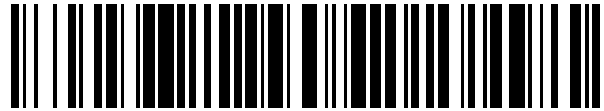


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 879**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2008 E 08785426 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 2179056**

54 Título: **Marcador del tratamiento con inhibidor de EGFR**

30 Prioridad:

14.08.2007 EP 07114312
20.05.2008 EP 08156511

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2013

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH

72 Inventor/es:

DELMAR, PAUL;
KLUGHAMMER, BARBARA;
LUTZ, VERENA y
MCLOUGHLIN, PATRICIA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 395 879 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

Marcador del tratamiento con inhibidor de EGFR

- 5 La presente invención proporciona un biomarcador que es predictivo de la respuesta al tratamiento con erlotinib en pacientes con NSCLC.

10 Varios tumores malignos humanos se asocian a la expresión aberrante o a la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El EGF, el factor α de crecimiento transformante (TGF- α), y algunos otros ligandos, se unen al EGFR, estimulando la autofosforilación del dominio intracelular de tirosina quinasa del receptor. Seguidamente se activa una diversidad de rutas intracelulares, y estos sucesos posteriores resultan en la proliferación de las células tumorales *in vitro*. Se ha planteado que la estimulación de las células tumorales mediante el EGFR podría resultar importante para el crecimiento y la supervivencia tumorales *in vivo*.

15 Los primeros datos clínicos con Tarceva, un inhibidor de la EGFR tirosina quinasa, indican que el compuesto es seguro y que generalmente resulta bien tolerado a dosis que proporcionan la concentración efectiva objetivo (determinada a partir de datos preclínicos). Los ensayos clínicos de fase I y II en paciente con enfermedad avanzada han demostrado que Tarceva presenta una actividad clínica prometedora en un abanico de tumores epiteliales. En efecto se ha demostrado que Tarceva es capaz de inducir remisiones parciales duraderas en pacientes previamente tratados con cáncer de cabeza y cuello y NSCLC (cáncer pulmonar de células no pequeñas) de un orden similar a la quimioterapia de segunda línea establecida, aunque con el beneficio añadido de un mejor perfil de seguridad que la quimioterapia y una mayor comodidad (administración con tableta en lugar de intravenosa [i.v.]). Un ensayo aleatorizado, de doble ciego y controlado con placebo completado recientemente (BR.21) ha demostrado que el agente único Tarceva prolonga y mejora significativamente la supervivencia de los pacientes con NSCLC para los
20
25 que la terapia estándar para la enfermedad avanzada ha fracasado.

Tarceva (erlotinib) es una molécula química pequeña; es un inhibidor selectivo potente activo oralmente de la EGFR tirosina quinasa (EGFR-TKI).

30 El cáncer de pulmón es la causa principal de muertes relacionadas con el cáncer en Norteamérica y Europa. En los Estados Unidos, el número de muertes secundarias a cáncer de pulmón excede el número combinado total de muertes de la segunda (colon), tercera (mama) y cuarta (próstata) causas principales del total de muertes por cáncer. Aproximadamente 75% a 80% del total de cánceres de pulmón son cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), presentando aproximadamente 40% de los pacientes una enfermedad localmente avanzada y/o
35 irresecable. Este grupo típicamente incluye los pacientes con enfermedad voluminosa de estadios IIIA y IIIB, excluyendo las efusiones pleurales malignas.

40 La incidencia bruta del cáncer de pulmón en la Unión Europea es de 52,5 y la tasa de mortalidad, de 48,7 casos/100.000/año. Entre hombres, las tasas son de 79,3 y 78,3, y entre mujeres, de 21,6 y 20,5, respectivamente. NSCLC representa 80% de todos los casos de cáncer de pulmón. Aproximadamente 90% de la mortalidad por cáncer de pulmón en hombres, y 80% en mujeres, es atribuible al tabaquismo.

45 En los EUA, según la American Cancer Society, durante 2004 se produjeron aproximadamente 173.800 nuevos casos de cáncer de pulmón (93.100 en hombres y 80.700 en mujeres), representando aproximadamente 13% de todos los nuevos cánceres. La mayoría de pacientes muere como consecuencia de su enfermedad en los dos años posteriores al diagnóstico. Para muchos pacientes con NSCLC, el tratamiento con éxito sigue siendo inalcanzable. Los tumores avanzados con frecuencia no admiten la cirugía y también pueden ser resistentes a dosis tolerables de radioterapia y quimioterapia. En ensayos aleatorizados, las quimioterapias de combinación actualmente más activas consiguieron tasas de respuesta de aproximadamente 30% a 40% y una tasa de supervivencia a 1 año de entre
50 35% y 40%. Esto constituye un avance respecto a la tasa de supervivencia a 1 año del 10% observada con sólo cuidados de apoyo.

55 Hasta recientemente las opciones terapéuticas para los pacientes después de la recaída se limitaban al mejor cuidado de apoyo disponible o a la paliación. Un ensayo reciente que compara el docetaxel (Taxotere) con los mejores cuidados de apoyo ha demostrado que los pacientes con NSCLC podrían beneficiarse de la quimioterapia de segunda línea tras el fracaso de los regímenes de primera línea basados en cisplatino. Los pacientes de todas las edades y con estado funcional ECOG de 0, 1 ó 2 mostraron una supervivencia mejorada con el docetaxel, al igual que aquellos refractarios al tratamiento previo basado en platino. Entre los pacientes que no se beneficiaron de la terapia se incluían aquellos con una pérdida de peso del 10%, niveles elevados de lactato deshidrogenasa, compromiso multiorgánico o compromiso hepático. Además, el beneficio de la monoterapia con docetaxel no se
60 extendió más allá del tratamiento de segunda línea. Los pacientes que recibieron docetaxel como tratamiento de tercera línea o posteriormente no mostraron ninguna prolongación de la supervivencia. El docetaxel como único agente se ha convertido en una terapia de segunda línea estándar para el NSCLC. Recientemente, otro ensayo de

fase III aleatorizado en la terapia de segunda línea del NSCLC ha comparado el pemetrexed (Alimta[®]) con el docetaxel. El tratamiento con pemetrexed resultó en una eficacia clínicamente equivalente aunque con significativamente menos efectos secundarios que el docetaxel.

5 Se admite desde hace mucho que existe una necesidad de desarrollar métodos para individualizar el tratamiento del cáncer. Con el desarrollo de los tratamientos personalizados del cáncer, existe un particular interés en las metodologías que podrían proporcionar un perfil molecular de la diana tumoral (es decir, aquéllas que son predictivas de beneficio clínico). Ya se ha establecido la prueba de principio para el perfilado de la expresión génica en el NSCLC, con la clasificación molecular de tipos tumorales que no resultan evidentes basándose en los ensayos morfológicos e inmunohistoquímicos actuales.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar biomarcadores de expresión que sean predictivos del beneficio clínico del tratamiento con erlotinib en los pacientes con NSCLC.

