p. ej., la supresión del crecimiento del tumor. Como alternativa, se pueden evaluar todos los biomarcadores de la Tabla 2 como un solo grupo para evaluar la sensibilidad a la dosis del MDM2i.

Se pueden preparar kits para evaluar la actividad de cualquier MDM2i. Por ejemplo, para evaluar la sensibilidad a MDM2i, se puede utilizar un kit que comprenda cebadores de ácidos nucleicos para PCR o para la hibridación de micromatrices de los biomarcadores enumerados en la Tabla 2. Como alternativa, en la evaluación de la sensibilidad a MDM2i, podría ser útil un kit suministrado con anticuerpos para al menos uno de los biomarcadores enumerados en la Tabla 2.

Es muy conocido en la técnica el hecho de que los cánceres se pueden volver resistentes a un tratamiento quimioterapéutico, especialmente cuando ese tratamiento se prolonga. Se puede realizar una evaluación de la expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores de la Tabla 2 después de un tratamiento prolongado con cualquier agente quimioterapéutico para determinar si el cáncer es sensible al MDM2i. Por ejemplo, los inhibidores de cinasas tales como Gleevec® inhibirán de forma potente una cinasa específica, pero también pueden inhibir de forma débil otras cinasas. También existen otros MDM2i, por ejemplo, la familia de compuestos de las Nutlinas. Si el paciente ha sido tratado previamente con otro agente terapéutico u otro MDM2i, resulta una información útil para el paciente evaluar al menos uno de los biomarcadores de la Tabla 2 para determinar si el tumor es sensible a un MDM2i. Este ensayo puede ser especialmente beneficioso para el paciente si el cáncer remite y después se vuelve a desarrollar o ha llegado a la metástasis en un sitio diferente.

#### Cribado de inhibidores de MDM2

Es posible evaluar al menos un biomarcador enumerado en la Tabla 2 para cribar otro MDM2i. Este método comprende evaluar una célula con al menos un biomarcador de la Tabla 2, que predice si la célula es sensible a un inhibidor candidato a MDM2i, a continuación la célula se pone en contacto con el MDM2i candidato y el valor de CI50 de la célula tratada se compara con un MDM2i conocido que se pone en contacto con una célula sensible. Por ejemplo, para células que se prevé que son sensibles a cualquier MDM2i, según se determina mediante la expresión diferencial de al menos un biomarcador de la Tabla 2, el MDM2i candidato tendrá un valor de CI50  $\leq 3 \mu\text{M}$ . La medición de la expresión de al menos un biomarcador de la Tabla 2 se puede realizar mediante los métodos descritos previamente,

por ejemplo, PCR o análisis de micromatrices. Como alternativa, se pueden evaluar todos los biomarcadores de la Tabla 2 como un solo grupo.

Tabla 2

5

| Nombre del gen | Número de acceso      |  |
|----------------|-----------------------|--|
| MDM2           | NM_002392 / NP_002383 |  |
| CDKN1A         | NM_000389 / NP_000380 |  |
| ZMAT3          | NM_022470 / NP_071915 |  |
| DDB2           | NM_000107 / NP_000098 |  |
| FDXR           | NM_004110 / NP_004101 |  |
| RPS27L         | NM_015920 / NP_057004 |  |
| BAX            | NM_004324 / NP_004315 |  |
| RRM2B          | NM_015713 / NP_056528 |  |
| SESN1          | NM_014454 / NP_055269 |  |
| CCNG1          | NM_004060 / NP_004051 |  |
| XPC            | NM_004628 / NP_004619 |  |
| TNFRSF10B      | NM_003842 / NP_003833 |  |
| AEN            | NM_022767 / NP_073604 |  |

**EJEMPLOS**

10 Ejemplo 1: Tanto MDM2i(1) como MDM2i(2) son inhibidores de p53-MDM2 igualmente potentes en ensayos celulares y bioquímicos.

15 *Ensayo de TR-FRET para la determinación de  $Cl_{50}$ :* las condiciones estándar del ensayo consistieron en un volumen total de 60  $\mu$ L en placas blancas de 384 pocillos (Greiner Bio-One: Frickenhausen, Alemania), en tampón de PBS que contenía NaCl 125 mM, un 0.001% de Novexina, un 0.01% de Gelatina, un 0.2% de Pluronic F-127, DTT 1 mM y un 1.7% de DMSO final). Tanto MDM2i(1) como MDM2i(2) se añadieron en diferentes concentraciones a MDM2 biotinilado 0.1 nM (aminoácidos de MDM2 humano 2-188, preparados internos), estreptavidina marcada con europio 0.1 nM (Perkin Elmer: Waltham, MA, EE. UU.) y péptido Cy5-p53 10 nM (aa18-26 de Cy5-p53, preparado interno).  
 20 Después de una incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos, las muestras se midieron en un lector GeniosPro (Tecan: Mannedorf, Alemania). La lectura del ensayo de FRET se calculó a partir de los datos no procesados de las dos señales de fluorescencia diferentes medidas en un modo resuelto en el tiempo (fluorescencia

a 665 nm/fluorescencia a 620 nm x 1000). Los valores de  $CI_{50}$  se calculan mediante un ajuste de la curva utilizando XLfit® (modelo del ajuste #205). Estos datos se muestran en la Figura 1A.

*Determinación de las constantes de la velocidad de unión ( $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ):* se utilizó la herramienta de mezcla rápida del lector GeniosPro (Tecan: Mannedorf, Alemania) para estudiar la cinética de unión rápida (modo de pocillo único). Se colocaron en el lector microplacas que contenían el inhibidor y péptido p53 marcado con Cy5 20 nM en 50  $\mu$ L de tampón de ensayo. Después de una equilibración de 10 min a 25 °C, se iniciaron las reacciones de unión inyectando 50  $\mu$ L de tampón que contenía MDM2 biotinilado 0.2 nM y estreptavidina-europio 0.2 nM a 475  $\mu$ L/s. Se midió la fluorescencia a 665 nm y en varios intervalos de tiempo, el primero de ellos 0.6 s después de la inyección. En ausencia de inhibidor, la fluorescencia de Cy5 ya fue máxima a los 0.6 s y se mantuvo estable durante al menos 15 min. En presencia de MDM2i(1) y MDM2i(2), la fluorescencia se redujo lentamente y se realizaron mediciones hasta que se llegó a un estado estable. La fluorescencia de control se tomó como la diferencia entre pocillos que contenían un 1% de DMSO y pocillos que contenían Nutlina-3 10  $\mu$ M como control. El efecto inhibidor en cada punto temporal se calculó como el porcentaje del control correspondiente. Las curvas de evolución obtenidas en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor se combinaron y se ajustaron como un todo. Se llevó a cabo una regresión no lineal con XLfit® utilizando una metodología de ajuste novedosa que se diseñó para obtener valores exactos de  $K_{on}$  y  $K_{off}$ , basándose en las siguientes ecuaciones respectivas: Ajuste= $[Imín+((Imáx-(((Ki^nH)*Imáx)/((y^nH)+(Ki^nH))))*(1-exp(((1-koff)+((y*koff)/Ki))^x)))]$  y Ajuste= $[Imín+((Imáx-(((Ki^nH)*Imáx)/((y^nH)+(Ki^nH))))*(1-exp(((1-kon*(Ki+y))^x)))]$ , donde  $K_i$  representa la constante de inhibición,  $Imín$  representa la inhibición mínima (en %),  $Imáx$  representa la inhibición máxima (en %),  $nH$  representa el coeficiente de Hill,  $x$  representa el tiempo e  $y$  representa la concentración de inhibidor). Estos datos se muestran en la Figura 1A.

*Inhibición de la proliferación celular y ensayo GRIP de traslado de p53:* Se miden los efectos de MDM2i(1) y MDM2i(2) sobre el crecimiento celular y la pérdida de viabilidad en líneas celulares tanto con p53 de origen natural (células p53<sup>wt/wt</sup> SJS-A1 y HCT116) como con p53 mutado (células p53<sup>-/-</sup> SAOS2 y HCT116) utilizando un ensayo de proliferación estándar basado en el tinte fluorescente que interacciona con ADN YOPRO (Invitrogen: Lucern, Suiza). En resumen, se colocan células en placas de 96 pocillos durante toda la noche a 37 °C y se tratan con concentraciones cada vez mayores de MDM2i(1) o MDM2i(2) durante 72 horas. A continuación, se determina la concentración celular en cada pocillo utilizando el tinte fluorescente que interacciona con ADN YOPRO de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se mide la señal fluorescente utilizando un lector de placas estándar Gemini-EM (Molecular Devices: Sunnyvale, CA, EE. UU.). Se calculan los valores de  $CI_{50}$  mediante un ajuste de la curva utilizando XLfit® (modelo de ajuste #201) y estos datos se muestran en la Figura 1A.

El ensayo mecanístico de redistribución de p53-MDM2 (ensayo GRIP) se utiliza para monitorizar directamente en las células la capacidad de los compuestos para modular la interacción proteína-proteína de p53-MDM2. En este ensayo totalmente modificado, la proteína p53 se marca con una etiqueta de GFP fluorescente y se une a la proteína MDM2, la cual está anclada en el citoplasma de las células. El tratamiento de las células con compuestos específicos provoca la disociación de la interacción entre las dos proteínas y el traslado de la proteína p53-GFP liberada desde el citoplasma hacia el núcleo. Este efecto se detecta y cuantifica utilizando una plataforma de generación de imágenes de alto contenido empleando un ArrayScan-VTi (Cellomics), que sigue la señal de fluorescencia en función del tiempo (remítase a la Figura 1B, ensayo GRIP de traslado de p53).

En conjunto, utilizando tanto ensayos *in vitro* como celulares, los resultados presentados en las Figuras 1A y 1B muestran que tanto MDM2i(1) como MDM2i(2) son inhibidores de la interacción proteína-proteína de p53-MDM2 potentes comparables *in vitro*, que inhiben la interacción proteína-proteína de p53-MDM2, dificultan la proliferación de células tumorales de un modo dependiente de p53 e inducen la acumulación de p53 y su traslado hacia el núcleo. Estos datos se muestran en la Figura 1B; cabe destacar que existen grandes discrepancias en los valores de  $CI_{50}$  entre las líneas celulares. Esto también es una indicación de que existen diferencias en la sensibilidad entre las dos líneas celulares frente a un MDM2i y, por lo tanto, la determinación de la sensibilidad puede resultar útil a la hora de determinar qué pacientes reciben el agente terapéutico.

#### Ejemplo 2: El estado mutacional de p53 se asocia con la sensibilidad química a MDM2i en líneas celulares

Se evaluó la asociación de la mutación de p53 con la sensibilidad química a MDM2i(2) en un panel de líneas celulares relevantes para el cáncer mediante la prueba exacta de Fisher. El panel de líneas celulares es el cubierto por la iniciativa de la *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) (Barretina J., Caponigro G., Stransky N., Venkatesan K. *et al.* La *Cancer Cell Line Encyclopedia* hace posible la modelización predictiva de la sensibilidad a fármacos contra el cáncer. *Nature* 483:603-7, 2012). Se llevó a cabo una caracterización genómica, genética y farmacológica detallada en las líneas celulares CCLE.

El estado de mutación de p53 en las líneas celulares CCLE se obtiene a partir de una fuente de datos de alteraciones genéticas a nivel génico, por ejemplo, mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y alteraciones genéticas complejas, compiladas a partir de los datos COSMIC del centro Sanger y fuentes internas que incluyen la secuenciación con captura de exoma. Esto comprende datos de aproximadamente 1600 genes relacionados con el cáncer a lo largo de las líneas celulares CCLE. El análisis del panel de CCLE reveló 244 líneas celulares que contenían

un p53 mutado y 112 líneas celulares que expresaban p53 de origen natural (números de acceso de p53: ADN - NM\_000546, proteína - NP\_000537).

La sensibilidad química a MDM2i(2) se determinó a partir de la caracterización farmacológica de las líneas celulares CCLE. Las líneas celulares se separaron en dos grupos de acuerdo con su sensibilidad a MDM2i(2). Un grupo contiene las líneas celulares sensibles al compuesto de tipo MDM2i(2), mientras que el otro grupo engloba aquellas que son químicamente insensibles al compuesto de tipo MDM2i(2). Tal estratificación dio como resultado dos grupos de 47 líneas celulares sensibles y 309 insensibles, respectivamente. A partir de tales datos de sensibilidad química *in vitro*, se estimó que la predicción de que una célula fuera sensible a un tratamiento con MDM2i era de un 13%. La evaluación estadística de la asociación de la mutación de p53 con grupos de sensibilidad muestra una asociación entre la mutación de p53 (mt) y la sensibilidad química a MDM2i(2) (Figura 2). El panel mt en la Figura 2 presenta los perfiles de sensibilidad frente a MDM2i(2) para líneas celulares CCLE con p53 mutado, el panel de origen natural (wt) presenta los perfiles de sensibilidad frente a MDM2i(2) para líneas celulares CCLE con p53 de origen natural. Se define Amáx como el nivel de efecto máximo (la inhibición para la concentración de MDM2i(2) más alta evaluada, calibrada respecto a MG132, un inhibidor de proteasoma utilizado como referencia, según se describe en la publicación de CCLE a la que se ha hecho referencia anteriormente) y se define CI50 como la concentración  $\mu\text{M}$  en la que la respuesta a MDM2i(2) alcanzó una inhibición absoluta de -50 respecto al inhibidor de referencia.

El recuento de la línea celular se desglosa en la sensibilidad química a MDM2i(2) y el estado de mutación de p53, y la estadística asociada. Los datos también se presentan como una tabla de contingencia con la estadística asociada.

Estos datos indican que es más probable que una línea celular muestre sensibilidad a MDM2i(2) si su estado de p53 es de origen natural. Es más, se observa que la mayoría de líneas celulares con p53 mutado son insensibles al compuesto, mientras que más de dos tercios de las líneas celulares con p53 de origen natural son sensibles.

A partir de estos datos, se puede concluir que un genotipo de p53 de origen natural es la primera indicación de sensibilidad a MDM2i y, por consiguiente, es el primer biomarcador de estratificación que se debe considerar para seleccionar a pacientes con cáncer que respondan a un MDM2i.

### Ejemplo 3: Predicción de la sensibilidad química de una línea celular a MDM2i a partir de datos genómicos e implicación clínica.

