

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 450**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06814954 .1**
96 Fecha de presentación: **19.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1926996**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2008**

54 Título: **MARCADORES BIOLÓGICOS PREDICTIVOS DE RESPUESTA ANTICANCERÍGENA PARA INHIBIDORES DE CINASA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO 1 SIMILAR A INSULINA.**

30 Prioridad:
20.09.2005 US 718643 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2012

73 Titular/es:
**OSI Pharmaceuticals, LLC
1 Bioscience Park Drive
Farmingdale, NY 11735, US**

72 Inventor/es:
HALEY, John, D.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 450 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 biológicos predictivos de respuesta anticancerígena para inhibidores de cinasa del receptor del factor de crecimiento 1 similar a insulina

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para diagnosticar y tratar pacientes de cáncer. En particular, la presente invención se refiere a procedimientos para determinar qué pacientes se beneficiarán más de tratamiento con un inhibidor de cinasa del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1R).

10 El cáncer es un nombre genérico para una amplia gama de malignidades celulares caracterizadas por crecimiento desregulado, falta de diferenciación y por la capacidad de invadir tejidos locales y metastatizar. Estas malignidades neoplásicas afectan, en diversos grados de prevalencia, cada tejido y cada órgano en el cuerpo.

15 Una multitud de agentes terapéuticos se han desarrollado durante los últimos decenios para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Los tipos de agentes anticancerígenos más comúnmente usados incluyen: agentes alquilantes del ADN (p. ej., ciclofosfamida, ifosfamida), antimetabolitos (p. ej., metotrexato, un antagonista de folato y 5-fluorouracilo, un antagonista de pirimidina), desbaratadores de microtúbulos (p. ej., vincristina, vinblastina, paclitaxel), intercalantes de ADN (p. ej., doxorubicina, daunomicina, cisplatina) y terapia hormonal (p. ej., tamoxifeno, flutamida).

20 IGF-1R es un RTK transmembrana que se une principalmente a IGF-1 pero también a IGF-II e insulina con afinidad más baja. La unión de IGF-1 a su receptor da como resultado oligomerización del receptor, activación de tirosina cinasa, autofosforilación del receptor intermolecular y fosforilación de sustratos celulares (los sustratos importantes son IRS1 y Shc). El IGF-1R activado por ligando induce la actividad mitogénica en células normales y desempeña un papel importante en el crecimiento anormal. Un papel fisiológico principal del sistema de IGF-1 es la promoción de crecimiento y regeneración normales. IGF-1R (receptor de factor de crecimiento de tipo I similar a insulina) sobreexpresado puede iniciar mitogénesis y promover transformación neoplásica dependiente de ligando. Además, IGF-1R desempeña un papel importante en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo maligno. A diferencia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), no se han identificado formas oncogénicas mutantes del IGF-1R. Sin embargo, se ha demostrado que varios oncogenes afectan a la expresión de IGF-1 e IGF-1R. Se ha visto la correlación entre una reducción de la expresión de IGF-1R y la resistencia a la transformación. La exposición de las células al ARNm antisentido para ARN de IGF-1R evita el crecimiento en agar blando de varias líneas celulares de tumores humanos. IGF-1R aboga la progresión a apoptosis, tanto *in vivo* como *in vitro*. También se ha demostrado que una disminución en el nivel de IGF-1R por debajo de niveles naturales provoca la apoptosis de células tumorales *in vivo*. Parece que la capacidad de disrupción de IGF-1R para causar apoptosis está disminuida en células normales, no tumorigénicas.

35 La ruta de IGF-1 en desarrollo de tumor humano tiene un papel importante. La sobreexpresión de IGF-1R se encuentra frecuentemente en diversos tumores (mama, colon, pulmón, sarcoma) y a menudo está asociada con un fenotipo agresivo. Las concentraciones de IGF1 en circulación altas están fuertemente correlacionadas con riesgo de cáncer de próstata, de pulmón y de mama. Además, el IGF-1R se requiere para el establecimiento y mantenimiento del fenotipo transformado *in vitro* e *in vivo* (Baserga R. Exp. Cell. Res., 1999, 253, 1-6). La actividad de cinasa de IGF-1R es esencial para la actividad de transformación de varios oncogenes: EGFR, PDGFR, antígeno T de SV40, Ras activado, Raf, y v-Src. La expresión de IGF-1R en fibroblastos normales induce fenotipos neoplásicos, que después pueden formar tumores *in vivo*. La expresión de IGF-1R desempeña un papel importante en el crecimiento independiente de la fijación. También se ha demostrado que IGF-1R protege las células de la apoptosis inducida por quimioterapia, radiación y citocina. En cambio, se ha demostrado que la inhibición de IGF-1R endógeno por IGF-1R negativo dominante, la formación de triple hélice o el vector de expresión antisentido reprimen la actividad de transformación *in vitro* y el crecimiento tumoral en modelos animales.

45 Se ha reconocido que los inhibidores de las tirosina cinasas de proteínas son útiles como inhibidores selectivos del crecimiento de células cancerosas de mamíferos. Por ejemplo, Gleevec™ (también conocido como mesilato de imatinib), un inhibidor de tirosina cinasa de 2-fenilpirimidina que inhibe la actividad cinasa del producto del gen de fusión BCR-ABL, se ha aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para el tratamiento de CML. El compuesto de 4-anilinoquinazolína Tarceva™ (erlotinib HCl) también ha sido recientemente aprobado por la FDA e inhibe selectivamente cinasa de receptor EGF con alta potencia. El desarrollo para usar como agentes antitumorales de compuestos que inhiben directamente la actividad cinasa de IGF-1R, así como anticuerpos que reducen la actividad cinasa de IGF-1R bloqueando activación de IGF-1R u oligonucleótidos que bloquean la expresión de IGF-1R, son áreas de esfuerzo de investigación intenso (p. ej. véase Larsson, O. y cols. (2005) Brit. J. Cancer 92: 2097-2101; Ibrahim, Y.H. y Yee, D. (2005) Clin. Cancer Res. 1 :944s-950s; Mitsiades, C.S. y cols. (2004) Cancer Cell 5: 221-230; Camirand, A. y cols. (2005) Breast Cancer Research 7: R570-R579 (DOI 10.1186/bcr1028); Camirand, A. y Pollak, M. (2004) Brit. J. Cancer 90: 1825-1829; García-Echeverría, C. y cols. (2004) Cancer Cell 5: 231-239).

Un fármaco antineoplásico eliminaría idealmente a las células cancerosas selectivamente, con un amplio índice terapéutico relativo a su toxicidad hacia células no malignas. También retendría su eficacia contra células malignas, incluso después de exposición prolongada al fármaco. Desafortunadamente, ninguna de las quimioterapias actuales posee un perfil ideal tal. En cambio, la mayoría posee índices terapéuticos muy estrechos. Además, las células cancerosas expuestas a concentraciones ligeramente subletales de un agente quimioterapéutico desarrollarán muy a menudo resistencia a un agente tal y bastante a menudo resistencia cruzada a algunos otros agentes antineoplásicos también. Adicionalmente, para cualquier tipo de cáncer dado no se puede predecir frecuentemente qué paciente es probable que responda a un tratamiento particular, incluso con terapias dirigidas a genes más nuevas, tales como inhibidores de proteína-tirosina cinasa, necesitándose así considerable ensayo y error, a menudo un riesgo y malestar considerables para el paciente, con el fin de encontrar la terapia más efectiva.

Así, hay una necesidad de tratamiento más eficaz para neoplasia y otros proliferativos y para medios más efectivos para determinar qué tumores responderán a qué tratamiento. Las estrategias para potenciar la eficacia terapéutica de los fármacos existentes han implicado cambios en el programa para su administración y también su uso en combinación con otros agentes anticancerígenos o agentes moduladores bioquímicos. La terapia de combinación se conoce bien como un procedimiento que puede dar como resultado mayor eficacia y efectos secundarios disminuidos relativos al uso de la dosis relevante terapéutica de cada agente solo. En algunos casos, la eficacia de la combinación de fármacos es aditiva (la eficacia de la combinación es aproximadamente igual a la suma de los efectos de cada fármaco solo), pero en otros casos el efecto es sinérgico (la eficacia de la combinación es más grande que la suma de los efectos de cada fármaco dado solo). Las aproximaciones terapéuticas específicas de objetivo están generalmente asociadas con toxicidad reducida comparadas con agentes citotóxicos convencionales y por lo tanto se permiten usar las mismas en regímenes de combinación.

El documento WO2004/086038 se refiere a un procedimiento para rastrear compuestos que inhiben transición epitelial-mesenquimal. Hayley, J. y cols. (2005) *Molecular & Cellular Proteomics* 4 (8): S433 relates to regulation of NSCLC cell sensitivity to EGF receptor inhibition by epithelial-mesenchymal transition. Mitsiades, C.S y cols. (2002) 100(11): 170A se refiere al sistema de IGF/IGF-1R como un objetivo terapéutico principal para mieloma múltiple y otras neoplasias. El documento WO2005/009373 se refiere a los compuestos capaces de inhibir y/o regular transducción de señales de tirosina cinasas tanto de tipo receptor como de tipo no receptor. Zhang, H. y cols. (2005) 29: 213-219 se refiere a la existencia de células de epiteliales a mesenquimales con la capacidad de respaldar hematopoyesis en hígado fetal humano.

Varios grupos han investigado biomarcadores potenciales para predecir una respuesta de paciente a inhibidores de proteína-tirosina cinasa, por ejemplo inhibidores de EGFR (véanse por ejemplo, publicaciones de PCT: WO 2004/063709, WO 2005/017493, WO 2004/111273 y WO 2004/071572; y Solicitudes de Patente publicadas de los EE.UU.: US 2005/0019785 y US 2004/0132097). Sin embargo, ninguna prueba diagnóstica o de pronóstico ha surgido aún que pueda guiar la práctica de los médicos en el tratamiento de sus pacientes con tales inhibidores.

Así, permanece una necesidad crítica de procedimientos mejorados para determinar el mejor modo de tratamiento para cualquier paciente de cáncer dado. La presente invención proporciona procedimientos para determinar qué tumores responderán más efectivamente a tratamiento con inhibidores de cinasa de IGF-1R basados en si las células tumorales han sufrido una transición epitelial a mesenquimal ("EMT"; Thiery, J.P. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2: 442-454; Savagner, P. (2001) *Bioessays* 23: 912-923; Kang Y. y Massague, J. (2004) *Cell* 118: 277-279; Julien-Grille, S., y cols. *Cancer Research* 63: 2172-2178; Bates, R.C. y cols. (2003) *Current Biology* 13: 1721-1727; Lu Z., y cols. (2003) *Cancer Cell* 4 (6): 499-515) y para la incorporación de tales determinaciones en regímenes de tratamiento más efectivos para pacientes de cáncer, si tales inhibidores se usan como agentes individuales o combinados con otros agentes anticancerígenos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere en su sentido más amplio a procedimientos según se definen en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona procedimientos diagnósticos y de pronóstico para predecir la efectividad de tratamiento de un paciente de cáncer con un inhibidor de cinasa de IGF-1 R. En base al descubrimiento sorprendente de que la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R es dependiente de si tales células tumorales han sufrido una transdiferenciación epitelial a mesenquimal, se han ideado procedimientos para determinar biomarcadores epiteliales y/o mesenquimales para predecir la sensibilidad de las células tumorales a inhibidores de cinasa de IGF-1R.

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, γ -catenina, α -catenina, queratina 8 y queratina 18 expresado por una célula tumoral; y predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que, en relación al nivel de expresión del marcador epitelial en células no tumorales del mismo tejido, los niveles de expresión altos de biomarcadores epiteliales de células tumorales

correlacionan con alta sensibilidad a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R y los niveles de expresión bajos de biomarcador epitelial por las células tumorales correlacionan con baja sensibilidad a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento celular tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria expresados por una célula tumoral; y predecir la sensibilidad de crecimiento celular del tumor a inhibición por un inhibidor de cinasa IGF-1R, en la que en relación al nivel de expresión del biomarcador epitelial en células no tumorales del mismo tejido altos niveles de expresión de biomarcadores mesenquimales de células tumorales correlacionan con baja sensibilidad a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R y niveles bajos de expresión de biomarcador mesenquimal por la célula tumoral correlacionan con alta sensibilidad a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.

15 Se proporcionan también tratamientos mejorados para pacientes de cáncer con inhibidores de cinasa de IGF-1R que incorporan la metodología anterior. Así, la presente invención proporciona adicionalmente un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento para tratamiento de tumores o para tratamiento de metástasis de tumores en un paciente, en el que la responsividad probable del paciente a un inhibidor de cinasa IGF-1R se ha diagnosticado valorando si las células tumorales han sufrido una transición epitelial-mesenquimal usando la metodología mencionada anteriormente.

20 Se describe adicionalmente un procedimiento de identificar un biomarcador epitelial que es diagnóstico de tratamiento más efectivo de una afección neoplásica con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, comprende: medir el nivel de un biomarcador epitelial candidato en muestras que contengan células neoplásicas de pacientes con una afección neoplásica e identificar una correlación entre el nivel de dicho biomarcador epitelial candidato en la muestra del paciente con la efectividad de tratamiento de la afección neoplásica con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que una correlación de niveles altos del biomarcador epitelial con tratamiento más efectivo de la afección neoplásica con un inhibidor de cinasa de IGF-1R indica que dicho biomarcador epitelial es diagnóstico de tratamiento más efectivo de la afección neoplásica con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

25 Se describe adicionalmente un procedimiento de identificar un biomarcador mesenquimal que es diagnóstico de tratamiento menos efectivo de una afección neoplásica con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, comprende: (a) medir el nivel de un biomarcador mesenquimal candidato en muestras que contengan células neoplásicas de pacientes con una afección neoplásica y (b) identificar una correlación entre el nivel de dicho biomarcador mesenquimal candidato en la muestra del paciente con la efectividad de tratamiento de la afección neoplásica con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que una correlación de niveles altos del biomarcador mesenquimal con tratamiento menos efectivo de la afección neoplásica con un inhibidor de cinasa de IGF-1R indica que dicho biomarcador mesenquimal es diagnóstico de tratamiento menos efectivo de la afección neoplásica con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

30 Se describe adicionalmente un procedimiento para la identificación de un agente que potencia sensibilidad del crecimiento de una célula tumoral a un inhibidor de cinasa de IGF-1R, habiéndose caracterizado dicha célula tumoral como una que ha sufrido previamente una transición epitelial-mesenquimal, comprende poner en contacto una muestra de dichas células tumorales con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, poner en contacto una muestra idéntica de dichas células tumorales con un inhibidor de cinasa de IGF-1R en presencia de un agente de prueba, comparando la inhibición de crecimiento mediado por inhibidor de cinasa IGF-1R en presencia y ausencia del agente de prueba y determinando si el agente de prueba es un agente que potencia sensibilidad del crecimiento de la célula tumoral a un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Sensibilidad de líneas celulares de NSCLC a Compuesto 66 inhibidor de cinasa de IGF-1R.

45 Figura 2: Las líneas de NSCLC sensibles a inhibición de receptor de IGF-1 expresan niveles elevados de E-cadherina, con las tendencias observadas para cateninas γ y β para cateninas α . Se llevaron a cabo inmunotransferencias de E-cadherina con dos anticuerpos distintos con resultados similares (datos no mostrados). Las líneas NSCLC relativamente insensibles a inhibición de crecimiento por Compuesto 66 expresaron las proteínas mesenquimales vimentina y/o fibronectina.

50 Figura 3: Las líneas NSCLC se cultivaron como xenoinjertos subcutáneos en ratones SCID a un volumen de $\sim 500 \text{ mm}^3$, se escindieron y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido (4 animales por línea celular). El tejido tumoral se pulverizó mientras se congeló, se sometió a lisis de detergente y SDS-PAGE según se describe y las inmunotransferencias se probaron con anticuerpos a E-cadherina, catenina γ , Brk, fibronectina, vimentina y GAPDH. De forma consistente con los resultados *in vitro*, la expresión de E-cadherina estaba restringida a líneas sensibles a Compuesto 66 y de fibronectina a líneas relativamente insensibles.

Figura 4: Inmunotransferencia que muestra niveles de expresión de Brk más altos en líneas celulares NSCLC que son las más sensibles a inhibición de cinasa de IGF-1R.

Descripción detallada de la invención

5 El término "cáncer" en un animal hace referencia a la presencia de células que poseen características típicas de células que causan el cáncer, tales como proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastático, crecimiento rápido y velocidad de proliferación y ciertos rasgos morfológicos característicos. A menudo, las células de cáncer estarán en la forma de un tumor, pero tales células pueden existir solas dentro de un animal, o pueden circular en la corriente sanguínea como células independientes, tal como las células leucémicas.

10 "Crecimiento celular anormal", como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, se refiere un crecimiento celular que es independiente de mecanismos reguladores normales (por ejemplo, pérdida de inhibición por contacto). Esto incluye el crecimiento anormal de: (1) células tumorales (tumores) que proliferan expresando una tirosina cinasa mutada o por sobreexpresión de una tirosina cinasa receptora; (2) células benignas y malignas de otros trastornos proliferativos en los que se produce la activación de tirosina cinasa aberrante; (4) tumores cualesquiera que proliferan mediante las tirosina cinasas receptoras; (5) tumores cualesquiera que proliferan mediante activación de serina/treonina cinasa aberrante; y (6) células benignas y malignas de otros trastornos proliferativos en los que se produce la activación de serina/treonina cinasa aberrante.

15 El término "tratar" como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o impedir, bien parcialmente o bien completamente, el crecimiento de tumores, metástasis de tumores, u otras células causantes de cáncer o neoplásicas en un paciente. El término "tratamiento" como se usa en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, se refiere al acto de tratar.

20 La frase "un procedimiento de tratar" o su equivalente, cuándo se aplica a, por ejemplo, el cáncer se refiere a un procedimiento o curso de acción que está diseñado para reducir o eliminar el número de células de cáncer en un animal, o para aliviar los síntomas de un cáncer. "Un procedimiento de tratar" cáncer u otro trastorno proliferativo no significa necesariamente que las células cancerosas u otro trastorno se eliminarán, de hecho, que el número de células o el trastorno se reduzcan, de hecho, o que los síntomas de cáncer u otro trastorno se alivien, de hecho. A menudo, un procedimiento de tratar cáncer se llevará a cabo incluso con una baja probabilidad de éxito, pero lo cual, dada la historia médica y la expectativa de supervivencia estimada de un animal, se considera no obstante un curso de acción beneficioso en general.

El término "agente terapéuticamente eficaz" quiere decir una composición que facilitará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal, o ser humano que se está buscando por el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro profesional de la salud.

30 Los términos "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" quieren decir la cantidad del compuesto o combinación que facilitará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que se está buscando por el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro trabajador clínico.

Los datos presentados en los Ejemplos en el presente documento más adelante demuestran que las células tumorales, tales como las células NSCLC, bien crezcan en cultivo celular o bien *in vivo*, muestran un intervalo de sensibilidades a intervención con inhibidores de cinasa de IGF-1R, dependiendo de si han sufrido una transición epitelial a mesenquimal (EMT). Con anterioridad a EMT, las células tumorales son muy sensibles a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R tales como Compuesto 66, un inhibidor de cinasa de IGF-1R de bajo peso molecular potente (CI₅₀ de aproximadamente 50 nM) y selectivo, mientras que las células tumorales que han sufrido una EMT son sustancialmente menos sensibles a inhibición por tales compuestos. Los datos indican que la EMT puede ser un "cambio biológico general" que determina el nivel de sensibilidad de tumores a inhibidores de cinasa de IGF-1R. Está demostrado que el nivel de sensibilidad de tumores a inhibidores de cinasa de IGF-1R puede valorarse determinando el nivel de biomarcadores expresado por una célula tumoral que son característicos de células bien antes o bien subsiguientemente a un evento de EMT. Por ejemplo, niveles altos de expresión de células tumorales de biomarcadores epiteliales tales como E-cadherina, indicativos de una célula que aún no ha sufrido una EMT, correlacionan con sensibilidad alta a inhibidores de cinasa de IGF-1R. En cambio, niveles altos de expresión de células tumorales de marcadores mesenquimales tales como vimentina o fibronectina, indicadores de que una célula ha sufrido una EMT, correlacionan con sensibilidad baja a inhibidores de cinasa de IGF-1R. Adicionalmente, los análisis celulares morfométricos se pueden usar para proporcionar información sobre el estatus epitelial o mesenquimal de células tumorales y su sensibilidad subsiguiente a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R. Así, estas observaciones pueden formar la base de procedimientos diagnósticos nuevos valiosos para predecir los efectos de inhibidores de cinasa de IGF-1R en crecimiento tumoral y dan a los oncólogos una herramienta adicional para ayudarlos a elegir el tratamiento más apropiado para sus pacientes.

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 expresadas por una célula tumoral; y predecir la sensibilidad de crecimiento de célula tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa IGF-1R, en el que, en relación al nivel de expresión del biomarcador epitelial en células no tumorales del mismo tejido niveles altos de expresión de biomarcadores de células epiteliales tumorales

correlacionan con alta sensibilidad a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R. Los ejemplos preferidos de biomarcadores epiteliales incluyen E-cadherina y Brk (es decir PTK-6) (véase Tabla 1). Ejemplos adicionales de biomarcadores epiteliales que se pueden utilizar en el procedimiento de esta invención incluyen catenina γ (es decir placoglobina de unión), catenina α (es decir catenina $\alpha 1$, $\alpha 2$, o $\alpha 3$), queratina 8 y queratina 18 (véase Tabla 1).