15 En un primer objetivo, la presente invención proporciona un método *in vitro* para predecir el beneficio clínico de un paciente con NSCLC en respuesta al tratamiento con erlotinib, que comprende las etapas siguientes:

determinar un nivel de expresión de un gen PSPH en una muestra tumoral de un paciente y comparar el nivel de expresión del gen PSPH con un valor representativo de un nivel de expresión del gen PSPH en tumores de una población de pacientes no respondedores, en el que un nivel de expresión más alto del gen PSPH en la muestra tumoral del paciente es indicativo de un paciente que responderá al tratamiento, en el que se ha definido el beneficio clínico como manifestar una respuesta objetiva o la estabilización de la enfermedad durante 12 semanas.

20 La expresión "un valor representativo de un nivel de expresión de PSPH en tumores de una población de pacientes no respondedores" se refiere a una estimación del nivel de expresión medio del gen marcador en una población de pacientes que no responden al tratamiento con erlotinib.

25 En una realización preferente, el gen marcador PSPH (SEC ID nº muestra típicamente un nivel de expresión entre 1,8 y 3,7 ó más veces superior en la muestra tumoral del paciente respondedor que un valor representativo del nivel de expresión del gen PSPH en tumores de una población de pacientes no respondedores.

30 En una realización preferente, el nivel de expresión del gen PSPH se determina mediante tecnología de micromatrices u otras tecnologías que evalúan los niveles de expresión del ARN, tales como la RT-PCR cuantitativa o mediante cualquier método que analice el nivel de expresión de la proteína respectiva, por ejemplo la inmunohistoquímica (IHC). La construcción y utilización de chips génicos es bien conocida de la técnica, ver las patentes US nº 5.202.231, nº 5.445.934, nº 5.525.464, nº 5.695.940, nº 5.744.305, nº 5.795.716 y nº 5.800.992. Ver también Johnston M., *Curr. Biol.* 8:R171-174, 1998; Lyer V.R. *et al.*, *Science* 283:83-87, 1999. Evidentemente el nivel de expresión génica puede determinarse mediante otros métodos que son conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, transferencias northern, RT-PCR, PCR cuantitativa en tiempo real, extensión de cebadores, protección frente a ARNasa y perfilado de expresión del ARN.

35 El gen marcador utilizado en la presente invención puede combinarse con otros biomarcadores formando juegos de biomarcadores. Pueden construirse juegos de biomarcadores a partir de cualquier combinación de biomarcadores predictivos con el fin de realizar predicciones sobre el efecto del tratamiento de erlotinib en los pacientes con NSCLC. Los biomarcadores y juegos de biomarcadores indicados en la presente invención pueden utilizarse para, por ejemplo, predecir cómo los pacientes con NSCLC responderán a la intervención terapéutica con erlotinib.

40 El término "gen" tal como se utiliza en la presente memoria comprende variantes del gen. El término "variante" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que son sustancialmente similares a las secuencias de ácidos nucleicos indicadas mediante el número de acceso de GenBank. La expresión "sustancialmente similar" es perfectamente conocida por el experto en la materia. En particular, una variante génica puede ser un alelo que muestra intercambios de nucleótidos en comparación con la secuencia de nucleótidos del alelo más prevalente en la población humana. Preferentemente, dicha secuencia de ácidos nucleicos sustancialmente similar presenta una similitud de secuencias respecto al alelo más prevalente de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 85%, más preferentemente de por lo menos 90% y todavía más preferentemente de por lo menos 95%. El término "variantes" también pretende referirse a las variantes de procesamiento.

45 Entre las técnicas para la detección y cuantificación de la expresión génica de los genes indicados en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las transferencias northern, la RT-PCR, la PCR cuantitativa en tiempo real, la extensión de cebadores, la protección frente a ARNasa, el perfilado de expresión del ARN y técnicas relacionadas. Estas técnicas son bien conocidas por el experto en la materia; ver, por ejemplo, Sambrook J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 2000).

Entre las técnicas para la detección de la expresión de proteínas a partir de los genes respectivos descritos por la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la inmunohistoquímica (IHC).

5 Las células de una muestra de tejido del paciente, por ejemplo de un tumor o biopsia de cáncer, pueden someterse a ensayo para determinar el patrón de expresión de uno o más biomarcadores. El éxito o fracaso de un tratamiento del NSCLC puede determinarse basándose en el patrón de expresión de biomarcadores de las células procedentes del tejido de ensayo (células de ensayo), por ejemplo del tumor o biopsia del cáncer, siendo relativamente similar o diferente del patrón de expresión de un juego de control de uno o más biomarcadores. En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que el gen PSPH se encuentra regulado positivamente, es decir, muestra un nivel de expresión más alto en tumores de pacientes que responden al tratamiento con erlotinib que en tumores de pacientes que no respondieron al tratamiento con erlotinib. De esta manera, en el caso de que las células de ensayo muestren un perfil de expresión que corresponda al de un paciente que respondió al tratamiento del NSCLC, es altamente probable o predecible que el NSCLC o tumor del individuo responderá favorablemente al tratamiento con erlotinib. En contraste, en el caso de que las células de ensayo muestren un perfil de expresión de los biomarcadores que corresponda al de un paciente que no respondió al tratamiento del NSCLC, es altamente probable o predecible que el NSCLC o tumor del individuo no responderá al tratamiento con erlotinib.

20 El biomarcador utilizado en la presente invención, es decir, el gen listado en la Tabla 3, es un primer paso hacia una terapia individualizada para los pacientes con NSCLC, en particular para los pacientes con NSCLC refractario. Esta terapia individualizada permitirá a los médicos tratantes seleccionar el agente más apropiado de entre los fármacos existentes para la terapia del NSCLC. El beneficio de la terapia individualizada para cada paciente en el futuro es que: las tasas de respuesta/el número de pacientes beneficiados se incrementará, y el riesgo de efectos secundarios adversos debidos al tratamiento inefectivo se reducirá.

25 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el diseño del estudio; la figura 2 muestra el esquema del procesamiento de las muestras. la figura 3a muestra los niveles de expresión frente al resultado clínico para el perfilado Genechip[®]; la figura 3b muestra los niveles de expresión de PTPRF frente al resultado clínico para qRT-PCR y la figura 3c muestra la correlación entre las mediciones de GeneChip[®] y de qRT-PCR de PSPH.

