

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
19 de noviembre de 2020 (19.11.2020) WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional  
WO 2020/229717 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:  
C07K 16/40 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)  
G01N 33/573 (2006.01)

NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2020/070308

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Fecha de presentación internacional:  
13 de mayo de 2020 (13.05.2020)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201930419 13 de mayo de 2019 (13.05.2019) ES

(71) Solicitantes: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano, nº 117, 28006 Madrid (ES). UNIVERSIDAD DE CANTABRIA [ES/ES]; Avenida de los Castros, s/n, 39005 Santander (Cantabria) (ES).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(72) Inventores: CRESPO BARAJA, Pedro; INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGIA DE CANTABRIA, C/ALBERT EINSTEIN, 22 . PARQUE CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE CANTABRIA, 39011 Santander (Cantabria) (ES). CASAR MARTÍNEZ, Berta; INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGIA DE CANTABRIA, C/ALBERT EINSTEIN, 22 . PARQUE CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE CANTABRIA, 39011 Santander (Cantabria) (ES).

(74) Mandatario: PONS ARIÑO, Angel; Glorieta Rubén Darío 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,

(54) Title: METHOD FOR PREDICTING THERAPEUTIC RESPONSE TO SERINE-THREONINE KINASE BRAF INHIBITOR DRUGS

(54) Título: MÉTODO PARA PREDECIR LA RESPUESTA TERAPÉUTICA A FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA SERINA-THREONINA KINASA BRAF

(57) Abstract: The present invention relates to an *in vitro* method which enables the prediction of therapeutic response to treatment with BRAF inhibitor drugs, such as vemurafenib, in cancer patients associated with oncogenic mutations in said kinase, such as BRAF positive melanoma. Said method is based on the measurement of cytoplasmic ERK1/2 levels through the detection and quantification of ERK1/2 phosphorylated in serine 301/284, respectively, in an isolated biological sample of the patient. The invention also provides a specific antibody against ERK1/2 phosphorylated in serine 301/284 and a kit comprising it, which are of use in the described method.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método *in vitro* que permite predecir la respuesta terapéutica al tratamiento con fármacos inhibidores de BRAF, tales como vemurafenib, en pacientes de cáncer asociado a mutaciones oncogénicas en dicha kinasa, tal como melanoma BRAF positivo. Dicho método se basa en la medición de los niveles de ERK1/2 citoplasmática, a través de la detección y cuantificación de ERK1/2 fosforiladas en serina 301/284 respectivamente, en una muestra biológica aislada del paciente. La invención también proporciona un anticuerpo específico frente a ERK1/2 fosforiladas en serina 301/284 y un kit que lo comprende, los cuales son de utilidad en el método descrito.



WO 2020/229717 A1

## DESCRIPCIÓN

### MÉTODO PARA PREDECIR LA RESPUESTA TERAPÉUTICA A FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA SERINA-TREONINA KINASA BRAF

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la oncología, específicamente dentro de los métodos de predicción de la respuesta a fármacos inhibidores de la serina-treonina kinasa BRAF en pacientes de cáncer portadores de mutaciones oncogénicas en BRAF (BRAF positivos). Dichos métodos permiten identificar tempranamente qué pacientes se beneficiarán de dicho tratamiento previamente a su administración. En particular, la invención proporciona un biomarcador, así como un anticuerpo específico frente al mismo, útil para predecir qué pacientes mostrarán sensibilidad y, por tanto, una respuesta clínica adecuada, a un posterior tratamiento con inhibidores de BRAF.

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El 60% de los melanomas portan mutaciones oncogénicas en la serina / treonina kinasa BRAF. Actualmente, el único tratamiento eficaz para estos casos es mediante la administración de inhibidores específicos de dicha kinasa (por ejemplo, vemurafenib y dabrafenib). Aunque la mayoría de los casos responden al tratamiento, por razones todavía desconocidas aproximadamente un 30% de los pacientes son refractarios a dicha terapia, por lo que dichos pacientes se ven sometidos a un tratamiento inútil, no exento de efectos secundarios adversos. Además, considerando que dicho tratamiento cuesta alrededor de 30.000€ por paciente, estos casos suponen para los sistemas de salud un dispendio de recursos económicos innecesario y completamente estéril.

25 La existencia de pacientes refractarios al tratamiento con fármacos inhibidores de BRAF hace necesario desarrollar métodos de predicción que puedan aplicarse en la práctica clínica para identificar estos pacientes en una etapa temprana. Este enfoque ayudaría a diseñar estrategias de tratamiento eficaces adaptadas a cada paciente.

30 La caracterización de marcadores moleculares que permitan discriminar los casos que son susceptibles de responder al tratamiento con inhibidores de BRAF y los que no, entre todos los pacientes de melanoma BRAF positivo, es de crucial importancia. Ser

capaces de determinar tempranamente si el paciente presentará una respuesta favorable al tratamiento antes de administrar el mismo sería muy útil en la práctica clínica para poder seleccionar el tratamiento apropiado para cada caso individual. Esto permitiría a su vez mejorar el pronóstico del sujeto.

5

Sin embargo, actualmente no hay disponible ningún biomarcador ni ninguna metodología que permita predecir, de manera fiable y simple, la respuesta clínica al tratamiento con fármacos inhibidores de BRAF en estos pacientes antes de proceder a su administración. Es decir, no se dispone de métodos susceptibles de ser aplicados en la práctica clínica que permitan la identificación de los pacientes no respondedores, lo que impide predecir la eficacia de la terapia.

Hace unos años se describió que la respuesta a vemurafenib se correlaciona positivamente con los niveles citoplasmáticos de la MAP kinasa ERK1/2 (Bollag G *et al.*, 2010, *Nature*, 467: 596-599). A este respecto, cabe destacar también que los niveles de ERK1/2 citoplasmático se correlacionan con un buen pronóstico en tumores de mama invasivos y en tumores microcíticos de pulmón (Blackhall FH. *et al.*, 2007, *Clin Cancer Res*, 9: 2241-2247; Nakopoulou L. *et al.*, 2007, *APMIS*, 113: 693-701). Desafortunadamente, hasta la fecha dicho concepto no se ha podido llevar a la clínica, ya que no hay una manera fácil de discriminar entre ERK1/2 citoplasmática y ERK1/2 nuclear, a no ser por engorrosas técnicas microscópicas (Bollag G *et al.*, 2010, *Nature*, 467: 596-599), poco prácticas para el diagnóstico rutinario.

Por lo tanto, es necesario disponer de herramientas adecuadas susceptibles de ser empleadas en la práctica clínica que posibiliten identificar de manera selectiva ERK1/2 citoplasmática *versus* ERK1/2 nuclear, ya que dichas herramientas permitirían predecir la respuesta de los pacientes de cáncer, preferiblemente melanoma, BRAF positivo a la administración terapéutica de fármacos inhibidores de BRAF, tales como vemurafenib.

## 30 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención soluciona el problema anteriormente planteado mediante un método que permite discriminar ERK1/2 citoplasmática de ERK1/2 nuclear. Dicho método utiliza, en particular, la detección y cuantificación, en muestras aisladas de

pacientes de cáncer BRAF positivo, de ERK1/2 fosforiladas en la serina 301/284 respectivamente, las cuales se ha demostrado en la presente invención que están presentes únicamente en la fracción citoplasmática de ERK. La cuantificación de los niveles de ERK1/2 fosforiladas en la serina 301/284 permite, así, predecir la respuesta clínica a un posterior tratamiento con inhibidores de BRAF.