5 La presente invención también proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, comprendiendo: valorar el nivel de un biomarcador mesenquimal seleccionado por vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria expresados por una célula tumoral; y predecir la sensibilidad de crecimiento celular tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que, en relación con el nivel de expresión del biomarcador epitelial en células no tumorales del mismo tejido niveles altos de expresión de biomarcadores de células mesenquimales tumorales correlacionan con baja sensibilidad a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R. Ejemplos preferidos de biomarcadores mesenquimales incluyen vimentina y fibronectina (véase Tabla 1). Ejemplos adicionales de biomarcadores mesenquimales que se pueden utilizar en el procedimiento de esta invención incluyen fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria (véase Tabla 1).

En la práctica de esta invención, con biomarcadores epiteliales preferidos, el nivel de expresión en células tumorales que son sensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R estará generalmente a un nivel tan alto que el biomarcador será muy fácilmente detectable, usando por ejemplo un antibiomarcador específico para detección. Con biomarcadores epiteliales preferidos, el nivel de expresión en células tumorales que es relativamente insensible a inhibidores de cinasa de IGF-1R generalmente estará a un nivel tan bajo que el biomarcador será apenas detectable, en todo caso, usando procedimientos similares (p. ej. en los datos presentados en los Ejemplos en el presente documento más adelante, se comparan los niveles de E-cadherina entre células tumorales sensibles y relativamente insensibles en las Figuras 2 y 3).

25 Sin embargo, para otros biomarcadores menos preferidos, el nivel de expresión de biofármacos en células tumorales que son relativamente insensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R puede ser fácilmente aceptable, pero no obstante estará a un nivel de expresión sustancialmente más bajo que en células tumorales que son sensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R (p. ej., en el dato presentado en los Ejemplos en el presente documento más adelante, se comparan niveles de catenina α para la célula tumoral SW1573 relativamente insensible con los de las células tumorales sensibles H441, H358 y H292 en Figura 2).

Similarmente, en la práctica de esta invención, con biomarcadores mesenquimales preferidos, el nivel de expresión en células tumorales que son relativamente insensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R estará generalmente a un alto nivel tal que el biomarcador será muy fácilmente detectable, usando por ejemplo un anticuerpo anti-biomarcador específico para detección. Con biomarcadores mesenquimales preferidos, el nivel de expresión en células tumorales que son relativamente sensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R estará a un nivel bajo tal que el biomarcador será apenas detectable, en todo caso, usando procedimientos similares (p. ej. en los datos presentados en los Ejemplos en el presente documento más adelante, se comparan los niveles de fibronectina o vimentina entre células tumorales sensibles y relativamente insensibles en las Figuras 2 y 3).

Además, para otros biomarcadores mesenquimales menos preferidos, el nivel de una expresión de biomarcador en células tumorales que sean relativamente sensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R puede ser fácilmente detectable, pero no obstante estará a un nivel sustancialmente más bajo que en células tumorales que sean relativamente insensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R.

Para cualquier biomarcador dado epitelial o mesenquimal, el intervalo de expresión entre células tumorales que son relativamente insensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R y aquellos que son sensibles, puede valorarse fácilmente por alguien de habilidad en la técnica, por ejemplo realizando pruebas en un panel de células tumorales como se describe en el presente documento (por ejemplo, Figura 2), o por realización de ensayos en biopsias tumorales a partir de pacientes cuyos tumores presenten un intervalo de sensibilidades para un inhibidor de cinasa de IGF-1R (p. ej. Compuesto 66).

En el contexto de esta invención, para un porcentaje relativamente pequeño de células tumorales que son relativamente insensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R, los procedimientos descritos anteriormente para predecir la sensibilidad del crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, comprendiendo evaluar el nivel de un marcador epitelial o mesenquimal expresado por una célula tumoral, en circunstancias donde sólo se valora un único nivel de biomarcador, pueden pronosticar falsamente que ese crecimiento de células tumorales es sensible a inhibición con un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Por ejemplo, en los datos presentados en los Ejemplos en el presente documento más adelante, los niveles de los biomarcadores epiteliales catenina γ y catenina α en células tumorales H460, o el biomarcador mesenquimal vimentina en células H460, predicen falsamente sensibilidad alta a inhibidores de cinasa de IGF-1R (véase Figura 2). Así, en base a tales predicciones falsas, un médico puede dirigirse a tratar un número pequeño de pacientes con inhibidores de cinasa de IGF-1R y el tumor puede no ser sensible al inhibidor. Sin embargo, para la inmensa mayoría de células

tumorales (p. ej. al menos el 90 %, a partir de los datos presentados en los Ejemplos en el presente documento más adelante), se esperaría que la valoración de un nivel de expresión de biomarcador individual proporcione una predicción segura de nivel de sensibilidad a inhibidores de cinasa de IGF-1R.

5 Además, lo más importante en el contexto de esta invención, no se han encontrado células tumorales que sean sensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R que cuando se prueben por los procedimientos anteriores (donde sólo se valora un nivel de biomarcador individual) den una predicción falsa de que el crecimiento de células tumorales será insensible a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Así, utilizar los procedimientos de realización de pruebas descritos en el presente documento nunca debería conducir a un médico a negar tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R en casos donde el paciente pueda beneficiarse de tal tratamiento.

10 Además, alguien de habilidad en las técnicas médicas, particularmente concernientes a la aplicación de pruebas diagnósticas y de tratamiento con productos terapéuticos, reconocerá que los sistemas biológicos son algo variables y no siempre enteramente previsible y pruebas diagnósticas buenas o muchos productos terapéuticos buenos son ocasionalmente ineficaces. Así, depende en última instancia del juicio del médico que atiende determinar el curso más apropiado de tratamiento para un paciente individual, en base a resultados de pruebas, a afección e historial del paciente y a su propia experiencia. Incluso puede haber ocasiones, por ejemplo, cuando un médico escogerá tratar un paciente con un inhibidor de cinasa de IGF-1R incluso cuando un tumor no se pronostique que sea particularmente sensible a inhibidores de IGF-1R, en base a datos de pruebas diagnósticas o de otros criterios, particularmente si todas o la mayoría de las otras opciones de tratamiento obvias han fallado, o si se anticipa alguna sinergia cuando se da con otro tratamiento. El hecho que los inhibidores de cinasa como una clase de compuestos se toleren relativamente bien comparados con muchos otros compuestos anticancerígenos, tales como agentes de quimioterapia o citotóxicos más tradicionales usados en el tratamiento de cáncer, hace de esta una opción más viable.

25 Ejemplos preferidos de biomarcadores epiteliales más adecuados para usar en esta invención, tales como E-cadherina, no conducen a ninguna predicción falsa cuando se usan en los procedimientos anteriormente descritos (donde sólo se valora un biomarcador).

Además, esta invención también proporciona procedimientos adicionales en los que se utiliza la valoración simultánea del nivel de expresión en células tumorales de más de un biomarcador. En realizaciones preferidas de estos procedimientos (descritas más adelante) no hay ningún nivel de predicción falsa, como es el caso para alguno de los procedimientos descritos anteriormente donde se valora un nivel de expresión de biomarcador individual.

30 De acuerdo con ello, la presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de uno o más (o de un panel de) biomarcadores epiteliales seleccionados a partir de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 expresado por una célula tumoral; y predecir la sensibilidad de crecimiento celular del tumor a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que, en lo que se refiere al nivel de expresión del biomarcador epitelial en células no tumorales frente a los niveles de expresión altos simultáneos en los mismos tejidos de todos los biomarcadores epiteliales de células tumorales valorados correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R. En una realización preferida de este procedimiento los biomarcadores epiteliales comprenden E-cadherina y Brk, en la que el nivel de expresión alto simultáneo de los dos biomarcadores epiteliales de células tumorales correlaciona con alta sensibilidad a inhibición por inhibidor de cinasa de IGF-1R. En otra realización preferida de este procedimiento los biomarcadores epiteliales comprenden E-cadherina y catenina γ , en la que el nivel de expresión alto simultáneo de los dos biomarcadores epiteliales celulares tumorales correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidor de cinasa de IGF-1R. Nótese que en las dos últimas realizaciones preferidas se requiere un nivel de expresión alto de ambos biomarcadores para indicar sensibilidad alta.

45 La presente invención también proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento celular tumoral por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de uno o más (o un panel de) biomarcadores mesenquimales seleccionados de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria expresados por una célula tumoral; y predecir la sensibilidad del crecimiento celular tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que, en relación al nivel de expresión del biomarcador epitelial en células no tumorales del mismo tejido frente a los niveles de expresión bajos o indetectables simultáneos en los mismos tejidos de todos los biomarcadores mesenquimales de células tumorales valorados correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R. En una realización preferida de este procedimiento los biomarcadores mesenquimales comprenden vimentina y fibronectina, en la que el nivel de expresión bajo o indetectable simultáneo de los dos biomarcadores de células tumorales correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidor de cinasa de IGF-1R. Nótese que en la última realización preferida se requiere una expresión baja o indetectable de ambos biomarcadores para indicar alta sensibilidad.

La presente invención también proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador

epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 expresado por una célula tumoral; valorar el nivel de un biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria expresado por una célula tumoral; y predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa IGF-1R, en el que una proporción alta de niveles de expresión de biomarcadores epiteliales frente a niveles de expresión de biomarcadores mesenquimales correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R. En una realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende E-cadherina y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina. En otra realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende Brk y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina. En otra realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende E-cadherina y el biomarcador mesenquimal comprende vimentina. En otra realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende catenina γ y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina.

La presente invención también proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de uno o más (o un panel de) biomarcadores epiteliales seleccionados a partir de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 expresados por células del tumor; y predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que niveles de expresión altos simultáneos de todos los biomarcadores epiteliales celulares valorados correlacionan con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R. En una realización preferida de este procedimiento los biomarcadores epiteliales comprenden E-cadherina y Brk, en la que el nivel de expresión alto simultáneo de los dos biomarcadores epiteliales de células tumorales correlaciona con alta sensibilidad a inhibición por inhibidor de cinasa de IGF-1R. En otra realización preferida de este procedimiento los biomarcadores epiteliales comprenden E-cadherina y catenina γ , en la que el nivel de expresión alto simultáneo de los dos biomarcadores epiteliales celulares tumorales correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidor de cinasa de IGF-1R. Nótese que en las dos últimas realizaciones preferidas se requiere un nivel de expresión alto de ambos biomarcadores para indicar sensibilidad alta.

La presente invención también proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de uno o más (o de un panel de) biomarcadores mesenquimales seleccionados a partir de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria expresados por células del tumor; y predecir la sensibilidad de crecimiento del tumor a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que niveles de expresión bajos e indetectables de todos los biomarcadores mesenquimales de tumores valorados correlacionan con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R. En una realización preferida de este procedimiento los biomarcadores mesenquimales comprenden vimentina y fibronectina, en la que el nivel de expresión bajo o indetectable simultáneo de los dos biomarcadores de células tumorales correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidor de cinasa de IGF-1R. Nótese que en la última realización preferida se requiere una expresión baja o indetectable de ambos biomarcadores para indicar alta sensibilidad.

La presente invención también proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 expresadas por células del tumor; valorar el nivel de un biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria expresados por células del tumor; y predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa IGF-1R, en el que una proporción alta de niveles de expresión de biomarcadores epiteliales frente a niveles de expresión de biomarcadores mesenquimales correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R. En una realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende E-cadherina y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina. En otra realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende Brk y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina. En otra realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende E-cadherina y el biomarcador mesenquimal comprende vimentina. En otra realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende catenina γ y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina.

La presente invención también proporciona un procedimiento de predecir si un paciente de cáncer está afectado con un tumor que responderá de forma efectiva al tratamiento con un inhibidor de IGF-1R de cinasa, que comprende: valorar el nivel de uno o más (o un panel de) biomarcadores epiteliales seleccionados a partir de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 expresados por células del tumor; y predecir si el tumor responderá de manera efectiva al tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que niveles de expresión altos simultáneos de todos los biomarcadores epiteliales de células tumorales correlacionan con un tumor que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R. En una realización preferida de este procedimiento los biomarcadores epiteliales comprenden E-cadherina y Brk, en la que el nivel de expresión alto

simultáneo de los dos biomarcadores epiteliales de células tumorales correlaciona con un tumor que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R. En una realización preferida de este procedimiento los biomarcadores epiteliales comprenden E-cadherina y catenina γ , en la que el nivel de expresión alto simultáneo de los dos biomarcadores epiteliales de células tumorales correlaciona con un tumor que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Nótese que en las dos últimas realizaciones preferidas se requiere un nivel de expresión alto de ambos biomarcadores para indicar un tumor que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

La presente invención también proporciona un procedimiento de predecir si un paciente de cáncer está afectado con un tumor que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de uno o más (o de un panel de) biomarcadores mesenquimales seleccionados a partir de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria expresados por células del tumor; y predecir si el tumor responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que niveles de expresión bajos e indetectables simultáneos de todos los biomarcadores mesenquimales correlacionan con un tumor que responderá eficazmente a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R. En una realización preferida de este procedimiento los biomarcadores mesenquimales comprenden vimentina y fibronectina, en la que el nivel de expresión bajo o indetectable simultáneo de los dos biomarcadores epiteliales de células tumorales correlaciona con un tumor que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Nótese que en la última realización preferida se requiere un nivel de expresión bajo o indetectable de ambos biomarcadores para indicar un tumor que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

La presente invención también proporciona un procedimiento de predecir si un paciente de cáncer está afectado con un tumor que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 expresado por células del tumor; valorar el nivel de un biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria expresados por células del tumor; y predecir si el tumor responderá de forma efectiva al tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que una proporción alta de niveles de expresión de biomarcadores mesenquimales correlaciona con un tumor que responderá de manera efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R. En una realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende E-cadherina y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina. En otra realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende Brk y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina. En otra realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende E-cadherina y el biomarcador mesenquimal comprende vimentina. En otra realización preferida de este procedimiento el biomarcador epitelial comprende catenina γ y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina.

Los biomarcadores expresados por una célula tumoral pueden incluir marcadores moleculares y celulares que indican el estado de transición de la célula tumoral. En una realización preferida de la invención el biomarcador es una proteína marcadora individual, o su ARNm codificante, característico del estado de transición particular del tumor, es decir un tumor que presenta características epiteliales o mesenquimales. En ciertas circunstancias los biomarcadores pueden ser un patrón morfológico característico producido en la célula tumoral por macromoléculas celulares que es característico bien de una afección epitelial o bien de una afección mesenquimal. Así, los análisis celulares morfométricos se pueden usar para proporcionar información sobre el estatus epitelial o mesenquimal de células tumorales y su sensibilidad subsiguiente a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.

Tabla 1: Identificación de gen de biomarcador molecular

Biomarcador humano	NCBI GeneID ¹	RefSeq NCBI ²	de
E-cadherina	999	NP 004351	
Brk	5753	NP 005966	
catenina γ	3728	NP 002221	
catenina α 1	1495	NP 001894	
catenina α 2	1496	NP 004380	
catenina α 3	29119	NP 037398	

(continuación)

Biomarcador humano	NCBI GeneID ¹	RefSeq de NCBI ²
queratina 8	3856	NP 002264
queratina 18	3875	NP 000215
vimentina	7431	NP 003371
fibronectina 1	2335	NP 002017
fibrilina-1	2200	NP 000129
fibrilina-2	2201	NP 001990
colágeno alfa 2 (IV)	1284	NP 001837
colágeno alfa 2 (V)	1290	NP 000384
LOXL1	4016	NP 005567
nidogen	4811	NP 002499
C11orf9	745	NP 037411
tenascina	3371	NP 002151
N-cadherina	1000	NP 001783

¹ El número NCBI GeneID es un identificador único del gen de biomarcador del registro de bases de datos de genes de entradas de NCBI (Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI), Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU., 8600 Rockville Pike, Edificio 38A, Bethesda, MD 20894; dirección de Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

² La RefSeq (Secuencia de Referencia) de NCBI es un ejemplo de una secuencia expresada por el gen biomarcador.

La Tabla 1 enumera los genes que codifican para los biomarcadores moleculares que se pueden usar en la práctica de los procedimientos de la invención descritos en el presente documento. Los biomarcadores moleculares pueden incluir cualquier producto expresado por estos genes, incluyendo variantes de los mismos, p. ej. ARNm expresado o proteína, variantes de ajuste, proteínas modificadas cotraduccionalmente y postraduccionalmente, variantes polimórficas, etc. En una realización el biomarcador es la fibronectina EDB+ embrionaria, una variante de ajuste expresada por la fibronectina 1 (Kilian, O. y cols. (2004) Bone 35 (6): 1334-1345). Una ventaja posible de determinar esta forma fetal de fibronectina es que se podría distinguir fácilmente tumores mesenquimales a partir de un tejido estromal circundante. En una realización adicional el biomarcador puede ser un homólogo animal del producto de gen humano (p. ej. de perro, ratón, rata, conejo, gato, mono, simio, etc.).

En los procedimientos descritos en el presente documento la célula tumoral típicamente será de un paciente diagnosticado con cáncer, una afección precancerosa u otra forma de crecimiento celular anormal y en necesidad de tratamiento. El cáncer puede ser cáncer de pulmón (p. ej. cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)), cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer ovárico, o cualquiera de una variedad de otros cánceres descritos en el presente documento más adelante. El cáncer es preferentemente uno conocido por ser potencialmente tratable con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

El nivel de expresión de biomarcador puede evaluarse en relación a un molécula de control cuyo nivel de expresión permanece constante por toda la EMT, o cuando se comparan las células tumorales expresando bien estados de transición epiteliales o bien estados de transición mesenquimales según se indican por biomarcadores moleculares (p. ej. un gen "de mantenimiento", como GAPDH, actina β, tubulina, o similares). El nivel de expresión de biomarcador también puede ser evaluado en relación al otro tipo de biomarcador celular tumoral (es decir epitelial comparado con mesenquimal), o al nivel biomarcador en células no tumorales del mismo tejido, u otra célula o

fuelle de tejido usada como una referencia de ensayo. En los procedimientos de esta invención la expresión de biomarcador se valora en relación al nivel de biomarcador en células no tumorales del mismo tejido.

5 En los procedimientos de esta invención, el nivel de un biomarcador epitelial o mesenquimal expresado por una célula tumoral puede evaluarse usando cualquiera de los procedimientos de bioensayos estándar conocidos o la técnica para determinación del nivel de expresión de un gen, incluyendo por ejemplo ELISA, RIA, inmunoprecipitación, inmunotransferencia, microscopía de inmunofluorescencia, RT-PCR, hibridación in situ, microensayo de ADNc, o similares, como se describe en más detalle más adelante.

10 En los procedimientos de esta invención, el nivel de expresión de un biomarcador epitelial o mesenquimal de células tumorales se valora preferentemente sometiendo a ensayos una biopsia tumoral. Sin embargo, en una realización alternativa, el nivel de expresión del biomarcador de células tumorales puede valorarse en fluidos corporales o en excreciones conteniendo niveles detectables de biomarcadores que se originan a partir del tumor o de las células tumorales. Los fluidos corporales o excreciones útiles en la presente invención incluyen sangre, orina, saliva, deposición, fluido pleural, fluido linfático, esputo, ascitis, fluido prostático, fluido cerebrospinal (CSF), o cualquier otra secreción corporal o derivado de la misma. Por sangre se entiende que incluye sangre completa, plasma, suero o cualquier derivado de sangre. La valoración de tumor epitelial o de biomarcadores mesenquimales en tales fluidos corporales o excreciones puede preferirse algunas veces en circunstancias donde un procedimiento de toma de muestras invasivo es inapropiado o inconveniente.

20 En los procedimientos de esta invención, la célula tumoral puede ser una célula tumoral de cáncer de pulmón (p. ej. cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)), una célula tumoral de cáncer pancreático, una célula tumoral de cáncer de mama, una célula tumoral de cáncer de cabeza y cuello, una célula de tumor de cáncer gástrico, una célula de tumor de cáncer de colon, una célula de tumor de cáncer ovárico, o una célula tumoral de cualquiera de una diversidad de otros cánceres cuando se describen en el presente documento más adelante. La célula tumoral es preferentemente de un tipo que se sabe que expresa o se espera que exprese cinasa de IGF-1R, como hacen todas las células tumorales de tumores sólidos. La cinasa de IGF-1R puede ser de tipo silvestre o una forma mutante.

25 En los procedimientos de esta invención, el inhibidor de cinasa de IGF-1R puede ser cualquier inhibidor de cinasa de IGF-1R como se describe en el presente documento más adelante, incluyendo sales o polimorfos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los siguientes procedimientos representan realizaciones adicionales específicas del procedimiento de la invención.

30 La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 expresado por células del tumor; y predecir la sensibilidad de crecimiento de tumor a inhibición por un inhibidor de IGF-1R, en el que niveles de expresión altos de biomarcadores epiteliales de célula tumoral correlacionan con sensibilidad alta de crecimiento tumoral a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.