Los dos grupos de sensibilidad de las líneas celulares, determinados por el tratamiento con MDM2i(2), se comparan con el objetivo de identificar los biomarcadores que diferencian las líneas celulares sensibles de las líneas celulares insensibles, antes de cualquier tratamiento con MDM2i. Tales biomarcadores se utilizan para predecir la sensibilidad de cualquier tratamiento con MDM2i. Los biomarcadores analizados son los siguientes tipos: 1) los valores de expresión a nivel génico generados por la tecnología Affymetrix GeneChip™ con la matriz HG-U133 más 2, que se resumen de acuerdo con el método de normalización RMA; 2) los valores del número de copias de cromosomas a nivel génico, obtenidos con la tecnología Affymetrix SNP6.0 (Affymetrix Santa Clara, CA, EE. UU.) y procesados utilizando el software Affymetrix apt y expresados como relaciones transformadas de log2 en una colección de muestras normales de referencia HapMap; 3) las alteraciones o mutaciones genéticas a nivel génico, según se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2; 4) los valores de expresión a nivel de la vía, que resumen los niveles de expresión de la vía mediante una estrategia promedio estandarizada entre los genes que contribuyen a las vías, según se detalla en la base de conocimiento GeneGo Metacore®; 5) el linaje de la línea celular (tejido de origen de la línea celular); 6) el estado supresor del tumor a nivel génico, que resume el estado de activación de una selección de genes supresores de tumores, mediante la integración de la alteración genética, el número de copias y la información sobre la expresión. Tales datos genómicos se generaron en el contexto de la caracterización genética y genómica de las líneas celulares CCLE y cubre un total de aproximadamente 45 000 características genómicas.

Se utilizan pruebas de los rangos con signo de Wilcoxon o pruebas exactas de Fischer para comparar las características genómicas de dos grupos de líneas celulares, dependiendo del tipo de característica. Las características que tienen valores continuos (características de expresión de la vía, número de copias y expresión génica) se someten a una prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, las que tienen valores discretos (características de alteración genética, estado supresor de tumores y linaje), a una prueba exacta de Fischer, para una evaluación del perfil diferencial entre grupos de líneas celulares sensibles e insensibles. Las características significativas, que discriminan el grupo de líneas celulares sensibles del de las insensibles, son las que pasan un corte del valor p controlado por la relación de descubrimientos falsos. Independientemente del límite del valor p, también se requiere un número mínimo o máximo de características por cada tipo de característica. Para minimizar el impacto del alto grado de correlación entre las características en el paso de selección de la característica, los datos de las características se agrupan antes de las pruebas estadísticas como un paso de preprocesamiento. Este paso se lleva a cabo en el nivel de tipo de característica utilizando el método de propagación de la afinidad de Frey y Dueck (*Clustering by Passing Messages Between Data Points*. Frey B. y Dueck D. *Science* 315:972-6, 2007) y se extrae un conjunto de características que representan la mayor variabilidad.

Las clases o grupos de sensibilidad de las líneas celulares se definen como se indica a continuación para esta comparación de dos clases que tiene como objetivo la identificación de biomarcadores: un grupo sensible de 47 líneas celulares sensibles y un grupo insensible de 204 líneas celulares insensibles. Las 204 líneas celulares que constituyen este grupo insensible son las más insensibles del conjunto de 309 líneas celulares insensibles mencionadas en el Ejemplo 2. Este paso de selección de las características proporciona un total de aproximadamente 200 características significativas, que tienen un perfil diferencial significativo para diferenciar el grupo sensible de líneas celulares del insensible y, por lo tanto, tienen las propiedades necesarias para ser consideradas como marcadores para predecir la sensibilidad química de las muestras frente a un MDM2i. Según se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2, un biomarcador relevante es el estado de mutación de p53 en sí. La estadística del paso de selección de las características (valor  $p$   $1.17E-21$ ) confirmó su función a la hora de predecir la sensibilidad a un MDM2i. Además, la relación de probabilidades asociada con el estado de p53 (0.024) indica que la mutación de p53 está más representada en las líneas celulares insensibles a MDM2i. Aún cabe destacar y todavía de acuerdo con la estadística del paso de selección de las características, que se observa que la mayoría de los biomarcadores predictivos son un subconjunto de genes diana de transcripción de p53. Estos se muestran en la Tabla 2/Figura 3. Sus factores de cambio indican que los transcritos de estos biomarcadores están más expresados en la población de líneas celulares sensibles a MDM2i, según se muestra en la Figura 3. Probablemente, esto es indicativo de un nivel de actividad funcional de p53 preexistente antes de cualquier tratamiento en las líneas celulares que son sensibles a un MDM2i.

El hecho de que los biomarcadores de la Tabla 2/Figura 3 reflejan una vía de p53 funcional en células sensibles a MDM2i se verifica en la Figura 4. En la Figura 4, las células han sido tratadas con concentraciones cada vez mayores de MDM2i(1) durante 4 horas antes de la lisis celular. Se prepararon lisados celulares enteros utilizando un tampón de lisis celular que contenía Tris-HCl 50 mM de pH 7.5, NaCl 120 mM, EDTA 1 mM, EGTA 6 mM de pH 8.5, un 1% de NP-40, NaF 20 mM, PMSF 1 mM y Vanadato de Na 0.5 mM, las proteínas se separaron en un gel NuPAGE de Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen # NP0322BOX, Lucerne; Suiza), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Protran® BA 85 (Whatman # 10 401 261: Piscataway, NJ, EE. UU.) a 1.5 mA/cm<sup>2</sup> de membrana durante 2 h utilizando un sistema semiseco de inmunotransferencia y se sometieron a una inmunotransferencia con o bien un anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfo-p53 (Ser<sup>15</sup>) (1/1000; Cell Signaling Technology #9284: Beverly, MA, EE. UU.) o unos anticuerpos monoclonales de ratón anti-p53 (Ab-6) (Pantropic, clon DO-1) (1/1000; Calbiochem # OP43 San Diego, CA, EE. UU.), un anti-MDM2 (Ab-1, clon IF2) (1/1000; Calbiochem # OP46), un anti-p21<sup>WAF1</sup> (Ab-1, clon EA10) (1/500; Calbiochem # OP64: San Diego, CA, EE. UU.) o un anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma # T5168: St. Louis, MO, USA), según se indica. Según se muestra en la Figura 4, el hecho de incrementar las concentraciones de MDM2i(1) induce la estabilización de los niveles de proteína p53, sin un incremento significativo de fosfo-p53 tanto en células C3A como COLO 792. Curiosamente, el tratamiento con MDM2i(1) también induce una expresión *de novo* potente de ambos genes que tienen p53 como diana p21 (CDKN1A) y MDM2 en células sensibles C3A, pero no en la línea de células insensibles COLO-792. En conjunto, estos datos indican que la sensibilidad a un inhibidor MDM2i está directamente relacionada con la presencia de una vía de p53 funcional intrínseca, que los biomarcadores de la Tabla 2/Figura 3, considerados conjuntamente como un grupo o solos, apuntan directamente a la funcionalidad de la vía de p53 antes del tratamiento e indican que estos biomarcadores tienen una gran capacidad para predecir la sensibilidad de un paciente que se correlaciona con el mecanismo de acción de p53.

Las características genómica significativas se utilizan como características base para una modelización probabilística bayesiana ingenua de los dos grupos o clases de sensibilidad química a MDM2i. El objetivo del paso de modelización consiste en obtener un clasificador o esquema de clasificación que prediga la respuesta del paciente (ya sea sensible o insensible) de una muestra desconocida con cierta confianza. El modelo predictivo se define entrenando un algoritmo bayesiano ingenuo a lo largo de toda la población de líneas celulares CCLE caracterizadas químicamente, estratificada en las dos clases de sensibilidad mencionadas anteriormente. El comportamiento del clasificador se evalúa en 5 repeticiones de validaciones cruzadas de factor 5 de los datos utilizados para entrenar el modelo. El comportamiento del modelo se resume con las siguientes mediciones a nivel de la clase: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. La clase sensible se utiliza como referencia para los cálculos de sensibilidad y valor predictivo positivo. El resultado por defecto del algoritmo bayesiano ingenuo es una puntuación o probabilidad, para cada muestra prevista que se ha de asignar a una clase o la otra. Se define un umbral de probabilidad para transformar las puntuaciones de probabilidad en una predicción a nivel de la clase sensible o insensible. El umbral de probabilidad se define como la probabilidad que maximiza la sensibilidad y especificidad calculadas entre todas las muestras previstas. El procedimiento entero y casi idéntico se describe con más detalles en la publicación de CCLE a la cual se ha hecho referencia en el Ejemplo 2.

Para demostrar que se puede conseguir un mejor poder predictivo a partir de al menos un biomarcador que se encuentra en la Tabla 2 y, como alternativa, los biomarcadores de la Tabla 2 como un grupo, que a partir del estado de mutación de p53 por sí solo, o a partir de todo el conjunto de características predictivas de aproximadamente 200 genes, los modelos bayesianos ingenuos de cada uno de estos grupos de características se entrenaron y se evaluó su comportamiento mediante validación cruzada, según se ha mencionado anteriormente, y se compararon (Figura 5). La Figura 5 demuestra que los biomarcadores seleccionados que se encuentran en la Tabla 2 funcionan mejor que el estado de mutación de p53 y el grupo más grande de aproximadamente 200 características significativas, y proporcionan una mejora sustancial a la hora de predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un MDM2i. Esto es particularmente notable cuando los comportamientos se evalúan mediante el valor predictivo positivo (PPV).

Un valor predictivo positivo (PPV) de un 76% sugiere que un 76% de las líneas celulares sensibles previstas serán sensibles a un tratamiento con MDM2i. A modo de extrapolación a un entorno clínico, un PPV de un 76% también sugiere que un 76% de pacientes con cáncer, que se ha previsto que sean sensibles a MDM2i(2) a partir de biopsias de los tumores, mostrarían una respuesta clínica tras el tratamiento con MDM2i(2). Este enriquecimiento de la respuesta clínica mediante la estratificación de los pacientes, utilizando los biomarcadores de la Tabla 2 y en asociación con el modelo predictivo bayesiano ingenuo, se comparó con la tasa de respuesta clínica de referencia sin estratificación previa de los pacientes. La tasa de respuesta clínica de referencia estimada a partir de los datos de sensibilidad química es de un 19%. Por lo tanto, desde un punto de vista clínico, los biomarcadores de la Tabla 2 presentan un claro incremento de la respuesta clínica en la población prevista de pacientes sensibles. Este incremento en la predicción es mayor y más específico que la evaluación del estado de p53 por sí sola o todas las aproximadamente 200 características genómicas inicialmente seleccionadas. Esto se puede observar en la Figura 5, donde la barra de la característica «todos los 200 biomarcadores» es el PPV de las aproximadamente 200 características genómicas inicialmente seleccionadas. El PPV indicado para la característica «todos los 200 biomarcadores» es de un 59%. El PPV para el uso de p53 por sí solo es de un 56% (Figura 5). El PPV del grupo de biomarcadores descritos en la Tabla 2 es de un 76% («biomarcadores seleccionados de la Tabla 2»). Esto es un resultado sorprendente, ya que en general el grupo de datos más grande de 200 características genómicas proporcionaría más puntos de datos y más información sobre la predicción de la sensibilidad a MDM2i. Sin embargo, este no es el caso, ya que los biomarcadores de la Tabla 2, cuando se consideran como un grupo, proporcionan un incremento de un 17% en el valor predictivo. Esto resulta importante en los centros de salud, ya que ahora se prediría que 17 pacientes adicionales de entre 100 recibirían el tratamiento correcto.

Con el fin de evaluar el valor predictivo de los biomarcadores de la Tabla 2, se evaluaron 52 líneas celulares que no se habían examinado previamente en la caracterización farmacológica como parte del proyecto de CCLE, para determinar su sensibilidad a MDM2i en ensayos de proliferación. En resumen, se colocan células en placas de 96 pocillos durante toda la noche a 37 °C y se tratan con concentraciones cada vez mayores de MDM2i durante 72 horas. A continuación, se determina la concentración celular en cada pocillo utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Cat. de Promega # G7571 /2/3: Madison WI, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del proveedor, y la señal luminiscente se mide utilizando un lector de placas SYNERGY HT (BioTek: Winooski, VT, EE. UU.). Los valores de  $CI_{50}$  se calculan mediante un ajuste de la curva utilizando XLfit® (Figura 6). La sensibilidad de las líneas celulares a un MDM2i se determina comparando el valor de  $CI_{50}$  observado de todas las células que se evaluaron en el ensayo de inhibición de proliferación celular según se ha descrito en el Ejemplo 1. Se determinó que el corte para la sensibilidad era un valor de  $CI_{50} \leq 3 \mu M$  tanto para MDM2i(1) como para MDM2i(2). Las predicciones de sensibilidad para cada una de las líneas celulares se realizaron utilizando el modelo predictivo según se ha descrito anteriormente, para confirmar los valores descritos en la Figura 5. Las líneas celulares proceden de varios tumores. Por ejemplo, melanoma (COLO-829, COLO-849, IGR-1, MEL-JUSO, SK-MEL-1, SK-MEL-31, UACC-62, UACC-257), leucemia (BV173, EOL-1, GDM-1, HuNS1, L-540, MV-4-11, OCI-LY3, RS4:11, SUP-B15, HDLM2, JM1), cáncer de mama (CAL51, EFM-192, HCC202), cáncer pancreático (DAN-G), cáncer hepático (JHH-5) y cáncer de pulmón (RERF-LCK-KJ). Este ensayo se realizó con todos los biomarcadores descritos en la Tabla 2 como un único grupo. En general, se predijo que 36/52 líneas celulares eran sensibles a un MDM2i, y de estas 36 líneas celulares 24 eran sensibles, lo que da como resultado un valor predictivo positivo de un 66%, nuevamente un incremento significativo en el valor predictivo (PPV) en comparación con la evaluación de p53 por sí sola. Respecto al cribado de las células que no responden, se predijo que 16/52 líneas celulares eran insensibles a un inhibidor de p53-MDM2 y se determinó que 13/16 eran en efecto insensibles, lo cual conduce a un valor predictivo negativo (NPV) significativo de un 81%. En general, estos datos son similares a los comportamientos del modelo predictivo que se describen en la Figura 5. La evaluación *in vitro* real de líneas celulares no relacionadas permitió la evaluación del modelo predictivo de la sensibilidad química a MDM2i, con lo que se validaron de este modo los biomarcadores descritos en la Tabla 2.