Los inventores de la presente invención han identificado un nuevo sitio de fosforilación en ERK2, concretamente en la serina 284 (serina 301 en ERK1) y, tras generar un anticuerpo que reconoce específicamente a ERK1 y ERK2 fosforiladas en serina 301/284 respectivamente, han comprobado que dicha fosforilación se da, única y exclusivamente, en la fracción citoplasmática de ERK1/2. Así, utilizando técnicas de electroforesis de proteínas, se demuestra en la presente invención que los niveles de ERK1/2 fosforiladas en serina 301/284 son muy superiores en líneas celulares de melanoma que responden adecuadamente al tratamiento con el fármaco inhibidor de BRAF vemurafenib, en comparación con los niveles encontrados en líneas resistentes a dicho fármaco. Por tanto, la cuantificación de los niveles de ERK1/2 fosforiladas en serina 301/284 en muestras biológicas aisladas de pacientes de cáncer portadores de mutaciones oncogénicas en BRAF (BRAF positivo) permite predecir la respuesta terapéutica a la administración de inhibidores de BRAF.

Asimismo, el anticuerpo anti-ERK1/2 fosforiladas en serina 301/284 generado en la presente invención puede ser utilizado en el método de predicción de la respuesta terapéutica a inhibidores de BRAF aquí propuesto para la estratificación, fácil y rápida, de los casos de cáncer, preferiblemente melanoma, BRAF positivo en función de su potencial de respuesta a la terapia con inhibidores de BRAF.

Por todo ello, un aspecto de la invención se refiere al uso de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de los niveles de ERK2 fosforilada en la serina 284 como biomarcador para predecir *in vitro* la respuesta terapéutica al tratamiento con un fármaco inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF en un paciente.

“Predecir la respuesta terapéutica” se refiere a determinar, antes de administrar el tratamiento, si el fármaco inhibidor de BRAF inducirá una respuesta favorable, positiva o adecuada en el sujeto o paciente una vez tratado con el mismo, es decir, después de

administrar el fármaco. Una "respuesta positiva o adecuada" a un fármaco inhibidor de BRAF se produce cuando se observa una mejora o una reducción en los síntomas del tumor, preferiblemente cáncer, más preferiblemente melanoma, en el paciente. Dicha respuesta positiva o adecuada al tratamiento con un inhibidor de BRAF se da, en particular, cuando los niveles de actividad total de ERK1/2, evaluados mediante los niveles de fosforilación de su motivo de fosforilación TEY, se ven disminuidos en una muestra biológica aislada del paciente tras la administración del fármaco en comparación con dichos niveles de actividad medidos en una muestra biológica aislada del mismo paciente previamente a la administración del fármaco. Dicha respuesta positiva o adecuada al tratamiento con un inhibidor de BRAF se da, también, preferiblemente, cuando hay desaparición, o disminución, de las lesiones metastásicas macroscópicas.

El término "*in vitro*" significa que los métodos y usos descritos en la invención se realizan enteramente fuera del cuerpo humano o animal.

El término "sujeto", "individuo" o "paciente", como se usa en la presente invención, se refiere preferiblemente a un humano o mamífero no humano, tal como primates, equinos, roedores, rumiantes, gatos o perros. Preferiblemente, el paciente al que se refiere la invención es un ser humano.

"ERK1/2" se refiere, preferiblemente, a ERK1 (MAPK1) y ERK2 (MAPK3) humanas (MAPK1 (UniprotKB: P28482) y MAPK3 (UniprotKB: P27361) según la nomenclatura HUGO). Son MAP kinasas implicadas en diversas funciones celulares, tales como regulación de la meiosis, mitosis y postmitosis en células diferenciadas. Una variedad de estímulos, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas, infección viral, agentes carcinogénicos, etc., activan la vía de señalización RAS-ERK. ERK1/2 son rápidamente fosforiladas tras la activación de los receptores tirosina kinasas de la superficie celular, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Esta fosforilación conduce a la activación de su actividad kinasa.

Las "ERK1/2 fosforiladas en la serina 301 o en la serina 284, respectivamente" son las enzimas ERK1 y ERK2 que han incorporado un grupo fosfato en dichas posiciones concretas de su secuencia aminoacídica.

La enzima "serina-treonina kinasa BRAF" es la enzima, preferiblemente humana, (UniprotKB: P15056), más preferiblemente codificada por el gen 7q34. La expresión "BRAF positivo" se refiere, en la presente invención, a la presencia de una mutación (oncogénica) de sustitución en el residuo V600 de la secuencia aminoacídica de BRAF, preferiblemente a la presencia de la sustitución V600E.

En otra realización preferida, el inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF es vemurafenib y/o dabrafenib, más preferiblemente vemurafenib.

El fármaco "vemurafenib" (PLX4032 o RG7204) es un compuesto químico de bajo peso molecular que se administra por vía oral, inhibidor de la actividad de la enzima serina-treonina quinasa BRAF. La indicación terapéutica de este inhibidor de BRAF es en melanoma no resecable o metastásico con mutación de BRAF V600 positiva. Se comercializa bajo el nombre de Zelboraf®.

El fármaco "dabrafenib" es también un inhibidor de BRAF y su indicación terapéutica es en melanoma no resecable o metastásico con mutación de BRAF V600 positiva, como tratamiento en monoterapia o en combinación con trametinib, y en cáncer de pulmón no microcítico avanzado con mutación de BRAF V600 positiva, en combinación con trametinib. Se comercializa bajo el nombre de Tafinlar®.

Las mutaciones oncogénicas en el gen codificante para la enzima BRAF, las cuales conducen a la sustitución del aminoácido Valina (V) en la posición 600, preferiblemente por el aminoácido aspártico (E), conducen a la activación constitutiva de esta proteína, lo que promueve la proliferación celular en ausencia de los factores de crecimiento que normalmente son requeridos para dicha proliferación. Las mutaciones oncogénicas en BRAF se han identificado de manera muy frecuente en tipos de cáncer específicos, estando presentes, por ejemplo, en el 60% de los melanomas. La mutación oncogénica en BRAF observada con mayor frecuencia es V600E, la cual representa aproximadamente el 90% de las mutaciones en BRAF observadas en casos de melanoma.

Por ello, en otra realización preferida, el paciente al que se refiere la presente invención

padece cáncer, en particular cáncer BRAF positivo, es decir, es un paciente de cáncer que presenta una mutación oncogénica en BRAF donde dicha mutación es preferiblemente en la V600, más preferiblemente la mutación es V600E.

- 5 Más preferiblemente, el cáncer es melanoma, aún más preferiblemente melanoma no resecable o metastásico con mutación de BRAF V600 positiva, o cáncer de pulmón no microcítico, aún más preferiblemente cáncer de pulmón no microcítico avanzado con mutación de BRAF V600 positiva. En una realización particular, el cáncer es melanoma.
- 10 En la realización más preferida de la presente invención, el inhibidor de BRAF es vemurafenib y el paciente padece melanoma.

Como los niveles de ERK1/2 citoplasmático se correlacionan, no solo con la respuesta terapéutica al tratamiento con un fármaco inhibidor de BRAF, sino también con un buen  
15 pronóstico en tumores de mama, preferiblemente invasivos, y en tumores de pulmón, preferiblemente microcíticos (Blackhall FH. *et al.*, 2007, *Clin Cancer Res*, 9: 2241-2247; Nakopoulou L. *et al.*, 2007, *APMIS*, 113: 693-701), otro aspecto de la invención se refiere al uso de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de los niveles de ERK2 fosforilada en la serina 284 como biomarcador para el pronóstico *in vitro* de tumores de  
20 mama, preferiblemente invasivos, y/o de pulmón, preferiblemente microcíticos, en un paciente.

El término "pronóstico" se refiere al procedimiento mediante el cual se establece una predicción de los sucesos que ocurrirán en el desarrollo o curso de una enfermedad,  
25 preferiblemente, cáncer, incluyendo recaída o capacidad de diseminación metastásica.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro*, de ahora en adelante "método de la invención", para predecir la respuesta terapéutica al tratamiento con un fármaco inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF en un paciente, donde dicho  
30 método comprende las siguientes etapas:

- a. Cuantificar los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en una muestra biológica aislada del paciente (recolectada antes de administrar el tratamiento con el inhibidor de BRAF),

- 5
- b. Comparar los niveles cuantificados en la etapa (a) con un valor de referencia, donde dicho valor de referencia procede de la cuantificación de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en una muestra biológica aislada de un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF, y
  - c. Asignar al paciente de la etapa (a) al grupo de individuos que responderán adecuadamente al tratamiento cuando el valor de cuantificación obtenido en la etapa (a) es significativamente mayor que el valor de referencia.