35 La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador mesenquimal seleccionado a partir de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria expresados por células del tumor; y predecir la sensibilidad de crecimiento del tumor a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que los niveles de expresión bajos e indetectables de todos los biomarcadores mesenquimales de células tumorales valorados correlacionan con sensibilidad baja de crecimiento tumoral a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.

40 La presente invención describe un procedimiento de predecir si un paciente de cáncer está afectado con un tumor que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador epitelial seleccionado a partir de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 expresadas por células del tumor; y predecir si el tumor responderá de manera efectiva al tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que niveles de expresión altos simultáneos de todos los biomarcadores epiteliales de células tumorales responderán de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

45 En los procedimientos, el tumor puede ser un tumor de cáncer de pulmón (p. ej. cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)), un tumor de cáncer pancreático, un tumor de cáncer de mama, un tumor de cáncer de cabeza y cuello, un tumor de cáncer gástrico, un tumor de cáncer de colon, un tumor de cáncer ovárico, o un tumor de cualquiera de una diversidad de otros cánceres como se describen en el presente documento más adelante. El tumor es preferentemente de un tipo cuyas células se sabe que expresan o se espera que expresen cinasa de IGF-1R, como hacen todas las de tumores sólidos. La cinasa de IGF-1R puede ser de tipo silvestre o una forma mutante.

5 La presente invención describe un procedimiento de predecir si un paciente de cáncer está afectado con un tumor que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador mesenquimal seleccionado a partir de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embriónica expresados por células del tumor; y predecir si el tumor responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que niveles de expresión altos de biomarcadores mesenquimales de células tumorales correlacionan con un tumor que responderá de forma menos efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

10 La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R que comprende: determinar el nivel de células tumorales de al menos un polipéptido biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18; determinar el nivel de células tumorales de al menos un polipéptido de control; comparar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido biomarcador epitelial con el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido de control; en el que una proporción alta de polipéptido de biomarcador de células tumorales frente a polipéptido de control de células tumorales indica una sensibilidad prevista alta del crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, ejemplos de polipéptidos biomarcadores epiteliales útiles incluyen E-cadherina, catenina γ , queratina 8, queratina 18 y Brk.

15 La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: determinar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador epitelial que codifica un polipéptido seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18; determinar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido de control; comparar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador epitelial que codifica un polipéptido con el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de control; en el que una proporción alta de polinucleótido de biomarcador en células tumorales frente a polinucleótido de control en células tumorales indica una sensibilidad prevista alta del crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento ejemplos de polipéptidos codificados por el polinucleótido biomarcador epitelial incluyen E-cadherina, catenina γ , queratina 8, queratina 18 y Brk.

20 La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R que comprende: determinar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido de biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embriónica; determinar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido de control; comparar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido biomarcador mesenquimal con el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido de control; en el que una proporción baja de polipéptido biomarcador en células tumorales frente a polipéptido de control en células tumorales indica una sensibilidad predicha alta del crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, los ejemplos de polipéptidos biomarcadores mesenquimales útiles incluyen vimentina y fibronectina.

25 La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R que comprende: determinar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador mesenquimal que codifica un polipéptido seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embriónica; determinar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de control; comparar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador mesenquimal que codifica un polipéptido con el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido de control; en el que una proporción baja de polipéptido biomarcador en células tumorales frente a polipéptido de control en células tumorales indica una sensibilidad predicha alta del crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, los ejemplos de polipéptidos codificados por el polinucleótido de biomarcador útiles incluyen vimentina y fibronectina.

30 La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R que comprende: determinar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18; determinar un nivel en células no tumorales de al menos un polipéptido biomarcador epitelial; comparar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido biomarcador epitelial con el nivel en células no tumorales de al menos un biomarcador epitelial; en el que una proporción alta de polipéptido de biomarcador en células tumorales frente a polipéptido de biomarcador en células no tumorales indica una sensibilidad predicha alta del crecimiento en células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, ejemplos de polipéptidos biomarcadores epiteliales útiles incluyen E-cadherina, catenina γ , queratina 8, queratina 18 y Brk.

35 La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R que comprende: determinar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador epitelial que codifica un polipéptido seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ ,

catenina α , queratina 8 y queratina 18; determinar el nivel en células no tumorales de al menos un polipéptido seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18; comparar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador epitelial que codifica un polipéptido con el nivel en células no tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador epitelial que codifica un polipéptido; en el que una proporción alta de polinucleótido de biomarcador en células tumorales frente a polinucleótido de biomarcador en células tumorales indica una sensibilidad predicha alta del crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, ejemplos de polipéptidos biomarcadores codificados por el polinucleótido de biomarcador epitelial útiles incluyen E-cadherina, catenina γ , queratina 8, queratina 18 y Brk.

La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R que comprende: determinar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido de biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria; determinar el nivel en células no tumorales de al menos un polipéptido de biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria; comparar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido biomarcador mesenquimal con el nivel en células no tumorales de al menos un polipéptido biomarcador mesenquimal; en el que una proporción baja de polipéptido biomarcador en células tumorales frente a polipéptido biomarcador en células tumorales indica una sensibilidad predicha alta del crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, los ejemplos de polipéptidos biomarcadores mesenquimales útiles incluyen vimentina y fibronectina.

La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R que comprende: determinar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador mesenquimal que codifica un polipéptido seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria; determinar el nivel en células no tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador mesenquimal que codifica un polipéptido seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria; comparar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador mesenquimal que codifica un polipéptido con el nivel en células no tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador mesenquimal que codifica un polipéptido; en el que una proporción baja de polinucleótido de biomarcador en células tumorales frente a polinucleótido de biomarcador en células no tumorales indica una sensibilidad predicha alta del crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, los ejemplos de polipéptidos codificados por el polinucleótido de biomarcador útiles incluyen vimentina y fibronectina.

La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R que comprende: determinar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18; determinar el nivel en células tumorales de al menos un polipéptido de biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria; comparando el nivel del al menos un polipéptido biomarcador epitelial con el nivel de al menos un polipéptido biomarcador mesenquimal; en el que una proporción alta de polipéptido biomarcador epitelial frente a polipéptido biomarcador mesenquimal indica una sensibilidad alta predicha de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, ejemplos de polipéptidos biomarcadores epiteliales útiles incluyen E-cadherina, catenina γ , queratina 8, queratina 18 y Brk. Para este procedimiento, los ejemplos de polipéptidos biomarcadores mesenquimales útiles incluyen vimentina y fibronectina.

La presente invención proporciona un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: determinar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador epitelial que codifica un polipéptido seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18; determinar el nivel en células tumorales de al menos un polinucleótido de biomarcador mesenquimal que codifica un polipéptido seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria; (c) comparar el nivel del al menos un polinucleótido de biomarcador epitelial con el nivel de al menos un polinucleótido de biomarcador mesenquimal; en el que una proporción alta de polinucleótido de biomarcador epitelial frente a polinucleótido de biomarcador mesenquimal indica una sensibilidad alta predicha de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, ejemplos de polipéptidos biomarcadores codificados por el polinucleótido de biomarcador epitelial útiles incluyen E-cadherina, catenina γ , queratina 8, queratina 18 y Brk. Para este procedimiento, los ejemplos de polipéptidos codificados por el polinucleótido de biomarcador mesenquimal útiles incluyen vimentina y fibronectina.

La presente invención describe un procedimiento de valorar si un paciente de cáncer está afectado con un cáncer que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, comprendiendo el procedimiento comparar: el nivel de expresión de un biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina,

fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria en una muestra de paciente; y el nivel normal de expresión del biomarcador en una muestra no de cáncer de control, en el que un incremento significativo en el nivel de expresión del biomarcador mesenquimal en la muestra de paciente sobre el nivel normal es una indicación de que el paciente está afectado con un cáncer que es menos probable que responda de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, ejemplos de biomarcadores mesenquimales útiles incluyen vimentina y fibronectina y los ácidos nucleicos que codifican para estas proteínas.

La presente invención describe un procedimiento de valorar si un paciente de cáncer está afectado con un cáncer que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, comprendiendo el procedimiento comparar: el nivel de expresión de un biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 en una muestra del paciente; y el nivel normal de expresión del biomarcador en una muestra no de cáncer de control, en el que un incremento significativo en el nivel de expresión del biomarcador epitelial en la muestra de paciente sobre el nivel normal es una indicación de que el paciente está afectado con un cáncer que es menos probable que responda de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, ejemplos de biomarcadores epiteliales útiles incluyen E-cadherina, catenina γ , queratina 8, queratina 18 y Brk, y los ácidos nucleicos que codifican para estas proteínas.

La presente invención describe un procedimiento de valorar si un paciente de cáncer está afectado con un cáncer que responderá de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, comprendiendo el procedimiento comparar: el nivel de expresión de un biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 en una muestra del paciente; biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria en una muestra de paciente, en el que una proporción alta del nivel de expresión del biomarcador epitelial frente al nivel de expresión del biomarcador mesenquimal es una indicación de que el paciente está afectado con un cáncer que es probable que responda de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este procedimiento, ejemplos de biomarcadores epiteliales útiles incluyen E-cadherina, catenina γ , queratina 8, queratina 18 y Brk y los ácidos nucleicos que codifican para estas proteínas. Para este procedimiento, ejemplos de biomarcadores mesenquimales útiles incluyen vimentina y fibronectina y los ácidos nucleicos que codifican para estas proteínas.

En cualquiera de los procedimientos anteriores que se refieren a una muestra de paciente, un ejemplo de una muestra tal puede ser una biopsia de tumor.

La presente invención describe un procedimiento de determinar si en un sujeto humano un tumor será capaz de responder a un tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: (a) recoger una muestra de una sustancia corporal que contiene ácido nucleico humano o proteína humana, habiéndose originado dicho ácido nucleico o dicha proteína a partir de células del sujeto humano, (b) determinar cuantitativamente o semi-cuantitativamente en la muestra un nivel de expresión para una o más proteínas biomarcadoras celulares epiteliales o uno o más ARNm específicos de proteínas biomarcadoras celulares epiteliales seleccionadas de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18; y (c) comparar el nivel de expresión en (b) con el nivel de expresión de biomarcador en un control normal, o con el nivel de un polipéptido de control o ácido nucleico en la muestra, en la que la expresión reducida de una o más proteínas biomarcadoras celulares epiteliales o uno o más ARNm específicos de uno o más proteínas biomarcadoras celulares epiteliales, con respecto al nivel de control, indica la presencia en el sujeto humano de un tumor que es menos probable que responda de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

La presente invención describe un procedimiento de determinar si en un sujeto humano un tumor será capaz de responder a tratamiento con un inhibidor de de cinasa de IGF-1R, que comprende: (a) recoger una muestra de una sustancia corporal que contiene ácido nucleico humano o proteína humana, habiéndose originado dicho ácido nucleico o dicha proteína a partir de células del sujeto humano, (b) determinar cuantitativamente o semi-cuantitativamente en la muestra un nivel de expresión para una o más proteínas biomarcadoras celulares mesenquimales o uno o más ARNm específicos de proteínas biomarcadoras celulares mesenquimales seleccionadas de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria en una muestra de paciente; y (c) comparar el nivel de expresión en (b) con el nivel de expresión de biomarcador en un control normal, o con el nivel de un polipéptido de control o ácido nucleico en la muestra, en la que la expresión reducida de una o más proteínas biomarcadoras celulares mesenquimales o uno o más ARNm específicos de uno o más proteínas biomarcadoras celulares mesenquimales, con respecto al nivel de control, indica la presencia en el sujeto humano de un tumor que es menos probable que responda de forma efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

La presente invención describe un procedimiento de determinar la probabilidad de que un paciente con un tumor muestre el beneficio de supervivencia relativamente larga de terapia con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende determinar el nivel de uno o más biomarcadores epiteliales seleccionados de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 en las células del tumor, comparando dicho nivel con el nivel de expresión de biomarcador epitelial en control no tumoral, o con el nivel de un polipéptido control o de un ácido nucleico control

en la muestra tumoral y determinar si las células del tumor contienen un nivel relativamente alto de uno o más biomarcadores epiteliales, siendo indicativo un alto nivel de que un paciente con un tumor mostrará el beneficio de supervivencia relativamente larga a partir de terapia con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

5 La presente invención describe un procedimiento de determinar la probabilidad de que un paciente con un tumor muestre el beneficio de supervivencia relativamente larga de terapia con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende determinar el nivel de uno o más biomarcadores epiteliales seleccionados de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria en las células del tumor, comparando dicho nivel con el nivel de expresión de biomarcador mesenquimal en un control no tumoral, o con el nivel de un polipéptido de control o un ácido nucleico
10 de control en la muestra tumoral y determinar si las células del tumor contienen un nivel relativamente bajo de uno o más biomarcadores mesenquimales, siendo indicativo un nivel bajo de que un paciente con un tumor mostrará el beneficio de supervivencia relativamente larga a partir de terapia con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

15 La presente invención describe un procedimiento para determinar para un paciente con un tumor la probabilidad de que dicho paciente muestre beneficio de supervivencia relativamente larga a partir de terapia con un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: determinar el nivel de uno o más biomarcadores epiteliales seleccionados de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 en las células del tumor, comparando dicho nivel con el nivel de expresión de biomarcador epitelial en un control no tumoral, o al nivel de un polipéptido de control o ácido nucleico de control en la muestra tumoral y determinar si las células del tumor contienen un nivel relativamente alto de uno o más biomarcadores epiteliales; determinar el nivel de uno o más biomarcadores
20 mesenquimales seleccionados de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria en las células del tumor, comparando dicho nivel con el nivel de expresión de biomarcador mesenquimal en un control no tumoral, o con el nivel de un polipéptido de control o ácido nucleico de control en la muestra de tumor y determinar si las células del tumor contienen un nivel relativamente bajo de uno o más biomarcadores mesenquimales, en los que un nivel alto
25 de uno o más biomarcadores epiteliales es indicativo de que un paciente con un tumor mostrará beneficio de supervivencia relativamente largo de terapia con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

30 Para valoración de expresión de biomarcador epitelial o mesenquimal de células tumorales, las muestras de los pacientes que contienen células tumorales, o proteínas o ácidos nucleicos producidos por esas células tumorales, se pueden usar en los procedimientos de la presente invención. En estas realizaciones, el nivel de expresión del biomarcador puede valorarse valorando la cantidad (por ejemplo la cantidad absoluta o la concentración absoluta) del marcador en una muestra celular tumoral, p. ej., una biopsia tumoral obtenida de un paciente, u otra muestra de paciente que contiene material derivado del tumor (p. ej. sangre, suero, orina, u otros fluidos corporales o excreciones como se describen en el presente documento anteriormente). La muestra de célula puede, por supuesto, someterse a una diversidad de técnicas preparativas y de almacenamiento post-recogida (por ejemplo, ácido nucleico y/o extracción de proteína, fijación, almacenamiento, congelado, ultrafiltración; concentración, evaporación, centrifugación, etc.) con anterioridad a evaluar la cantidad del marcador en la muestra. Asimismo, las biopsias de tumor pueden también someterse a técnicas preparativas y de almacenamiento post-recogida, p. ej., fijación.

40 En los procedimientos de la invención, alguien puede detectar expresión de proteínas biomarcadoras que tienen al menos una parte que se muestra en la superficie de células tumorales que las expresan. Es un asunto sencillo para el trabajador experto determinar si una proteína marcadora, o una parte de la misma, está expuesta en la superficie celular. Por ejemplo, se pueden usar procedimientos inmunológicos para detectar tales proteínas en células enteras, o bien se pueden usar procedimientos de análisis de secuencia basados en ordenadores bien conocidos para predecir la presencia de al menos un dominio extracelular (es decir incluyendo tanto proteínas segregadas como proteínas que al menos tienen un dominio de superficie celular). La expresión de una proteína marcadora que
45 tiene al menos una parte que se presenta en la superficie de una célula que la expresa se puede detectar sin lisar necesariamente la célula tumoral (p. ej. usando un anticuerpo marcado que está unido específicamente con un dominio de superficie celular de la proteína).

50 La expresión de biomarcadores descritos en esta invención puede valorarse por cualquiera de una amplia diversidad de procedimientos bien conocidos para detectar expresión de un ácido nucleico transcrito o proteína. Ejemplos no limitantes de tales procedimientos incluyen procedimientos inmunológicos para detección de proteínas segregadas, de superficie celular, citoplásmicas, o nucleares, procedimientos de purificación de proteínas, ensayos de función o actividad de proteínas, procedimientos de hibridación de ácidos nucleicos, procedimientos de transcripción reversa de ácidos nucleicos y procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos.

55 En una realización, la expresión de un biomarcador se evalúa usando un anticuerpo (p. ej. un anticuerpo radiomarcado, marcado con un cromóforo, marcado con un fluoróforo, o marcado enzimáticamente), un derivado de anticuerpo (p. ej. un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par proteína-ligando {p. ej. biotina-estreptavidina}), o un fragmento de anticuerpo (p. ej. un anticuerpo de cadena individual, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente con una proteína biomarcadora o un fragmento de la misma, que incluye una proteína biomarcadora que ha sufrido bien todas o bien una parte de las
60

modificaciones postraduccionales a las que se somete normalmente en la célula tumoral (p. ej. glicosilación, fosforilación, metilación etc.).

En otra realización, la expresión de un biomarcador se valora preparando ARNm/ADNc (es decir un polinucleótido transcrito) a partir de células en una muestra de paciente e hibridar el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complemento de un ácido nucleico de biomarcador, o un fragmento del mismo. El ADNc puede, opcionalmente, amplificarse usando cualquiera de una diversidad de procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa antes de hibridación con el polinucleótido de referencia. La expresión de uno o más biomarcadores puede asimismo detectarse usando PCR cuantitativa para evaluar el nivel de expresión del/de los biomarcador(es). Alternativamente, cualquiera de los muchos procedimientos conocidos de detectar mutaciones o variantes (p. ej. polimorfismos de nucleótido individual, deleciones, etc.) de un biomarcador de la invención puede usarse para detectar aparición de un biomarcador en un paciente.

En una realización relacionada, se pone en contacto una muestra de polinucleótidos transcritos obtenida a partir de la muestra con un sustrato que tiene fijado al mismo un polinucleótido complementario a u homólogo con al menos una parte (p. ej. al menos 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500 o más residuos de nucleótidos) de un ácido nucleico de biomarcador. Si los polinucleótidos complementarios a u homólogos con al menos una parte de un ácido nucleico de biomarcador son diferencialmente detectables en el sustrato (p. ej. detectables usando diferentes cromóforos o fluoróforos, o fijados a diferentes posiciones seleccionadas), entonces los niveles de expresión de una pluralidad de biomarcadores pueden evaluarse simultáneamente usando un sustrato individual (p. ej. un microensayo de "chip de genes" de polinucleótidos fijados en posiciones seleccionadas). Cuando se usa un procedimiento de valorar expresión de biomarcador que implica hibridación de un ácido nucleico con otro, se prefiere que la hibridación se lleve a cabo en condiciones de hibridación restrictivas.

Cuándo una pluralidad de biomarcadores de la invención se usa en los procedimientos de la invención, el nivel de expresión de cada biomarcador en una muestra paciente se puede comparar con el nivel normal de expresión de cada uno de la pluralidad de biomarcadores en muestras no cancerosas del mismo tipo, bien en una mezcla de reacción única (es decir, usando reactivos, tales como diferentes sondas fluorescentes, para cada biomarcador) o en mezclas de reacción individuales que corresponden a uno o más de los biomarcadores.

El nivel de expresión de un biomarcador en tejido humano normal (es decir, no canceroso) puede valorarse en una diversidad de formas. En una realización, este nivel normal de expresión se valora valorando el nivel de expresión del biomarcador en una parte de células que parece ser no cancerosa y después comparando este nivel normal de expresión con el nivel de expresión en una parte de las células tumorales. De forma alterna y particularmente según información adicional llega a estar disponible como resultado de la realización de rutina de los procedimientos descritos en el presente documento, se pueden usar los valores promedio de la población para expresión normal de los biomarcadores de la invención. En otras realizaciones, el nivel 'normal' de expresión de un biomarcador puede determinarse valorando la expresión del biomarcador en una muestra de paciente obtenida a partir de un paciente no afectado con cáncer, a partir de una muestra de paciente obtenida a partir de un paciente antes de la aparición sospechada de cáncer en el paciente, a partir de muestras del paciente archivadas y similares.

Un procedimiento ejemplar para detectar la presencia o ausencia de una proteína biomarcadora o de un ácido nucleico biomarcador en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica (p. ej. un fluido corporal asociado a tumor) a partir de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar el polipéptido o ácido nucleico (p. ej., ARNm, ADN genómico, o ADNc). Los procedimientos de detección de la invención pueden usarse así para detectar ARNm, proteína, ADNc, o ADN genómico, por ejemplo, en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para detección de ARNm incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para detección de proteína biomarcadora incluyen ensayos inmunoabsorbentes unidos a enzima (ELISA), pruebas de bandas de Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para detección del ADN genómico incluyen hibridaciones de Southern. Las técnicas *in vivo* para detección de ARNm incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Además, las técnicas *in vivo* para detección de una proteína biomarcadora incluyen introducir dentro de un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína o fragmento de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto se puede detectar por técnicas de formación de imágenes estándar.