Ejemplo 4: El tratamiento con MDM2i inhibe la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*, lo cual se correlaciona con un incremento dependiente de la dosis de los niveles de proteína y ARNm de p21 (CDKN1A) en los tumores.

Para validar adicionalmente los biomarcadores predictivos descritos en la Figura 3, se inyectaron directamente *in vivo* modelos de xenoinjertos humanos o bien de muestras primarias humanas o de líneas celulares y se cultivaron en tumores subcutáneamente en ratones y a continuación se evaluaron para determinar su sensibilidad a MDM2i. Se permitió que todos los animales se adaptaran durante 4 días y se alojaron en un entorno con patógenos controlados (5 ratones/jaula de tipo III) con acceso a comida y agua *ad libitum*. Los animales se identificaron con transpondedores. Los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos cubiertos por el número de permiso 1975 emitido por Kantonales Veterinäramt Basel-Stadt y adheriéndose estrictamente a Eidgenössisches Tierschutzgesetz y Eidgenössische Tierschutzverordnung. Se indujeron tumores subcutáneos concentrando  $3.0 \times 10^6$  células de osteosarcoma SJS-1 en 100  $\mu L$  de PBS (sin  $Ca^{2+}$  ni  $Mg^{2+}$ ) e inyectándolas en el costado derecho de ratones atímicos de Harlan. La administración de MDM2i se inició 12-14 días después de la inyección de las células. El MDM2i se preparó inmediatamente antes de cada administración. Los compuestos de tipo MDM2i se disolvieron en un 0.5% de HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y se inyectaron diariamente (q24h) con una dosis de 25, 50 o 100 mg/kg. Se midieron los volúmenes de los tumores (TVol), determinados a partir de mediciones con un calibre (utilizando la fórmula  $l \times w \times h \times \pi / 6$ ), tres veces por semana. La respuesta del tumor se cuantificó según el cambio en el volumen del

tumor (punto final menos valor de partida en mm<sup>3</sup>) como T/C, es decir,  $\left( \frac{\Delta \text{TVol}_{\text{fármaco}}}{\Delta \text{TVol}_{\text{vehículo}}} \times 100 \right)$ . En el caso de una regresión del tumor, la respuesta del tumor se cuantificó según el porcentaje de regresión del TVol de partida, es decir,

$$\left( \frac{\Delta \text{TVol}_{\text{fármaco}}}{\text{TVol}_{\text{Día 0}}} \times 100 \right)$$

El peso corporal (BW) de los ratones se midió tres veces por semana, lo que permitió el cálculo en cualquier punto temporal particular respecto al día de inicio del tratamiento (día 0) de ambos el cambio porcentual en BW ( $\Delta\%BW$ ). Según se muestra en la Figura 7A, un tratamiento de 10 días de tumores xenoinjertados SJSA-1 con MDM2i(1) condujo a una inhibición del crecimiento tumoral dependiente de la dosis con un T/C significativo de un 50% para una dosis de 25 mg/kg q24h y de un 3% (estasis) para una dosis de 50 mg/kg q24h. Para una dosis de 100 mg/kg q24h durante 10 días, el tratamiento con MDM2i(1) indujo una regresión significativa del tumor de un 65% (Figura 7B). Todas las dosis fueron bien toleradas con un programa q24h, según indican las curvas de peso corporal medio en función del tiempo.

La actividad antitumoral de MDM2i(1) se correlacionó con una inducción dependiente de la dosis significativa de los niveles de ARNm de p21 (CDKN1A) en los tumores (Figura 7C). En resumen, se purificó el ARN total a partir de pellets celulares utilizando QIAshredder® (79654, Qiagen:Valencia CA, EE. UU.) y RNeasy Mini Kit® (74106, Qiagen: Valencia CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del proveedor, con la excepción de que no se llevó a cabo la digestión del ADN. El ARN total se eluyó con 50  $\mu\text{L}$  de agua exenta de RNasa. El ARN total se cuantificó utilizando el espectrofotómetro ND-1000 Nanodrop® (Wilmington DE, EE. UU.). La qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa) se preparó por triplicado para cada muestra utilizando la mezcla maestra plus para RT qPCR (RT-QPRT-032X, Eurogentec: Seraing, Bélgica), con o bien cebadores de control y cebadores para p21 humano (CDKN1A) (Hs00355782\_m1, Applied Biosystems: Carlsbad CA, EE. UU.) o p21 de ratón (CDKN1A) (Mm00432448\_m1, Applied Biosystems: Carlsbad CA, EE. UU.), a saber ensayos con el kit de expresión génica TaqMan (20x colorante de sonda FAM™ (o VIC)-TAMRA (o MGB); Applied Biosystems: Carlsbad CA, EE. UU.). Más concretamente, se preparó una mezcla maestra en hielo para obtener una concentración final de: 1x tampón de mezcla maestra, 1x solución de cebador y 1x transcriptasa inversa Euroscript, en combinación con H<sub>2</sub>O, volumen total: 8  $\mu\text{L}$ /pocillo. Una placa de reacción óptica de 384 pocillos MicroAmp (4309849, Applied Biosystems) se fijó sobre la mesa de laboratorio y se pipetearon 2  $\mu\text{L}$  de ARNm (concentración: 10 o 20 ng/ $\mu\text{L}$ ) (o agua para el control negativo) por triplicado, a continuación se añadieron 8  $\mu\text{L}$ /pocillo de mezcla maestra. Posteriormente, la placa se cubrió con un kit de película adhesiva óptica MicroAmp (4313663, Applied Biosystems: Carlsbad CA, EE. UU.), se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm a 4 °C y se colocó en un sistema rápido de PCR a tiempo real 7900 HT (Applied Biosystems: Carlsbad CA, EE. UU.). El programa se ejecutó con un ciclo de 48 °C durante 30 min, un ciclo de 95 °C durante 10 min y finalmente 40 ciclos de alternación de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Se determinó el número de ciclos (CT), se calcularon los valores de 2<sup>-CT</sup> y el valor se normalizó dividiéndolo por el valor de 2<sup>-CT</sup> obtenido a partir del control de GAPDH. Se calculó el factor de incremento en comparación con el control (es decir, animales tratados con DMSO o vehículo) y se representó en una gráfica de barras.

Además, la actividad antitumoral de MDM2i(1) se correlacionó con una inducción dependiente de la dosis significativa de los niveles de proteína p21 (CDKN1A) en los tumores, a juzgar por la inmunohistoquímica (Figura 8). Se recolectaron tumores de xenoinjertos SJSA-1 y se extrajo una porción de 3-4 mm del medio del tumor, se transfirió a histocasetes preetiquetados y se fijó por inmersión en formalina tamponada neutra (NBF) al 10% (v/v) (pH 6.8-7.2) (J.T. Baker, Winter Garden, FL, EE. UU.), enfriada previamente a 4 °C. A continuación, los tumores se fijaron a temperatura ambiente durante 24 horas y a después se procesaron en un TPC 15Duo (centro procesador de tejidos, Medite) para su parafinización. Posteriormente, las porciones de los tumores se embebieron en parafina y, de cada bloque de parafina, se cortaron varias secciones de 3  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo rotatorio (Mikrom International AG, Suiza), se esparcieron en un baño de agua a 48 °C, se montaron sobre portaobjetos de vidrio (SuperFrost Plus, Thermo Scientific:Waltham MA, EE. UU.) y se secaron en un horno o bien a 37 °C durante toda la noche o a 60 °C durante 30 min. Las secciones de tejido seco se procesaron para tinción inmunohistoquímica (IHC). La inmunohistoquímica de p21 (CDKN1A) se ha llevado a cabo utilizando el clon de anticuerpo monoclonal de ratón SX118 de Dako (N.º de cat. M7202 Dako: Carpintería CA, EE. UU.) con una dilución de 1:50. La inmunohistoquímica se ha llevado a cabo en un instrumento de inmunotinción automatizado Ventana Discovery XT utilizando el kit N-Histofine Mousestain (Nichirei Bioscience Inc, Japón) combinado con el sistema cromógeno del kit DABMap, omitiendo la solución de SA-HRP (Ventana/Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La recuperación del antígeno se llevó a cabo utilizando el acondicionamiento celular ULTRA® (Ventana/Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en condiciones suaves (95 °C durante 8 min + 100 °C durante 20 min). Las reactividades cruzadas en ratón se bloquearon utilizando los reactivos bloqueadores A y B del kit N-Histofine Mousestain® (Nichirei Bioscience Inc, Japón) antes y después de la incubación del anticuerpo primario, siguiendo las instrucciones del proveedor. El anticuerpo primario se aplicó manualmente con la dilución deseada en diluyente de anticuerpo Dako (AbD) y a continuación se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los controles negativos correspondientes se incubaron con AbD únicamente. Las secciones se tiñeron posteriormente utilizando el sistema polimérico marcado Simple Stain Mouse

MAX PO (M) del kit N-Histofine Mousestain® (Nichirei) y el sustrato DAB del kit DABMap (Ventana/Roche Diagnostics). La contratinción de las secciones se realizó utilizando hematoxilina (Ventana/Roche Diagnostics). Después del experimento de tinción automatizado, los portaobjetos se deshidrataron en una serie graduada de etanol, se clarificaron en xileno y se montaron en un medio de montaje Pertex®.

5 Ejemplo 5: Predicción de la sensibilidad a MDM2i(2) en modelos de xenoinjerto en ratón de tumores primarios humanos y en tumores primarios humanos.

10 Los biomarcadores de la Tabla 2 se utilizaron asociados con un modelo predictivo bayesiano ingenuo para predecir la sensibilidad a MDM2i en una colección de muestras de tumores primarios humanos y modelos de xenoinjerto, para demostrar si los biomarcadores y su poder predictivo asociado existen fuera de los sistemas de líneas celulares *in vitro*.

15 Los valores de expresión a nivel génico de todos los biomarcadores de la Tabla 2 se utilizaron como la base característica para la modelización probabilística bayesiana ingenua. Estos se generaron como se ha descrito en el Ejemplo 3, siendo la única diferencia el paso de integración RMA, donde la normalización se dirigió a un grupo de referencia de muestras normales y tumorales. La modelización bayesiana ingenua se lleva a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 3.

20 Las muestras de tumores primarios humanos y los modelos de xenoinjerto que se sometieron a la predicción de sensibilidad eran una colección de aproximadamente 18 000 y 503 muestras, respectivamente, de las cuales están disponibles los perfiles de expresión génica, generados con la tecnología Affymetrix (genoma humano U133 más la matriz 2.0). Las muestras de la colección se anotaron internamente con un vocabulario controlado para la ontología de la muestra, que incluía la patología, histología y sitio primario. Los datos del chip génico asociado se recopilaron a partir de fuentes tanto internas como públicas, y se normalizaron según se ha descrito anteriormente respecto al mismo conjunto de muestras de referencia para mantener la coherencia.

25 Las relaciones de muestras sensibles a MDM2i previstas de la colección se compararon con las predicciones de las líneas celulares sensibles, proporcionadas por los datos de sensibilidad química a MDM2i(2) que se han descrito en el Ejemplo 3 anteriormente. Cabe esperar que una buena correlación demuestre la capacidad de los biomarcadores descritos en la Figura 3 para predecir la sensibilidad a MDM2i en muestras de tumores primarios humanos. Con fines clarificativos, así como también para identificar potencialmente linajes en los que las proporciones de líneas celulares sensibles estén infraestimadas en los datos de sensibilidad química de las líneas celulares, la comparación de la relación de predicción sensible respecto a la relación de líneas celulares sensibles se desglosa según el tejido de origen.

30 La Figura 9 (panel de la izquierda) muestra una correlación entre las muestras previstas de tumores primarios humanos sensibles de la colección y las líneas celulares sensibles de los datos de sensibilidad química a MDM2i. Esta indica que los biomarcadores descritos en la Tabla 2 y su uso para predecir la sensibilidad fuera de las muestras de líneas celulares *in vitro* son válidos. También indica que los biomarcadores descritos en la Tabla 2 se pueden utilizar para predecir la sensibilidad química a MDM2i en muestras de tumores primarios humanos. Revela nuevas indicaciones de los tumores que no han sido investigadas previamente y confirma los resultados observados en el presente estudio. Las nuevas indicaciones, por ejemplo, hígado (carcinoma hepatocelular) y riñón (carcinoma de células renales), representan potencialmente nuevas indicaciones patológicas que se ha de evaluar clínica y preclínicamente con los biomarcadores descritos en la Tabla 2 para el tratamiento con un MDM2i. La Figura 9A también indica que los biomarcadores descritos en la Tabla 2 se pueden utilizar para predecir la sensibilidad química a MDM2i en tumores de melanomas primarios, lo cual es coherente con los resultados observados en el presente estudio.

35 La Figura 9 (panel de la derecha) muestra una correlación entre las fracciones de muestras previstas de tumores primarios humanos sensibles y las relaciones sensibles previstas en la colección de xenoinjertos de tumores primarios. Las muestras de tumores/xenoinjertos/líneas celulares se organizan según su linaje. La línea de puntos en ambos paneles es la línea de identidad. Muestra que los datos generados a partir de los modelos de xenoinjerto en ratón *in vivo*, en los que la firma ilustrativa y el clasificador predictivo asociado se pueden estudiar y validar, son acordes con los datos procedentes del resto de las muestras de la colección *in vivo*. Confirma que los modelos de xenoinjerto en ratón constituyen una fuente de material para validar la estrategia de clasificadores basada en genes diana posteriores a p53 a la hora de predecir el resultado clínico de pacientes con cáncer e indicaciones patológicas, en un entorno preclínico *in vivo*.

40 Ejemplo 6: Biomarcadores individuales y cualesquiera combinaciones de los trece biomarcadores identificados predicen la sensibilidad química a MDM2i.

45 Los trece biomarcadores representados en la Tabla 2, cuando se utilizan asociados con un marco de modelo predictivo bayesiano ingenuo, predicen la sensibilidad a MDM2i tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*, según se ilustra en los Ejemplos 3 y 5. Para investigar si los subgrupos de estos trece biomarcadores también predirían la sensibilidad a MDM2i, se emplean biomarcadores individuales y múltiples combinaciones de ellos como base característica para

el modelo predictivo. Sus comportamientos de predicción se comparan a continuación con los conseguidos o bien con los trece biomarcadores o con un estado de mutación de p53 cuando se utiliza como característica predictiva para la predicción de la sensibilidad a MDM2i.