Parte experimental

35 Justificación del estudio y del diseño del mismo

Recientemente, se han descrito mutaciones dentro del gen EGFR en el tejido tumoral de un subconjunto de pacientes con NSCLC y la asociación de estas mutaciones con la sensibilidad al erlotinib y al gefitinib (Pao W. *et al.*, 2004; Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004). Para los pacientes agrupados de ambos estudios, se observó EGFR mutado en 13 de los 14 pacientes que respondieron al gefitinib y en ninguno de los 11 pacientes tratados con gefitinib que no respondieron. La prevalencia publicada de estas mutaciones es de 8% (2 de 25) en pacientes con NSCLC no seleccionados. Estas mutaciones se encontraron más frecuentemente en adenocarcinomas (21%), en tumores procedentes de mujeres (20%) y en tumores procedentes de pacientes japoneses (26%). Estas mutaciones resultan en una actividad *in vitro* incrementada de EGFR y en una sensibilidad incrementada al gefitinib. La relación de las mutaciones con una enfermedad estable prolongada o la duración de la supervivencia no ha sido evaluada prospectivamente.

50 Basándose en análisis preliminares del estudio BR.21, aparentemente resultaba improbable que el beneficio de supervivencia observado se debiese únicamente a las mutaciones de EGFR ya que se mantuvo un beneficio de supervivencia significativo incluso tras excluir de los análisis a los pacientes que presentaban una respuesta objetiva (datos en archivo). Otros mecanismos moleculares también deben contribuir al efecto.

Basándose en la premisa de que existen cambios de los niveles de expresión génica que son predictivos de la respuesta/beneficio al tratamiento de Tarceva, se utilizó el análisis de micromatrices para detectar dichos cambios.

55 Lo anterior requirió una población de estudio claramente definida tratada con monoterapia de Tarceva tras el fracaso de la terapia de primera línea. Basándose en la experiencia del estudio BR.21, se definió la población beneficiada como aquella que presentaba una respuesta objetiva o la estabilización de la enfermedad durante 12 semanas. Se analizaron bases de datos clínicos y de micromatrices según un plan estadístico predefinido.

60 La aplicación de esta técnica requiere tejido fresco congelado (TFC). Por lo tanto, tuvo que realizarse una biopsia obligatoriamente antes del inicio del tratamiento. El material recogido se congeló en nitrógeno líquido (N₂).

Se recogió una segunda muestra tumoral simultáneamente y se almacenó en parafina (fijada con formalina e

incluida en parafina, FFIP). Esta muestra se analizó para alteraciones en la ruta de señalización de EGFR.

La capacidad de llevar a cabo biopsias tumorales mediante broncoscopia era un requisito previo para este estudio. La broncoscopia es un procedimiento estándar para confirmar el diagnóstico del cáncer de pulmón. Aunque generalmente seguro, sigue existiendo riesgo de complicaciones, por ejemplo de sangrado.

Este estudio fue una primera etapa hacia una terapia individualizada para pacientes con NSCLC refractario. Esta terapia individualizada permitirá a los médicos tratantes seleccionar el agente más apropiado de entre los fármacos existentes para esta indicación.

Tras hacerse disponible una terapia individualizada, el beneficio para cada paciente en el futuro superará el riesgo que deben correr los pacientes en el presente estudio:

las tasas de respuesta/el número de pacientes beneficiados se incrementará, el riesgo de efectos secundarios adversos debidos al tratamiento inefectivo se reducirá.

Justificación de la selección de dosis

Se administró Tarceva™ por vía oral una vez al día a una dosis de 150 mg hasta la progresión de la enfermedad, toxicidades intolerables o muerte. La selección de dicha dosis se basó en parámetros farmacocinéticos, así como en el perfil de seguridad y tolerabilidad de dicha dosis observado en ensayos de fase I, II y III en pacientes fuertemente pretratados con cáncer avanzado. Los niveles de fármaco observados en el plasma de pacientes con cáncer que recibían la dosis de 150 mg/día eran consistentemente superiores a la concentración plasmática media de 500 ng/ml que era el objetivo para la eficacia clínica. BR.21 mostró un beneficio de supervivencia con dicha dosis.

Objetivos del estudio

El objetivo principal era la identificación de genes expresados diferencialmente que fuesen predictivos de beneficio (CR, RP o EE? 12 semanas) del tratamiento con Tarceva. La identificación de genes expresados diferencialmente predictivos de "respuesta" (CR, RP) al tratamiento con Tarceva era un objetivo adicional importante.

Los objetivos secundarios eran evaluar las alteraciones en las rutas de señalización de EGFR con respecto al beneficio del tratamiento.

Diseño del estudio

Descripción general del diseño del estudio y del régimen de dosificación

Estudio de fase II de etiqueta abierta de identificación de marcadores predictivos. El estudio se llevó a cabo en aproximadamente 26 sitios en aproximadamente 12 países. Se incluyeron durante un periodo de 12 meses 264 pacientes con NSCLC avanzado tras el fracaso de por lo menos un régimen anterior de quimioterapia. Se administró Tarceva oral continuo a una dosis de 150 mg/día. Se permitieron reducciones de las dosis basándose en la tolerabilidad a la terapia farmacológica. Se evaluaron parámetros clínicos y de laboratorio con el fin de evaluar el control de la enfermedad y la toxicidad. El tratamiento se prolongó hasta la progresión de la enfermedad, toxicidad inaceptable o muerte. Se ilustra en la figura 1 el diseño del estudio.

Se obtuvieron muestras de tejido tumoral y de sangre para los análisis moleculares destinados a evaluar los efectos de Tarceva y para identificar los subgrupos de pacientes que se beneficiarán de la terapia

Evaluaciones de los marcadores predictivos

Se obtuvieron biopsias de tumores en las 2 semanas anteriores al inicio del tratamiento. Se recogieron dos muestras diferentes:

La primera muestra en todos los casos se congeló inmediatamente en N₂ líquido. La segunda muestra se fijó en formalina y se incluyó en parafina. El tejido congelado instantáneamente se consideró prioritario en el presente estudio. La figura 2 muestra un esquema del procesamiento de las muestras.

Análisis de micromatrices

Las muestras congeladas instantáneamente se utilizaron para la microdissección por captura con láser (MCL) de células tumorales con el fin de extraer el ARN tumoral y el ARN del tejido circundante al tumor. El ARN se analizó

en chips micromatrices Affymetrix (HG-U133A) para establecer el perfil de expresión génica del tumor del paciente. Se utilizó un control de calidad de los chips Affymetrix para seleccionar aquellas muestras de calidad adecuada para la comparación estadística.

5 Análisis de biomarcadores individuales en tejido fijado en formalina e incluido en parafina

Se utilizó la segunda biopsia tumoral, la muestra FFIP, para llevar a cabo análisis de mutaciones del ADN, IHC e ISH, tal como se describe posteriormente. Se llevaron a cabo análisis similares de tejido recogido en el momento del diagnóstico inicial.