10 La expresión “cuantificar” se refiere a la medida de la cantidad o concentración de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en la muestra.

15 El término “cantidad” se refiere, pero sin limitación, a la cantidad absoluta o relativa de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en la muestra, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con ella o que se pueda derivar de ella. Estos otros valores o parámetros comprenden, por ejemplo, valores de intensidad de una señal obtenida a partir de cualquier propiedad física o química de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 obtenidos por medidas indirectas o directas, por ejemplo, por espectroscopía de masas o por  
20 resonancia magnética nuclear.

Así, la cuantificación de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284, tal y como se describe en la presente invención, puede realizarse como una medición directa o indirecta. La medición directa se refiere a la  
25 medición de la intensidad de una señal directamente obtenida de la presencia de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284. Esta señal se correlaciona directamente con el número de moléculas de producto presentes en la muestra. Esta señal, también denominada “señal de intensidad”, puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad derivado de una propiedad física o química del  
30 producto. La medición indirecta se refiere a la medición obtenida a partir de un componente secundario (es decir, un componente que es diferente de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284) o una medición derivada de, por ejemplo, respuestas celulares, ligandos, sustratos, etiquetas o productos de reacción enzimática asociados a ERK1 fosforilada en la serina 301 y ERK2 fosforilada

en la serina 284 o a sus actividades.

Métodos para detectar y cuantificar los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y los niveles de ERK2 fosforilada en la serina 284 son conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante estudios masivos de fosfoproteómica empleando la técnica de espectrometría de masas.

Esta cuantificación de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y los niveles de ERK2 fosforilada en la serina 284 puede realizarse, pero sin limitación, por incubación o hibridación *in situ* con anticuerpos específicos contra (que reconocen) ERK1 fosforilada en la serina 301 y/o ERK2 fosforilada en la serina 284, o un fragmento inmunológicamente activo de los mismos, en ensayos tales como Western blot, geles de electroforesis, transferencia a membrana e hibridación con sondas específicas, ensayos de inmunoprecipitación, arrays de proteína, preferentemente microarrays basados en anticuerpos, citometría de flujo, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, quimioluminiscencia, inmunoensayos tales como ELISA, radioinmunoensayo (RIA), o cualquier otro método enzimático, por incubación con un ligando o sustrato específico, dispositivos de flujo lateral o Luminex®, RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas u otro tipo de nanopartículas funcionalizadas, por técnicas cromatográficas preferentemente combinadas con espectrometría de masas, colorimetría o isoelectroenfoque. La medición de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 puede realizarse por el reconocimiento específico de cualquier fragmento de las enzimas así fosforiladas por medio de sondas y/o anticuerpos.

Preferiblemente, la cuantificación de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 se lleva a cabo en la presente invención mediante inmunoensayo basado en anticuerpos específicos frente a dichas formas de ERK, más preferiblemente mediante Western blot. Para el inmunoensayo, los anticuerpos empleados pueden estar marcados o no marcados, por ejemplo, pueden marcarse con un anticuerpo secundario, una enzima, un sustrato de una enzima, radioisótopos, etiquetas magnéticas, fluorescencia o similares, y/o pueden estar inmovilizados en un soporte tal como una placa de microtitulación o bio-chip.

Un "inmunoensayo" o "ensayo inmunohistoquímico" es un ensayo bioquímico que detecta y/o cuantifica la cantidad o concentración de uno o más péptidos de interés (en el contexto de la presente invención ERK1 fosforilada en la serina 301 y ERK2 fosforilada en la serina 284), en una muestra. Para ello, la reacción emplea uno o más anticuerpos específicos de los antígenos que van a ser detectados. La cuantificación de la proteína puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, para lo cual el antígeno y/o el anticuerpo estarán preferiblemente marcados. El inmunoensayo al que se refiere la presente invención puede ser competitivo o no competitivo. En un inmunoensayo competitivo la señal detectada será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra. En un inmunoensayo no competitivo (tal como un ELISA en sándwich) la señal detectada es directamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra.

Ejemplos de inmunoensayos útiles para ser aplicados en el método de la presente invención son, pero sin limitarnos, inmunobloting (Western blot), inmunoprecipitación, ELISA, ensayo multiplex, ensayo dipstick, inmunoensayo en línea (LIA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoradiométrico (IRMA), inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, quimioluminiscencia, hemaglutinación pasiva, inmunomarcaje con partículas de oro (microscopía electrónica de transmisión), chips de lipopolisacárido (LPS) o proteína o mapa-x, PCR inmunocuantitativa en tiempo real (iqPCR), etiquetas electroquimioluminiscentes, inmunoensayos libres de etiquetas (por ejemplo, resonancia de plasmones superficiales), inmunoensayo fotoacústico, inmunoensayo con enzimas clonadas de donador (CEDIA), ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral, inmunoensayo magnético (MIA), inmunoensayo de fibra óptica envolvente (SOFIA), inmunoensayo basado en CD/DVD o aglutinación-PCR (ADAP).

El ensayo ELISA está basado en la inmovilización de un antígeno o anticuerpo en un soporte sólido, de manera que este sistema es posteriormente puesto en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario, el cual puede estar unido a una etiqueta o compuesto marcador. La técnica ELISA referida en la presente invención puede ser directa, indirecta o en sándwich.

El anticuerpo empleado en los métodos aquí descritos se encuentra preferiblemente

conjugado con un sistema de detección o se encuentra unido a un anticuerpo secundario el cual está acoplado a un sistema de detección. La señal producida como consecuencia de la reacción de marcaje se puede medir, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante espectrofotometría, quimioluminiscencia, espectrofluorometría, bioluminiscencia, calorimetría diferencial, ultracentrifugación analítica, interferometría, etc. Preferiblemente, la técnica empleada en la presente invención es quimioluminiscencia.

La expresión "recolectada antes de administrar el tratamiento con el inhibidor de BRAF" se refiere a una muestra biológica procedente del paciente cuando éste aún no ha recibido tratamiento previo con inhibidores de BRAF, preferiblemente con vemurafenib.

El término "muestra biológica aislada" se refiere, pero sin limitaciones, a cualquier tejido y/o fluido biológico obtenido u extraído de un sujeto o paciente que comprende células tumorales, es decir, células procedentes de un tumor. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, un tejido procedente de una biopsia tumoral o una muestra procedente de un aspirado por aguja fina, o puede ser un fluido biológico, por ejemplo, sangre, plasma, suero, linfa, fluido ascítico, orina, saliva o exudado glandular. La muestra biológica puede ser fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

El término "valor de referencia", tal y como se emplea en el método de la invención anteriormente descrito, es cualquier valor o rango de valores derivado de la cuantificación de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en una muestra biológica aislada de un paciente que se sabe que no responde adecuadamente al tratamiento con un inhibidor de BRAF, preferiblemente vemurafenib, o en una mezcla de muestras biológicas aisladas de pacientes de este tipo.

La "comparación" a la que se refiere a la etapa (b) del método de la invención puede llevarse a cabo de manera manual o automatizada.

Una cantidad "significativamente mayor" que un valor de referencia puede determinarse mediante varias herramientas estadísticas, tales como, por ejemplo, pero sin limitarnos, determinación de intervalos de confianza, determinación del p-valor, test T de Student, funciones discriminantes de Fisher, Kruskal-Wallis, ANOVA, Bonferroni, Mann-Whitney,

etc.

Las etapas (a) y (b) del método de la invención pueden ser total o parcialmente computarizadas. Además, el método de la invención puede comprender otras etapas  
5 adicionales, opcionales, por ejemplo, relacionadas con el pre-tratamiento de las muestras biológicas antes de su análisis.