5 En el Ejemplo 6 se consideran dos casos de estado de mutación de p53. Estos casos se definen en los datos de secuenciación con captura de exoma de las líneas celulares CCLE, según se ha mencionado en el Ejemplo 2, y se pretende que sean sustitutos de los entornos clínicos en los que el gen p53 se secuencia para la estratificación o anotación clínica de los pacientes.

10 El primer caso de estado de mutación de p53 se define a partir de las mutaciones que abarcan los exones 5-8 de p53. Los exones 5-8 engloban el dominio de unión del ADN de p53, que contiene la mayoría de mutaciones de p53 descritas, y son los exones de p53 que constituyen habitualmente la diana para la secuenciación en entornos clínicos (por ejemplo, *Rapid sequencing of the p53 gene with a new automated DNA sequencer*. Bharaj B., Angelopoulou K. y Diamandis E., *Clinical Chemistry* 44:7 1397-1403, 1998). El segundo caso considera el marco de lectura abierto completo del transcrito de p53 principal y se define, por consiguiente, a partir de todas las mutaciones de exones codificantes.

20 Se pueden generar múltiples combinaciones de biomarcadores a partir de la lista de 13 biomarcadores que se describe en la Tabla 2. Todos los tipos de combinaciones desde 2 hasta 12 biomarcadores se evalúan como base característica para el modelo predictivo de sensibilidad química a MDM2i. Cuando existen más de 50 combinaciones diferentes para un tipo de combinación dado, el número de combinaciones evaluadas se restringe a 50. Se eligieron de forma aleatoria las 50 combinaciones de cada tipo de combinación.

25 Todos los modelos predictivos asociados con los grupos de características que se han descrito anteriormente (biomarcadores individuales, combinaciones de 2 a 12 biomarcadores, casos de estado de mutación de p53) se entrenaron y evaluaron mayormente como se ha descrito en el Ejemplo 3. Lo que difiere del Ejemplo 3 es lo siguiente: Los datos de entrenamiento fueron ligeramente mayores que los utilizados en el Ejemplo 3 y englobaron 264 líneas celulares (47 de la clase sensible y 217 de la clase insensible); se utilizó un umbral del valor p de 0.5 en el modelo probabilístico bayesiano ingenuo para denominar a una línea celular como sensible o insensible en el esquema de validación cruzada de factor 5. Además, todos los estratos de las muestras generados por los procesos de validación cruzada se seleccionaron de forma aleatoria e independiente los unos de los otros. Los comportamientos de los modelos predictivos combinatorios y sus comparaciones con el caso de estado de mutación de p53 y los modelos de 13 biomarcadores se muestran en las Figuras 10-12.

35 La Figura 10 representa los valores predictivos positivos (PPV) conseguidos con los modelos de biomarcador individual, el combinatorio, el de 13 biomarcadores y el de mutación de p53. El PPV es una estimación de la eficacia clínica que cabría esperar en un ensayo clínico al seleccionar el paciente con el proceso de modelización considerado. A efectos de conveniencia, los datos se representan como gráficas de caja y bigote cuando hay más de cinco puntos de datos para representar por cada grupo de características.

40 La Figura 10 muestra que las combinaciones de tan solo dos y tres biomarcadores funcionan mejor que las características de mutación de los exones 5 a 8 de p53 («ex5to8mt») y mutación de todos los exones de p53 («allExMt»), respectivamente. Es más, los límites superior e inferior definidos por los extremos de los bigotes engloban aproximadamente un 99% de los puntos de datos, con lo que se asume una distribución normal de los datos. Por consiguiente, la mayoría de las combinaciones de 2 y 3 biomarcadores evaluadas muestran un PPV más elevado que los conseguidos con los casos de estado de mutación de p53. Además, incluso si todos los modelos de genes individuales no funcionan mejor que los dos casos de mutaciones de p53, la mayoría de ellos (aproximadamente un 75%, la caja más el bigote superior) funcionan mejor que en las mutaciones de todos los exones de p53. Cabe destacar que todos los modelos de genes individuales proporcionan un incremento de los PPV, que son superiores a la relación de líneas celulares sensibles (~18%) en la población de muestras considerada, lo cual indica que los modelos de predicción de sensibilidad a MDM2i contruidos a partir de incluso solo un biomarcador son capaces de enriquecer las muestras seleccionadas en las sensibles.

55 Adicionalmente, en este ejercicio de modelización, según se representa en la Figura 10, el PPV obtenido por el modelo de estado de mutación de los exones 5 a 8 de p53, promediado para las 5 repeticiones de validación cruzada, es de un 48%. Este es significativamente inferior al PPV de mutación de p53 descrito en el Ejemplo 3 (56%). Esto indica que, en un entorno clínico en el que se emplee la secuenciación de los exones 5 a 8 de p53 para la selección de los pacientes, lo cual es una práctica común, la selección de pacientes basada en 13 biomarcadores ilustrada presenta incluso un valor añadido mayor que el anticipado a partir del Ejemplo 3.

60 La Figura 11 muestra las especificidades conseguidas con los diferentes modelos evaluados. Según el PPV de la Figura 10, cada combinación realizada a partir de incluso tan solo 2 biomarcadores es suficiente para conseguir una especificidad mayor a las obtenidas únicamente a partir de los casos de mutaciones. Todos los modelos de biomarcadores individuales funcionan mejor que las mutaciones, cuando se utiliza la especificidad para monitorizar los comportamientos de los modelos.

65

La Figura 12 muestra las sensibilidades. La sensibilidad también se denomina *recall* y es una estimación de la población de pacientes realmente sensible retenida en una selección de pacientes.

5 Las combinaciones de 9 biomarcadores como base característica para los modelos de predicción de sensibilidad a MDM2i son suficientes para obtener sensibilidades comparables a la conseguida con la lista de todos los 13 biomarcadores. Sin embargo, tan solo unas pocas combinaciones de 9 biomarcadores conseguirían sensibilidades más elevadas que en las obtenidas con los 2 modelos predictivos del estado de mutación de p53. Pero cabe destacar que todas las combinaciones evaluadas, desde incluso tan solo 2 biomarcadores y una mayoría de modelos de  
10 biomarcadores individuales, presentan sensibilidades más elevadas que la que cabría esperar al azar en una clasificación aleatoria (~18%).

A partir de las Figuras 10, 11 y 12, se concluye que los biomarcadores individuales, cuando se utilizan como base característica en modelos para predecir la sensibilidad química a MDM2i, son suficientes para conseguir predicciones de sensibilidad de las muestras que darían como resultado un enriquecimiento significativo de pacientes que responden potencialmente a MDM2i en un entorno clínico. Además, las combinaciones realizadas a partir de 2 biomarcadores cualquiera, o más, incrementan la eficacia clínica esperada respecto a la obtenida con la selección de pacientes basada en la mutación de p53. El hecho de combinar 8 biomarcadores, entre cualquiera de los biomarcadores enumerados en la Tabla 2, es suficiente para conseguir una sensibilidad de los pacientes equivalente a la obtenida con el modelo de 13 biomarcadores. Los parámetros del comportamiento del modelo predictivo, obtenidos para la firma de 13 genes y combinaciones asociadas, se pueden optimizar adicionalmente optimizando el umbral del valor p de la asignación de la clase que se utiliza en el paso probabilístico bayesiano ingenuo del modelo, tal y como se realizó en el Ejemplo 3.

25 En una realización adicional, se investiga si los biomarcadores representados en la Tabla 2 podrían predecir la sensibilidad química a MDM2i en colaboración con el estado de mutación de p53. Se combinan biomarcadores individuales y combinaciones de 2 biomarcadores y más con el estado de mutación de p53 en listas de características. A continuación, las listas de características se utilizan como base para el modelo predictivo de la sensibilidad, como previamente y según se ha descrito anteriormente. Los comportamientos de los múltiples modelos resultantes se evalúan como se ha descrito anteriormente.

El caso de estado de mutación de p53 que se utiliza como ejemplo es el de las mutaciones de los exones 5 a 8 de p53. Las Figuras 13, 14 y 15 representan los PPV, especificidades y sensibilidades de los modelos que combinan la mutación de p53 con los biomarcadores, respectivamente, y se comparan con los resultados obtenidos con modelos de mutación únicamente y el modelo de los 13 biomarcadores.

La Figura 13 muestra que al menos un biomarcador individual de la lista de 13, en colaboración con el estado de mutación de p53, es suficiente para conseguir un PPV más elevado que la relación de sensibilidad basal (18%) en los datos. También muestra que un biomarcador individual como mínimo, aún combinado con el estado de mutación de p53, consigue un PPV más elevado que los obtenidos con los dos casos de estado de mutación de P53 mencionados anteriormente, cuando se emplea como las características en un modelo predictivo. Y finalmente, 5 biomarcadores cualquiera combinados con la mutación de p53 repiten el PPV que se consigue con el modelo de 13 biomarcadores.

Se obtienen las mismas conclusiones a partir de las Figuras 14 y 15 cuando se tienen en cuenta las especificidades y sensibilidades como parámetros del comportamiento del modelo. A partir de la Figura 15, cabe destacar que se puede obtener una sensibilidad elevada a partir de incluso tan solo un biomarcador, cuando se utiliza en el modelo junto con la mutación de p53.

Como conclusión, el hecho de combinar un biomarcador individual o múltiples biomarcadores de la Tabla 2 con el estado de mutación p53 hace posible la predicción de la sensibilidad a MDM2i y daría como resultado, cuando se aplica para la selección de pacientes en un entorno terapéutico o clínico, un enriquecimiento significativo con una pérdida limitada de pacientes potenciales que responden a MDM2i.

Ejemplo 7: Los trece biomarcadores identificados predicen la sensibilidad química a MDM2i *in vivo* y en modelos de xenoinjertos primarios humanos con p53 de origen natural preseleccionados.

Para validar adicionalmente los biomarcadores predictivos descritos en la Figura 3, se trasplantaron directamente tumores primarios humanos y se cultivaron subcutáneamente en ratones y a continuación se evaluaron para determinar su sensibilidad a MDM2i. Se permitió que todos los animales se adaptaran durante 4 días y se alojaron en un entorno con patógenos controlados (5 ratones/jaula de tipo III) con acceso a comida y agua *ad libitum*. Los animales se identificaron con transpondedores. Los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos cubiertos por el número de permiso 1975 emitido por Kantonaales Veterinäramt Basel-Stadt y adhiriéndose estrictamente a Eidgenössisches Tierschutzgesetz y Eidgenössische Tierschutzverordnung. Se indujeron tumores subcutáneos trasplantando fragmentos tumorales (3x3x3 mm<sup>3</sup>) de tumores de pacientes humanos en el costado derecho de ratones atímicos de Harlan. La administración de MDM2i(1) se inició cuando los tumores tenían un tamaño de 150-200 mm<sup>3</sup>

durante un periodo de tratamiento de hasta 4 semanas. El MDM2i(1) se preparó fresco para cada administración. El MDM2i(1) se disolvió en un 0.5% de HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y se inyectó diariamente (q24h) con una dosis de 100 mg/kg. Se midieron los volúmenes de los tumores (TVol), determinados a partir de mediciones con un calibre (utilizando la fórmula  $l \times w \times h \times \pi / 6$ ), tres veces por semana. La respuesta del tumor se cuantificó según el porcentaje

5 de cambio en el volumen del tumor, es decir, 
$$\left( \frac{\Delta TVol_{\text{fármaco}}}{TVol_{\text{Día 0}}} \times 100 \right)$$
. El peso corporal (BW) de los ratones se midió tres veces por semana, lo que permitió el cálculo en cualquier punto temporal particular respecto al día de inicio del tratamiento (día 0) de ambos el cambio porcentual en BW ( $\Delta\%BW$ ).

10 Los cortes utilizados para la sensibilidad a MDM2i se basaron en los RECIST adaptados para una medición del volumen del tumor total (en lugar de la suma de los diámetros más largos), es decir, los modelos que se considera que son sensibles o que responden o bien presentaron una respuesta completa (regresión total) o una respuesta parcial (reducción > 50% en el volumen del tumor) o una enfermedad estable (entre un 50% de reducción de un 35% de incremento en el volumen del tumor). Se consideró que los modelos *in vivo* que mostraban una enfermedad progresiva (incremento > 35% en el volumen del tumor) no respondían al tratamiento con MDM2i. La calificación de sensibilidad se realizó en el punto temporal de efecto máximo durante el periodo de tratamiento, para evitar cualquier calificación errónea que podría ser debida, por ejemplo, a la aparición de un mecanismo o mecanismos de resistencia tras un periodo de tratamiento sostenido con MDM2i. Los modelos de tumores de xenoinjertos primarios humanos utilizados para el estudio son de varios tumores y la composición del linaje se seleccionó de acuerdo con la Figura 9, por ejemplo, melanoma (19), cáncer colorrectal (17), liposarcoma (3), carcinoma de células renales (3), cáncer hepático (7), cáncer de mama (1), cáncer pancreático (2) y cáncer de pulmón (3). Las predicciones de sensibilidad para cada modelo de tumor de xenoinjerto primario humano se realizaron utilizando todos los biomarcadores descritos en la Tabla 2 como un grupo individual y un modelo predictivo principalmente como se ha ilustrado en los Ejemplos 3 y 5. En este ejemplo particular, la regla probabilística bayesiana ingenua se entrenó comparando 77 líneas celulares sensibles a MDM2i(2) con 557 líneas celulares insensibles, y el umbral de probabilidad del modelo predictivo bayesiano ingenuo, por encima del cual se predice que un modelo de tumor de xenoinjerto es sensible a la inhibición con MDM2, se fijó como 0.2. Además, la asignación de la sensibilidad química de las líneas celulares entrenadas en clases sensibles e insensibles se realizó según se ha ilustrado en el Ejemplo 2, siendo la única diferencia que, cuando la caracterización farmacológica se replicó para una línea celular dada, el valor mediano del parámetro de la sensibilidad de la línea celular se utilizó para la integración de las sensibilidades replicadas.