10 Se analizaron mediante secuenciación del ADN el estado de mutación del ADN de los genes codificantes de EGFR y de otras moléculas participantes en la ruta de señalización del EGFR. La amplificación génica del EGFR y genes relacionados se estudiaron mediante FISH. Los análisis de expresión de proteínas incluyeron análisis inmunohistoquímicos [IHC] del EGFR y de otras proteínas en la ruta de señalización del EGFR.

15 Evaluaciones de la respuesta

Se utilizaron los criterios RECIST (medición unidimensional de los tumores) para evaluar la respuesta. Estos criterios pueden encontrarse en el enlace siguiente:

20 <http://www.eortc.be/recist/>

25 Observar que: Para asignar un estatus de CR o de PR, deben confirmarse cambios en las mediciones de los tumores en evaluaciones repetidas separadas por lo menos por 4 semanas en cualquier momento durante el periodo de tratamiento.

En el caso de una EE, las mediciones de seguimiento deben cumplir los criterios de EE por lo menos en una ocasión después del inicio del estudio a un intervalo mínimo de 6 semanas.

30 En el caso de una EE mantenida, las mediciones de seguimiento deben cumplir los criterios de EE por lo menos en una ocasión después del inicio en el estudio con una duración del mantenimiento de por lo menos 12 semanas.

Evaluación de la supervivencia

35 Se llevó a cabo una comprobación periódica del estado cada 3 meses mediante una visita del paciente a la clínica o telefónicamente. Se registraron todas las muertes. Al final del estudio fue necesaria una confirmación definitiva de la supervivencia de cada paciente.

40 Respuesta al tratamiento con erlotinib

45 Se incluyeron en el estudio un total de 264 pacientes procedentes de 12 países y 26 centros. 26% presentaba NSCLC de estadio IIIB y 24%, NSCLC de estadio IV. 13,6% (n=36) de los pacientes consiguieron una respuesta objetiva, mientras que 31,4% (n=83) presentaron un beneficio clínico (definido como manifestar una respuesta objetiva o una enfermedad estable durante 12 semanas o más). La mediana de supervivencia global fue de 7,6 (IC 7 a 9) meses y la mediana de la supervivencia sin progresión fue de 11,3 (IC 8 a 12) semanas. En la Tabla 1 se proporcionan detalles completos de los datos clínicos.

50 Se recogieron biopsias broncoscópicas frescas congeladas de todos los sujetos, pero o no todas las muestras presentaba suficiente contenido tumoral previamente a la microdissección (MCL) o no presentaban suficiente ARN tras la MCL para continuar al análisis de micromatrices, de manera que sólo se disponía de material tumoral para 125 pacientes; 122 de ellos presentaba ARN evaluable. Otro juego de 20 muestras no pasó la evaluación de control de calidad de los presentes inventores de los datos de las micromatrices. De los 102 conjuntos de datos de micromatriz que se consideraron adecuados para el análisis estadístico, se muestran las características clínicas en la Tabla 1. Mientras que 36 pacientes en el estudio global mostraron una respuesta objetiva, sólo 6 de ellos disponía de datos de micromatriz; de manera similar, de aquellos que mostraron un beneficio clínico, el número de sujetos con datos de micromatriz era de sólo 21, comparado con 83 en el conjunto completo de datos. Se estimó que 6 eran respondedores parciales (RP), 31 presentaban una EE y 49 mostraban una EP; de los 6 pacientes con una RP, 5 presentaba adenocarcinoma y uno, carcinoma de células escamosas. No se observaron pacientes que mostrasen una RC en el conjunto de datos.

60 Métodos

Preparación de muestras de ARN y control de calidad de las muestras de ARN

5 Todo el procesamiento de las muestras de biopsia fue realizado por un laboratorio patológico de referencia; se enviaron muestras de tejido fresco congelado procedente de los sitios de investigación a las instalaciones de manipulación de muestras clínicas en Roche Basel y de ahí al laboratorio de patología para el procesamiento posterior. Se utilizó la microdissección con captura con láser para seleccionar las células tumorales del tejido circundante. Tras la MCL, se purificó el ARN a partir del material tumoral enriquecido. A continuación, el laboratorio de patología llevó a cabo varias etapas para realizar una estimación de la concentración y calidad del ARN.

10 Las ARNasas son enzimas degradadores del ARN y se encuentran en todas partes y por lo tanto todos los procedimientos en los que se utilice ARN deben controlarse estrictamente para minimizar la degradación del ARN. La mayoría de las especies de ARNm presentan vidas medias bastante cortas y por lo tanto se consideran bastante inestables. Por lo tanto, resulta importante llevar a cabo comprobaciones de integridad y cuantificaciones del ARN antes de cualquier ensayo.

15 Puede evaluarse la concentración y perfil de calidad del ARN utilizando un instrumento de Agilent (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) denominado 2100 Bioanalyzer[®]. El software del instrumento genera un número de integridad del ARN (RIN), una estimación cuantitativo (Schroeder A. *et al.*, The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol. 7: 3, 2006) y calcula las proporciones ribosómicas de la muestra del ARN total. El RIN se determina a partir del registro electroforético completo de la muestra de ARN, que de esta manera incluye la presencia o ausencia de productos de degradación.

20 Se analizó la calidad del ARN utilizando un 2100 Bioanalyzer[®]. Sólo se seleccionaron muestras con por lo menos un pico de ARNr sobre el ruido de poli-I añadido y suficiente ARN para el análisis posterior en la plataforma Affymetrix. Se envió el ARN purificado al Roche Centre for Medical Genomics (RCMG, Basel, Suiza) para el análisis mediante micromatrices. Se recibieron 122 muestras de ARN del laboratorio de patología para el procesamiento posterior.

Marcaje de la diana de muestras de ARN de tejido

30 El marcaje de la diana se llevó a cabo siguiendo el protocolo de amplificación de marcaje de la diana en dos ciclos de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, California) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El método se basa en el procedimiento estándar de Eberwine de amplificación lineal, aunque utiliza dos ciclos de este procedimiento par agenerar suficiente ARNc marcado para la hibridación con una micromatriz.

35 La cantidad total de ARN utilizada en la reacción de marcaje fue de 10 ng para aquellas muestras en las que se disponía de más de 10 ng de ARN; en caso de disponerse de menos de esta cantidad, o si no se disponía de datos cuantitativos (debido a que la concentración de ARN era muy baja), se utilizó la mitad de la muestra total en la reacción. Los rendimientos de las reacciones de marcaje fueron de entre 20 y 180 µg de ARNc. Se introdujo una etapa de normalización al nivel de la hibridación, en la que se utilizaron 15 µg de ARNc para cada muestra.

40 Se utilizó ARN de referencia humano (Stratagene, Carlsbad, CA, USA) a modo de muestra de control en el flujo de trabajo con cada lote de muestras. Se utilizaron 10 ng de dicho ARN como entrada, conjuntamente con las muestras de ensayo con el fin de verificar que los reactivos de marcaje y de hibridación funcionaban tal como se esperaba.