Un principio general de tales ensayos de diagnóstico y de pronóstico implican preparar una muestra o mezcla de reacción que puede contener un biomarcador, y una sonda, en condiciones apropiadas y durante un tiempo suficiente para permitir al biomarcador y a la sonda interactuar y unirse, formando así un complejo que puede retirarse y/o detectarse en la mezcla de reacción. Estos ensayos pueden llevarse a cabo en una diversidad de maneras.

Por ejemplo, un procedimiento para llevar a cabo un ensayo tal implicaría fijar el biomarcador o sonda sobre un soporte en fase sólida, también referido como un sustrato y detectar los complejos biomarcador/sonda objetivo fijados sobre la fase sólida al final de la reacción. En una realización de un procedimiento tal, una muestra de un sujeto, que se somete a ensayo en presencia y/o concentración de biomarcador, puede fijarse sobre un vehículo o

sobre un soporte en fase sólida. En otra realización, la situación inversa es posible, en la que la sonda puede fijarse a una fase sólida y una muestra de un sujeto puede dejarse reaccionar como un componente no fijado del ensayo.

Hay muchos procedimientos establecidos para fijar los componentes del ensayo a una fase sólida. Estos incluyen, sin limitación, moléculas biomarcadoras o moléculas de sonda que están inmovilizadas por conjugación con biotina y estreptavidina. Tales componentes de ensayo biotinilados pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando las técnicas conocidas en la técnica (p. ej., kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, 111) e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos revestidas de estreptavidina (Pierce Chemical). En ciertas realizaciones, las superficies con componentes de ensayo inmovilizados se pueden preparar en avance y almacenarse.

Otros vehículos adecuados o soportes en fase sólida para tales ensayos incluyen cualquier material capaz de unir la clase de molécula a la que pertenece el biomarcador o la sonda. Soportes o vehículos bien conocidos incluyen, pero no están limitados a, vidrio, poliestireno, nailon, polipropileno, nailon, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita.

Con el fin de llevar a cabo ensayos con las aproximaciones anteriores mencionadas, se añade el componente no inmovilizado a la fase sólida tras lo que se fija el segundo componente. Después de que la reacción está completa, los componentes que no reaccionan se pueden retirar (por ejemplo, por lavado) en condiciones tales que cualesquiera complejos formados permanecerán inmovilizados sobre la superficie sólida. La detección de complejos de biomarcador/sonda fijados a la fase sólida puede llevarse a cabo en un número de procedimientos esquematizados en el presente documento.

En una realización, la sonda, cuando es el componente de ensayo no fijado, puede marcarse para el propósito de detección y lectura de resultados del ensayo, bien directa o bien indirectamente, con marcas detectables discutidas en el presente documento y bien conocidas para alguien experto en la técnica.

También es posible detectar directamente formación de complejos de biomarcador/sonda sin manipulación adicional o marcado de cualquier componente (biomarcador o sonda), por ejemplo utilizando la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (es decir FET, véanse por ejemplo, Lakowicz y cols., Patente de los Estados Unidos N.º: 5.631.169; Stavrianopoulos, y cols., Patente de los Estados Unidos N.º: 4.868.103). Una marca de fluoróforo en la primera molécula "donante" está seleccionada de tal manera que, tras excitación con luz incidente de longitud de onda apropiada, su energía fluorescente emitida se absorberá por una marca fluorescente en una segunda molécula "aceptora", que a su vez es capaz de fluorescer debido a la energía absorbida. De forma alterna, la molécula de proteína "donante" puede utilizar simplemente la energía fluorescente natural de los residuos de triptófano. Se eligen marcas que emiten diferentes longitudes de onda de luz, tales que la molécula de marca "aceptora" se pueda diferenciar de aquella del "donante". Dado que la eficiencia relativa de transferencia de energía entra las marcas se refiere a la distancia que separa las moléculas, se pueden valorar las relaciones espaciales entre las moléculas. En una situación en que tiene lugar unión entre las moléculas, la emisión fluorescente de la marca de molécula "aceptora" en el ensayo debería ser máxima. Un evento de unión de FET se puede medir convenientemente por medios de detección fluorimétricos estándar bien conocidos en la técnica (p. ej., usando un fluorímetro).

En otra realización, la determinación de la habilidad de una sonda para reconocer un biomarcador puede llevarse a cabo sin marcar cualquier componente de ensayo (sonda o biomarcador) utilizando una tecnología como Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) en tiempo real (véase, p. ej., Sjolander, S. Y Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63: 2338-2345 y Szabo y cols., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705). Como se usa en el presente documento, "BIA" o "resonancia de plasmón superficial" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas a tiempo real, sin marcar cualquiera de los interaccionantes (p. ej., BIAcore). Cambios en la masa en la superficie obligatoria (indicadores de un acontecimiento de unión) dan como resultado alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR)), dando como resultado una señal detectable que se puede usar como una indicación de reacciones a tiempo real entre moléculas biológicas.

Alternativamente, en otra realización, se pueden llevar a cabo ensayos diagnósticos y de pronóstico con biomarcador y sonda como solutos en una fase líquida. En un ensayo tal, el biomarcador complejado y la sonda están separados por componentes que no forman complejos por cualquiera de una número de técnicas estándar, incluyendo pero no limitadas a: centrifugación diferencial, cromatografía, electroforesis e inmunoprecipitación. En centrifugación diferencial, los complejos de biomarcador/sonda pueden separarse de componentes de ensayo que no forman complejos por una serie de etapas de centrifugación, debidas a los diferentes equilibrios de sedimentación de complejos en base a sus diferentes tamaños y densidades (véase, por ejemplo, Rivas, G. y Minton, A. P., 1993, Tendencias Biochem Sci. 18 (8): 284-7). Las técnicas cromatográficas estándar pueden usarse también para separar moléculas que forman complejos de moléculas que no forman complejos. Por ejemplo, la cromatografía de filtración de gel separa moléculas en base al tamaño y por la utilización de una resina de filtración de gel apropiada en un formato de columna, por ejemplo, el complejo relativamente más grande se puede separar de los componentes que no forman complejos relativamente más pequeños. De forma similar, las propiedades de carga relativamente diferentes del complejo de biomarcador/sonda comparadas con los componentes que no forman

complejos se pueden explotar para diferenciar el complejo de los componentes que no forman complejos, por ejemplo a través de la utilización de resinas de cromatografía de intercambio iónico. Tales resinas y las técnicas cromatográficas se conocen bien por alguien experto en la técnica (véase, p. ej., Heegaard, N. H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11 (1-6): 141-8; Hage, D. S., y Tweed, S. A. J. Chromatogr B Biomed Sci Appl 10 de octubre de 1997; 699 (1-2): 499-525). La electroforesis de gel se puede emplear también para separar componentes de ensayo de componentes no marcados (véase, p. ej., Ausubel y cols., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987-1999). En esta técnica, los complejos de proteínas o de ácidos nucleicos se separaron en base a tamaño o carga, por ejemplo. Con el fin de mantener la interacción de unión durante el procedimiento electroforético, se prefieren típicamente materiales de matriz de gel no desnaturizante y afecciones en la ausencia de agente reductor. Las condiciones apropiadas para el ensayo particular y los componentes del mismo se conocerán bien por aquellos expertos en la técnica.

En una realización particular, el nivel de ARNm de biomarcador se puede determinar tanto por formatos *in situ* como por formatos *in vitro* en una muestra biológica usando procedimientos conocidos en la técnica. El término "muestra biológica" se desea para incluir tejidos, células, fluidos biológicos y aislados de los mismos, aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Muchos procedimientos de detección de expresión usan ARN aislados. Para procedimientos *in vitro*, cualquier técnica de aislamiento del ARN que no seleccione en contra del aislamiento de ARNm puede utilizarse para la purificación de ARN a partir de células tumorales (véase, p. ej., Ausubel y cols., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York 1987-1999). Adicionalmente, se pueden procesar fácilmente grandes números de muestras tisulares usando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el procedimiento de aislamiento de ARN en una única etapa de Chomczynski (1989, Patente de los EE. UU. N.º: 4.843.155).

El ARNm aislado puede ser usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis de Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y variedades de sonda. Un procedimiento diagnóstico preferido para la detección de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridar con el ARNm codificado por el gen que se detecta. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud total, o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones restrictivas con un ARNm o ADN genómico que codifica un biomarcador de la presente invención. Otras sondas adecuadas para usar en los ensayos diagnósticos de la invención se describen en el presente documento. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el biomarcador en cuestión se está expresando.

En un formato, el ARNm se inmovilizó en una superficie sólida y se puso en contacto con una sonda, por ejemplo corriendo el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm desde un gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato alternativo, la(s) sonda(s) se inmovilizaron en una superficie sólida y el ARNm se puso en contacto con las sonda(s), por ejemplo, en un ensayo de chip de genes de Affymetrix. Un trabajador especializado puede adaptar fácilmente procedimientos de detección de ARNm conocidos para usar en detectar el nivel de ARNm codificado por los biomarcadores de la presente invención.

Un procedimiento alternativo para determinar el nivel de biomarcador de ARNm en una muestra implica el procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, p. ej., por RT-PCR (el procedimiento experimental expuesto por Mullis, 1987, Pat. de los Estados Unidos N.º: 4.683.202), reacción de cadena de ligasa (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 88: 189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli y cols., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh y cols., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 1173-1177), replicasa Q-beta (Lizardi y cols., 1988, Bio/Technology 6: 1197), replicación por círculo rodante (Lizardi y cols., Pat. de los EE.UU. N.º: 5.854.033) o cualquier otro procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por aquellos de habilidad en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácidos nucleicos si tales moléculas están presentes en números muy bajos. Como se usa en el presente documento, los cebadores de amplificación se definen como que son un par de moléculas de ácidos nucleicos que pueden fusionarse a regiones 5' o 3' de un gen (hebras más y menos, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta intermedia. En general, los cebadores de amplificación son de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos en longitud y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos en longitud. En condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para procedimientos *in situ*, ARNm no necesita aislarse a partir de células tumorales anteriores a la detección. En tales procedimientos, una muestra celular o tisular se prepara/procesa usando procedimientos histológicos conocidos. La muestra se inmoviliza después en un soporte, típicamente un portaobjetos de vidrio y después se pone en contacto con una sonda que puede hibridar a ARNm que codifica el biomarcador.

Como una alternativa a realizar determinaciones en base al nivel de expresión absoluto del biomarcador, las determinaciones pueden basarse en el nivel de expresión normalizado del biomarcador. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluta de un biomarcador comparando su expresión con la expresión

de un gen que no es un biomarcador, p. ej., un gen de mantenimiento que se expresa constitutivamente. Los genes adecuados para normalización incluyen genes de mantenimiento tales como el gen de actina, o los genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de paciente, a otra muestra, por ejemplo, una muestra no tumoral, o entre muestras de diferentes fuentes.

Alternativamente, el nivel de expresión puede proporcionarse como un nivel de expresión relativo. Para determinar un nivel de expresión relativo de un biomarcador (p. ej. un biomarcador mesenquimal), el nivel de expresión del biomarcador está determinado para 10 o más muestras de aislados de células normales frente a células cancerosas, preferentemente 50 o más muestras, con anterioridad a la determinación del nivel de expresión para la muestra en cuestión. El nivel de expresión de nivel medio de cada uno de los genes ensayados en el número de muestras más grande se determina y se usa como un nivel de expresión de línea base para el biomarcador. El nivel de expresión del biomarcador determinado para la muestra de ensayo (nivel de expresión absoluto) se divide después por el valor de expresión medio obtenido para ese biomarcador. Esto proporciona un nivel de expresión relativo.

En otra realización de la presente invención, se detecta una proteína de biomarcador. Un agente preferido para detectar la proteína biomarcadora de la invención es un anticuerpo capaz unirse a una proteína tal o a un fragmento de la misma, preferentemente un anticuerpo con una marca detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferentemente, monoclonales. Se puede usar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, se desea para abarcar marcado directo de la sonda o anticuerpo acoplado (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que se marca directamente. Ejemplos de marcado indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y marcado en un extremo de una sonda de ADN con biotina tal que se puede detectar con estreptavidina marcada fluorescentemente.

Las proteínas de células tumorales pueden aislarse usando técnicas que se conocen bien por aquellos de habilidad en la técnica. Los procedimientos de aislamiento empleados pueden, por ejemplo, ser tales como aquellos descritos en Harlow y Lane (Harlow y Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Se puede emplear una diversidad de formatos para determinar si una muestra contiene una proteína que se une a un anticuerpo dado. Los ejemplos de tales formatos incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de transferencia de Western y ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Un trabajador experto puede adaptar fácilmente procedimientos de detección de proteína/anticuerpo conocidos para usar en determinar si las células tumorales expresan un biomarcador de la presente invención.

En un formato, anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo o derivados, se pueden usar en procedimientos tales como prueba de bandas de Western o técnicas de inmunotransferencia para detectar las proteínas expresadas. En tales usos, es generalmente preferible inmovilizar bien el anticuerpo o bien las proteínas en un soporte sólido. Soportes o vehículos de fase sólida adecuados incluyen cualquier soporte capaz de unir un antígeno o un anticuerpo. Soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita.

Alguien experto en la técnica conocerá muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpo o antígeno y será capaz de adaptar tal soporte para usar con la presente invención. Por ejemplo, la proteína aislada de células tumorales puede correrse en una electroforesis de gel de poliacrilamida e inmovilizarse en un soporte en fase sólida tal como nitrocelulosa. El soporte se puede lavar con tampones adecuados seguido por tratamiento con el anticuerpo marcado detectablemente. Después, el soporte de fase sólida se puede lavar con el tampón una segunda vez para retirar el anticuerpo no unido. La cantidad de marca unida sobre el soporte sólido puede detectarse después por medios convencionales.

Para ensayos de ELISA, los pares de unión específicos pueden ser del tipo inmune o no inmune. Los pares de unión específicos inmunes se ejemplifican por sistemas de antígeno-anticuerpo o por sistemas de haptenos/anti-haptenos. Se pueden mencionar fluoresceína/anti-fluoresceína, dinitrofenilo/anti-dinitrofenilo, biotina/anti-biotina, péptido/anti-péptido y similares. El miembro de anticuerpo del par de unión específico puede producirse por los procedimientos de costumbre familiares a aquellos expertos en la técnica. Tales procedimientos implican inmunizar un animal con el miembro de antígeno del par de unión específico. Si el miembro de antígeno del par de unión específico no es inmunogénico, p. ej., un hapteno, puede acoplarse covalentemente a una proteína transportadora para volverla inmunogénica. Los pares de unión no inmunes incluyen los sistemas en los que los dos componentes comparten una afinidad natural entre sí pero no son anticuerpos. Los pares no inmunes ejemplares son biotina-estreptavidina, factor intrínseco-vitamina B₁₂, proteína de unión ácido fólico-folato y similares.

Una diversidad de procedimientos están disponibles para marcar covalentemente anticuerpos con miembros de pares de unión específicos. Los procedimientos se seleccionan en base a la naturaleza del miembro del par de

unión específico, el tipo de enlace deseado y la tolerancia del anticuerpo a diversos procesos químicos de conjugación. La biotina puede estar covalentemente acoplada a anticuerpos utilizando derivados activos comercialmente disponibles. Algunos de estos son biotina-N-hidroxi-succinimida que se une a grupos amino en proteínas; hidrazida de biotina que se une a restos de carbohidratos, aldehídos y grupos carboxilo por medio de un acoplamiento de carbodiimida; y maleimida de biotina y yodoacetilbiotina que se unen a grupos sulfhidrilo. La fluoresceína puede acoplarse a grupos amina de proteínas usando isotiocianato de fluoresceína. Los grupos dinitrofenilo pueden acoplarse a grupos amina de proteínas usando sulfato de 2,4-dinitrofenilo o 2,4-dinitrofluorobenceno. Otros procedimientos estándar de conjugación se pueden emplear para acoplar anticuerpos monoclonales a un miembro de un par específico de unión incluyendo dialdehído, acoplamiento de carbodiimida, reticulación homofuncional y reticulación heterobifuncional. El acoplamiento de carbodiimida es un procedimiento efectivo de acoplar grupos carboxilo en una sustancia a grupos amino en otra. El acoplamiento de carbodiimida se facilita usando reactivo comercialmente disponible 1-etil-3-(dimetil-aminopropil)-carbodiimida (EDAC).

Los agentes de reticulación homobifuncionales, incluyendo los imidoésteres bifuncionales y los ésteres de N-hidroxisuccinimida bifuncionales, están comercialmente disponibles y se emplean para acoplar grupos amina en una sustancia a grupos amina en otra. Agentes de reticulación heterobifuncionales son reactivos que poseen diferentes grupos funcionales. Los agentes de reticulación heterobifuncionales comercialmente disponibles tienen un éster de N-hidroxisuccinimida reactiva de amina como un grupo funcional y un grupo reactivo sulfhidrilo como el segundo grupo funcional. Los grupos reactivos sulfhidrilo más comunes son maleimidias, disulfuros de piridilo y halógenos activos. Uno de los grupos funcionales puede ser un nitreno de arilo fotoactivo, que tras la irradiación reacciona con una diversidad de grupos.

El anticuerpo marcado detectablemente o el miembro marcado detectablemente del par de unión específico se prepara por acoplamiento a un comunicador, que puede ser un isótopo radiactivo, una enzima, materiales fluorogénicos, quimioluminiscentes o electroquímicos. Dos isótopos radiactivos usados comúnmente son ^{125}I y ^3H . Los procedimientos de marcado isotópicos radiactivos estándar incluyen los procedimientos de la cloramina T, de la lactoperoxidasa y de Bolton-Hunter para ^{125}I y metilación reductiva para ^3H . El término "unido detectablemente" se refiere a una molécula marcada de tal manera que puede detectarse fácilmente por la actividad enzimática intrínseca de la marca o por la unión a la marca de otro componente, que puede detectarse fácilmente por sí mismo.

Enzimas adecuadas para usar en esta invención incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa oxidasa, luciferasas, incluyendo luciferasas de luciérnaga y de renilla, β -lactamasa, ureasa, proteína fluorescente verde (GFP) y lisozima. El procedimiento de marcaje se facilita usando dialdehído, acoplamiento de carbodiimida, agentes de reticulación homobifuncionales y agentes heterobifuncionales como se describen anteriormente acoplando un anticuerpo con un miembro de un par de unión específico.

El procedimiento de marcado elegido depende de los grupos funcionales disponibles en la enzima y del material a marcarse y de la tolerancia a ambos de las condiciones de conjugación. El procedimiento de marcado usado en la presente invención puede ser uno de, pero no limitado a, cualesquiera procedimientos convencionales actualmente empleados descritos por Engvall y Pearlmann, *Immunochemistry* 8, 871 (1971), Avrameas y Temyck, *Immunochemistry* 8, 1175 (1975), Ishikawa y cols., *J. Immunoassay* 4 (3): 209-327 (1983) y Jablonski, *Anal. Biochem.* 148: 199 (1985).

El marcado puede llevarse a cabo por procedimientos indirectos tales como espaciadores usados u otros miembros de pares de unión específicos. Un ejemplo de esto es la detección de un anticuerpo biotinilado con estreptavidina no marcada y enzima biotinilada, con estreptavidina y enzima biotinilada añadiéndose bien secuencialmente o bien simultáneamente. Así, de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo usado para detectar puede estar marcado de forma detectable con un comunicador o indirectamente con un primer miembro de un par de unión específico. Cuando el anticuerpo está acoplado a un primer miembro de un par de unión específico, después la detección se efectúa haciendo reaccionar el primer miembro de anticuerpo de un complejo de unión específico con el segundo miembro del par de unión que está marcado o no marcado como se menciona anteriormente.

Además, el anticuerpo detector no marcado se puede detectar haciendo reaccionar el anticuerpo no marcado con un anticuerpo marcado específico para el anticuerpo no marcado. En este caso "marcado detectablemente" como se usa anteriormente se toma para querer decir que contiene un epitopo por el que se puede unir un anticuerpo específico para el anticuerpo no marcado. Un anticuerpo tal puede estar marcado directa o indirectamente usando cualquiera de las aproximaciones discutidas anteriormente. Por ejemplo, el anti-anticuerpo puede estar acoplado a biotina que se detecta haciéndola reaccionar con el sistema de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante tratado anteriormente.

En una realización de esta invención se utiliza biotina. El anticuerpo biotinilado se hace reaccionar a si vez con complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Ortofenilenodiamina, 4-cloro-naftol, tetrametilbencidina (TMB), ABTS, BTS o ASA pueden usarse para llevar a cabo detección cromogénica.

En un formato de inmunoensayo para llevar a la práctica esta invención, se usa un ensayo de sandwich directo en el que el reactivo de captura se ha inmovilizado, usando técnicas convencionales, en la superficie de un soporte. Los

soportes adecuados usados en los ensayos incluyen soportes de polímero sintético, tales como polipropileno, poliestireno, poliestireno sustituido, p. ej. poliestireno aminado o carboxilado, poliacrilamidas, poliamidas, cloruro de polivinilo, cuentas de vidrio, agarosa, o nitrocelulosa.