30 Según se muestra en la Figura 16, se predijo que 27/55 modelos de tumores de xenoinjertos primarios humanos eran sensibles a un MDM2i y, de estos 27 modelos *in vivo*, se confirmó experimentalmente que 19 eran sensibles, lo que da como resultado un valor predictivo positivo de un 70.5%, que mejora la relación de respuesta basal de un 49%. Además, se predijo que 28/55 modelos *in vivo* eran insensibles a un MDM2i y se confirmó experimentalmente que 20/28 eran insensibles, lo que conduce a un valor predictivo negativo (NPV) significativo de un 71.5%. En general, estos datos son comparables a los comportamientos del modelo predictivo que se describen en la Figura 5. La evaluación de la respuesta del modelo de tumor de xenoinjerto primario humano al tratamiento con MDM2i hizo posible la validación del modelo predictivo de sensibilidad química a MDM2i *in vivo*, con lo que se confirma de este modo la validez de los biomarcadores descritos en la Tabla 2, utilizando tumores de xenoinjertos derivados de pacientes en ratones (Figura 16).

45 La calificación de la mutación de p53 está disponible para los 55 modelos de tumores de xenoinjertos primarios humanos utilizados en este estudio. Treinta y cuatro de ellos son p53 de origen natural. Según se muestra en la Figura 17, se predijo que 22/34 modelos de tumores de xenoinjertos primarios humanos con p53 de origen natural eran sensibles a un MDM2i y, de estos 22 modelos *in vivo*, se confirmó experimentalmente que 18 eran sensibles, lo que da como resultado un valor predictivo positivo de un 82%, que mejora de nuevo significativamente la relación de respuesta basal de un 65%. Se predijo que doce de entre los 34 modelos eran insensibles a un MDM2i y se confirmó experimentalmente que 8/12 eran insensibles, lo que conduce a un valor predictivo negativo (NPV) significativo de un 66.5%. En global, estos datos son igualmente comparables a los comportamientos del modelo predictivo que se describen en la Figura 5, lo que valida de nuevo los biomarcadores descritos en la Tabla 2, utilizando tumores xenoinjertados derivados de pacientes seleccionados con p53 de origen natural en ratones (Figura 17).

50 Como conclusión, se confirmaron los comportamientos del modelo predictivo *in vitro* que se describen en la Figura 5 utilizando modelos de tumores de xenoinjertos primarios humanos, con lo que se validaron adicionalmente los biomarcadores descritos en la Tabla 2 en un entorno *in vivo*. Cabe destacar que los descubrimientos descritos en la presente están a favor del uso del modelo predictivo de la sensibilidad química a MDM2i en o bien poblaciones de pacientes con cáncer no seleccionadas o poblaciones de pacientes con cáncer preseleccionadas con p53 de origen natural.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para predecir la sensibilidad de un paciente con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de doble minuto humano 2 (MDM2i), comprendiendo el método:

5 evaluar la expresión génica de más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2,

Tabla 2:

| <b>Nombre del gen</b> | <b>Número de acceso</b> |
|-----------------------|-------------------------|
| MDM2                  | NM_002392 / NP_002383   |
| CDKN1A                | NM_000389 / NP_000380   |
| ZMAT3                 | NM_022470 / NP_071915   |
| DDB2                  | NM_000107 / NP_000098   |
| FDXR                  | NM_004110 / NP_004101   |
| RPS27L                | NM_015920 / NP_057004   |
| BAX                   | NM_004324 / NP_004315   |
| RRM2B                 | NM_015713 / NP_056528   |
| SESN1                 | NM_014454 / NP_055269   |
| CCNG1                 | NM_004060 / NP_004051   |
| XPC                   | NM_004628 / NP_004619   |
| TNFRSF10B             | NM_003842 / NP_003833   |
| AEN                   | NM_022767 / NP_073604   |

10 en una muestra de cáncer obtenida del paciente, donde un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 es Mdm2; y la expresión génica de más de un biomarcador indica que el paciente es sensible al tratamiento con un MDM2i.

15 2. El método de la reivindicación 1, donde al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce o los trece biomarcadores se seleccionan a partir de la Tabla 2.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el p53 se selecciona como un biomarcador además de los biomarcadores seleccionados a partir de la Tabla 2.

20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la muestra de cáncer se selecciona del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino

grosso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfoide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.

5 El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, donde se mide un ARNm o proteína de al menos un biomarcador.

10 6. Un MDM2i para su uso en un método de tratamiento de un paciente con cáncer que comprende: evaluar la expresión génica de más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en una muestra de cáncer obtenida del paciente, donde un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 es Mdm2; y la presencia de al menos un biomarcador indica la sensibilidad del paciente a un MDM2i; y administrar al paciente un MDM2i.

15 7. Un MDM2i para su uso en el método de acuerdo con la reivindicación 6, donde al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce o los trece biomarcadores se seleccionan a partir de la Tabla 2.

8. Un MDM2i para su uso en el método de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde el p53 se selecciona como un biomarcador además de los biomarcadores seleccionados a partir de la Tabla 2.

20 9. Un MDM2i para su uso en el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde la muestra de cáncer se selecciona del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfoide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.

25 10. Una composición que comprende un MDM2i para su uso en el tratamiento del cáncer en una población seleccionada de pacientes con cáncer, donde la población de pacientes con cáncer se selecciona basándose en que muestren una expresión génica de más de un biomarcador seleccionado a partir de la Tabla 2 en una muestra de cáncer obtenida de dichos pacientes, donde un biomarcador es Mdm2.

30 11. La composición de la reivindicación 10, donde la muestra de cáncer se selecciona del grupo constituido por mama, pulmón, páncreas, ovario, sistema nervioso central (SNC), endometrio, estómago, intestino grueso, colon, esófago, hueso, tracto urinario, hematopoyético, linfoide, hígado, piel, melanoma, riñón, sarcoma de tejido blando y pleura.

35 12. La composición de las reivindicaciones 10 u 11, donde los pacientes se seleccionan basándose en una expresión génica de los biomarcadores MDM2, CDKN1A, ZMAT3, DDB2, FDXR, RPS27L, BAX, RRM2B, SESN1, CCNG1, XPC, TNFRSF10B y AEN.

**FIGURA 1**

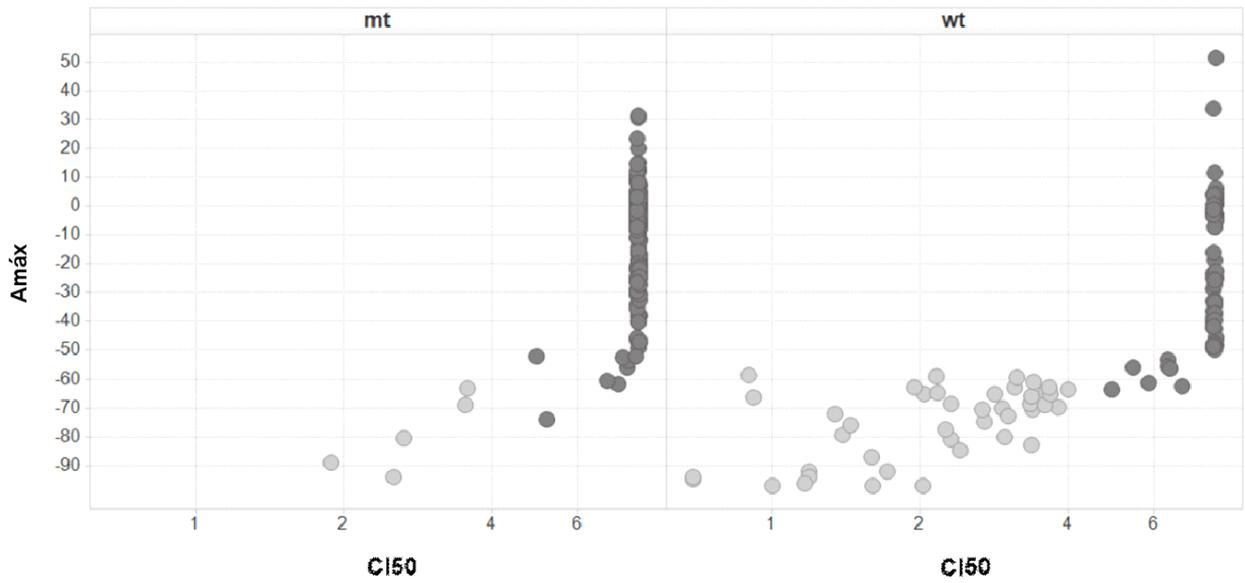
Figura 1A

| <b>TR-FRET</b>  | <b>MDM2i(1)</b> | <b>MDM2i(2)</b> |
|---|-----------------|-----------------|
| Cl <sub>50</sub> (nM)   | 1.7             | 1.3             |
| K <sub>i</sub> (nM)   | 1.3             | 1.1             |
| K <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>6</sup> | 37              | 70              |
| K <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )                                   | 0.071           | 0.084           |
| T <sub>1/2</sub> (s)  | 10              | 8               |

Figura 1B

| <b>Ensayo</b>   | <b>MDM2i(1)</b> | <b>MDM2i(2)</b> |
|---|-----------------|-----------------|
| Inhibición de la proliferación celular  |                 |                 |
| - Cl <sub>50</sub> en SJS-A1 (p53 <sup>WT/WT</sup> ) (μM)                         | 0.29            | 0.34            |
| - Cl <sub>50</sub> en SAOS2 (p53 <sup>-/-</sup> ) (μM)<br>[Factor de diferencia]  | 19.75<br>[68x]  | 17.06<br>[50x]  |
| - Cl <sub>50</sub> en HCT116 (p53 <sup>WT/WT</sup> ) (μM)                         | 0.35            | 0.44            |
| - Cl <sub>50</sub> en HCT116 (p53 <sup>-/-</sup> ) (μM)<br>[Factor de diferencia] | 13.37<br>[38x]  | 10.60<br>[24x]  |
| Ensayo GRIP de traslado de p53:   |                 |                 |
| - Cl <sub>50</sub> con un 10% de FCS (μM)   | 0.27            | 0.36            |

**FIGURA 2**



■ Células insensibles    ■ Células sensibles

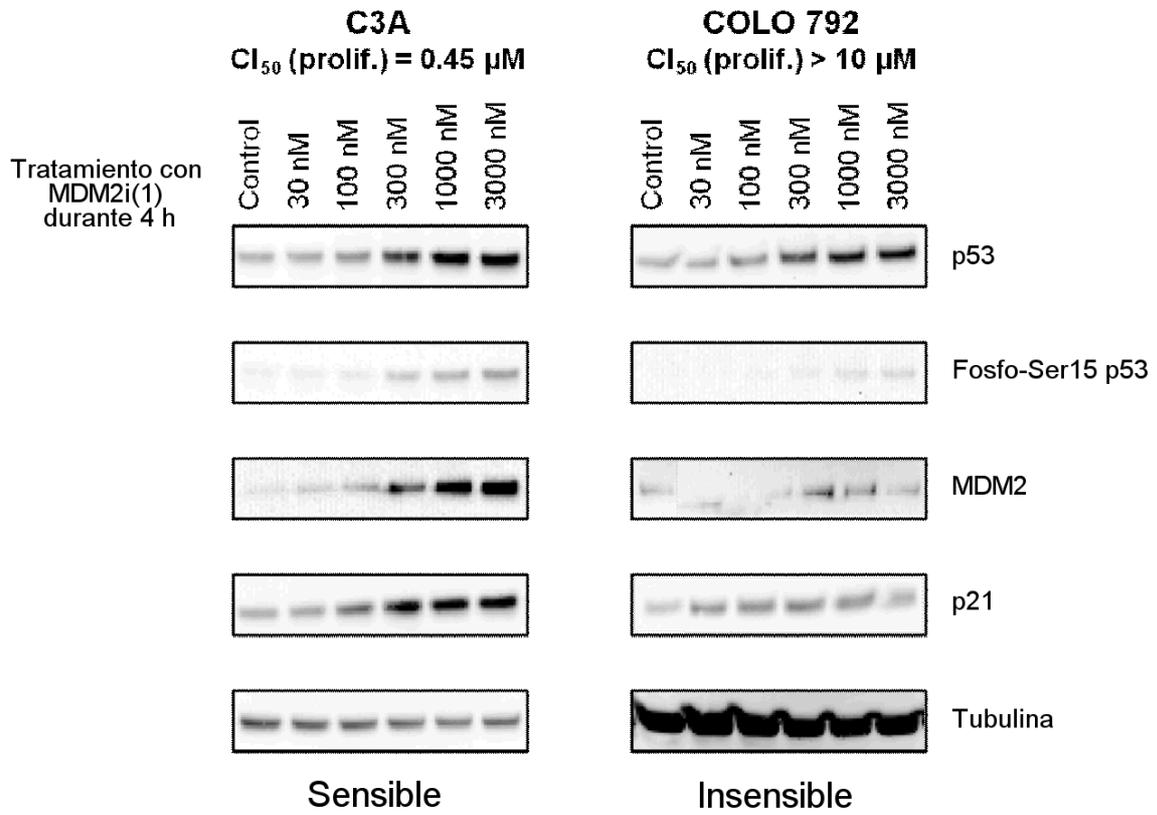
| <b><u>MDM2i(2)</u></b> | <b><u>wt</u></b> | <b><u>mt</u></b> |
|------------------------|------------------|------------------|
| <u>Insensible</u>      | <u>70</u>        | <u>239</u>       |
| <u>Sensible</u>        | <u>42</u>        | <u>5</u>         |

Valor de p = 6.3e-19 (Prueba exacta de Fischer)  
 Estimación de la relación de probabilidades = 28.38