45 Hibridaciones con micromatrices

Las micromatrices Affymetrix HG-U133A contienen más de 22.000 juegos de sondas con diana en aproximadamente 18.400 transcritos y variantes, representando aproximadamente 14.500 genes bien caracterizados.

50 La hibridación para todas las muestras se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de Affymetrix (Affymetrix Inc., manual técnico de análisis de la expresión, 2004). Brevemente, para cada muestra se fragmentaron 15µg de ARNc marcado con biotina en presencia de cationes divalentes y calor, y se hibridaron durante la noche con matrices Affymetrix HG-U133A de oligonucleótidos del genoma completo. Al día siguiente las matrices se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes, Eugene, OR) siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente se escanearon las matrices utilizando un escáner GeneChip 3000 (Affymetrix) y se calcularon automáticamente las intensidades de las señales con el software operativo GeneChip (GCOS) versión 1.4 (Affymetrix).

Análisis estadístico

60 El análisis de los datos de AffymetrixTM consistió en cinco etapas principales.

La etapa 1 fue la de control de calidad. El objetivo era identificar y excluir del análisis datos de las matrices con un perfil de calidad deficiente.

La etapa 2 fue de preprocesamiento y normalización. El objetivo era crear una "base de datos para el análisis" normalizada y escalada que permitiese la comparación entre matrices. Comprendía la estimación y sustracción del ruido de fondo, y el agrupado ("sumarización") y escalado de las sondas.

La etapa 3 fue de exploración y descripción. El objetivo era identificar los potenciales sesgos y las fuentes de variabilidad. Consistía en la aplicación de técnicas de análisis descriptivo multivariante y univariante para identificar las covariables con influencia.

La etapa 4 fue de modelaje y ensayo. El objetivo era identificar una lista de los marcadores candidatos basándose en la evaluación estadística de las diferencias en el nivel medio de expresión entre "respondedores" (pacientes con "respuesta parcial" o "respuesta completa" como mejor respuesta) y "no respondedores" (pacientes con "enfermedad progresiva" como mejor respuesta). Consistía en ajustar un modelo estadístico adecuado a cada juego de sondas y extraer una medida de significación estadística. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete informático R.

Etapa 1: control de calidad

La evaluación de la calidad de los datos se basó en la comprobación de varios parámetros. Entre ellos se incluían parámetros de calidad de GeneChip™ de Affymetrix, en particular: el factor de escala, el porcentaje de expresión presente ("present call") y el nivel medio de fondo. Esta etapa también incluía la inspección visual de imágenes virtuales de los chips para la detección de problemas localizados de hibridación y la comparación de cada chip con un chip virtual en la mediana para la detección de cualquier desviación no habitual respecto a la mediana del comportamiento. También se llevó a cabo un análisis de correlación entre chips para detectar las muestras atípicas. Además, se consideraron medidas complementarias de la calidad del ARN obtenidas a partir del análisis de muestras de ARN con el Bioanalyzer™ 2100 de Agilent.

Basándose en estos parámetros, se excluyeron del análisis los datos procedentes de 20 matrices. De esta manera, se incluyeron en el análisis datos procedentes de un total de 102 matrices, que representaban 102 pacientes. Se proporciona en la Tabla 1 la descripción clínica de este conjunto de 102 pacientes.

Tabla 1: Descripción de las características clínicas de los pacientes incluidos en el análisis

Variable	Valor	n=102
		n (%)
Mejor respuesta	N/A	16 (15,7%)
	EP	49 (48,0%)
	EE	31 (30,4%)
	RP	6 (5,9%)
Beneficio clínico	NO	81 (79,4%)
	SÍ	21 (20,6%)
SEXO	FEMENINO	25 (24,5%)
	MASCULINO	77 (74,5%)
ETNICIDAD	CAUCÁSICA	65 (63,7%)
	ORIENTAL	37 (36,3%)
Histología	ADENOCARCINOMA	35 (34,3%)
	ESCAMOSO	53 (52,0%)
	OTRAS	14 (13,7%)
¿Ha fumado alguna vez?	NO	20 (19,6%)
	SÍ	82 (80,4%)

Etapa 2: Preprocesamiento y normalización de los datos

Se utilizó el algoritmo rma (Irizarry R.A. *et al.*, Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. Nucl. Acids Res. 31(4): e15, 2003) para el preprocesamiento y normalización. Se utilizó el algoritmo mas5 (AFFYMETRIX, GeneChip® Expression: Data Analysis Fundamentals. 2004, AFFYMETRIX) para realizar análisis de detección para los diferentes juegos de sondas. Los juegos de sondas con resultados de “ausente” o “marginal” en todas las muestras se eliminaron de los análisis posteriores; se eliminaron 5.930 juegos de sondas del análisis basándose en este criterio. Por lo tanto, la base de datos para el análisis consistió de una matriz con 16.353 (de un total de 22.283) juegos de sondas medidos en 102 pacientes.

Etapa 3: Descripción y exploración de los datos

Se llevó a cabo un análisis exploratorio descriptivo para identificar sesgos potenciales y las fuentes principales de variabilidad. Se cribó un conjunto de covariables con un impacto potencial sobre los perfiles de expresión génica. Comprendía variables tanto técnicas como clínicas. Entre las covariables técnicas se incluían: fecha del procesamiento del ARN (posteriormente denominado “lote”), RIN (como medida de la calidad/integridad del ARN), operador y centro de recolección de las muestras. Entre las covariables clínicas se incluían: tipo histológico, situación de tabaquismo, grado del tumor, puntuación de rendimiento (Oken M.M. *et al.*, Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am. J. Clin. Oncol. 5(6): 649-55, 1982), datos demográficos, estatus del respondedor y estatus de beneficio clínico.

Entre las herramientas de análisis se incluían el ANOVA univariante y el análisis de componentes principales. Para cada una de dichas covariables, se aplicó el ANOVA variante independientemente a cada juego de sondas.

Se identificó un efecto significativo de la variable lote. En la práctica, la variable lote captura diferencias entre fechas de procesamiento de las muestras y del gráfico del chip Affymetrix. Tras comprobar que la variable lote era prácticamente independiente de las variables de interés, se corrigió el efecto de lote utilizando el método descrito en Johnson W.E., C. Li y A. Rabinovic, Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostat.* 8(1): 118-127, 2007.

La base de datos normalizados tras la corrección del efecto de lote sirvió como base de datos para el análisis en los análisis posteriores.

La histología y el RIN fueron dos variables importantes adicionales subrayadas en el análisis descriptivo.

Etapa 4: Modelaje y ensayo de los datos.