5 La invención también describe kits para detectar la presencia de una proteína biomarcadora o de un ácido nucleico de biomarcador en una muestra biológica. Tales kits pueden usarse para determinar si un sujeto está sufriendo de o está en riesgo incrementado de desarrollar un tumor que es menos susceptible de inhibición con inhibidores de cinasa IGF-1R. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto o agente capaz de detectar una proteína biomarcadora o un ácido nucleico en una muestra biológica y medios para determinar la cantidad de la proteína o de ARNm en la muestra (p. ej., un anticuerpo que ata la proteína o un fragmento del mismo, o una sonda oligonucleotídica que se une al ADN o al ARNm que codifican la proteína). Los kits también pueden incluir instrucciones para interpretar los resultados obtenidos usando el kit.

Para kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (por ejemplo, acoplado a un soporte sólido) que se une a una proteína biomarcadora; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo, diferente, que se une bien a la proteína o bien al primer anticuerpo y se conjuga a una marca detectable.

15 Para kits basados en oligonucleótidos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido marcado detectablemente que hibrida con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína biomarcadora o (2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico biomarcadora. El kit puede comprender también, por ejemplo, un agente tamponante, un conservante, o una agente estabilizante de proteínas. El kit puede comprender adicionalmente componentes necesarios para detectar la marca detectable (por ejemplo, una enzima o un sustrato). El kit puede también contener una muestra de control o una serie de muestras de control que se pueden ensayar y comparar con la muestra de prueba. Cada componente del kit puede estar encerrado dentro de un recipiente individual y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de un envase individual, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos realizados usando el kit.

25 La presente invención proporciona adicionalmente un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento para tratar tumores o metástasis de tumores en un paciente con las etapas de diagnosticar la responsividad probable de un paciente a un inhibidor de cinasa de IGF-1R valorando si las células tumorales han sufrido una transición epitelial-mesenquimal, mediante por ejemplo cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento para determinar el nivel de expresión de células epiteliales tumorales y/o biomarcadores mesenquimales y administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa de IGF-1R. Para este uso, un ejemplo de un inhibidor de cinasa de IGF-1R preferido debería ser uno de características similares (por ejemplo selectividad, potencia) al Compuesto 66, incluyendo sales farmacológicamente aceptable o o polimorfos del mismo. Uno o más agentes o tratamientos anticancerígenos adicionales se pueden coadministrar simultánea o secuencialmente con el inhibidor de cinasa de IGF-1R, según se juzga que es apropiado por el médico administrador dada la predicción de la responsividad probable del paciente a un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en combinación con cualesquiera circunstancias adicionales pertenecientes al paciente individual.

35 Se apreciará por alguien de habilidad en las técnicas médicas que la manera exacta de administrar a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa de IGF-1R tras un diagnóstico de una responsividad probable de paciente a un inhibidor de cinasa de IGF-1R será a la discreción del médico que atiende. El modo de administración, incluyendo dosificación, la combinación con otros agentes anticancerígenos, el momento y la frecuencia de administración, y similares, puede verse afectado por la diagnosis de una responsividad probable del paciente a un inhibidor de cinasa de IGF-1R, así como por la afección y el historial del paciente. Así, incluso los pacientes diagnosticados con tumores que se predice que son relativamente insensibles a inhibidores de cinasa de IGF-1R pueden beneficiarse aún del tratamiento con tales inhibidores, en particular en combinación con otros agentes anticancerígenos, o agentes que puedan alterar una sensibilidad del tumor a los inhibidores de cinasa de IGF-1R.

45 La presente invención proporciona adicionalmente un inhibidor de cinasa IGF-1R para usar en un procedimiento para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente con las etapas de diagnosticar una responsividad probable del paciente a un inhibidor de cinasa de IGF-1R valorando si las células tumorales han sufrido una transición epitelial-mesenquimal, mediante por ejemplo cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento para determinar el nivel de expresión de los biomarcadores epiteliales y/o mesenquimales de células tumorales, identificar el paciente como uno que es probable que muestre una respuesta efectiva al tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R y administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

55 La presente invención proporciona adicionalmente un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento de tratar tumores o de metástasis de tumores en un paciente que comprende diagnosticar una responsividad probable de un paciente a un inhibidor de cinasa de IGF-1R valorando si las células tumorales han sufrido una transición epitelial-mesenquimal, mediante por ejemplo cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento para determinar el nivel de expresión de biomarcadores epiteliales y/o mesenquimales de células tumorales, identificar el paciente como uno que es menos probable o que no es probable que muestre una

respuesta efectiva a tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R y tratar a dicho paciente con una terapia anticancerígena distinta de un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

5 La efectividad del tratamiento en los los procedimientos precedentes pueden por ejemplo determinarse midiendo el decrecimiento en tamaño de tumores presente en los pacientes con la afección neoplásica, o ensayando un determinante molecular de grado de proliferación de las células tumorales.

La presente invención describe adicionalmente los procedimientos precedentes para tratar tumores o metástasis de tumores en un paciente, comprendiendo administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa de IGF-1R y además, simultáneamente o secuencialmente, uno o más agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o anticancerígenos, o compuestos que potencian los efectos de tales agentes.

10 En el contexto de este invención, otros agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o anticancerígenos adicionales, u otros compuestos que potencian los efectos de tales agentes, incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes o agentes con una acción alquilante, tales como ciclofosfamida (CTX; por ejemplo CYTOXAN®), clorambucilo (CHL; por ejemplo LEUKERAN®), cisplatina (CisP; por ejemplo PLATINOL®), busulfán (por ejemplo MYLERAN®), melfalán, carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenomelamina (TEM), mitomicina C y similares; antimetabolitos, tales como el metotrexato (MTX), etopósido (VP16; por ejemplo VEPESID®), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (por ejemplo XELODA®), dacarbazina (DTIC) y similares; antibióticos, tales como actinomicina D, doxorubicina (DXR; por ejemplo ADRIAMYCIN®), daunorrubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; alcaloides, tales como alcaloides de vinca, tales como vincristina (VCR), vinblastina y similares; y otros agentes antitumorales, tales como paclitaxel (por ejemplo TAXOL®) y derivados de paclitaxel, los agentes citostáticos, glucocorticoides tales como dexametasona (DEX; por ejemplo DECADRON®) y corticosteroides tales como prednisona, inhibidores de enzima nucleosídica tales como hidroxiaurea, enzimas reductoras de aminoácidos tales como asparraginas, leucovorina y otros derivados de ácido fólico, y agentes antitumorales distintos, similares. Los siguientes agentes pueden usarse también como agentes adicionales: arnifostina (por ejemplo ETHYOL®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina liposomal (por ejemplo DOXIL®), gemcitabina (por ejemplo GEMZAR®), daunorrubicina liposomal (por ejemplo DAUNOX- OME®), procarbazona, mitomicina, docetaxel (por ejemplo TAXOTERE®), aldesleucina, carboplatina, oxaliplatina, cladribina, camptotecina, CPT 11 (irinotecán), 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), flouxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón beta, interferón alfa, mitoxantrona, topotecán, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromán, plicamicina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo.

La presente invención describe adicionalmente los procedimientos precedentes para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente, comprendiendo administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa y además, simultánea o secuencialmente, uno o más agentes anti-hormonales. Como se usa en el presente documento, el término agente "anti-hormonal" incluye compuestos naturales o sintéticos orgánicos o peptídicos que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores.

Agentes antihormonales incluyen, por ejemplo: antagonistas de receptores de esteroides, antiestrógenos tales como tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben aromatasa, otros inhibidores de la aromatasa, 42-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (por ejemplo FARESTON®); anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualesquiera de los anteriores; agonistas y/o antagonistas de hormonas de glucoproteínas tales como la hormona estimuladora de folículo (FSH), hormona estimuladora del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH) y hormona luteinizante-hormona de liberación (LHRH); el acetato de goserelina agonista de la LHRH, comercialmente disponible como ZOLADEX® (AstraZeneca); N-acetil-3-(2-naftalenil)-D-alanil-4-cloro-D-fenilalanil-3-(3-piridinil)-D-alanil-L-seril-N6-(3-piridinilcarbonil)-L-lisil-N6-(3-piridinilcarbonil)-D-lisil-L-leucil-N6-(1-metiletil)-L-lisil-L-prolina de D-alaninamida antagonista de la LHRH (por ejemplo ANTIDE®, Ares-Serono); el ganirelixacetato antagonista de la LHRH; los antiandrógenos esteroideos acetato de ciproterona (CPA) y acetato de megestrol, comercialmente disponibles como MEGACE® (Bristol-Myers Oncology); la flutamida antiandrógena no esteroidea (2-metil-N-[4,20-nitro-3-(trifluorometil)fenilpropanamida], comercialmente disponible como EULEXIN® (Schering Corp.); el antiandrógeno no esteroideo nilutamida, (5,5-dimetil-3-[4-nitro-3-(trifluorometil-4'-nitrofenil)-4,4-dimetil-imidazolidinadiona]; y antagonistas para otros receptores no permisivos, tales como antagonistas para RAR, RXR, TR, VDR y similares.

El uso de agentes citotóxicos y otros agentes anticancerígenos descritos anteriormente en regímenes quimioterapéuticos está generalmente bien caracterizado en las técnicas de tratamiento de cáncer y su uso en el presente documento cae en las mismas consideraciones para hacer seguimiento de tolerancia y efectividad y para controlar vías de administración y dosificaciones, con algunos ajustes. Por ejemplo, las dosificaciones reales de los agentes citotóxicos pueden variar dependiendo de la respuesta de células cultivadas del paciente determinado usando procedimientos de histocultura. Generalmente, la dosificación será reducirá comparada con la cantidad usada en ausencia de otros agentes adicionales.

Las dosificaciones típicas de un agente citotóxico efectivo pueden estar en los intervalos recomendados por el fabricante y donde se indique por las respuestas *in vitro* o por las respuestas en los modelos animales, pueden reducirse en concentración o cantidad en hasta un orden de magnitud. Así, la dosificación real dependerá del juicio del médico, la afección del paciente y la efectividad del procedimiento terapéutico en base a la responsividad *in vitro* de las células malignas cultivadas principalmente o de la muestra de tejido histocultivado, o de las respuestas observadas en los modelos animales apropiados.

La presente invención describe adicionalmente los procedimientos precedentes para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente, comprendiendo administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa y además, simultánea o secuencialmente, uno o más inhibidores de angiogénesis.

Los agentes anti-angiogénicos incluyen, por ejemplo: inhibidores de VEGFR, tales como SU-5416 y SU-6668 (Sugen Inc. de South San Francisco, Calif., Estados Unidos), o como se describen en, por ejemplo las Solicitudes Internacionales N.ºs: WO 99/24440, WO 99/62890, WO 95/21613, WO 99/61422, WO 98/50356, WO 99/10349, WO 97/32856, WO 97/22596, WO 98/54093, WO 98/02438, WO 99/16755 y WO 98/02437 y Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 5.883.113, 5.886.020, 5.792.783, 5.834.504 y 6.235.764; inhibidores de VEGF tales como IM862 (Cytran Inc. de Kirkland, Wash, Estados Unidos); angiozima, una ribozima sintética a partir de ribozima (Boulder, Colo.) y Chiron (Emeryville, Calif.); y anticuerpos para VEGF, tales como bevacizumab (por ejemplo AVASTIN™, Genentech, South San Francisco, CA), un anticuerpo humanizado recombinante para VEGF; antagonistas del receptor de integrinas y antagonistas de integrinas, tales como para integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_v\beta_6$ y subtipos de las mismas, por ejemplo cilengitida (EMD 121974), o los anticuerpos de anti-integrinas, tales como por ejemplo anticuerpos específicos humanizados $\alpha_v\beta_3$ (por ejemplo VITAXIN®); factores tales como IFN-alfa (Patentes de los EE.UU. N.ºs: 41.530.901, 4.503.035, y 5.231.76); angiostatina y fragmentos de plasminógeno (por ejemplo kringle 1-4, kringle 5, kringle 1-3 (O'reilly, M. S. y cols. (1994) Cell 79: 315-328; Cao y cols. (1996) J. Biol. Chem. 271: 29461-29467; Cao y cols. (1997) J. Biol. Chem. 272: 22924-22928); endostatina (O'reilly, M. S. y cols. (1997) Cell 88: 277; y Publicación de Patente Internacional N.º WO 97/15666); trombospondina (TSP-1; Frazier, (1991) Curr. Opin. Cell. Biol. 3: 792); factor plaquetario 4 (PF4); activador del plasminógeno/inhibidores de urocinasa; antagonistas de receptores de urocinasa; heparinasas; análogos de fumagilina tales como TNP-4701; suramina y análogos de suramina; esteroides angiostáticos; antagonistas de bFGF; flk-1 y antagonistas de flt-1; agentes anti-angiogénicos tales como MMP-2 (inhibidores de metaloproteinasa de matriz 2) e inhibidores de MMP-9 (metaloproteinasa de matriz 9). Ejemplos de inhibidores de metaloproteinasas de matriz útiles se describen en las Publicaciones de Patentes Internacionales N.ºs: WO 96/33172, WO 96/27583, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667 y WO 99/07675, Publicaciones de Patentes Europeas N.ºs: 818.442, 780.386, 1.004.578, 606.046 y 931.788; Publicaciones de Patentes de Gran Bretaña N.ºs: 9912961 y Patentes de los EE.UU. N.ºs: 5.863.949 y 5.861.510. Los inhibidores de MMP-2 y MMP-9 preferidos son los que tienen poca o ninguna actividad para inhibir MMP-1. Se prefieren más los que inhiben de forma selectiva MMP-2 y/o MMP-9 en relación con las otras metaloproteinasas de la matriz (es decir MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12 y MMP-13).

La presente invención describe adicionalmente los procedimientos precedentes para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente, comprendiendo administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasas de IGF-1R y además, simultánea o secuencialmente uno o más agentes celulares pro-apoptóticos o estimuladores de apoptosis.

La presente invención describe adicionalmente los procedimientos precedentes para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente comprendiendo administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa de IGF-1R y además, simultáneamente o secuencialmente, uno o más inhibidores de transducción de señales.

Inhibidores de transducción de señales incluyen, por ejemplo: inhibidores de cinasa de EGFR, tales como moléculas orgánicas, por ejemplo, erlotinib HCl (TARCEVA™), o anticuerpos que se unen al receptor de EGFR; inhibidores del receptor de erbB2, tales como moléculas orgánicas, o anticuerpos que se unen al receptor erbB2, por ejemplo, trastuzumab (por ejemplo, HERCEPTIN®); inhibidores de las proteína tirosina-cinasas, por ejemplo imitinib (por ejemplo GLEEVEC®); inhibidores de ras; inhibidores de raf (por ejemplo BAY 43-9006, Onyx Pharmaceuticals/Bayer Pharmaceuticals); inhibidores de MEK; inhibidores de mTOR; inhibidores de cinasa dependientes de ciclina; inhibidores de la proteína cinasa C; e inhibidores de PDK-1 (véase Dancey, J. y Sausville, E.A. (2003) Nature Rev. Drug Discovery 2: 92-313, para una descripción de varios ejemplos de tales inhibidores y de su uso en ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer).

Los inhibidores de EGFR incluyen, por ejemplo: [6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolin-4-il]-(3-etinilfenil)amina (también conocidos como OSI-774, erlotinib, o TARCEVA™ (erlotinib HCl); OSI Pharmaceuticals/Genentech/Roche) (Patente de los EE.UU. N.º: 5.747.498; Publicación de Patente Internacional N.º WO 01/34574, y Moyer, J.D. y cols. (1997) Cancer Res. 57: 4838-4848); CI-1033 (antes conocido como PD183805; Pfizer) (Sherwood y cols., 1999, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 40: 723); PD-158780 (Pfizer); AG-1478 (Universidad de California); CGP-59326 (Novartis); PKI-166 (Novartis); EKB-569 (Wyeth); GW-2016 (también conocidos como GW-572016 o ditosilato de lapatinib; GSK);

gefitinib (también conocido como ZD1839 o IRES-SATM; Astrazeneca) (Woodbum y cols., 1997, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 38: 633); e inhibidores de cinasa de EGFR basados en anticuerpos. Un inhibidor de cinasa de EGFR de peso molecular bajo particularmente preferido que puede usarse de acuerdo con la presente invención es [6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolin-4-il]-(3-etinilfenil)amino (es decir erlotinib), su sal clorhidrato (es decir erlotinib HCl, TARCEVATM), u otras formas de sal (por ejemplo mesilato de erlotinib). Inhibidores de anticuerpos de cinasa de EGFR incluyen cualquier anticuerpo anti-EGFR o fragmento de anticuerpo que pueda bloquear parcialmente o completamente activación de EGFR por su ligando natural. Ejemplos no limitantes de inhibidores de anticuerpos de cinasa de EGFR incluyen aquellos descritos en Modjtahedi, H., y cols., 1993, Br. J. Cancer 67: 247-253; Teramoto, T., y cols., 1996, Cancer 77: 639-645; Goldstein y cols., 1995, Clin. Cancer Res. 1: 1311-1318; Huang, S. M., y cols., 1999, Cancer Res. 15: 59 (8): 1935-40; y Yang, X. y cols., 1999, Cancer Res. 59:1236-1243. Así, el inhibidor de cinasa de EGFR puede ser el anticuerpo monoclonal Mab E7.6.3 (Yang, X.D. y cols. (1999) Cancer Res. 59: 1236-43), o Mab C225 (N.º de acceso de ATCC HB-8508), o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo seroprotector que tiene la especificidad de unión del mismo. Los inhibidores de cinasa de EGFR de anticuerpos monoclonales adecuados incluyen, pero no se limitan a, IMC-C225 (también conocido como cetuximab o ERBITUXTM; Imclone Systems), ABX-EGF (Abgenix), EMD 72000 (Merck KgaA, Darmstadt), RH3 (York Medical Bioscience Inc.) y MDX-447 (Medarex/Merck KgaA).

Inhibidores de receptor de ErbB2 incluyen, por ejemplo: inhibidores del receptor de ErbB2, tales como GW-282974 (Glaxo Wellcome plc), anticuerpos monoclonales tales como AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc. de The Woodlands, Tex., EE.UU.) y 2B-1 (Chiron) y los inhibidores de erbB2 tales como aquellos descritos en las Publicaciones Internacionales de Patentes N.ºs: WO 98/02434, WO 99/35146, WO 99/35132, WO 98/02437, WO 97/13760, y WO 95/19970 y Patentes de los EE.UU. N.ºs: 5.587.458, 5.877.305, 6.465.449 y 6.541.481.

La presente invención describe adicionalmente los procedimientos precedentes para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente, comprendiendo administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa IGF-1R y además, simultáneamente o secuencialmente, un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento activo inmunoterapéutico del mismo.

La presente invención describe adicionalmente los procedimientos precedentes para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente, comprendiendo administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa de IGF-1R y además, simultáneamente o secuencialmente, uno o más agentes anti-proliferativos adicionales.

Los agentes antiproliferativos adicionales incluyen, por ejemplo: inhibidores de la enzima farnesil proteína transferasa e inhibidores de la tirosina cinasa de receptor PDGFR, incluyendo los compuestos revelados y reivindicados en los Números de patente de los EE.UU. 6.080.769, 6.194.438, 6.258.824, 6.586.447, 6.071.935, 6.495.564, 6.150.377, 6.596.735 y 6.479.513 y en la Publicación de Patente Internacional WO 01/40217.

La presente invención proporciona adicionalmente los procedimientos precedentes para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente, que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa de IGF-1R y además, simultáneamente o secuencialmente, un inhibidor de COX II (ciclooxigenasa II). Ejemplos de inhibidores de COX-II útiles incluyen alecoxib (por ejemplo, CELEBREXTM), valdecoxib y rofecoxib.

La presente invención describe adicionalmente los procedimientos precedentes para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente, que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa de IGF-1R y además, simultánea o secuencialmente, tratamiento con radiación o proceso radiofarmacéutico.

La fuente de radiación puede ser bien externa o bien interna al paciente que se está tratando. Cuando la fuente es externa al paciente, la terapia se conoce como terapia de radiación de haz externo (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se llama braquiterapia (BT). Los átomos radiactivos para usar en el contexto de esta invención se pueden seleccionar del grupo incluyendo, pero no limitados a, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131 e indio-111. Donde el inhibidor de cinasa de IGF-1R de acuerdo con esta invención es un anticuerpo, también es posible marcar el anticuerpo con tales isótopos radiactivos.