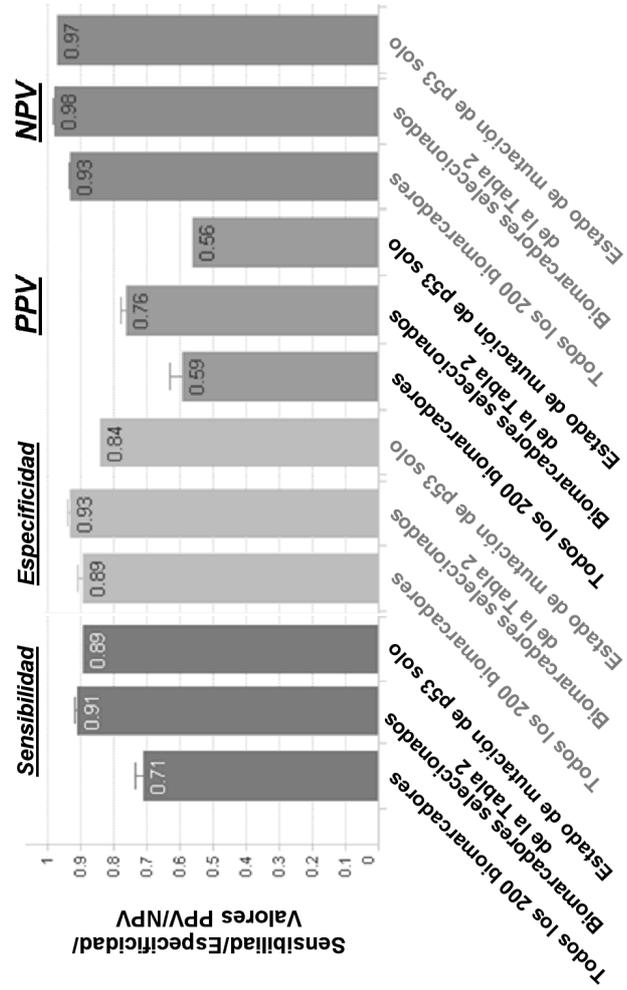
**FIGURA 3**

| <b>Biomarcadores</b> | <b>Factor de cambio</b> | <b>Valor p de Wilcoxon</b> | <b>Ajuste del valor p de Wilcoxon</b> |
|----------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Expr MDM2            | 2.18                    | 1.71E-18                   | 3.09E-14                              |
| Expr CDKN1A          | 3.88                    | 4.16E-15                   | 3.76E-11                              |
| Expr ZMAT3           | 2.81                    | 1.98E-14                   | 1.20E-10                              |
| Expr DDB2            | 2.55                    | 2.71E-14                   | 1.22E-10                              |
| Expr FDXR            | 2.42                    | 2.98E-13                   | 1.08E-09                              |
| Expr RPS27L          | 1.97                    | 4.08E-13                   | 1.23E-09                              |
| Expr BAX             | 2.12                    | 7.12E-13                   | 1.84E-09                              |
| Expr RRM2B           | 2.06                    | 1.88E-12                   | 4.25E-09                              |
| Expr SESN1           | 2.27                    | 5.17E-12                   | 1.04E-08                              |
| Expr CCNG1           | 1.69                    | 2.65E-11                   | 4.81E-08                              |
| Expr XPC             | 1.62                    | 9.47E-11                   | 1.56E-07                              |
| Expr TNFRSF10B       | 1.91                    | 2.42E-09                   | 3.30E-06                              |
| Expr AEN             | 1.46                    | 2.55E-09                   | 3.30E-06                              |

**FIGURA 4**



**FIGURA 5**



**FIGURA 6**  
**Las células tumorales que presentan la firma génica diana de p53 son sensibles a MDM2i**

| Nombre de la línea celular | Sitio primario                   | Predicción de la sensibilidad a MDM2i | CI50 de MDM2i(1), $\mu\text{M}$ | CI50 de MDM2i(2), $\mu\text{M}$ | Calificación de la sensibilidad consenso de MDM2i(1) y (2) |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| SJSA-1                     | hueso                            | sensible                              | 0.223                           | 0.241                           | sensible   |
| CCF-STTG1                  | sistema nervioso central         | sensible                              | 0.87                            | 0.76                            | sensible   |
| D283 Med                   | sistema nervioso central         | sensible                              | 0.192                           | 0.191                           | sensible   |
| BV-173                     | tejido linfoide y hematopoyético | sensible                              | 0.085                           | 0.051                           | sensible   |
| EOL-1                      | tejido linfoide y hematopoyético | sensible                              | 0.082                           | 0.083                           | sensible   |
| GDM-1                      | tejido linfoide y hematopoyético | sensible                              | 0.282                           | 0.285                           | sensible   |
| HuHs1                      | tejido linfoide y hematopoyético | sensible                              | 0.562                           | 0.392                           | sensible   |
| L549                       | tejido linfoide y hematopoyético | sensible                              | 0.039                           | 0.038                           | sensible   |
| MH-CALL-4                  | tejido linfoide y hematopoyético | sensible                              | 0.109                           | 0.079                           | sensible   |
| MV-4-11                    | tejido linfoide y hematopoyético | sensible                              | 0.88                            | 0.991                           | sensible   |
| OCL-Y3                     | tejido linfoide y hematopoyético | sensible                              | 0.583                           | 1.573                           | sensible   |
| RS4-11                     | tejido linfoide y hematopoyético | sensible                              | 0.177                           | 0.297                           | sensible   |
| SUP-B15                    | tejido linfoide y hematopoyético | sensible                              | 0.135                           | 0.167                           | sensible   |
| A-498                      | riñón                            | sensible                              | 3.943                           | NA                              | insensible   |
| Caki-1                     | riñón                            | sensible                              | 4.721                           | NA                              | insensible   |
| CAL-51                     | riñón                            | sensible                              | 0.544                           | NA                              | sensible   |
| KMRC-2                     | riñón                            | sensible                              | 5.239                           | NA                              | insensible   |
| OS-RC-2                    | riñón                            | sensible                              | 10                              | NA                              | insensible   |
| A549                       | pulmón                           | sensible                              | 1.198                           | NA                              | sensible   |
| DM3                        | pleura                           | sensible                              | 10                              | NA                              | insensible   |
| IST-MES1                   | pleura                           | sensible                              | 4.083                           | NA                              | insensible   |
| JL-1                       | pleura                           | sensible                              | 1.421                           | NA                              | sensible   |
| MSTO-211H                  | pleura                           | sensible                              | 0.454                           | NA                              | sensible   |
| A191D                      | piel                             | sensible                              | 6.729                           | 7.784                           | insensible   |
| COLO-829                   | piel                             | sensible                              | 4.238                           | 2.175                           | insensible   |
| COLO-783                   | piel                             | sensible                              | 10                              | 10                              | insensible   |
| COLO-849                   | piel                             | sensible                              | 2.729                           | 2.934                           | sensible   |
| Hs 088ALT                  | piel                             | sensible                              | 10                              | 10                              | insensible   |
| Hs 034 T                   | piel                             | sensible                              | 10                              | 10                              | insensible   |
| Hs 940 T                   | piel                             | sensible                              | 1.434                           | 2.665                           | sensible   |
| ICR-1                      | piel                             | sensible                              | 5.995                           | 3.689                           | insensible   |
| MEL-JUSO                   | piel                             | sensible                              | 0.586                           | 0.801                           | sensible   |
| SK-MEL-1                   | piel                             | sensible                              | 1.613                           | 1.509                           | sensible   |
| SK-MEL-31                  | piel                             | sensible                              | 1.222                           | 1.275                           | sensible   |
| UACC-257                   | piel                             | sensible                              | 2.143                           | 2.08                            | sensible   |
| UACC-62                    | piel                             | sensible                              | 0.636                           | 0.74                            | sensible   |
| Nombre de la línea celular | Sitio primario                   | Predicción de la sensibilidad a MDM2i | CI50 de MDM2i(1), $\mu\text{M}$ | CI50 de MDM2i(2), $\mu\text{M}$ | Calificación de la sensibilidad consenso de MDM2i(1) y (2) |
| CAL-51                     | mama                             | insensible                            | 1.038                           | 0.552                           | sensible   |
| EFM-192A                   | mama                             | insensible                            | 10                              | 7.43                            | insensible   |
| HCC202                     | mama                             | insensible                            | 7.396                           | 7.398                           | insensible   |
| GA-10                      | tejido linfoide y hematopoyético | insensible                            | 0.061                           | 8.294                           | insensible   |
| HDLM-2                     | tejido linfoide y hematopoyético | insensible                            | 10                              | 9.059                           | insensible   |
| JMI                        | tejido linfoide y hematopoyético | insensible                            | 0.997                           | 1.102                           | sensible   |
| KASUM-1                    | tejido linfoide y hematopoyético | insensible                            | 5.271                           | 7.137                           | insensible   |
| VMRC-RCW                   | riñón                            | insensible                            | 10                              | NA                              | insensible   |
| JHH-5                      | hígado                           | insensible                            | 8.788                           | 9.012                           | insensible   |
| HCC-95                     | pulmón                           | insensible                            | 7.129                           | NA                              | insensible   |
| NCIH1568                   | pulmón                           | insensible                            | 6.202                           | NA                              | insensible   |
| REF-1C.KJ                  | pulmón                           | insensible                            | 8.753                           | 10                              | insensible   |
| DANG                       | páncreas                         | insensible                            | 10                              | 9.734                           | insensible   |
| NCIH20                     | pleura                           | insensible                            | 2.827                           | NA                              | sensible   |
| COLO-818                   | piel                             | insensible                            | 10                              | 10                              | insensible   |
| ICR-37                     | piel                             | insensible                            | 10                              | 10                              | insensible   |

**FIGURA 7A-7C**

Figura 7A

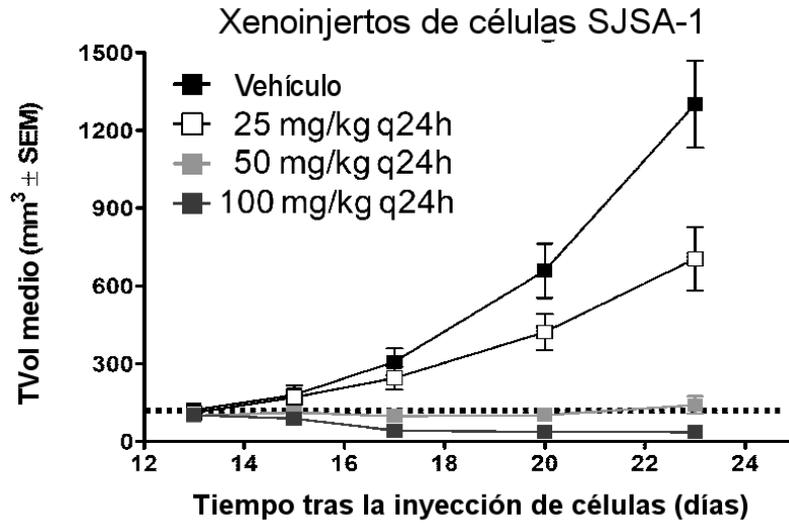
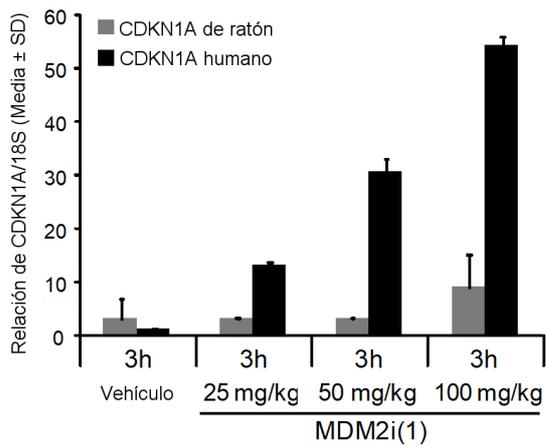


Figura 7B

| Xenoinjertos de tumores SJSA-1 – 10 días de tratamiento |         |               |
|---|---------|---------------|
| Tratamiento con MDM2i(1)                                | T/C (%) | Regresión (%) |
| 25 mg/kg q24h   | 50      | -             |
| 50 mg/kg q24h   | 3       | -             |
| 100 mg/kg q24h  | -       | 65            |

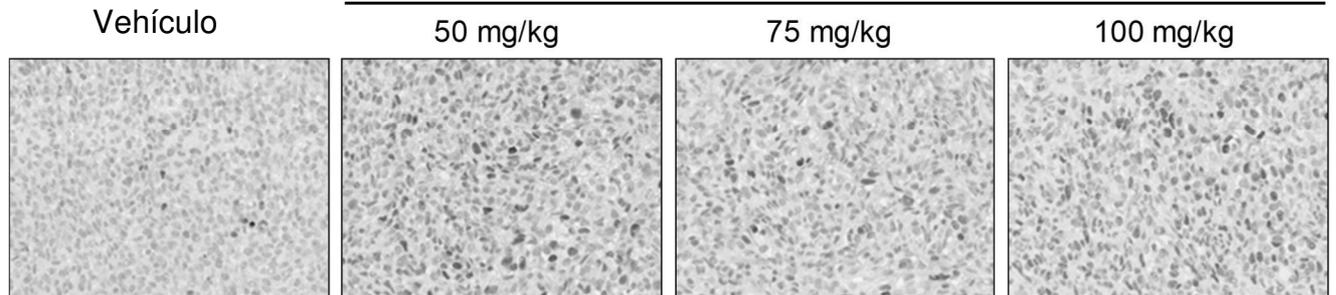
Figura 7C

Los niveles de ARNm de CDKN1A inducidos por MDM2i(1) en el tumor se correlacionan con la inhibición del crecimiento del tumor