Se ajustó independientemente un modelo lineal a cada juego de sondas. Las variables incluidas en el modelo se informan en la Tabla 2. Se estimaron los parámetros del modelo mediante la técnica de máxima probabilidad. El parámetro correspondiente a la variable “Respuesta” (X1) se utilizó para evaluar la diferencia en el nivel de expresión entre el grupo de pacientes “respondedores” y “no respondedores”.

Tabla 2: Descripción de las variables incluidas en el modelo lineal. El modelo lineal definido por estas variables, incluyendo un término de error de distribución normal, se ajustó a cada juego de sondas.

Variable	Tipo	Valores
expresión génica	Dependiente (Y_{ip})	Valor log2 intensidad normalizada del juego de sondas i en el paciente p
Punto de corte	Media global (μ)	
Respuesta	Factor predictivo de interés (X1)	SÍ / NO
Histología	Covariable de ajuste (X2)	ADENOCARCINOMA / ESCAMOSO / OTROS
ETNIA	Cov. Adj. (X3)	ORIENTAL / CAUCÁSICO
SEXO	Cov. Adj. (X4)	FEMENINO / MASCULINO
RIN	Cov. Adj. (X5)	[2, ..., 7.9]

Se excluyeron los pacientes con estatus de enfermedad estable (n=31). La justificación era que al centrarse en los

pacientes con la respuesta más marcada a la terapia, el grupo de no respondedores se volvería más homogéneo.

5 Para cada juego de sondas i , el objetivo de la prueba estadística era rechazar la hipótesis de que los niveles medios de expresión en pacientes con respuesta al tratamiento y en pacientes sin respuesta al tratamiento eran iguales, considerando las otras covariables de ajuste listadas en la Tabla 2. Formalmente, la hipótesis nula de igualdad se sometió a ensayo frente a una alternativa de dos colas. Bajo la hipótesis nula, la distribución del estadístico de Wald para este ensayo sigue una distribución Chi cuadrado con 64 grados de libertad. Se proporcionan los valores de p correspondientes en la Tabla 3.

10 La elección de modelo lineal se basó en dos motivos. En primer lugar, el modelaje lineal es un enfoque versátil, bien caracterizado y robusto que permite el ajuste de las variables de confusión al estimar el efecto de la variable de interés. En segundo lugar, dado el tamaño muestral, de 71, y la normalización y escalado de la base de datos, la premisa de la distribución normal era razonable y estaba justificada.

15 El problema de los ensayos múltiples se controló mediante la utilización de un criterio de tasa de falso descubrimiento (TFD) para identificar la lista de genes expresados diferencialmente (Benjamini *et al.*, Journal of the Royal Statistical Society serie B-metodológica 57(1):289-300, 1995. Los juegos de sondas con una TFD inferior al umbral de 0,3 se consideraron significativos. El valor de corte de 0,3 se seleccionó como compromiso razonable entre una corrección rigurosa de los ensayos múltiples y un control restrictivo del riesgo de falsos positivos y el riesgo de no identificar los marcadores realmente diferenciales. Se proporciona el gen marcador identificado en la Tabla 3.

25 Tabla 3: Marcadores basados en la comparación entre "Respondedores" y "Progresores". Se definieron los respondedores como los pacientes con una mejor respuesta igual a una "Respuesta parcial" (RP). Se definieron los "Progresores" como los pacientes con una mejor respuesta igual a "Enfermedad progresiva" (EP) o sin evaluación disponible.

30 Los pacientes sin evaluación tumoral se incluyeron en los grupos de "Progresores" porque en la mayoría de casos no se disponía de evaluación debido a la retirada temprana causada por la progresión de la enfermedad o la muerte.

35 La columna 1 es el identificador Affymetrix del juego de sondas. La columna 2 es el número de acceso de GenBank de la secuencia génica correspondiente. La columna 3 es el nombre oficial correspondiente del gen. La columna 4 es el factor medio ajustado correspondiente de cambio del nivel de expresión entre los "respondedores" y los "progresores", según las estimaciones realizadas con el modelo lineal. La columna 5 es el valor de p para el ensayo de las diferencias del nivel de expresión entre los "respondedores" y los "progresores", según se derivan del modelo lineal. La columna 6 es el intervalo de confianza al 95% para el factor medio ajustado de cambio del nivel de expresión.

ID de Affymetrix del juego de sondas	GenBank	Gen	Factor medio ajustado de cambio	valor de P	IC al 95%
205194_at	NM_004577	PSPH	2,6	$1,4 \times 10^{-5}$	1,8 , 3,7

40 Para cada juego de sondas se evaluó la premisa de homogeneidad de la varianza utilizando pruebas de Flinger-Killeen basadas en los residuales del modelo. El análisis consistió de 3 etapas:

45 Ensayo de todas las variables categóricas para la igualdad de la varianza residual entre los niveles de las mismas
 Identificación de la variable V con el valor p más bajo
 En el caso de que el valor de p más bajo sea inferior a 0,001, reajuste del modelo que permita que las variables V de diferente nivel presenten una varianza diferente.

50 Análisis estadístico posterior

Para el marcador candidato seleccionado PSPH, se llevaron a cabo los análisis adicionales siguientes en un entorno validado por expertos estadísticos independientes:

- Regresión Cox univariante para la SSP (supervivencia sin progresión) del análisis primario Affymetrix,
- Regresión logística univariante para la respuesta del análisis primario Affymetrix, y
- Regresión Cox univariante para la supervivencia del análisis primario Affymetrix.

Se presentan los resultados de estos análisis posteriormente. Son consistentes con los resultados del análisis primario y confirman la elección del marcador seleccionado.

Resultados: Regresión Cox univariante para la SSP (supervivencia sin progresión) del análisis primario Affymetrix:

Gen	Nº de pacientes	Cociente de riesgos	IC al 95% para el cociente de riesgos	valor de p
PSPH	102	0,61	0,42; 0,88	0,0086

5 Resultados: Regresión Cox univariante para la respuesta del análisis primario Affymetrix:

Gen	Nº de pacientes	Proporción de probabilidades	IC al 95% para la proporción de probabilidades	valor de p
PSPH	102	7,46	2,39; 23,32	0,0005

qRT-PCR (PCR cuantitativa en tiempo real)

10 Se sintetizó ADNc utilizando la mezcla de síntesis de primera cadena SuperScript™ III para qRT-PCR (Invitrogen, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante aunque sin inclusión de un digerido de ARNasa H.

Se llevó a cabo una PCR cuantitativa utilizando ensayos de expresión génica TaqMan® en un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7900HT siguiendo las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems, CA, USA).

15 Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Los cebadores y sondas utilizados cruzaban los límites de los exones o se encontraban dentro de la secuencia de interés de la sonda Affymetrix Genechip®. Se incluyeron dos genes de mantenimiento como controles endógenos: β-2-microglobulina (B2M; ensayo Hs99999907_m1) e hipoxantinfosforibosil transferasa (HPRT; ensayo Hs99999909_m1).