En otra realización preferida del método de la invención, el inhibidor de la serina-treonina  
10 quinasa BRAF es vemurafenib y/o dabrafenib, más preferiblemente vemurafenib.

En otra realización preferida, el paciente al que le va a ser aplicado el método de la invención padece cáncer, en particular cáncer BRAF positivo, es decir, es un paciente de cáncer que presenta una mutación oncogénica en BRAF donde dicha mutación es preferiblemente en la V600, más preferiblemente la mutación es V600E.

15 Más preferiblemente, el cáncer es melanoma, aún más preferiblemente melanoma no resecable o metastásico con mutación de BRAF V600 positiva, o cáncer de pulmón no microcítico, aún más preferiblemente cáncer de pulmón no microcítico avanzado con mutación de BRAF V600 positiva. En una realización particular, el cáncer es melanoma.

20 En una realización particular del método de la invención, el inhibidor de la serina-treonina quinasa BRAF es vemurafenib y el paciente padece melanoma.

En otra realización preferida, el paciente al que le va a ser aplicado el método de la  
25 invención es humano.

En otra realización preferida, la cuantificación de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 se lleva a cabo, en los métodos aquí descritos, mediante el uso de un anticuerpo que reconoce a ERK1 fosforilada en la serina 301 y a ERK2 fosforilada en la serina 284 específico frente al péptido que consiste  
30 en la SEQ ID NO: 1 (NRLFPNADSKALDLLDKML), es decir, mediante el anticuerpo de la invención descrito más abajo.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de tumores

de mama, preferiblemente invasivos, y/o de pulmón, preferiblemente microcíticos, en un paciente, donde dicho método comprende las siguientes etapas:

- a. Cuantificar los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en una muestra biológica aislada del paciente,
- 5 b. Comparar los niveles cuantificados en la etapa (a) con un valor de referencia, donde dicho valor de referencia procede de la cuantificación de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en una muestra biológica aislada de un paciente diagnosticado con el mismo tipo de cáncer que el paciente del paso (a) y que presenta un mal pronóstico,
- 10 y
- c. Asignar al paciente de la etapa (a) al grupo de individuos que presentarán un buen pronóstico cuando el valor de cuantificación obtenido en la etapa (a) es significativamente mayor que el valor de referencia de la etapa (b).

15 Se entiende por "mal pronóstico" la recaída, metástasis y/o ausencia de mejora en los síntomas del tumor, preferiblemente cáncer.

El anticuerpo descrito en la presente invención, el cual reconoce a ERK1 fosforilada en la serina 301 y a ERK2 fosforilada en la serina 284 y que es específico frente al péptido de SEQ ID NO: 1, ha sido diseñado por los inventores de la presente invención para desarrollar los métodos aquí descritos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo, que reconoce a ERK1 fosforilada en la serina 301 y a ERK2 fosforilada en la serina 284, específico frente al péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 (NRLFPNADSKALDLLDKML). De ahora en adelante se hará referencia a este anticuerpo como "anticuerpo de la invención".

Este anticuerpo de la invención es policlonal, es decir, ha sido generado mediante la inmunización de un animal, preferiblemente mamífero no humano, más preferiblemente conejo, con el péptido (antígeno) diseñado por los inventores que consiste en la SEQ ID NO: 1. Métodos de producción y purificación de anticuerpos policlonales mediante inmunización de un animal con el antígeno correspondiente son ampliamente conocidos por los expertos en la materia, y cualquiera de ellos podría emplearse para la obtención del anticuerpo de la invención.

En el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, la serina de la posición 9 se encuentra fosforilada, preferiblemente dicha serina ha sido fosforilada químicamente. Dicho péptido es 100% homólogo o idéntico entre los parálogos ERK1 y ERK2, por lo que el anticuerpo de la invención generado frente al mismo reconoce (se une, hibrida con) ambas proteínas fosforiladas en la serina 301 y 284 respectivamente.

Otro aspecto de la invención, se refiere a un péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 (NRLFPNADSKALDLLDKML), donde la serina de la posición 9 está fosforilada. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de dicho péptido para la generación del anticuerpo de la invención.

Preferiblemente, el anticuerpo de la invención se encuentra marcado. El término "marcado", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que el anticuerpo está conjugado con una etiqueta o sistema de detección. Son conocidos en el estado de la técnica un elevado número de etiquetas que pueden ser conjugadas a un anticuerpo. Ejemplos de dichas etiquetas son, pero sin limitarnos, radioisótopos [por ejemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ ], marcadores fluorescentes o luminiscentes [por ejemplo, fluoresceína (FITC), rodamina, rojo texas, GFP, ficoeritrina (PE), alofocianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA)]; anticuerpos secundarios o fragmentos de anticuerpos [por ejemplo, fragmentos F(ab)2], etiquetas de afinidad [por ejemplo, biotina, avidina, agarosa, proteína morfogenética del hueso (BMP), haptenos], enzimas o sustratos de enzimas [por ejemplo, fosfatasa alcalina (AP) y peroxidasa de rábano picante (HRP)].

La ventaja de marcar los anticuerpos es que éstos pueden ser detectados y su señal cuantificada.

Preferiblemente, el anticuerpo de la invención se encuentra inmovilizado en un soporte. El término "inmovilizado", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que el anticuerpo está unido a un soporte sin perder su actividad de inmunoreacción con su antígeno (péptido de SEQ ID NO: 1). Preferiblemente, el soporte es la superficie de una matriz (por ejemplo, una matriz de nylon o látex), una membrana, una placa de

microtitulación (por ejemplo, de 96 pocillos) o soporte de plástico, silicona, vidrio o similar, o bien cuentas (por ejemplo esferas, preferiblemente esferas de agarosa o microesferas pequeñas superparamagnéticas compuestas de matrices biodegradables), gel, soporte celulósico, resina de adsorción o similares. En general, cualquier superficie sólida que permita la unión, directa o indirecta, mediante enlace covalente o no covalente, del anticuerpo de la invención puede ser empleado. Además, el soporte puede estar en forma de varilla, tira reactiva, papel, cuenta de látex, microesfera, array, placa multipocillo o similar.

Más preferiblemente, el anticuerpo de la invención se encuentra marcado e inmovilizado. Aun más preferiblemente, dicho marcaje se da a través de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano.

El anticuerpo descrito en la presente invención puede ser humano, humanizado, recombinante, monoclonal, quimérico, conjugado, etc. Dentro del alcance de la presente invención también se incluyen fragmentos inmunológicamente activos del anticuerpo de la invención. Ejemplos de dichos fragmentos son, pero sin limitarnos, un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', F<sub>sc</sub> o Fv.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit, útil para ser empleado en los métodos aquí descritos, de ahora en adelante "kit de la invención", que comprende el anticuerpo de la invención, donde dicho anticuerpo puede o no estar marcado y/o inmovilizado como se ha descrito anteriormente.

Este kit comprende, preferiblemente, todos aquellos elementos necesarios para predecir la respuesta terapéutica al tratamiento con un fármaco inhibidor de BRAF en un paciente o para pronosticar (la evolución de) tumores de mama, preferiblemente invasivos, y/o de pulmón, preferiblemente microcíticos, en un paciente, según los métodos descritos anteriormente. Así, el kit de la invención puede comprender elementos tales como, por ejemplo pero sin limitarnos, soluciones de conservación, tampones, diluyentes, filtros, vehículos, enzimas, tales como polimerasas, cofactores necesarios para obtener una actividad óptima de dichas enzimas, etc. El kit puede comprender todos aquellos soportes y recipientes necesarios para la implementación de los métodos aquí descritos. El kit puede comprender además otras moléculas, genes, proteínas o sondas,

adecuados como controles positivos o negativos. Preferiblemente, el kit de la invención comprende además instrucciones sobre cómo llevar a cabo los métodos aquí descritos, etiquetas para identificar los diferentes elementos comprendidos en el kit y su aplicación y/o listados de los componentes comprendidos en el kit.