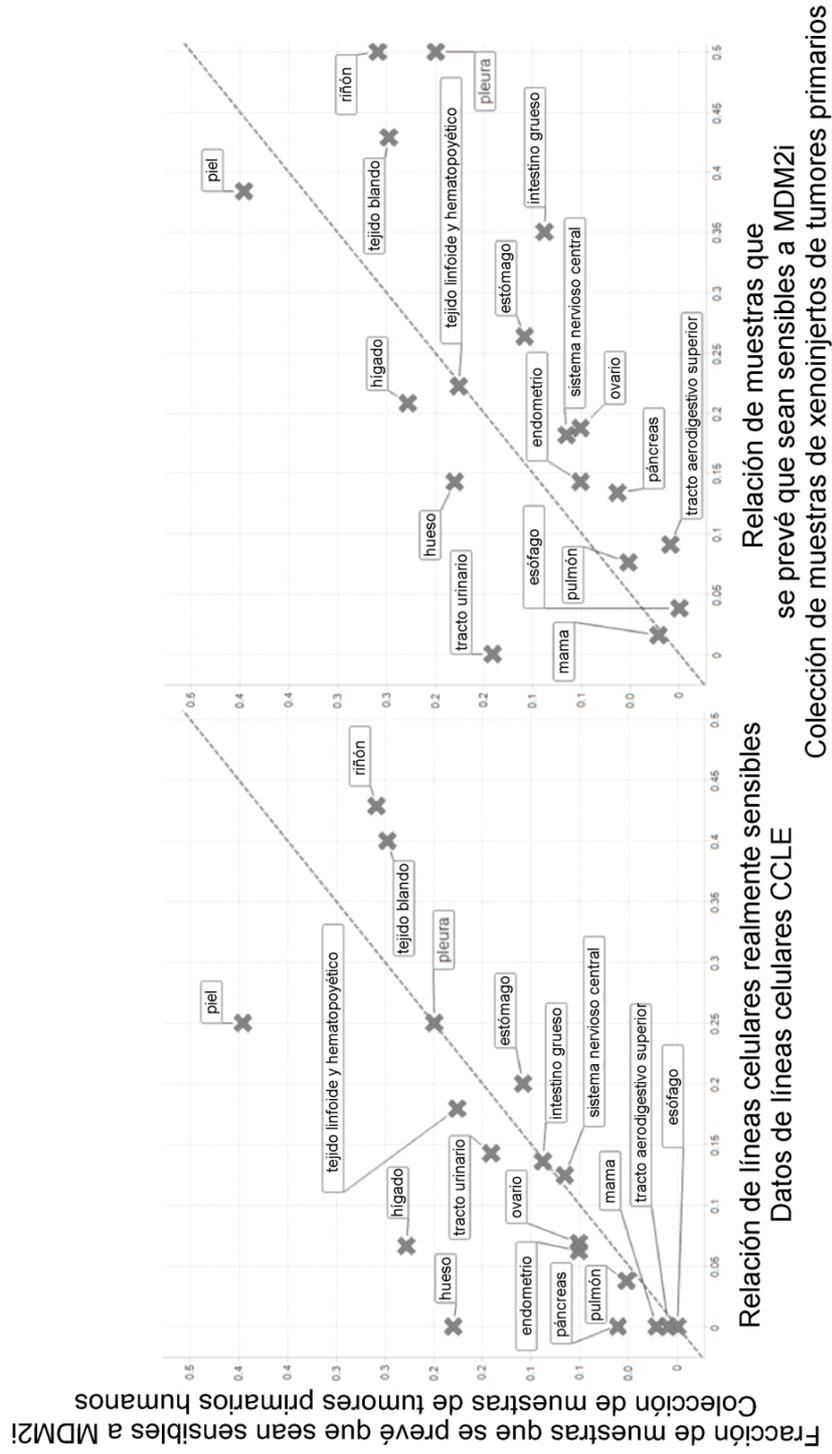


**FIGURA 8**

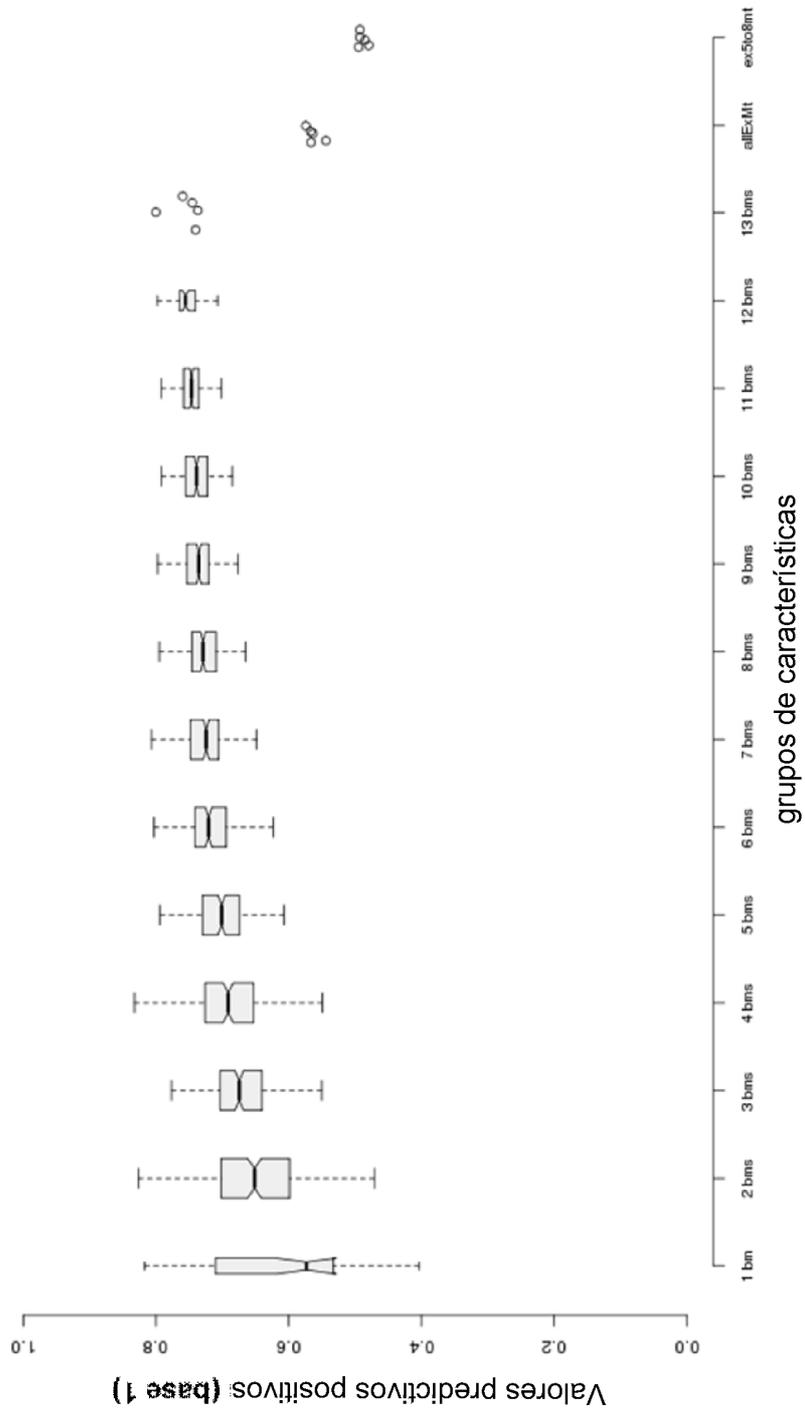
MDM2i(1) incrementa significativamente la expresión de p21 en ratones portadores de tumores SJSA-1