20 Todos los análisis incluían una muestra calibradora (ARN total MVP™ procedente de pulmón humano adulto; Stratagene, CA, USA) y una curva estándar. Se utilizó ARN humano total de referencia universal (Stratagene, CA, USA) como molde para las curvas estándares de PTPRF. Todos las muestras se midieron por triplicado. Se llevó a cabo la cuantificación relativa utilizando el método -ΔCt.

Resultados

30 Tal como se ha informado anteriormente, se determinaron los perfiles de expresión génica Affymetrix Genechip® para los 102 pacientes incluidos en el presente estudio. De entre estos pacientes, se obtuvieron resultados de qRT-PCR para 75 (Tabla 3). Las características demográficas y clínicas de los pacientes con resultados de qRT-PCR eran similares a las de la población entera (n=264) y a las de los pacientes para los que se disponía de un perfil de expresión génica Genechip®.

35 Tabla 3: Características de línea base: pacientes con análisis de qRT-PCR (n=75)

Característica	
Edad (mediana, intervalo)	62 (39-85)
Sexo, n (%)	
Masculino	19 (25)
Femenino	56 (75)
Estado funcional ECOG, n (%)	
0	7 (9)
1	45 (60)
2	23 (31)
Histología, n (%)	
Adenocarcinoma	27 (36)
Carcinoma de células escamosas	34 (45)
Carcinoma de células grandes	2 (3)
Otro	12 (16)
Estadio de la enfermedad, n (%)	
IIIB	22 (29)
IV	53 (71)
Número de regímenes de quimioterapia anteriores, n (%)	

0	19 (25)
1	36 (48)
≥2	20 (27)
Etnicidad; n (%)	
Caucásica	51 (68)
Asiática	24 (32)
Historia de tabaquismo, n (%)	
Nunca	12 (16)
Actualmente	24 (32)
Anterior	39 (52)

De los 75 pacientes con resultados de qRT-PCR, 4 (5%) presentaba una respuesta parcial (RP), 23 (31%) presentaba una EE, 39 (52%) presentaba una EP y 9 (12%) no eran evaluables. Estos resultados son muy similares a los observados en la población de estudio completa (n=264).

5

Correlación entre los datos de Affymetrix Genechip[®], datos de qRT-PCR y resultados clínicos

La figura 3 muestra los niveles relativos de ARNm para PTPRF en pacientes individuales, evaluados mediante el perfilado Affymetrix Genechip[®] y qRT-PCR. La figura 3a muestra los niveles de expresión frente al resultado clínico para el perfilado Genechip[®] y la figura 3b muestra los niveles de expresión frente a la qRT-PCR.

10

La figura 3c muestra la correlación entre las mediciones de Genechip[®] y de qRT-PCR para PSPH. La asociación entre los niveles de ARNm de PSPH y el resultado clínico con erlotinib observado en los datos de expresión génica de Genechip[®] se conservaba en los datos de qRT-PCR.

15

Identificación de los genes asociados a la respuesta al erlotinib

Se definieron los respondedores como los pacientes cuya mejor respuesta era la respuesta parcial, mientras que los "progresores" se definieron como los pacientes con enfermedad progresiva o para los que no se realizó ninguna evaluación (en la mayoría de casos como resultado de la retirada temprana debido a progresión de la enfermedad o muerte). De esta manera, en este modelo se compararon 6 "respondedores" con 65 "progresores".

20

Se ajustó un modelo lineal independientemente a cada uno de los 16.353 juegos de sondas restantes utilizados en el análisis tras la extracción de aquellos juegos de sondas que no se encontraban presentes en ninguna muestra del total de 22283 en la micromatriz HG-U133A. Se calculó un valor de p para la diferencia de expresión entre la respuesta y la no respuesta para cada juego de sondas. Se aplicó una tasa de falso descubrimiento (TFD) de 0,3 para corregir para los ensayos múltiples. En la Tabla 3 se muestra el marcador identificado en este análisis.

25

Comentario

30

Se propuso centrarse en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como medio para la terapia del cáncer basándose en su expresión aberrante ubicua en varios cánceres epiteliales. EGFR participa en la patogénesis y progresión de muchos tumores, entre ellos 40% a 80% de los tumores de NSCLC, como resultado de la activación de tumores en el dominio de tirosina quinasa y/o de su amplificación. Tras la activación, el receptor se dimeriza, resultando en la fosforilación de las dianas posteriores con función en la proliferación celular, metástasis, inhibición de la apoptosis y neoangiogénesis.

35

Se han desarrollado dos clases principales de inhibidores de EGFR: anticuerpos monoclonales con diana en el dominio extracelular del receptor, e inhibidores de molécula pequeña de la tirosina quinasa con diana en el dominio catalítico del receptor. Ésta última incluye el erlotinib, que compite con el ATP para el sitio de unión intracelular.

40

En los últimos años ha emergido que varios factores desempeñan un papel en la sensibilidad al erlotinib, incluyendo el sexo femenino, el estatus de no fumador, el origen asiático y la histología de adenocarcinoma; dado que son evidentes las tasas de respuesta incrementadas en dichos subconjuntos clínicos de pacientes, se están realizando esfuerzos intensivos para identificar marcadores moleculares predictivos para la estratificación de los pacientes. Las mutaciones en el EGFR, la amplificación del locus génico de EGFR y la sobreexpresión de EGFR al nivel de las proteínas, se han asociado todos a la respuesta en diversos grados, aunque estos no son los únicos determinantes moleculares de la respuesta.

45

Mediante el análisis de las muestras de tejido mediante tecnología de micromatrices de oligonucleótidos a alta densidad y la aplicación del modelaje estadístico a los datos, los presentes inventores han podido identificar un gen cuyo nivel de expresión es predictivo de la respuesta al erlotinib (comparación entre RP y EE) (Tabla 3). Este gen es

50

PSPH (regulado positivamente en un factor de 2,6, $p=0,000014$).

5 La fosfoserina fosfatasa (PSPH) es un enzima intermediario en la gluconeogénesis y en la biosíntesis de aminoácidos, y es específicamente responsable de la última etapa en la formación de la L-serina. Se ha encontrado que la actividad del enzima PSPH es más alta en el tejido canceroso que en el tejido pulmonar normal, así como en tumores pulmonares altamente diferenciados, en comparación con los tumores pulmonares no diferenciados o en el mesotelioma. Al nivel de transcritos de ARNm, se ha evaluado PSPH como marcador de las micrometástasis en el cáncer gástrico avanzado y ha demostrado una especificidad incrementada en combinación con un marcador estándar, el antígeno carcinoembrionario (ACE).