La terapia de radiación es un tratamiento estándar para controlar tumores no seccionables o inoperables y metástasis tumorales. Los resultados mejorados se han visto cuando la terapia de radiación se ha combinado con quimioterapia. La terapia de radiación se basa en el principio de que altas dosis de radiación administradas a un área objetivo darán como resultado la muerte de las células reproductoras tanto en tejidos tumorales como normales. El régimen de dosificación de la radiación se define generalmente en términos de dosis absorbidas de radiación (Gy), tiempo y fraccionamiento, y deben ser cuidadosamente definidas por el oncólogo. La cantidad de radiación que reciba un paciente dependerá de diversas consideraciones, pero las dos más importantes son la localización del tumor en relación a otras estructuras críticas u órganos críticos del cuerpo y la extensión a la que se ha dispersado el tumor. Un curso de tratamiento típico para un paciente que sufre de terapia de radiación será un

programa de tratamiento durante un periodo de 1 a 6 semanas, con una dosis total de entre 10 y 80 Gy administrada al paciente en una fracción diaria individual de aproximadamente 1,8 a 2,0 Gy, 5 días a la semana. En una realización preferida de esta invención hay sinergia cuando tumores en pacientes humanos se tratan con el tratamiento de combinación de la invención y la radiación. En otras palabras, la inhibición de crecimiento de tumor por medio de los agentes que comprende la combinación de la invención se potencia cuando se combina con radiación, opcionalmente con agentes quimioterapéuticos o anticancerígenos individuales. Los parámetros farmacocinéticos de terapias de radiación coadyuvantes están, por ejemplo, contenidos en la Publicación de Patente Internacional WO 99/60023.

La presente invención describe adicionalmente los procedimientos precedentes para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente, comprendiendo administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de cinasa de IGF-1R y además, simultáneamente o secuencialmente, tratamiento con uno o más agentes capaces de potenciar respuestas inmunes antitumorales.

Agentes capaces de potenciar respuestas inmunes antitumorales incluyen, por ejemplo: anticuerpos de CTLA4 (antígeno de linfocitos citotóxicos 4) (por ejemplo MDX-CTLA4), y otros agentes capaces de bloquear CTLA4. Anticuerpos CTLA4 específicos que se pueden usar en la presente invención incluyen aquellos descritos en la Patente de los EE.UU. N.º: 6.682.736.

En el contexto de esta invención, una "cantidad efectiva" de un agente o terapia es según se define anteriormente. Una "cantidad sub-terapéutica" de un agente o terapia es una cantidad menos efectiva para ese agente o terapia, pero cuando se combina con una cantidad efectiva o subterapéutica de otro agente o terapia puede producir un resultado deseado por el médico, debido a, por ejemplo, sinergia en los efectos eficaces resultantes, o efectos secundarios reducidos.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" preferentemente hace referencia a un ser humano en necesidad de tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R para cualquier propósito y más preferentemente a un ser humano en necesidad de tratamiento para tratar cáncer, o una afección o lesión precancerosa. Sin embargo, el término "paciente" puede hacer referencia también a animales no humanos, preferentemente mamíferos tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos, entre otros, que estén en necesidad de un tratamiento con un inhibidor de cinasa de IGF-1R.

En una realización preferida, el paciente es un ser humano en necesidad de tratamiento para cáncer, una afección o lesión precancerosa, u otras formas de crecimiento celular anormal. El cáncer es preferentemente cualquier cáncer tratable, bien parcialmente o bien completamente, por administración de un inhibidor de cinasa de IGF-1R. El cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón celular bronquioalveolar, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroideas, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de las células renales, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, leucemia aguda o crónica, linfomas linfocíticos, neoplasmas del sistema nervioso central, cáncer biliar, leucemia aguda o crónica, linfomas linfocíticos, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas celulares escamosos, adenomas de pituitaria, incluyendo versiones resistentes de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. La afección precancerosa o lesión incluye, por ejemplo, el grupo constituido por leukoplasia oral, queratosis actínica (queratosis solar), pólipos precancerosos del colon o el recto, displasia epitelial gástrica, displasia adenomatosa, síndrome de cáncer de colon no poliposis hereditario (HNPCC), esófago de Barrett, displasia de vejiga y afecciones cervicales precancerosas.

El término "refractario" como se usa en el presente documento se usa para definir un cáncer para el que el tratamiento (por ejemplo fármacos quimioterapéuticos, agentes biológicos, y/o terapia de radiación) ha demostrado ser ineficaz. Un tumor canceroso refractario puede encogerse, pero no hasta el punto donde se determina que el tratamiento es efectivo. Típicamente sin embargo, el tumor permanece del mismo tamaño como estaba antes del tratamiento (enfermedad estable), o crece (enfermedad progresiva).

Para los propósitos de la presente invención, "co-administración" y "co-administrar" un inhibidor de cinasa de IGF-1R con un agente anticancerígeno adicional (ambos componentes referidos de ahora en adelante como "dos agentes activos") se refiere a cualquier administración de los dos agentes activos, bien separadamente o bien conjuntamente, donde los dos agentes activos se administran como parte de un régimen de dosificación apropiada diseñado para obtener el beneficio de la terapia de combinación. Así, los dos agentes activos pueden administrarse bien como parte de la misma composición farmacéutica o bien en composiciones farmacéuticas separadas. El agente adicional se puede administrar antes de, a la misma hora que, o tras la administración del inhibidor de cinasa

de IGF-1R, o en algunas combinaciones de los mismos. Donde el inhibidor de cinasa de IGF-1R se administra al paciente a intervalos repetidos, por ejemplo, durante un curso estándar de tratamiento, el agente adicional puede administrarse antes de proceder a, al mismo tiempo que, o con posterioridad a, cada administración del inhibidor de la cinasa de IGF-1R, o algunas combinaciones de los mismos, o a diferentes intervalos en relación con el tratamiento de inhibidor de cinasa de IGF-1R, o en una dosis única antes de, en cualquier momento durante, o de forma subsiguiente al curso del tratamiento con el inhibidor de cinasa de IGF-1R.

El inhibidor de cinasa de IGF-1R se administrará típicamente al paciente en un régimen de dosis que estipula el tratamiento más efectivo del cáncer (tanto desde la perspectiva de la eficacia como desde la perspectiva de la seguridad) para el que el paciente está tratándose, como se conoce en la técnica y como se describe por ejemplo en la Publicación de la Patente Internacional N.º: WO 01/34574. En llevar a cabo el tratamiento de la presente invención, el inhibidor de la cinasa de IGF-1R puede administrarse en cualquier manera efectiva conocida en la técnica, tal como por vías oral, tópica, intravenosa, intra-peritoneal, intramuscular, intra-articular, subcutánea, intranasal, intra-ocular, vaginal, rectal, o intradérmica, dependiendo del tipo de cáncer que se trata, el tipo de inhibidor de cinasa de IGF-1R que se está usando (por ejemplo, molécula pequeña, anticuerpo, ARNi, ribozima o construcción antisentido) y el juicio médico del médico que prescribe como en base, por ejemplo, a los resultados de los estudios clínicos publicados.

La cantidad de inhibidor de cinasa de IGF-1R administrado y la coordinación de administración de inhibidor de cinasa de IGF-1R dependerá del tipo (especie, sexo, edad, peso, etc.) y de la afección del paciente que se está tratando, de la gravedad de la enfermedad o afección que se está tratando y de la vía de administración. Por ejemplo, los inhibidores de la cinasa de IGF-1R de moléculas pequeñas pueden administrarse a un paciente en dosis que varían desde 0,001 hasta 100 mg/kg de peso corporal por día o por semana en dosis individuales o divididas, o por infusión continua (véase, por ejemplo, Publicación de Patente Internacional N.º WO 01/34574). En particular, compuestos tales como Compuesto 66, o compuestos similares, pueden administrarse a una paciente en dosis que varían desde 200 mg por día, o 100-1600 mg por semana, en dosis individuales o divididas, o por infusión continua. Una dosis preferida es 150 mg/día. Los inhibidores de cinasa de UGF-1R basados en anticuerpos, o antisentido, construcciones de ARNi o de ribozima, se pueden administrar a un paciente en dosis que varían desde 0,1 hasta 100 mg/kg de peso corporal por día o por semana en dosis individuales o divididas, o por infusión continua. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis aún más grandes sin causar ningún efecto secundario perjudicial, siempre que dichas dosis mayores se dividan en primer lugar en varias dosis pequeñas para su administración durante todo el día.

Los inhibidores de cinasa de IGF-1R y otros agentes adicionales se pueden administrar bien por separado o bien conjuntamente por la misma o por diferentes vías y en una amplia diversidad de formas de dosificación. Por ejemplo, el inhibidor de la cinasa de IGF-1R se administra preferentemente oralmente o parenteralmente. Donde el inhibidor de cinasa de IGF-1R es Compuesto 66, o un compuesto tal similar, la administración oral es preferible. Tanto el inhibidor de cinasa de IGF-1R como otros agentes adicionales se pueden administrar en dosis individuales o múltiples.

El inhibidor de cinasa de IGF-1R se puede administrar con distintos vehículos inertes farmacéuticamente aceptables en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas, trociscos, caramelos duros, polvos, pulverizaciones, cremas, bálsamos, supositorios, jaleas, geles, pastas, lociones, ungüentos, elixires, jarabes y similares. La administración de tales formas de dosificación se puede llevar a cabo en dosis individuales o múltiples. Los vehículos incluyen diluyentes sólidos o cargas, medios acuosos estériles y diversos disolventes orgánicos no tóxicos, etc. Las composiciones farmacéuticas orales pueden edulcorarse y/o aromatizarse adecuadamente.

El inhibidor de cinasa de IGF-1R puede combinarse conjuntamente con diversos vehículos inertes farmacéuticamente aceptables en forma de pulverizadores, cremas, bálsamos, supositorios, jaleas, geles, pastas, lociones, ungüentos y similares. La administración de tales formas de dosificación se puede llevar a cabo en dosis individuales o múltiples. Los vehículos incluyen diluyentes sólidos o cargas sólidas, medios acuosos estériles y diversos disolventes orgánicos no tóxicos, etc.

Todas las formulaciones que comprenden inhibidores de cinasa de IGF-1R proteicos se deberían seleccionar para evitar desnaturalización y/o degradación y pérdida de la actividad biológica del inhibidor.

Se conocen en la técnica procedimientos de preparar composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de cinasa de IGF-1R, y se describen, por ejemplo en la Publicación de la Patente Internacional N.º WO 01/34574. En vista de la enseñanza de la presente invención, los procedimientos de preparar composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de cinasa de IGF-1R serán patentes a partir de las publicaciones anteriormente citadas y a partir de otras referencias conocidas, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 18ª edición (1990).

Para administración oral de inhibidores de cinasa de IGF-1R, los comprimidos que contienen uno o ambos de los agentes activos se combinan con cualquiera de diversos excipientes tales como, por ejemplo, celulosa

microcristalina, citrato sódico, carbonato de calcio, fosfato de dicalcio y glicina, junto con diversos disgregantes tales como almidón (y preferentemente almidón de maíz, de patata o de tapioca), ácido algínico y ciertos silicatos complejos, conjuntamente con aglutinantes de granulación como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y goma arábica. Adicionalmente, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco son a menudo muy útiles para propósitos de formación de comprimidos. Las composiciones sólidas de un tipo similar se pueden emplear también como cargas en cápsulas de gelatina; los materiales preferidos en esta conexión incluyen también lactosa o azúcar de leche así como polietilenglicoles de peso molecular alto. Cuando se desean las suspensiones acuosas y/o los elixires para administración oral, el inhibidor de cinasa de IGF-1R se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, agentes colorantes o tinciones, y, si así se desea, agentes emulsionantes y/o de suspensión también, conjuntamente con diluyentes tales como agua, etanol, propilenoglicol, glicerina y diversas combinaciones similares de los mismos.

Para administración parenteral de cualquiera de o ambos de los agentes activos, se pueden emplear soluciones tanto en aceite de sésamo o de cacahuate como en propilenoglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles que comprenden el agente activo o una sal soluble en agua correspondiente de los mismos. Tales soluciones acuosas estériles están preferentemente tamponadas adecuadamente y preferentemente se vuelven isotónicas, por ejemplo, con suficiente medio salino o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para propósitos de inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Las soluciones aceitosas son adecuadas para propósitos de inyección intra-articular, intramuscular y subcutánea. La preparación de todas estas soluciones en condiciones estériles se lleva a cabo fácilmente por técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Cualquier formulación parenteral seleccionada para administración de inhibidores de cinasa de IGF-1R proteicos se debería seleccionar tal como para evitar desnaturalización y pérdida de actividad biológica del inhibidor.

Además, es posible administrar tópicamente cualquiera o ambos de los agentes activos, por medio de, por ejemplo, cremas, lociones, jaleas, geles, pastas, ungüentos, bálsamos y similares, de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar. Por ejemplo, se puede preparar una formulación tópica que comprende un inhibidor de cinasa de IGF-1R en aproximadamente 0,1 % (p/v) a aproximadamente 5 % (p/v) de concentración.

Para efectos veterinarios, los agentes activos se pueden administrar por separado o conjuntamente con animales que usan cualquiera de las formas y cualquiera de las vías descritas anteriormente. En una realización preferida, el inhibidor de IGF-1R cinasa se administra en forma de cápsula, bolo, comprimido, empapamiento líquido, por inyección o como un implante. Como una alternativa, el inhibidor de cinasa de IGF-1R se puede administrar con el pienso de animales y para este propósito se puede preparar un aditivo alimentario concentrado o una premezcla para un alimento animal normal. Tales formulaciones se preparan en una manera convencional de acuerdo con la práctica veterinaria estándar.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de cinasa de IGF-1R" hace referencia a cualquier inhibidor de cinasa de IGF-1R que actualmente se conozca o que se identifique en el futuro e incluye cualquier entidad química que, tras administración a un paciente, dé como resultado inhibición de una actividad biológica asociada con activación del receptor de IGF-1 en el paciente, incluyendo cualquiera de los efectos biológicos más adelante en la cadena de activación que resulte de otro modo a partir de la unión a IGF-1R de su ligando natural. Tales inhibidores de cinasa de IGF-1R incluyen cualquier agente que pueda bloquear activación de IGF-1R de cualquiera de los efectos biológicos más adelante en la cadena de activación de IGF-1R que sean relevantes para tratar el cáncer en un paciente. Un inhibidor tal puede actuar uniéndose directamente al dominio intracelular del receptor e inhibiendo su actividad cinasa. Alternativamente, un inhibidor tal puede actuar ocupando el sitio de unión de ligando o una parte del mismo del receptor de IGF-1, haciendo por lo tanto al receptor inaccesible a su ligando natural de tal forma que su actividad biológica normal se evite o se reduzca. Alternativamente, un inhibidor tal puede actuar modulando la dimerización de polipéptidos de IGF-1R, o la interacción de polipéptido de IGF-1R con otras proteínas, o puede potenciar ubiquitinación y degradación endocítica de IGF-1R. Un inhibidor de cinasa de IGF-1R puede actuar también reduciendo la cantidad de IGF-1 disponible para activar IGF-1R, por ejemplo antagonizando la unión de IGF-1 a su receptor, reduciendo el nivel de IGF-1, o promoviendo la asociación de IGF-1 con proteínas distintas de IGF-1R tales como proteínas de unión a IGF (por ejemplo IGFBP3). Los inhibidores de cinasa de IGF-1R incluyen pero no se limitan a inhibidores de peso molecular bajo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, construcciones antisentido, ARN inhibidores pequeños (es decir ARN de interferencia por ARNs; ARNi) y ribozimas. En una realización preferida, el inhibidor de cinasa de IGF-1R es una molécula orgánica pequeña o un anticuerpo que se une específicamente al IGF-1R humano.

Los inhibidores de cinasa de IGF-1R incluyen, por ejemplo inhibidores de cinasa de IGF-1R de imidazopirazina, inhibidores de cinasa de IGF-1R de quinazolina, inhibidores de cinasa de IGF-1R de pirido-pirimidina, inhibidores de cinasa de IGF-1R de pirimido-pirimidina, inhibidores de cinasa de IGF-1R de pirrolo-pirimidina, inhibidores de cinasa de IGF-1R de pirazolo-pirimidina, inhibidores de cinasa de IGF-1R de fenilamino-pirimidina, inhibidores de cinasa de IGF-1R de oxindol, inhibidores de cinasa de IGF-1R de indolocarbazol, inhibidores de cinasa de IGF-1R de ftalazina, inhibidores de cinasa de IGF-1R de isoflavona, inhibidores de cinasa de IGF-1R de quinalona e inhibidores de cinasa de IGF-1R de tirfostina y todas las sales y solvatos de tales inhibidores de cinasa de IGF-1R.

Ejemplos adicionales de inhibidores de cinasa de IGF-1R incluyen aquellos en la Solicitud de Patente Internacional N.º: WO 05/037836, que describen inhibidores de cinasa de IGF-1R de imidazopirazina, Publicaciones de Patentes Internacionales N.ºs: WO 03/018021 y WO 03/018022 que describen pirimidinas para tratar trastornos relacionados con IGF-1R, Publicaciones de Patentes Internacionales N.ºs: WO 02/102804 y WO 02/102805, que describen ciclolignanos y ciclolignanos como inhibidores de IGF-1R, Publicación de Patente Internacional N.º: WO 02/092599, que describe pirrolopirimidinas para el tratamiento de una enfermedad que responde a una inhibición de la cinasa de IGF-1R, Publicación de Patente Internacional N.º: WO 01/72751, que describe pirrolopirimidinas como inhibidores de tirosina cinasas y en Publicación de Patente Internacional N.º: WO 00/71129, que describe inhibidores pirrolotriazina de cinasas y en Publicación de Patente Internacional N.º: WO 97/28161, que describe pirrolo[2,3-d]pirimidinas y su uso como inhibidores de cinasa, Parrizas, y cols., lo que describe tirfostinas con actividad inhibidora de IGF-1R *in vitro* e *in vivo* (Endocrinology, 138: 1427-1433 (1997)), Publicación de Patente Internacional N.º: WO 00/35455, que describe heteroaril-arilureas como inhibidores de IGF-1R, Publicación de Patente Internacional N.º: WO 03/048133, que describe derivados de las pirimidinas que como moduladores de IGF-1R, Publicaciones de Patentes Internacionales N.ºs: WO 03/024967, WO 03/035614, WO 03/035615, WO 03/035616 y WO 03/035619, que describen compuestos químicos con efectos inhibidores de proteínas cinasa, Publicación de Patente Internacional N.º: WO 03/068265, que describe procedimientos y composiciones para tratar afecciones hiperproliferativas, Publicación de Patente Internacional N.º: WO 00/17203, que describe pirrolopirimidinas como inhibidores de proteína cinasas, Publicación de Patente Internacional Japonesa N.º: JP 07/133280, que describe un compuesto de cefem, su producción y composición antimicrobiana, Albert, A. y cols., Journal of the Chemical Society, 11: 1540-1547 (1970), que describe estudios de pteridina y pteridinas no sustituidas en la posición 4, y A. Albert y cols., Chem. Biol. Pteridines Proc. Int. Symp., 4º, 4: 1-5 (1969) que describe una síntesis de pteridinas (no sustituidas en la posición 4) a partir de pirazinas, por medio 3-4-dihidropteridinas.

Ejemplos específicos de inhibidores de cinasa de IGF-1R que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen h7C10 (Centre de Recherche Pierre Fabre), un antagonista de IGF-1; EM-164 (ImmunoGen Inc.), un modulador de IGF-1R; CP-751871 (Pfizer Inc.), un antagonista de IGF-1; lanreotida (Ipsen), un antagonista de IGF-1; oligonucleótidos de IGF-1R (Lynx Therapeutics Inc.); oligonucleótidos de IGF-1 (National Cancer Institute); inhibidores de proteína-tirosina cinasa de IGF-1R en desarrollo por Novartis (por ejemplo NVP-AEW541, García-Echeverría, C. y cols. (2004) Cancer Cell 5: 231-239; o NVP-ADW742, Mitsiades, C.S. y cols. 2004) (Cancer Cell 5: 221-230); inhibidores de proteína-tirosina cinasa de IGF-1R (Ontogen Corp); AG- 1024 (Camirand, A. y cols. (2005) Breast Cancer Research 7: R570-R579 (DOI 10.1186/bcr1028); Camirand, A. y Pollak M. (2004) Brit. J. Cancer 90: 1825-1829; Pfizer Inc.), un antagonista de IGF-1; las tirfostinas AG-538 y I-OMe-AG 538; BMS-536924, un inhibidor de moléculas pequeñas de IGF-1R; y PNU-145156E (Farmacia & Upjohn SpA), un antagonista de IGF-1.

Inhibidores de cinasa de IGF-1R basados en anticuerpos incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-IGF-1R que pueden bloquear parcial o completamente la activación de IGF-1R por su ligando natural. Inhibidores de cinasa de IGF-1R basados en anticuerpos incluyen también cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-IGF-1R que pueda bloquear total o parcialmente la activación de IGF-1R. Ejemplos no limitantes de inhibidores de cinasa de IGF-1R basados en anticuerpos incluyen aquellos descritos en Larsson, O. y cols. (2005) Brit. J. Cancer 92: 2097-2101 e Ibrahim, Y.H. y Yee, D. (2005) Clin. Cancer Res. 11 :944s-950s, o que están desarrollados por Imclone (por ejemplo A 12) o por Schering-Plough Research Institute (por ejemplo 19D 12; o como se describe en las Publicaciones de Patentes de los EE.UU. N.ºs: US 2005/0136063 A1 y US 2004/0018191 A1). El inhibidor de cinasa de IGF-1R puede ser un anticuerpo monoclonal, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tenga la especificidad de unión del mismo.

Inhibidores de cinasa de IGF-1R basados en anticuerpos pueden obtenerse de acuerdo con procedimientos conocidos administrando el antígeno o epitopo adecuado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, a partir de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Diversos coadyuvantes conocidos en la técnica se pueden usar para potenciar la producción de anticuerpos.