5 El kit de la invención puede comprender, en diferentes combinaciones, cebadores u oligonucleótidos y sondas control, anticuerpos secundarios que sirvan para el marcaje a través de su conjugación con un sistema de detección y/o anticuerpos control que sirvan para la normalización de los niveles de expresión, reactivos, señales de detección, instrumentos necesarios para el procesamiento y puesta en marcha de  
10 arrays, fluorocromos, sondas de marcaje, sustratos necesarios para la activación o iniciación de la reacción de marcaje por el sistema de conjugación seleccionado, soluciones de bloqueo, de parada y/o de lavado, o similares. Las sondas, cebadores y/o anticuerpos control pueden ser específicos de genes, proteínas o péptidos expresados constitutivamente por las células en la muestra biológica analizada, de manera que su  
15 aplicación permita asegurar que los valores de los niveles de expresión de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 medidos en la muestra son fiables y correctos.

El kit puede también comprender medios adecuados para albergar y conservar la  
20 muestra biológica que va a ser analizada en los métodos aquí descritos. Dichos medios pueden ser, por ejemplo, un contenedor adecuado para contener una muestra de una biopsia o aspirado tumoral. Así, dicho kit puede comprender un contenedor tal como botellas, viales, jeringas o tubos de ensayo. Dicho contenedor puede estar hecho de, por ejemplo, pero sin limitarnos, vidrio o plástico o cualquier otro material adecuado para la  
25 conservación de la muestra biológica en condiciones óptimas.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del anticuerpo de la invención o del kit de la invención para predecir *in vitro* la respuesta terapéutica al tratamiento con un fármaco inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF en un paciente, o para pronosticar *in vitro*  
30 (la evolución de) tumores de mama, preferiblemente invasivos, y/o de pulmón, preferiblemente microcíticos, en un paciente, más preferiblemente mediante los métodos anteriormente descritos.

En una realización preferida de dicho uso, el inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF

es vemurafenib y/o dabrafenib, preferiblemente vemurafenib.

En otra realización preferida, el paciente padece cáncer, en particular cáncer BRAF positivo, es decir, es un paciente de cáncer que presenta una mutación oncogénica en  
5 BRAF, donde dicha mutación es preferiblemente en la V600, más preferiblemente la mutación es V600E.

Más preferiblemente, el cáncer es melanoma, aún más preferiblemente melanoma no resecable o metastásico con mutación de BRAF V600 positiva, o cáncer de pulmón no  
10 microcítico, aún más preferiblemente cáncer de pulmón no microcítico avanzado con mutación de BRAF V600 positiva. En una realización particular, el cáncer es melanoma.

En la realización más preferida, el inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF es  
15 vemurafenib y el paciente padece melanoma.

En otra realización preferida, el paciente es humano.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de información o datos útiles para predecir la respuesta terapéutica al tratamiento con un fármaco  
20 inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF en un paciente, donde dicho método comprende las siguientes etapas:

- a. Cuantificar los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en una muestra biológica aislada del paciente (recolectada antes de administrar el tratamiento con el inhibidor de BRAF), y  
25
- b. Comparar los niveles cuantificados en la etapa (a) con un valor de referencia, donde dicho valor de referencia procede de la cuantificación de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en una muestra biológica aislada de un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF.

30 Estas etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo como se ha explicado anteriormente para el método de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar a un paciente

que padece cáncer BRAF positivo, preferiblemente melanoma BRAF positivo, que comprende: (a) identificar al paciente como respondedor o no respondedor al tratamiento con inhibidores de BRAF, preferiblemente al tratamiento con vemurafenib, según el método de la invención; y (b) administrar dicho tratamiento al paciente cuando

5 en la etapa (a) se ha determinado que es un paciente respondedor al mismo.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los

10 siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos del ámbito de protección de la presente invención.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1. Especificidad del anticuerpo de la invención (anticuerpo anti-fosfo ser284/301).** Células HEK294 fueron transfectadas con ERK2 humana (Hs) o de pez zebra (Dr), donde el residuo homólogo de la serina 284 es una prolina, por tanto, no fosforilable. Se observa que el anticuerpo sólo reconoce ERK2 humana, en células bajo estimulación, en este caso con EGF. Un anticuerpo anti-FLAG fue utilizado como control.

15

**Fig. 2. ERK1/2 fosforiladas en ser 301/284 se localizan exclusivamente en el citoplasma.** Células HeLa fueron estimuladas con EGF por 5 min, y la localización subcelular de ERK1/2 endógenas fosforiladas en los antedichos residuos se analizó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se observa que ERK1/2 fosforiladas en dichas posiciones están completamente excluidas del núcleo, marcado con DAPI.

20

25

**Fig. 3. Correlación entre los niveles de ERK1/2 fosforiladas en ser 301/284 y la sensibilidad a vemurafenib.** De la línea celular de melanoma BRAF positivo M249, se obtuvo una sublínea resistente a vemurafenib (vemR) y los niveles de fosfo-ser 284/301 se analizaron en dicha sublínea en comparación con la línea parental. Se observa, que dichos niveles son muy superiores en la línea parental, sensible a vemurafenib.

30

Fig. 4. **Correlación entre los niveles de ERK1/2 fosforiladas en ser 301/284 y la sensibilidad a vemurafenib.** Se evaluó la sensibilidad al vemurafenib en distintas líneas de melanoma, analizando la reducción en la actividad total de ERK1/2, medida por la bajada en los niveles de fosforilación canónica (p-ERK). Se observa que las líneas más sensibles son 8505C y A375P. Los niveles de fosfo-ser 284/301 también se analizaron en dichas líneas. Se observa que dichos niveles, antes del tratamiento con vemurafenib, son muy superiores a los observados en las líneas resistentes MELJUSO y SKMEL2.

Fig. 5. **Sensibilidad a vemurafenib de las líneas de melanoma utilizadas en la Fig. 4, evaluada por la concentración necesaria para parar la proliferación (GI50).** Se observa que las líneas más sensibles son 8505C y A375P, las cuales muestran los niveles más altos de fosfo-ser 284/301 en la FIG. 4.

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del método de la invención y del anticuerpo generado para ser empleado en dicho método.

### Ejemplo 1. Material y métodos.

**Las líneas celulares empleadas en los ensayos fueron:**

- HEK293T: Células embrionarias de riñón humano, antígeno T positivas.
- HeLa: células epiteliales de cáncer de cuello uterino.
- A375p: células epiteliales de melanoma, presentan mutación en BRAF.
- SKMEL2: células epiteliales de melanoma, presentan mutación en BRAF.
- M249 parental y M249 resistente a Vemurafenib: células epiteliales de melanoma, presentan mutación en BRAF.
- Mel JUSO: células epiteliales de melanoma.

Las líneas celulares se crecieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y antibióticos (Penicilina y Estreptomina).

**Western blot:**

5 Para la obtención de los extractos totales de proteína las células se lisaron con el volumen adecuado de tampón de lisis (20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EGTA, 40 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1% detergente no iónico NP40, 2,5 mM  $MgCl_2$ , 1mM ortovanadato, 1mM DTT y extemporáneamente 10 $\mu$ g/ml aprotinina y 10 $\mu$ g/ml leupeptina). Las células se recogieron y se centrifugaron a 12.000 rpm, durante 10 minutos y a 4°C. Se separaron los extractos de proteínas del resto de componentes de las células y se procedió a la

10 cuantificación de la concentración proteica de cada lisado. Para la determinación de la cantidad de proteína se usó el método de Bradford. Se tomaron aproximadamente 50  $\mu$ g de proteína, a los que se añadió tampón Laemli 5X (100 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 20 mM DTT y 0,005% azul de bromofenol). Tras hervir las muestras durante cinco minutos, se sometieron a electroforesis en un gel vertical de poliacrilamida

15 -SDS (dodecil sulfato sódico)- PAGE de un porcentaje del 12% de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa fijando el amperaje en 400 mA durante 1 hora. Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente y con agitación, en una solución de TBS-T con un 4% de BSA, para bloquear los sitios inespecíficos. Tras ello, los filtros fueron incubados con

20 el anticuerpo primario fosfoespecífico de la invención (0,2-0,4  $\mu$ g/ml diluido en BSA al 4% en TBS-T) durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación. Se realizaron dos lavados con TBS-T durante un total de quince minutos, tras los cuales se incubaron los filtros con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, diluido 1:5.000 o 1:10.000 en BSA al 0,4% en TBS-T durante

25 una hora a temperatura ambiente. Se realizaron de nuevo dos lavados con TBS-T y se procedió a la detección de la proteína por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL. Se realizó una autorradiografía de los filtros con películas Kónica que permitió detectar una banda allí donde el anticuerpo primario había reconocido de forma específica la proteína fosforilada de interés. Como control de carga interno se utilizó un anticuerpo específico

30 que reconoce la proteína total de interés.