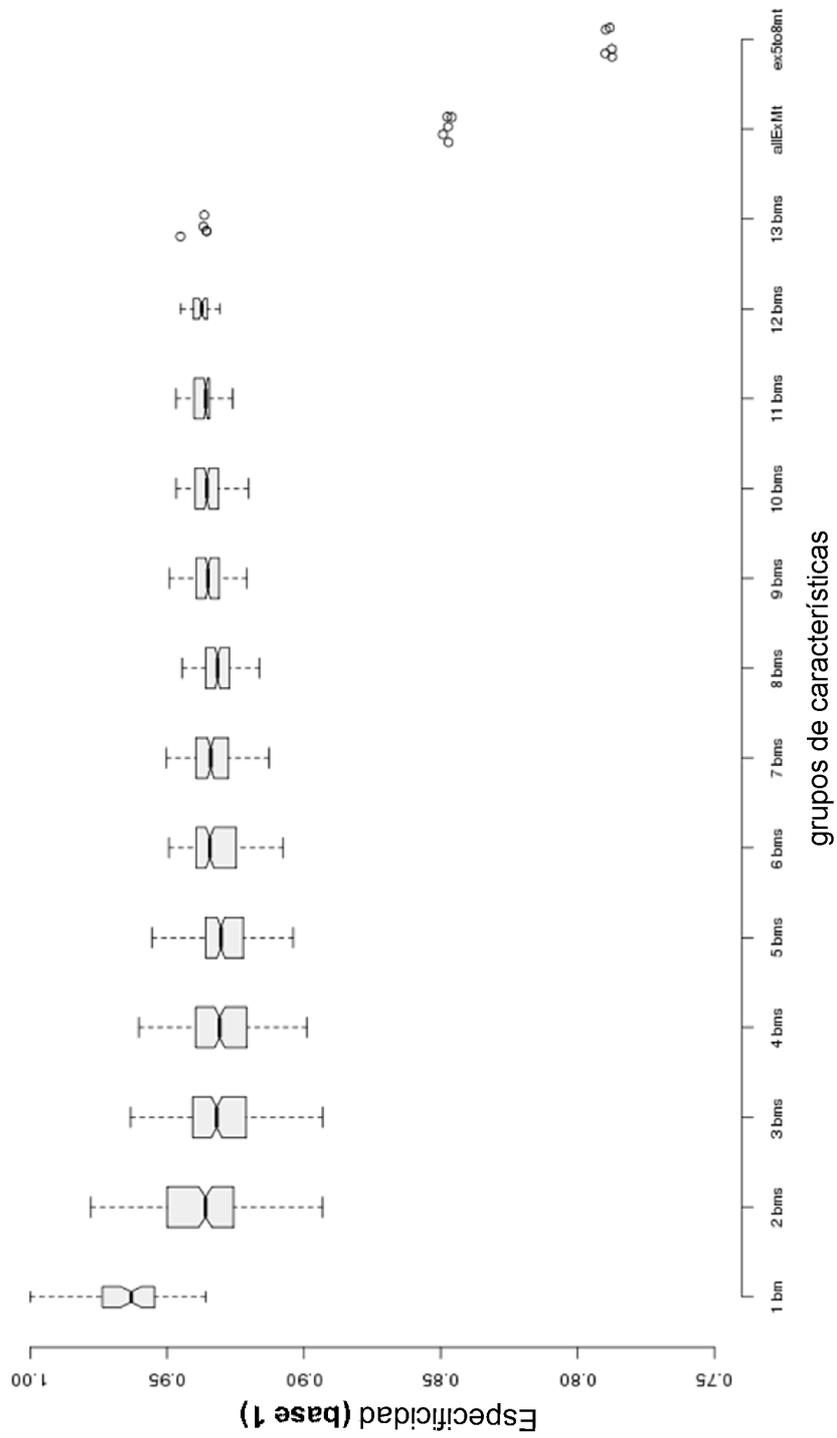
**FIGURA 9**



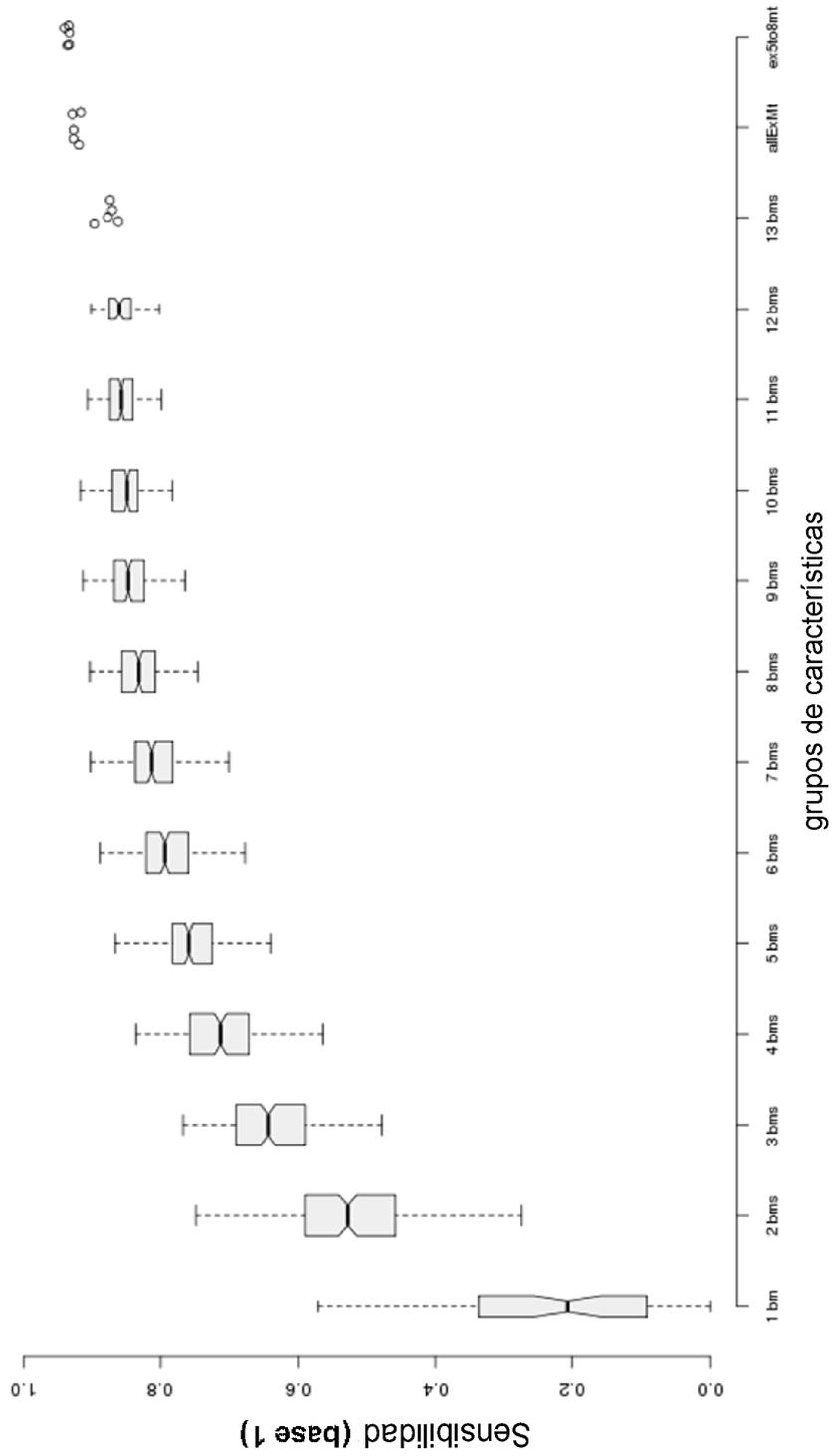
**FIGURA 10**



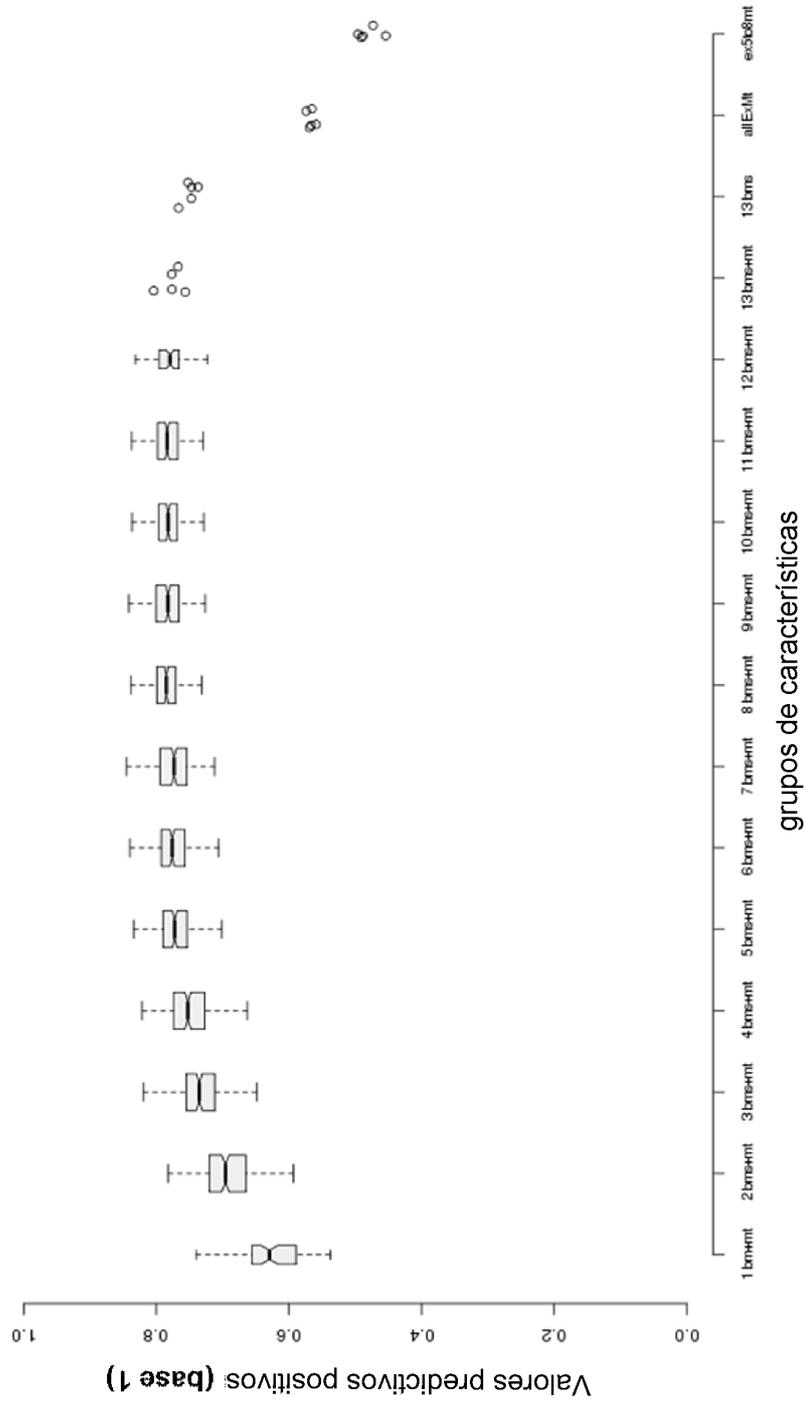
**FIGURA 11**



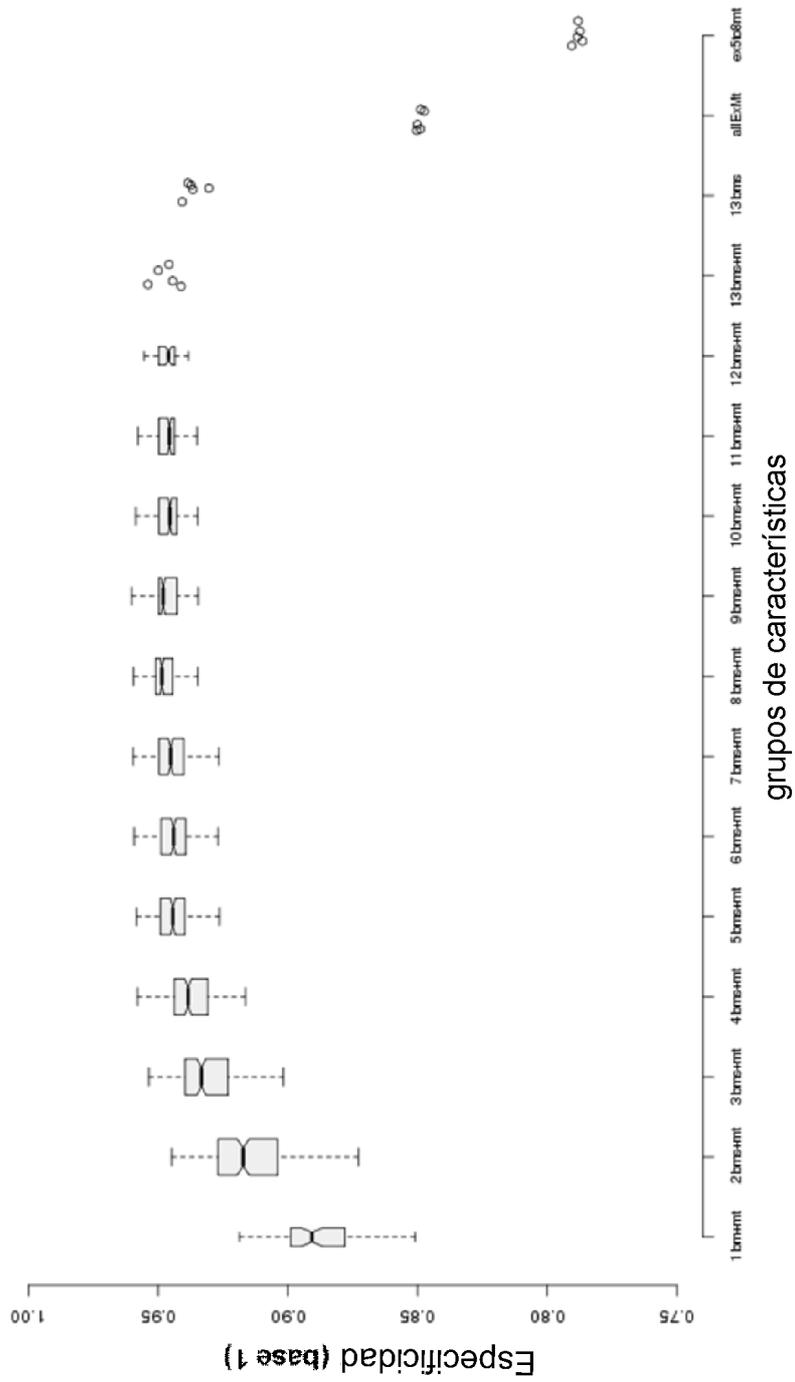
**FIGURA 12**



**FIGURA 13**



**FIGURA 14**



**FIGURA 15**

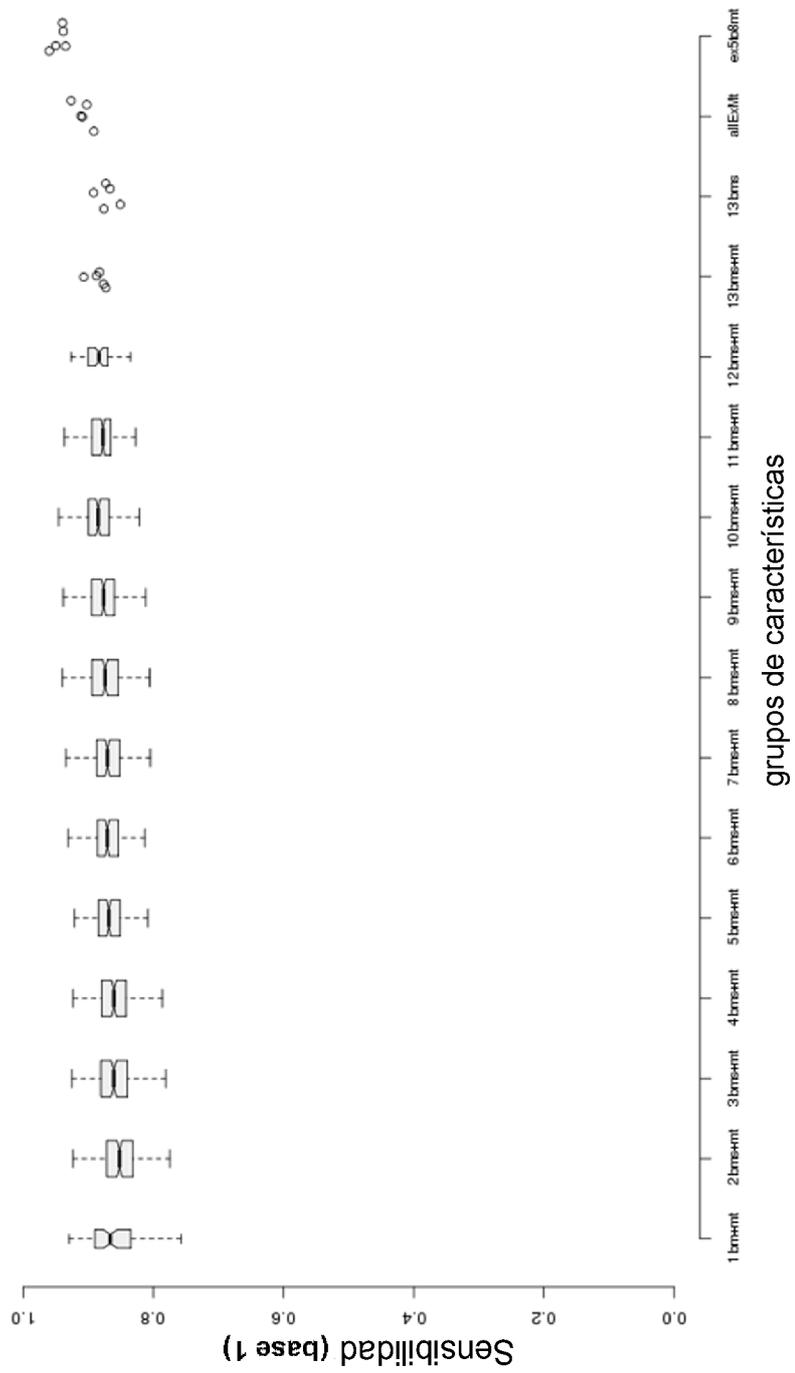
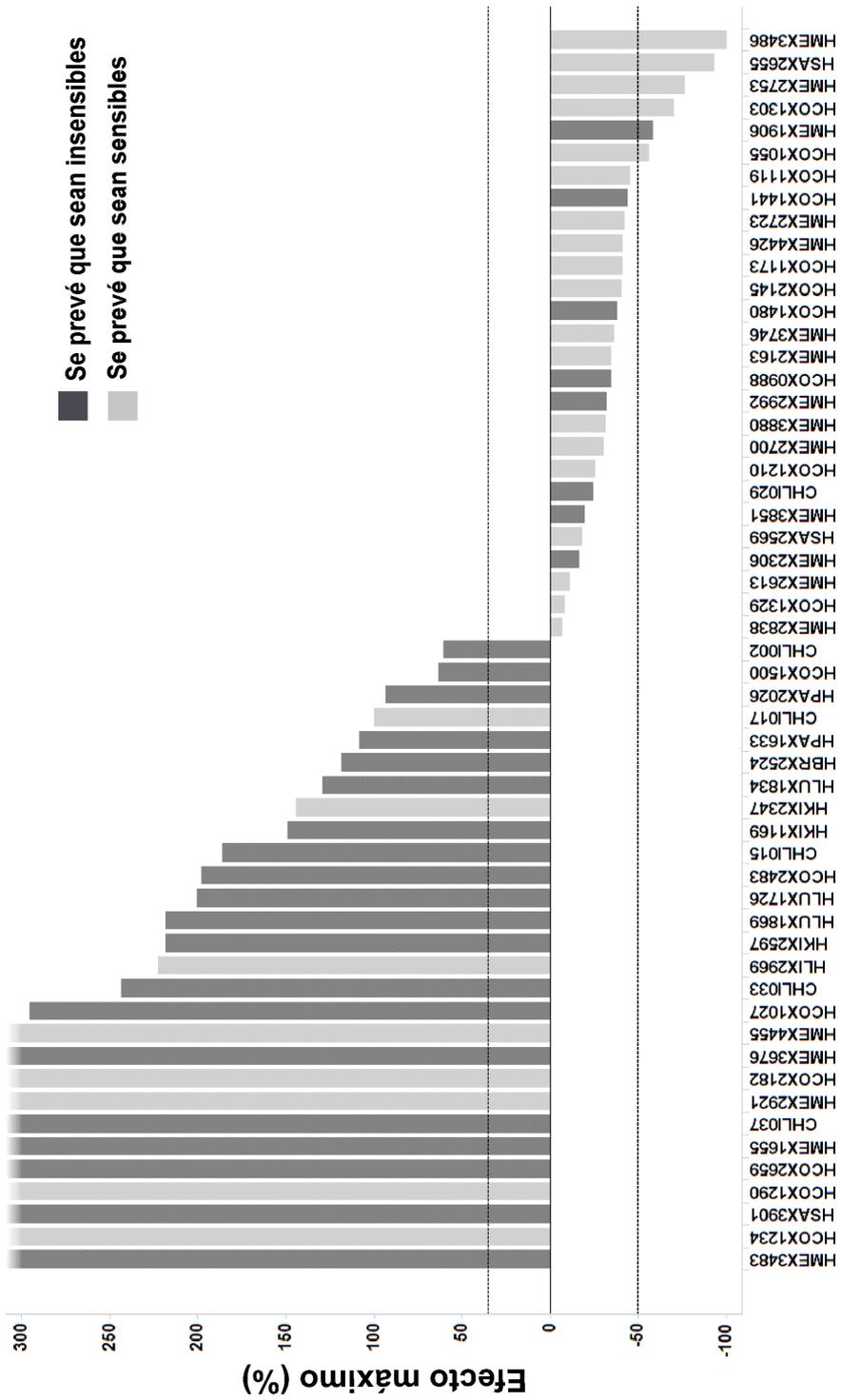


FIGURA 16



**FIGURA 17**