Aunque los anticuerpos útiles en poner en práctica la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra IGF-1R se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que estipule la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para producción y aislamiento incluyen pero no se limitan a la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (Nature, 1975, 256: 495-497); la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor y cols., 1983, Immunology Today 4: 72; Cote y cols., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 80: 2026-2030); y la técnica de EBV-hibridoma (Cole y cols., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96).

Alternativamente, se pueden adaptar técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (véase por ejemplo, Patente de los EE.U.U. N.º: 4.946.778) para producir anticuerpos de cadena única anti-IGF-1R. Los inhibidores de cinasa de IGF-1R basados en anticuerpos útiles en llevar a la práctica la presente invención incluyen también fragmentos de anticuerpo anti-IGF-1R incluyendo, pero no limitados a fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab y/o de scFv (véanse, por ejemplo, Huse y cols., 1989, Science 246: 1275-1281) para permitir identificación rápida de fragmentos que tienen la especificidad deseada para IGF-1R.

Técnicas para la producción y el aislamiento de anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos se conocen bien en la técnica, y se describen por Harlow y Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory y en J. W. Goding, 1986, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, Londres. Los anticuerpos anti-IGF-1R y los fragmentos de anticuerpos anti-IGF-1R humanizados se pueden preparar también de acuerdo con técnicas tales como aquellas descritas en Vaughn, T. J. y cols., 1998, *Nature Biotech.* 16: 535-539 y referencias citadas en ello y tales anticuerpos o fragmentos de ellos son también útiles en llevar a la práctica la presente invención.

Los inhibidores de cinasa de IGF-1R para usar en la presente invención pueden basarse alternativamente en construcciones de oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos anti-sentido, moléculas de ARN antisentido y moléculas de ADN antisentido, actuarían para bloquear directamente la traducción de ARNm de IGF-1R uniéndose a éste y evitando así la traducción de proteínas o incrementando la degradación de ARNm, disminuyendo así el nivel de proteína cinasa de IGF-1R y así la actividad, en una célula. Por ejemplo, se pueden sintetizar oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de secuencia transcrita de ARNm que codifica IGF-1R, por ejemplo, por técnicas de fosfodiéster convencionales y se pueden administrar mediante por ejemplo, inyección intravenosa o perfusión. Se conocen bien en la técnica los procedimientos para usar técnicas antisentido para inhibir específicamente expresión génica de genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo véanse Patentes de los EE.UU. N.ºs: 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321; y 5.981.732).

Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) pueden funcionar también como inhibidores de cinasa de IGF-1R para usar en la presente invención. La expresión génica de IGF-1R se puede reducir poniendo en contacto el tumor, sujeto o célula con un ARN de doble hebra pequeño (ARNdp) o con un vector o construcción que causa la producción de un ARN de doble hebra pequeño, de tal forma que la expresión de IGF-1R esté específicamente inhibida (es decir ARN de interferencia o ARNi). Los procedimientos para seleccionar un ARNdp o vector que codifica ARNdp apropiado se conocen bien en la técnica para genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo véanse Tuschli, T., y cols., (1999) *Genes Dev.* 13 (24): 3191-3197; Elbashir, S.M. y cols. (2001) *Nature* 411: 494-498; Hannon, G.J. (2002) *Nature* 418: 244-251; McManus, M.T. y Sharp, P. A. (2002) *Nature Reviews Genetics* 3: 737-747; Bremmelkamp, T.R. y cols. (2002) *Science* 296: 550-553; Patente de los EE.UU. N.ºs: 6.573.099 y 6.506.559; y Publicaciones de Patentes Internacionales N.ºs: WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836).

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de cinasa de IGF-1R para usar en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción de ribozimas implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima al ARN diana complementario, seguido por escisión endonucleolítica. Moléculas de ribozima de restos en horquilla o en cabeza de martillo que catalizan específica y eficientemente escisión endonucleolítica de secuencias de ARNm de ARNm de *IGF-1R* son por lo tanto útiles dentro del ámbito de la presente invención. Los sitios de escisión de ribozimas específicos dentro de cualquier ARN objetivo comercial se identifican inicialmente explorando la molécula objetivo para sitios de escisión de ribozimas, que incluyen típicamente las secuencias siguientes, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las secuencias cortas de ARN de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos que corresponden a la región del gen objetivo que contiene el sitio de escisión pueden evaluarse en características estructurales predichas, tales como estructura secundaria, que pueden volver a la secuencia de oligonucleótido inadecuada. La idoneidad de objetivos candidatos también puede evaluarse poniendo a prueba su accesibilidad a hibridación con oligonucleótidos complementarios, usando por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasas.

Tanto oligonucleótidos antisentido como ribozimas útiles como inhibidores de cinasa de IGF-1R se pueden preparar por procedimientos conocidos. Éstos incluyen técnicas de síntesis química tales como, por ejemplo, por síntesis química de fosforamada en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN antisentido pueden generarse por transcripción de secuencias de ADN *in vitro* e *in vivo* que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN pueden incorporarse dentro de una amplia diversidad de vectores que incorporan promotores de polimerasa de ARN adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Se pueden introducir diversas modificaciones a los oligonucleótidos como un medio de incrementar estabilidad intracelular y semivida. Las modificaciones posibles incluyen pero no se limitan a la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxinucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de enlaces fosforotioato o 2'-O-metilo más que enlaces fosfodiéstera dentro del armazón de oligodesoxirribonucleótidos.

Los inhibidores de cinasa de IGF-1R se usan como una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad efectiva terapéuticamente no tóxica de un compuesto inhibidor de cinasa de IGF-1R (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables del mismo).

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Cuando un compuesto usado en la presente invención es ácido, su sal correspondiente se puede preparar convenientemente a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de estas bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, de amonio, de calcio, de cobre (cúprica y cuprosa), férrica, ferrosa, de litio, de magnesio, de manganeso (mangánica y manganosa), de potasio, de sodio, de cinc y similares. Particularmente preferidas son las sales de

amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, así como aminas cíclicas y aminas sustituidas, tales como aminas naturales y sintéticas. Otras bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables a partir de las que se pueden formar sales incluyen resinas de intercambio iónico tales como, por ejemplo, arginina, betaína, cafeína, colina, N',N'-dibencililenodiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilenodiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares.

Cuando un compuesto usando en la presente invención es básico, su sal correspondiente se puede preparar convenientemente a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Estos ácidos incluyen, por ejemplo, ácido acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, múxico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico y similares. Se prefieren particularmente los ácidos cítrico, bromhídrico, clorhídrico, maleico, fosfórico, sulfúrico y tartárico.

Las composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención que comprenden un compuesto inhibidor de cinasa de IGF-1R (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables de los mismos) como ingredientes activos, pueden incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes o coadyuvantes terapéuticos. Otros agentes terapéuticos pueden incluir aquellos agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o anticancerígenos, o agentes que potencian los efectos de tales preparados, como se mencionan anteriormente. Las composiciones incluyen composiciones adecuadas para administración oral, rectal, tópica y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa), aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá del huésped particular, y de la naturaleza y gravedad de las afecciones para las que se va a administrar el ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia.

En la práctica, los compuestos inhibidores de cinasa de IGF-1R (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables de los mismos) usados en esta invención se pueden combinar como el ingrediente activo en mezcla íntima con un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas de formación de compuestos farmacéuticos convencionales. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo intravenosa). Por tanto, las composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención se pueden presentar como unidades discretas adecuadas para la administración oral tales como cápsulas, sobres o comprimidos conteniendo cada una una cantidad predeterminada del ingrediente activo. Además, las composiciones se pueden presentar como un polvo, como gránulos, como una solución, como una suspensión en un líquido acuoso, como un líquido no acuoso, como una emulsión de aceite-en-agua o como una emulsión líquida de agua en aceite. Además de las formas de dosificación comunes un compuesto inhibidor de cinasa de IGF-1R (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables de cada componente de los mismos) se puede administrar por medios de liberación controlada y/o dispositivos de administración. Las composiciones de combinación se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos de farmacia. En general, tales procedimientos incluyen una etapa de llevar en asociación los ingredientes activos con el vehículo que constituyen uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o con vehículos sólidos finamente divididos o con ambos. Después, el producto se puede conformar convenientemente en la presentación deseada.

Un compuesto inhibidor de cinasa de IGF-1R (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables del mismo) usado en esta invención, puede también incluirse en composiciones farmacéuticas en combinación con uno o más compuestos terapéuticamente activos distintos. Otros compuestos terapéuticamente activos pueden incluir aquellos agentes citotóxicos, quimioterapéutico o anticancerígenos, o agentes que potencian los efectos de tales agentes, como se enumeran anteriormente.

Así, la composición farmacéutica puede comprender un compuesto inhibidor de cinasa de IGF-1R en combinación con un agente anticancerígeno, en el que dicho agente anticancerígeno es un miembro seleccionado a partir del grupo constituido por fármacos alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de microtúbulos, podofilotoxinas, antibióticos, nitrosoureas, terapias hormonales, inhibidores de cinasa, activadores de apoptosis de células tumorales y agentes antiangiogénicos.

El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido, líquido o gas. Ejemplos de vehículos sólidos incluyen lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio y ácido esteárico. Ejemplos de vehículos líquidos son jarabe de azúcar, aceite de cacahuete, aceite de oliva y agua. Ejemplos de vehículos gaseosos incluyen dióxido de carbono y nitrógeno.

Para preparar las composiciones para la forma de dosificación oral, se puede emplear cualquier medio farmacéutico conveniente. Por ejemplo, se pueden usar agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares para formar preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, elixires y

5 soluciones; mientras que se pueden usar vehículos, tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes granuladores, lubricantes, aglutinantes, y agentes disgregantes y similares para formar preparaciones sólidas orales tales como polvos, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas son las unidades de dosificación orales preferidas cuando se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Opcionalmente, se pueden recubrir comprimidos por técnicas acuosas o no acuosas estándar.

10 Se puede preparar un comprimido que contiene la composición usada para esta invención por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes o coadyuvantes accesorios. Se pueden preparar comprimidos prensados comprimiendo, en una máquina adecuada, el ingrediente activo en una forma fluida tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, agente activo de superficie o agente dispersante. Se puede preparar comprimidos moldeados moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto pulverizado humedecido con un diluyente líquido inerte. Cada comprimido contiene preferentemente desde aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 5 g del ingrediente activo y cada sobre o cápsula contiene preferentemente desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 5 g del ingrediente activo.

15 Por ejemplo, una formulación destinada para la administración oral a seres humanos puede contener desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 5 g de agente activo, acompañado con una cantidad apropiada y conveniente de material de vehículo que puede variar de desde aproximadamente un 5 hasta aproximadamente un 95 por ciento de la composición total. En general, las formas de dosificación unitaria contendrán entre desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 2 g del ingrediente activo, normalmente 25 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 800 mg, o 1000 mg.

20 Se pueden preparar composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención adecuadas para administración parenteral como soluciones o suspensiones de los compuestos activos en agua. Se puede incluir un tensioactivo adecuado, tal como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. Además, se puede incluir un conservante para evitar el crecimiento perjudicial de microorganismos.

25 Las composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles. Además, las composiciones pueden estar en forma de polvos estériles para la preparación extemporánea de estas soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma inyectable final debe ser estéril y debe ser fluida de forma efectiva para una fácil inyectabilidad. Las composiciones farmacéuticas deben ser estables según las condiciones de fabricación y almacenamiento; por lo tanto, preferentemente se deben preservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio de dispersión o disolvente que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), aceites vegetales y mezclas adecuadas de los mismos.

30 Las composiciones farmacéuticas para la presente invención pueden estar en una forma adecuada para uso tópico, tal como, por ejemplo, un aerosol, crema, ungüento, loción, polvo para espolvorear, o similares. Además, las composiciones pueden estar en una forma adecuada para su uso en dispositivos transdérmicos. Estas formulaciones pueden prepararse, utilizando un compuesto inhibidor de cinasa de IGF-1R (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables del mismo), por medio de procedimientos de procesamiento convencionales. Como ejemplo, se prepara una crema o ungüento mezclando material hidrófilo y agua, junto con de aproximadamente un 5 % en peso a aproximadamente un 10 % en peso del compuesto, para producir una crema o ungüento que tenga una consistencia deseada.

35 Las composiciones farmacéuticas para esta invención pueden estar en una forma adecuada para la administración rectal en la que el vehículo es un sólido. Es preferible que la mezcla forme supositorios de dosis unitaria. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales usados comúnmente en la técnica. Los supositorios se pueden formar convenientemente mezclando en primer lugar la composición con el/los vehículo(s) suavizado(s) o fundido(s) seguido de enfriamiento y conformación en moldes.

40 Además de los ingredientes de vehículo mencionados anteriormente, las formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente pueden incluir, según sea apropiado, uno o más ingredientes de vehículo adicionales, tales como diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, aglutinantes, agentes activos de superficie, espesantes, lubricantes y conservantes (incluyendo antioxidantes) y similares. Además, se pueden incluir otros coadyuvantes para que la formulación se vuelva isotónica con la sangre o el recipiente deseado. Las composiciones que contienen un compuesto inhibidor de cinasa de IGF-1R (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables del mismo) pueden también prepararse en polvo o en forma de líquido concentrado.

45 Los niveles de dosificación para los compuestos usados para llevar a la práctica esta invención serán aproximadamente como se describen en el presente documento, o como se describen en la técnica para estos compuestos. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores incluyendo la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el

tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que esté en tratamiento.

Muchos procedimientos experimentales alternativos conocidos en la técnica pueden sustituirse exitosamente por aquellos descritos específicamente en la práctica de esta invención, como por ejemplo los descritos en muchos de los excelentes manuales y libros de texto disponibles en la práctica de esta invención (por ejemplo Using Antibodies, A Laboratory Manual, editado por Harlow, E. y Lane, D., 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (por ejemplo ISBN 0-87969-544-7); Roe B.A. y cols. 1996, DNA Isolation and Sequencing (Essential Techniques Series), John Wiley & Sons. (por ejemplo ISBN 0-471-97324-0); Methods in Enzymology: Chimeric Genes and Proteins", 2000, ed. J. Abelson, M. Simon, S. Emr, J. Thorner. Academic Press; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2001, 3ª edición, por Joseph Sambrook y Peter MacCallum, (el manual Maniatis Cloning anterior) (por ejemplo ISBN 0-87969-577-3); Current Protocols in Molecular Biology, Ed. Fred M. Ausubel, y cols. John Wiley & Sons (por ejemplo ISBN 0-471-50338-X); Current Protocols in Protein Science, Ed. John E. Coligan, John Wiley & Sons (por ejemplo ISBN 0-471-11184-8); y Methods in Enzymology: Guide to protein Purification, 1990, vol. 182, Ed. Deutscher, M.P., Academic Press, Inc. (por ejemplo ISBN 0-12-213585-7)), o como se describe en los muchos sitios de Internet universitarios y comerciales dedicados a describir procedimientos experimentales en biología molecular.

Detalles experimentales:

Introducción

Los inhibidores de la función del receptor de IGF-1 han mostrado utilidad clínica y la definición de rutas de señalización de receptor IGF-1 claves que describen subgrupos de pacientes que se benefician lo más probablemente de la terapia ha llegado a ser un área importante de investigación. La capacidad de células tumorales para mantener las señales de crecimiento y supervivencia en ausencia de adhesión a matriz extracelular o de contactos célula-célula no sólo es importante en el contexto de migración celular y metástasis sino también en mantener proliferación celular y supervivencia en ambientes tumorales similares a heridas donde la matriz extracelular se está remodelando y la inhibición de contacto celular está disminuida. Aquí los autores de la presente invención demuestran que la sensibilidad de células NSCLC a inhibición de receptor IGF-1 se confiere por un fenotipo celular epitelial de E-cadherina. En cambio la insensibilidad a inhibición de receptor de IGF-1 estaba mediada por una transición epitelial-mesenquimal (EMT) asociada con la manifestación de vimentina y/o fibronectina.

Materiales y procedimientos

30 Cultivo celular y preparación de extractos celulares

Las líneas de NSCLC con IGF-1R, H292, H358, H322, H441, A549, Calu6, H460, H1703 y SW 1573 se cultivaron en los medios suplementados recomendados de ATCC apropiados. Los extractos celulares se prepararon por lisis de detergente ((Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, Na-Desoxicolato al 0,5 %, SDS al 0,1 %) que contiene los inhibidores de proteasas y fosfatasa. La concentración de proteínas solubles se determinó por microensayo de BSA (Pierce, Rockford IL).

Soluciones de Stock de Compuesto de Inhibidor de IGF-1R

Concentración de reserva de Compuesto 66 de inhibidor de IGF-1R fue 10 mM en DMSO al 100 % (dimetilsulfóxido). Se usaron diluciones en serie (1:3 ó 1:4) para establecer la dosis inhibitora al 50 % de inhibidor de IGF-1R. Antes de dosificar, el inhibidor se diluyó en DMSO al 100 % y después se añadieron a las células a concentraciones finales deseadas en duplicados. La concentración de DMSO final fue entre 0,3-0,5 %.

Análisis de inmunotransferencia de extractos de línea celular de NSCLC

La inmunodetección de proteínas se llevó a cabo por transferencia electroforética de proteínas separadas por SDS-PAGE a nitrocelulosa, incubación con anticuerpo y segunda etapa de detección quimioluminiscente (PicoWest; Pierce, Rockford, IL). Los anticuerpos incluyeron: E-cadherina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; sc21791), catenina α (sc9988), catenina β (sc7963), catenina γ (sc8415) y Brk (sc1188); Vimentina (BD Biosciences, San José, CA; BD550513) y Fibronectina (BD610077); GAPDH (AbCam, Cambridge, Reino Unido); Phospho-Akt (Cell Signaling, Beverly, MA n.º: 9271), Akt (CS, n.º: 9272), Fosfo-p44/42 Map cinasa^{T202/Y204} (Erk1/2; CS n.º: 9101), familia de Fosfo-Src^{Y416} (CS n.º: 2101), Fosfo-STAT3^{Y705} (CS, n.º: 9131) y Fosfo-S6^{S235/236} (CS, n.º: 2211); actina β (Sigma, San Luis, MO n.º: A5441). Los anticuerpos incluyen adicionalmente: Fosfo-Shc (Cell Signaling, n.º: 2434, Beverly, MA), Fosfo-Paxilina (Cell Signaling, n.º: 2541), Fosfo- Akt (Ser473 and Thr308) (Cell Signaling, n.º: 9271 y 9275), Fosfo-HER2/ErbB2 (Cell Signaling, n.º: 2245), Fosfo- Her3 (Tyr1289) (Cell Signaling n.º: 4791), Fosfo-p44/42 Map cinasa (Cell Signaling, n.º: 9101), Fosfo-EGFR (Tyr845) (Cell Signaling, n.º: 2231), Fosfo-EGFR (Tyr992) (Cell Signaling, n.º: 2235), Fosfo-EGFR (Tyr1045) (Cell Signaling, n.º: 2237), EGFR (Cell Signaling, n.º: 2232), Fosfo-p70 S6 cinasa (Cell Signaling, n.º: 9205), Fosfo-GSK-3alfa/beta (Cell Signaling, n.º: 9331), Fosfo-EGFR (Tyr1068) (Cell Signaling, n.º: 2236), familia de Fosfo-Src (Tyr416) (Cell Signaling n.º: 2101), Fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)(Cell

Signaling n.º: 9251), Fosfo-STAT3 (Tyr705) (Cell Signaling n.º: 9131), ErbB2 (Cell Signaling n.º: 2242); ErbB4 (Cell Signaling 4795), PY20 (Exalpa Biologicals Inc.), Brk (Santa Cruz Biochemicals).

Farmacología *in vitro*

5 Para medir la viabilidad celular, se usó el ensayo Cell-Titer Glo, que está disponible como un kit de Promega. La base del ensayo es una cuantificación luminiscente de ATP presente en un pocillo de placa de cultivo celular. En esencia, cuanto mayor es el número de células viables en el pocillo, mayor es el nivel de ATP presente. El ensayo utiliza un sustrato que une ATP para producir una señal luminiscente, que puede leerse en un luminómetro. A menos que se destaque lo contrario, las instrucciones de los fabricantes se siguieron exactamente. Brevemente, en el Día 1, las células se plaquearon en 120 µl de medios de cultivo que contienen suero al 10 % a una densidad de 10 células/pocillo en una placa de ensayo de 96 pocillos de poliestireno blancos. En el día 2, las células se trataron con 15 µl de concentración 10X del Compuesto 66 inhibidor de IGF-1R o con DMSO solo para un volumen final de 150 µl. Después de incubación de 72 h con el inhibidor, las células se sometieron a ensayo. Los resultados se calcularon como una fracción de las células controladas en DMSO.

Farmacología *in vivo*

15 Hembras de ratones CD-1 nu/nu (Charles River Laboratories) se implantaron con células tumorales de NSCLC recogidas en un sitio subcutáneo individual en el flanco de los ratones en la región axilar. Los tumores se dejaron crecer a $200 \pm 50 \text{ mm}^3$. Los volúmenes tumorales y los pesos corporales se determinaron dos veces semanalmente. El volumen tumoral se determinó midiendo en dos direcciones con calibradores vernier y se calcularon usando la fórmula: Tumor volumen = $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$. Los tumores de animales se recogieron y se ultracongelaron en nitrógeno líquido.