**Inmunofluorescencia**

Las células se crecieron en DMEM 10% Suero fetal Bovino hasta subconfluencia sobre

5 cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro estériles. En el momento de hacer la inmunofluorescencia, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído en PBS 1X, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron incubando durante 5 minutos con una dilución 0,5% de Tritón X-100 en PBS, seguido de tres lavados de PBS 1X de cinco minutos cada uno. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario fosfoespecífico de la invención a una concentración 1/100 durante una hora en una cámara húmeda. Tras tres lavados con PBS, de cinco minutos cada uno, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo FITC y se incubó durante 45-50 minutos en una cámara húmeda y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se realizaron dos nuevos lavados, de cinco minutos cada uno, con PBS 1X. Por último, se añadió sobre un portaobjetos una gota de medio de montaje Prolong con DAPI y posteriormente se colocó encima el cubre con las células hacia abajo. Las células se examinaron mediante microscopía confocal (Leica TCS SP8). Las imágenes se digitalizaron y procesaron utilizando el programa Fiji Image J.

### Inmunohistoquímica

20 Las muestras de tejido o los pellets celulares fueron fijadas con paraformaldehído al 4% e incluidas en parafina. Los cortes fueron montados en portaobjetos con carga positiva (Genex-brand®), recomendados para inmunohistoquímica. El desparafinado se logró mediante el pase de los cortes por xileno (10 min), y graduaciones decrecientes de alcohol etílico (100° 10 min, 96° 5 min, y 70° 5 min). Se llevó a cabo un bloqueo de la actividad endógena peroxidasa mediante incubación de los cortes en solución de peróxido de hidrógeno 3% en metanol por 15 min, e incubación en agua destilada por 10 min. Posteriormente, los cortes se incubaron con una solución de albúmina bovina sérica BSA 1% en buffer TBST por 30 min con la intención de bloquear sitios de unión inespecíficos. Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo fosfoespecífico de la invención a una dilución 1:100 en PBS, durante toda la noche a 4 °C, en cámara húmeda. El revelado de la reacción se llevó a cabo mediante la técnica de DAB cromogen de DAKO. La coloración de contraste se realizó sumergiendo los cortes en hematoxilina de Mayer durante 1 min; luego se colocaron bajo un flujo de agua corriente para el revelado. El montaje se realizó con medio de montaje acuoso (VectaMount AQ, Vector Lab Ind). La observación de las preparaciones se hizo en un microscopio Nikon.

Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Olympus C4000.

### Ejemplo 2. Resultados.

5 Para obtener un anticuerpo que reconociese específicamente la ser 301/284 fosforilada de ERK1/2, respectivamente, se inmunizaron conejos con el péptido consistente en la SEQ ID NO: 1 anteriormente mencionado, siguiendo los protocolos al uso rutinariamente utilizados para este fin. La inmunoreactividad del suero resultante fue analizada mediante western blot (Fig. 1) en células HEK293 transfectadas con plásmidos que  
10 codifican ERK2 humana (Hs) o de pez cebra (Dr). En esta última el residuo correspondiente a la serina 284 es una prolina (prolina 293), por lo que no es fosforilable, y sirve de control negativo. Se observó que tras la estimulación con EGF durante 5 min, que induce la fosforilación de los residuos canónicos TEY tanto en ERK2 humanas como de pez cebra, la fosforilación de ser 284 se detecta únicamente en ERK2 humana.

15

Una vez demostrada la especificidad del anticuerpo, se procedió a analizar la sublocalización celular de ERK1/2 fosforilada en ser 301/284. Para ello, se realizaron inmunofluorescencias en células HeLa, en ayuno (starved) o estimuladas con EGF durante 5 min (Fig. 2). Se observó, mediante microscopía confocal, que ERK1/2  
20 endógenas fosforiladas en ser 301/284 se localizan exclusivamente en el citoplasma, estando completamente excluidas del núcleo celular, teñido mediante DAPI.

Posteriormente, se analizó la correlación de los niveles de ERK1/2 fosforilada en ser 301/284 con la sensibilidad hacia los inhibidores de BRAF en células de melanoma portadoras de mutaciones en BRAF. Para este menester se utilizó la línea celular M249,  
25 de la cual se obtuvo una sublínea resistente a vemurafenib (vemR). Los niveles de ERK1/2 endógenas fosforiladas en ser 301/284 se analizaron mediante western blot (FIG. 3) comparando la sublínea resistente con la línea parental, sensible al vemurafenib. Se observó que los niveles de fosfo-ser 301/284 son muy superiores en la  
30 línea parental, sensible a vemurafenib, demostrando una correlación positiva entre los niveles de fosfo-ser 301/284 y la respuesta al compuesto antitumoral.

Para verificar el anterior punto se evaluó la correlación entre los niveles de fosforilación de ser 284/301 en ERK1/2 y la sensibilidad al vemurafenib en distintas líneas de

melanoma. Se observó que la reducción en la actividad total de ERK1/2, medida por la bajada en los niveles de fosforilación canónica (p-ERK) mediante western blot, tras el tratamiento de las distintas líneas celulares con vemurafenib, se correlacionaba con los mayores niveles de fosfo-ser 284/301. Se observa que dichos niveles antes del

5 tratamiento con vemurafenib son muy superiores en las líneas más sensibles, 8505C y A375P, a los observados en las líneas más resistentes, MELJUSO y SKMEL2 (FIG. 4). Esta correlación también se observa cuando se evalúa la concentración de vemurafenib necesaria para parar la proliferación (GI50) de las distintas líneas celulares de melanoma (FIG. 5). Se observa que las líneas más sensibles al tratamiento con

10 vemurafenib son 8505C y A375P, las cuales muestran los niveles más altos de fosfo-ser 284/301 en la FIG 4.

15

### REIVINDICACIONES

1. Uso de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de los niveles de ERK2 fosforilada en la serina 284 como biomarcador para predecir *in vitro* la respuesta al tratamiento con un inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF en un paciente.  
5
2. Uso según la reivindicación 1, donde el inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF es vemurafenib y/o dabrafenib.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el paciente padece cáncer.
4. Uso según la reivindicación 3, donde el cáncer es melanoma o cáncer de pulmón no microcítico.  
15
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF es vemurafenib y el paciente padece melanoma.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el paciente es humano.  
20
7. Método *in vitro* para predecir la respuesta al tratamiento con un inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF en un paciente, donde dicho método comprende las siguientes etapas:
  - 25 a. Cuantificar los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en una muestra biológica aislada del paciente,
  - b. Comparar los niveles cuantificados en la etapa (a) con un valor de referencia, donde dicho valor de referencia procede de la cuantificación de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 en una muestra biológica aislada de un paciente que no responde al tratamiento con un inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF, y  
30
  - c. Asignar al paciente de la etapa (a) al grupo de individuos que responderán adecuadamente al tratamiento cuando el valor de cuantificación obtenido en la etapa (a) es significativamente mayor que el valor de referencia.