Resultados

Líneas NSCLC conteniendo receptor de IGF-1 de tipo silvestre presentan un intervalo de sensibilidades a Compuesto 66.

25 El análisis de sensibilidad a Compuesto 66 en un intervalo de líneas celulares NSCLC indicó un amplio intervalo de sensibilidad. Los autores de la presente invención han clasificado así en términos generales estas líneas celulares en aquellas que son relativamente insensibles (SW 1573 y H460), aquellas que muestran una sensibilidad intermedia (A549) y aquellas que son sensibles (H441, H358, y H292) a inhibición de crecimiento mediada por Compuesto 66. Así, se observó un intervalo de sensibilidades de las células a Compuesto 66, que oscila desde la más sensible (H358) hasta la menos sensible (SW 1573).

30 Cambios en marcadores epiteliales y mesenquimales correlacionan con sensibilidad de líneas celulares NSCLC a Compuesto 66

Los autores de la presente invención observaron una diferencia sorprendente entre las líneas NSCLC sensibles y relativamente insensibles a Compuesto 66 en la expresión anormal de vimentina y/o fibronectina (Figura 2). Típicamente la expresión de vimentina y fibronectina son características de células mesenquimales y sólo se expresan débilmente o no se expresan en linajes celulares epiteliales. La expresión de vimentina se encontró principalmente en SW1573, H1703 y Calu6, mientras que la expresión de fibronectina se observó en células H460. Las células SW1573 eran relativamente insensibles a inhibición de crecimiento por Compuesto 66 *in vitro*, con menos del 10 % de inhibición a inhibidor 10 µM. Se encontró poca o ninguna expresión de vimentina o fibronectina en las líneas NSCLC sensibles a Compuesto 66 H292, H441 y H358, o en la línea sensible de forma intermedia A549.

En base a la expresión de proteínas mesenquimales en líneas NSCLC relativamente insensibles a Compuesto 66, los autores de la presente invención analizaron extractos de proteínas a partir del mismo panel de líneas celulares NSCLC relativamente insensibles y sensibles para la presencia o ausencia de las características de los marcadores de bien fenotipos epiteliales o bien fenotipos mesenquimales (Figura 2). Sorprendentemente, se detectó E-cadherina en las líneas celulares sensibles (líneas H441, H358 y H292) pero estuvo ausente en las líneas celulares relativamente insensibles (SW1573 y H460). La línea celular sensible de forma intermedia A549 mostró expresión baja pero detectable. Se observó una pérdida similar de γ -catenina en células relativamente insensibles a Compuesto 66, con la excepción de H460. Por lo tanto, las líneas relativamente insensibles parecen haber perdido expresión de proteínas marcadoras de células epiteliales. A continuación los autores de la presente invención se preguntaron si estas líneas celulares expresaron los marcadores mesenquimales fibronectina y/o vimentina. Las líneas celulares relativamente insensibles expresaron claramente bien una o bien ambas de fibronectina y vimentina (Figura 2), mientras que ni una ni otra proteína fue detectable en líneas celulares sensibles a Compuesto 66. De forma interesante la línea celular sensible de forma intermedia A549 mostró de nuevo niveles bajos pero detectables de ambas proteínas. Sin embargo, los experimentos de microscopía confocal (resultados no mostrados) que usan inmunotinción con anticuerpos específicos para E-cadherina y vimentina indicaron que el cultivo de células A549 usado parece ser una población mezclada de células dado que no se observó tinción de células dual. Esto podría

explicar también los resultados algo variables obtenidos con esta línea celular y es consistente con su sensibilidad intermedia a Compuesto 66.

La sensibilidad a Compuesto 66 se correlaciona con el mantenimiento de marcadores epiteliales durante crecimiento tumoral *in vivo*

5 Los autores de la presente invención desearon examinar si los marcadores proteicos que predicen la sensibilidad a Compuesto 66 identificados *in vitro* también fueron observables *in vivo*. Se prepararon extractos de proteínas a partir de 3 xenoinjertos tumorales independientes crecidos a partir de células H460, Calu6, A549, H441 y H292. La inmunotinción de extractos indicó que la E-cadherina no se expresó detectablemente en los xenoinjertos derivados de las células H460 que son relativamente insensibles a Compuesto 66, se expresó a niveles bajos en xenoinjertos derivados de las células A549 de sensibilidad intermedia y se expresó a niveles altos en las líneas celulares H441 y H292 que son sensibles a Compuesto 66 (Figura 3). Se observó un resultado similar en el análisis de los niveles de catenina γ . En contraste las muestras de xenoinjerto derivadas de H460 expresaron fibronectina sola, un resultado consistente con aquel obtenido a partir de cultivos celulares *in vitro* (Figura 2). Extractos de xenotransplantes derivados de H441 y H292 mostraron poca o ninguna expresión bien de fibronectina o bien de vimentina. Estos resultados *in vivo* soportan adicionalmente los datos *in vitro* e indican que la presencia de estos marcadores de proteínas no es un artefacto de cultivo celular. Adicionalmente, apoyarán la hipótesis de que la sensibilidad a Compuesto 66 puede estar restringida a células con un fenotipo epitelial y de que las células que han sufrido EMT llegan a ser menos dependientes tras señalización de IGF-1R para proliferación celular y supervivencia celular.

20 **Expresión de Brk en líneas celulares NSCLC que son relativamente insensibles o sensibles a inhibición de los receptores IGF-1**

De forma interesante hay una muy buena correlación entre niveles de Brk y sensibilidad a Compuesto 66 en el grado en que la expresión de Brk alta equivale a sensibilidad a Compuesto 66 y la ausencia, o la expresión más baja, de Brk tiende a caracterizar líneas insensibles.

Conclusión

25 La pérdida de expresión de E-cadherina y la adquisición de un fenotipo más mesenquimal ha mostrado correlacionar con pronóstico pobre en tumores sólidos derivados epiteliales múltiples. La pérdida de E-cadherina y en un menor grado de catenina γ y Brk correlaciona con insensibilidad celular a inhibición de receptor de IGF-1. En cambio la adquisición celular de marcadores mesenquimales, vimentina, fibronectina o fibrilina correlacionan con una pérdida de la sensibilidad a inhibidores del receptor de IGF-1. Los autores de la presente invención muestran claramente que una transición epitelial a mesenquimal parcial o completa impacta negativamente en respuestas celulares a inhibidores de receptor IGF-1 y sirve como un diagnóstico para los pacientes que es más probable que se beneficien de inhibidores de cinasa de receptor de IGF-1 y terapias de anticuerpos anti-receptor IGF-1.

Abreviaturas:

35 EGF, factor de crecimiento epidérmico; EMT, transición de epitelial a mesenquimal; NSCLC, carcinoma pulmonar no de células pequeñas; HN-CECC, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; CRC, cáncer colorrectal; MBC, cáncer de mama metastático; EGFR, factor de crecimiento epidérmico; Brk, cinasa de tumor mamario (también conocida como proteína tirosina cinasa 6 (PTK6)); CL, cromatografía líquida; SRA, espectrometría de masas; IGF-1, factor de crecimiento similar a insulina 1; IGF-1R o IGFR, receptor de factor de crecimiento similar a insulina 1; TGF α , factor de crecimiento transformante alfa; HB-EGF, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina; LPA, ácido lisofosfatídico; TGF α , factor de crecimiento transformante alfa; CI₅₀, la mitad de la concentración inhibidora máxima; pY, fosfotirosina; wt, tipo silvestre; PI3K, fosfatidilinositol-3 cinasa; GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

45

50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento celular tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende:
- 5 valorar el nivel de un biomarcador epitelial seleccionado de E-cadherina, Brk, catenina γ , catenina α , queratina 8 y queratina 18 expresado por una célula tumoral; y
- predecir la sensibilidad del crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que, con respecto al nivel de expresión del biomarcador epitelial en las células no tumorales del mismo tejido, un alto nivel de expresión de biomarcador epitelial por la célula tumoral correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R y niveles bajos de expresión de biomarcador epitelial por la célula tumoral correlacionan con sensibilidad baja a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.
- 10
2. Un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento celular tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende:
- valorar el nivel de un biomarcador mesenquimal seleccionado de vimentina, fibronectina, fibrilina-1, fibrilina-2, colágeno alfa-2 (IV), colágeno alfa-2 (V), LOXL1, nidogen, C11orf9, tenascina, N-cadherina y fibronectina EDB+ embrionaria expresado por una célula tumoral; y
- 15
- predecir la sensibilidad del crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que, con respecto al nivel de expresión del biomarcador mesenquimal en las células no tumorales del mismo tejido, un alto nivel de expresión de biomarcador mesenquimal por la célula tumoral correlaciona con sensibilidad baja a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R y niveles bajos de expresión de biomarcador mesenquimal por la célula tumoral correlacionan con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.
- 20
3. Un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento celular tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de uno o más biomarcadores epiteliales según se definen en la reivindicación 1 expresados por una célula tumoral; y predecir la sensibilidad de crecimiento celular tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que, respecto al nivel de expresión del biomarcador epitelial en células no tumorales del mismo tejido, los niveles de expresión alta simultánea de todos los biomarcadores epiteliales celulares tumorales valorados correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.
- 25
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que los uno o más biomarcadores epiteliales comprenden E-cadherina y Brk.
- 30
5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que los uno o más biomarcadores epiteliales comprenden E-cadherina y catenina γ .
6. Un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de uno o más biomarcadores mesenquimales según se definen en la reivindicación 2 expresados por una célula tumoral; y predecir la sensibilidad de crecimiento celular tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que, respecto al nivel de expresión del biomarcador mesenquimal en células no tumorales del mismo tejido, los niveles de expresión baja o indetectable simultánea de todos los biomarcadores mesenquimales celulares tumorales valorados correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.
- 35
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que los uno o más biomarcadores mesenquimales comprenden vimentina y fibronectina.
- 40
8. Un procedimiento de predecir la sensibilidad de crecimiento de células tumorales a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende: valorar el nivel de un biomarcador epitelial según se define en la reivindicación 1 expresado por una célula tumoral; valorar el nivel de un biomarcador mesenquimal según se define en la reivindicación 2 expresado por una célula tumoral; y predecir la sensibilidad de crecimiento celular tumoral a inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, en el que una proporción alta de niveles de expresión epiteliales frente a niveles de expresión mesenquimales correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.
- 45
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el biomarcador epitelial comprende E-cadherina y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina.
- 50
10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el biomarcador epitelial comprende Brk y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina.

11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el biomarcador epitelial comprende E-cadherina y el biomarcador mesenquimal comprende vimentina.
12. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el biomarcador epitelial comprende catenina γ y el biomarcador mesenquimal comprende fibronectina.
- 5 13. Un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento para tratar tumores o metástasis de tumores en un paciente, en el que la responsividad probable de dicho paciente a un inhibidor de cinasa de IGF-1R se ha diagnosticado valorando si las células tumorales han sufrido una transición epitelial-mesenquimal por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 10 14. Un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento para tratar tumores o metástasis tumorales de acuerdo con la reivindicación 13, en el que uno o más agentes anticancerígenos adicionales se coadministran simultánea o secuencialmente con el inhibidor de cinasa de IGF-1R.
- 15 15. El procedimiento de la reivindicación 1, 2, 3, 6 u 8, o un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento de tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente según se define en la reivindicación 13, en el que la célula tumoral o el tumor es una célula tumoral o tumor de NSCL, de colon, de mama, de cabeza y cuello, o de páncreas.
16. El procedimiento o un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente según la reivindicación 15, en el que la célula tumoral o tumor es una célula tumoral o tumor de NSCL.
- 20 17. Un procedimiento de predecir una sensibilidad de crecimiento de células tumorales de paciente para inhibición por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, que comprende:
 valorar en una muestra tumoral del paciente, el nivel de E-cadherina expresado por las células tumorales; y determinar que si las células tumorales expresan E-cadherina, se predice la sensibilidad a inhibición de crecimiento por un inhibidor de cinasa de IGF-1R, o si las células tumorales no expresan E-cadherina, se predice la falta de la sensibilidad a inhibición de crecimiento por un inhibidor de cinasa de IGF-1R.
- 25 18. El procedimiento de las reivindicaciones 1, 3-5 y 8-12 y un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento para tratar tumores o metástasis de tumores de las reivindicaciones 13-16, en el que
 a) el nivel de expresión de biomarcador epitelial es el nivel expresado por células H441, H358, o H292 y correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R; o
 b) el nivel de expresión de biomarcador epitelial es el nivel expresado por células SW1573 o H460 y correlaciona con sensibilidad baja a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.
- 30 19. El procedimiento de las reivindicaciones 2 y 6-12 y un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento para tratar tumores o metástasis de tumores de las reivindicaciones 13-16, en el que
 a) el nivel de expresión de biomarcador mesenquimal es el nivel expresado por células H-441, H358, o H292 y correlaciona con sensibilidad alta a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R; o
 b) el nivel de expresión de biomarcador mesenquimal es el nivel expresado por células SW1573 o H460 y correlaciona con sensibilidad baja a inhibición por inhibidor de cinasa de IGF-1R.
- 35 20. El procedimiento de las reivindicaciones 1, 3-5, 8-12 y 18 y un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento para tratar tumores o
 metástasis tumorales de las reivindicaciones 13-16, en el que el biomarcador epitelial es detectable usando un anticuerpo antibiomarcador específico y es predictivo de alta sensibilidad a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.
- 40 21. El procedimiento de las reivindicaciones 2, 6-12 y 19 y un inhibidor de cinasa de IGF-1R para usar en un procedimiento para tratar tumores o metástasis tumorales de las reivindicaciones 13-16, en el que el biomarcador mesenquimal es detectable usando un anticuerpo antibiomarcador específico y es predictivo de baja sensibilidad a inhibición por inhibidores de cinasa de IGF-1R.
- 45

FIGURA 1

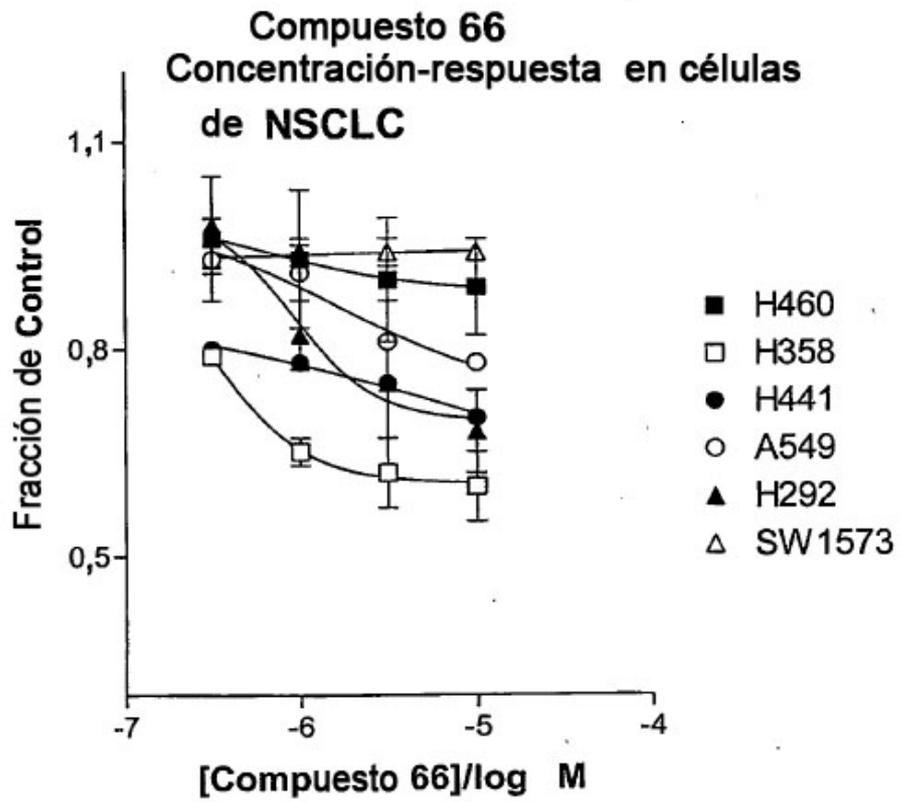


FIGURA 2

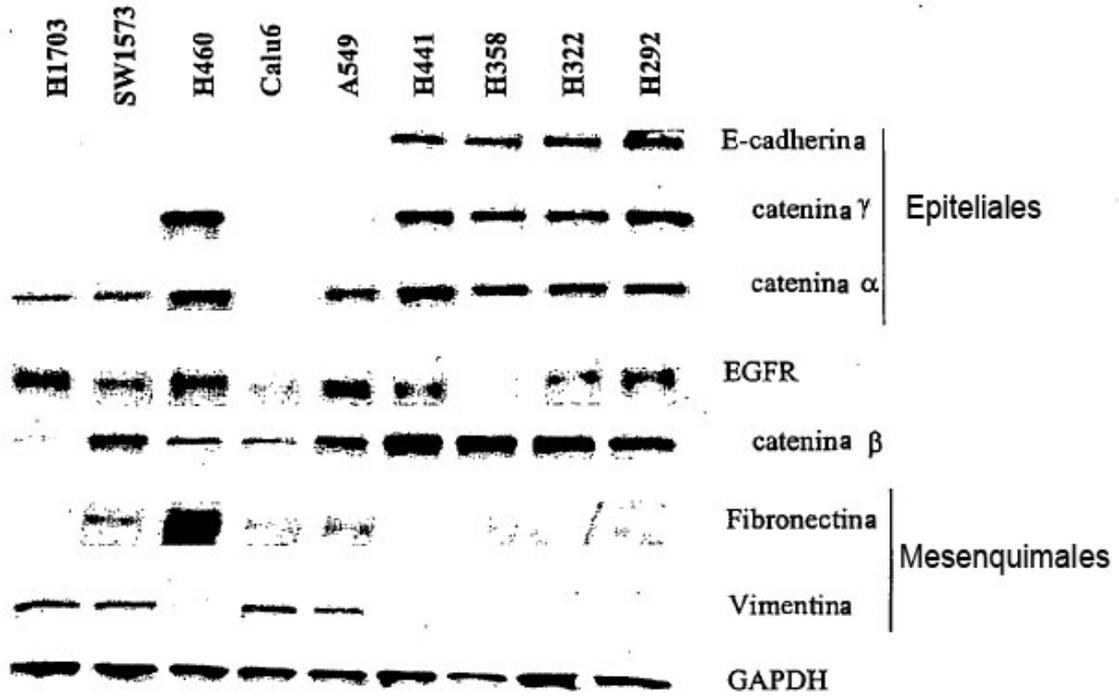


FIGURA 3

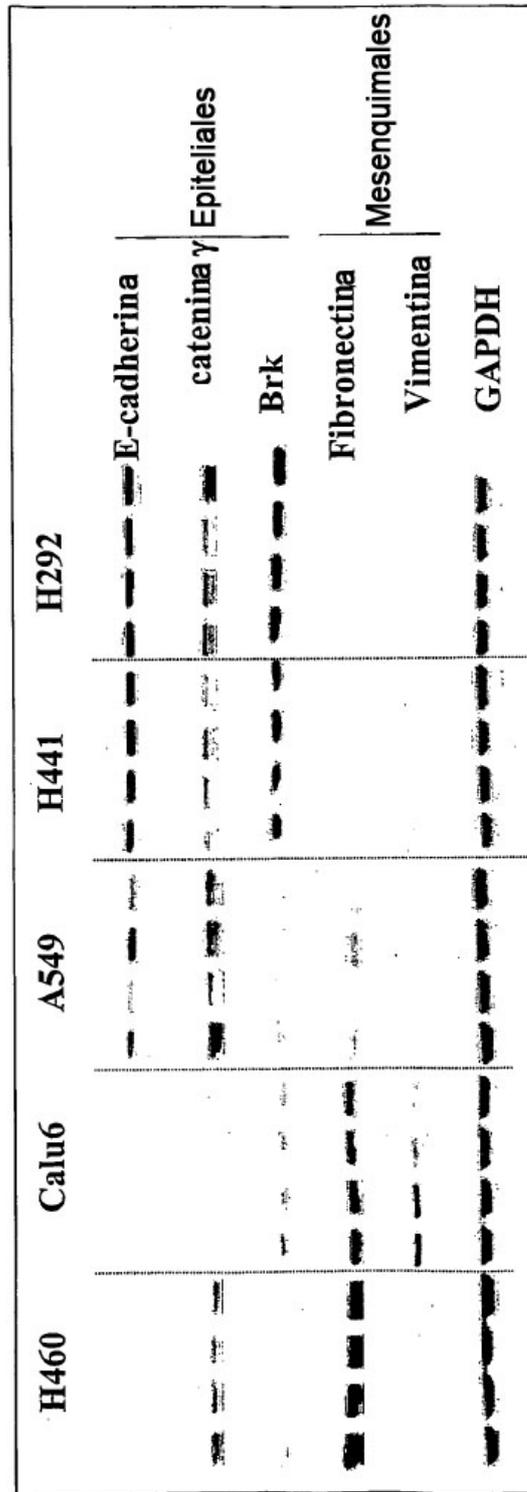


FIGURA 4