8. Método según la reivindicación 7, donde el inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF es vemurafenib y/o dabrafenib.
- 5 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, donde el paciente padece cáncer.
10. Método según la reivindicación 9, donde el cáncer es melanoma o cáncer de pulmón no microcítico.
- 10 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde el inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF es vemurafenib y el paciente padece melanoma.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde el paciente es humano.
- 15 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, donde la cuantificación de los niveles de ERK1 fosforilada en la serina 301 y de ERK2 fosforilada en la serina 284 se lleva a cabo mediante el uso de un anticuerpo específico frente al péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1.
- 20 14. Un anticuerpo específico frente al péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1.
15. Kit que comprende el anticuerpo según la reivindicación 14.
- 25 16. Uso del anticuerpo según la reivindicación 14 o del kit según la reivindicación 15 para predecir *in vitro* la respuesta al tratamiento con un inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF en un paciente.
17. Uso según la reivindicación 16, donde el inhibidor de la serina-treonina kinasa BRAF es vemurafenib y/o dabrafenib.
- 30 18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, donde el paciente padece cáncer.

19. Uso según la reivindicación 18, donde el cáncer es melanoma o cáncer de pulmón no microcítico.
20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde el inhibidor de la serina-  
5 treonina kinasa BRAF es vemurafenib y el paciente padece melanoma.
21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, donde el paciente es humano.

Fig. 1

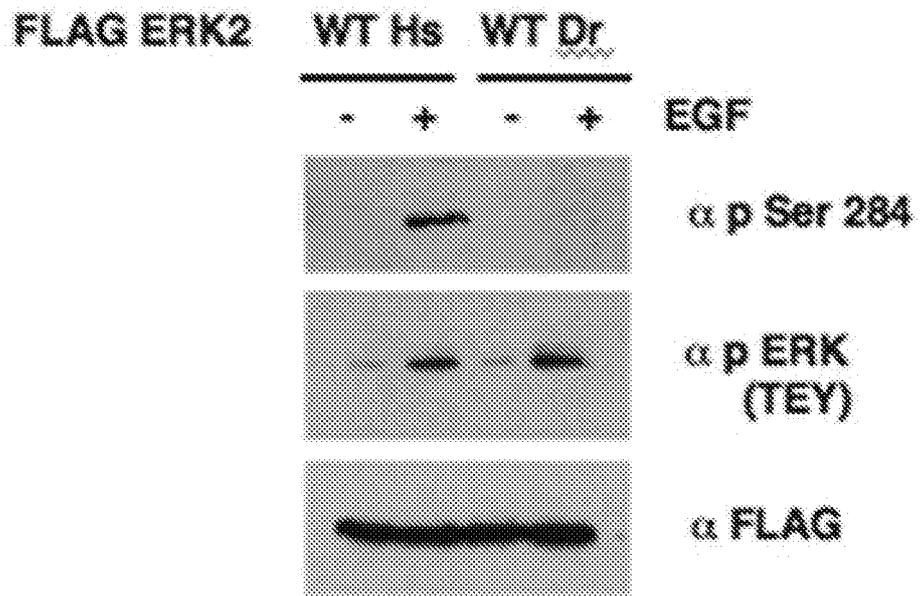


Fig. 2

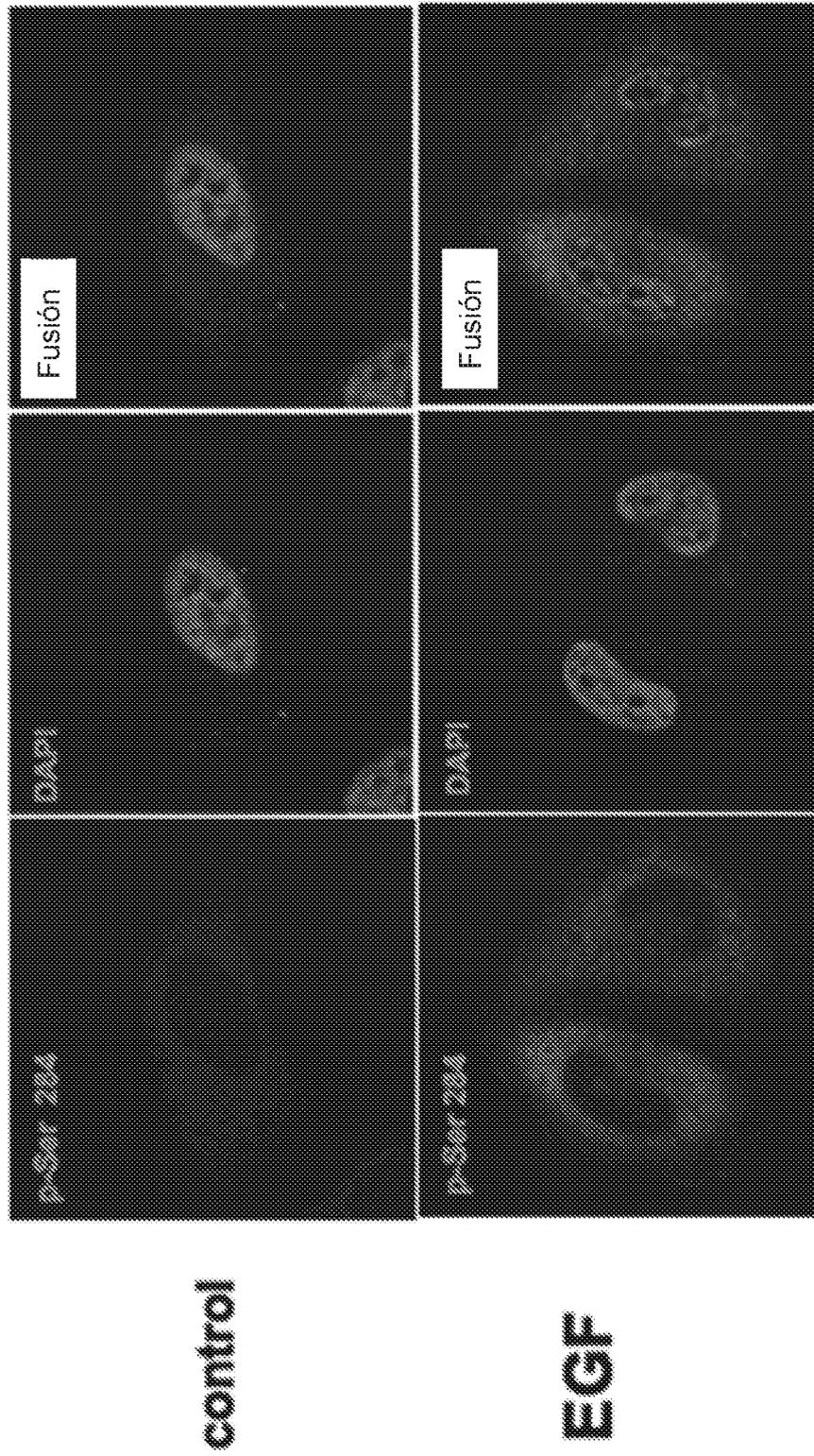


Fig. 3

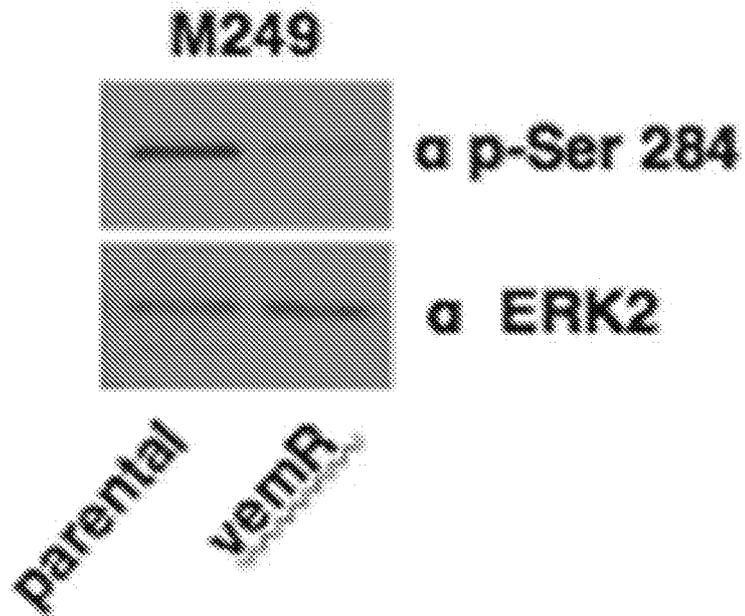


Fig. 4

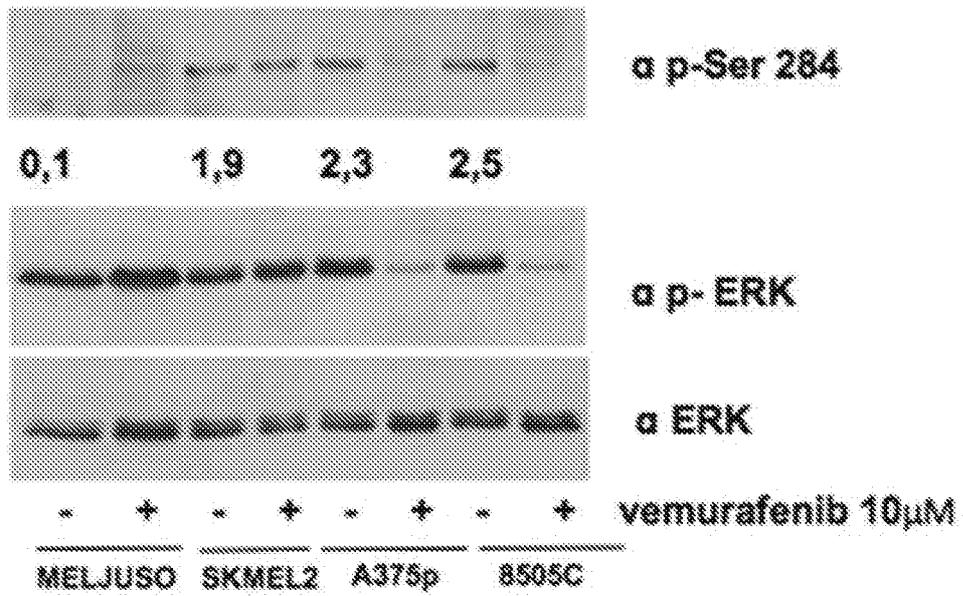
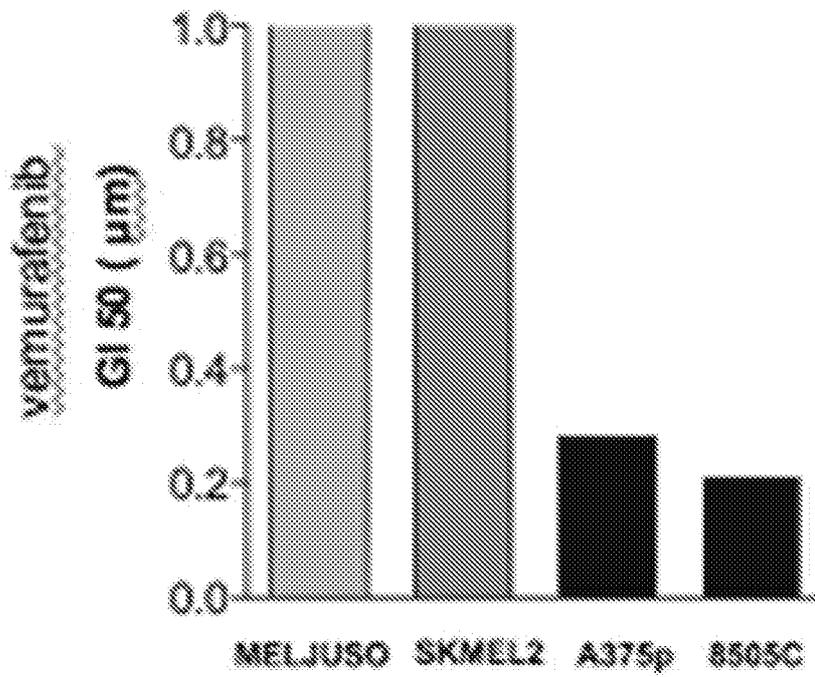


Fig. 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2020/070308

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, G01N, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, UNIPARC, REGISTRY, DGENE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TRUNZER, K. et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. <i>Journal of Clinical Oncology</i>. May 2013, Vol. 31, N° 14, pages 1767 – 1774. ISSN 1527-7755 (electronic), &lt;DOI: 10.1200/JCO.2012.44.7888&gt;. Especially: page 1771, right column; figure 2; table A1.</p>	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  
22/07/2020

Date of mailing of the international search report  
(23/07/2020)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
E. Relaño Reyes

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498504

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2020/070308

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PORCELLI, L. et al. Aurora kinase B inhibition reduces the proliferation of metastatic melanoma cells and enhances the response to chemotherapy. <i>Journal of Translational Medicine</i> . January 2015, Vol. 13, Article N° 26. ISSN 1479-5876, <DOI: 10.1186/s12967-015-0385-4>. Especially: page 4, right column.	1-21
A	BOLLAG, G. et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. <i>Nature</i> . September 2010, Vol. 467, N° 7315, pages 596 – 599. ISSN 0028-0836, <DOI: 10.1038/nature09454>. Especially: page 4, last paragraph.	1-21
A	OPPERMANN, F. S. et al. Large-scale proteomics analysis of the human kinome. <i>Molecular &amp; Cellular Proteomics</i> . July 2009, Vol. 8, N° 7, pages 1751 – 1764. ISSN 1535-9476, <DOI: 10.1074/mcp.M800588-MCP200>. Especially: supplementary table 6.	1, 7, 13-15

**CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

*C07K16/40* (2006.01)

*G01N33/573* (2006.01)

*C12N9/12* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2020/070308

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD  
Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
C07K, G01N, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)  
EPODOC, INVENES, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, UNIPARC, REGISTRY, DGENE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	TRUNZER, K. et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. <i>Journal of Clinical Oncology</i> . Mayo 2013, Vol. 31, Nº 14, páginas 1767 – 1774. ISSN 1527-7755 (electrónico), <DOI: 10.1200/JCO.2012.44.7888>. Especialmente: página 1771, columna derecha; figura 2; tabla A1.	1-21

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
22/07/2020

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**23 de julio de 2020 (23/07/2020)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
E. Relaño Reyes

Nº de teléfono 91 3498504

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2020/070308

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	<p>PORCELLI, L. et al. Aurora kinase B inhibition reduces the proliferation of metastatic melanoma cells and enhances the response to chemotherapy. <i>Journal of Translational Medicine</i>. Enero 2015, Vol. 13, N° artículo 26. ISSN 1479-5876, &lt;DOI: 10.1186/s12967-015-0385-4&gt;. Especialmente: página 4, columna derecha.</p>	1-21
A	<p>BOLLAG, G. et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. <i>Nature</i>. Septiembre 2010, Vol. 467, N° 7315, páginas 596 – 599. ISSN 0028-0836, &lt;DOI: 10.1038/nature09454&gt;. Especialmente: página 4, último párrafo.</p>	1-21
A	<p>OPPERMANN, F. S. et al. Large-scale proteomics analysis of the human kinome. <i>Molecular &amp; Cellular Proteomics</i>. Julio 2009, Vol. 8, N° 7, páginas 1751 – 1764. ISSN 1535-9476, &lt;DOI: 10.1074/mcp.M800588-MCP200&gt;. Especialmente: tabla suplementaria 6.</p>	1, 7, 13-15

**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

***C07K16/40*** (2006.01)

***G01N33/573*** (2006.01)

***C12N9/12*** (2006.01)