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Marcador predictivo para el tratamiento con inhibidor de EGFR

<130> 24412WO

10 <150> 07114312.7
<151> 2007-08-14

<150> 08156511.1
<151> 2008-05-20

15 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.4

20 <210> 1
<211> 2142
<212> ADN
<213> Homo sapiens

25 <400> 1

ES 2 395 879 T3

ggcgttggag ctctttgggg cccagctttg cggacccggg agctcgggac gcaggcgggg 60
 cttgtgctcc gcgggggcag ggcgtagggg gggcctccta cctccccctga tctcgcggtt 120
 tgttccgttt cattggagct tcccggaccg tgtgctcgac ggtgccctag gtgccgtggg 180
 gccacacgcg agtctgataa gcaccctccc ccggaatcat gcggtgctgt gaggcctagc 240
 gaagatgaag atagaatgca aggtagaaaag tgctggatac ctttagaaaag ctgcaggact 300
 ggtgcgatgg gagttgagac gtaagaacct gcccgctcctg agggctctgg atgctgctga 360
 ggcccgaggc ccctatggca gatttgaaaa ttcacccttg tagagtcatt cctgcctttg 420
 agcggactcc cttttaagca gatctcaaga gagcgttcgg tggaggccct gggctctgcac 480
 agctcacctc cctgggaact gctcgcccga gcgtcggagc cggcgctggc cccctgcagc 540
 cggaaagttg cagccgcagg agccccggag gcccaggaca cagggctctt gctcttgtag 600
 aatccacagc tctttcttga ggaaatctgt agacagaact ttgtgctgcg tttttatcta 660
 gggaaaggaac agaagagtgt cgtctcctag aaatctagca ctggagaaac gaggaaaatt 720
 cttccagcga tggctctcca ctcagagctg aggaagcttt tctactcagc agatgctgtg 780
 tgttttgatg ttgacagcac ggtcatcaga gaagaaggaa tcgatgagct agccaaaatc 840
 tgtggcgttg aggacgcggt gtcagaaatg acacggcgag ccatgggcgg ggcagtgccct 900
 ttcaaagctg ctctcacaga gcgcttagcc ctcatccagc cctccagggg gcaggtgcag 960
 agactcatag cagagcaacc cccacacctg acccccggca taaggagct ggtaagtgcg 1020
 ctacaggagc gaaatgttca ggttttccta atatctggtg gctttaggag tattgtagag 1080
 catgttgctt caaagctcaa tatcccagca accaatgtat ttgccaatag gctgaaattc 1140
 tactttaacg gtgaatatgc aggttttgat gagacgcagc caacagctga atctggtgga 1200
 aaaggaaaag tgattaaact tttaaaggaa aaatttcatt ttaagaaaat aatcatgatt 1260
 ggagatggtg ccacagatat ggaagcctgt cctcctgctg atgctttcat tggatttggg 1320

ES 2 395 879 T3

ggaaatgtga	tcaggcaaca	agtcaaggat	aacgccaaat	ggtatatcac	tgattttgta	1380
gagctgctgg	gagaactgga	agaataacat	ccattgtcgt	acagctccaa	acaacttcag	1440
atgaatTTTT	acaagttata	cagattgata	ctgtttgctt	acagttgcct	attacaactt	1500
gctatagaaa	gttggtacaa	atgatctgta	ctttaaacta	cagttaggaa	tcctagaaga	1560
ttgctTTTTT	TTTTTTTTta	actgtagttc	cagtattata	tgatgactat	tgatTTcctg	1620
gagaggTTTT	TTTTTTTTTT	gagacagaat	cttgctctgt	tgcccaggct	ggagtgcagt	1680
ggcgcggtct	cggctcactg	caagctctgc	ctcccaggtt	cacgccattc	tcctgcctca	1740
gcctcccgag	tagctgggac	tacaggcacc	cgccaccaca	tccggctaata	TTTTTgtatt	1800
tttagtagag	acggggTTTT	accgtgtag	ccaggatggt	cttgatctcc	tgaccttgTG	1860
atccgcctgc	ctcagcctcc	caaagtgctg	ggattacagg	cttgggccac	cgcgcccagc	1920
caatgtccta	gagagTTTTg	tgatctgaat	tctttatgta	tatttgtagc	tatatttcat	1980
acaaagtgct	ttaagtgtgg	agagtcaatt	aaacaccttt	actcttagaa	atacggattc	2040
ggcagccttc	agtgaatatt	ggtttctctt	tggtatgtca	ataaaagttt	atccgtatgt	2100
cagaacggat	ttgtggaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aa		2142

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para predecir la respuesta de un paciente con NSCLC al tratamiento con erlotinib, que comprende: determinar un nivel de expresión de un gen PSPH en una muestra tumoral de un paciente y comparar el nivel de expresión del gen PSPH con un valor representativo de un nivel de expresión del gen PSPH en tumores de una población de pacientes no respondedores, en el que un nivel de expresión más alto del gen PSPH en la muestra tumoral del paciente es indicativo de un paciente que responderá al tratamiento, en el que se ha definido el beneficio clínico como manifestar una respuesta objetiva o la estabilización de la enfermedad durante 12 semanas.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que se determina el nivel de expresión mediante tecnología de micromatrices.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el gen marcador muestra un nivel de expresión entre 1,8 y 3,7 ó más veces superior en la muestra tumoral del paciente respondedor que el valor representativo de un nivel de expresión del gen PSPH en tumores de una población de pacientes no respondedores, en el que se define la población beneficiada como la que manifiesta una respuesta objetiva o la estabilización de la enfermedad durante 12 semanas

Fig. 1

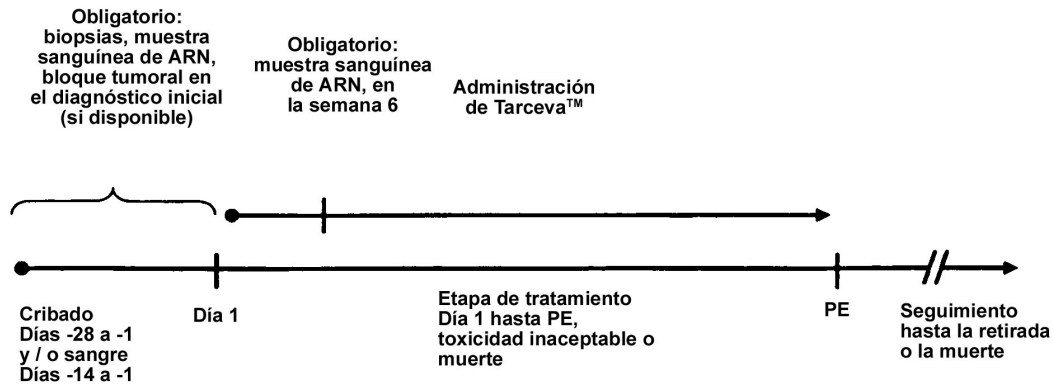


Fig. 2

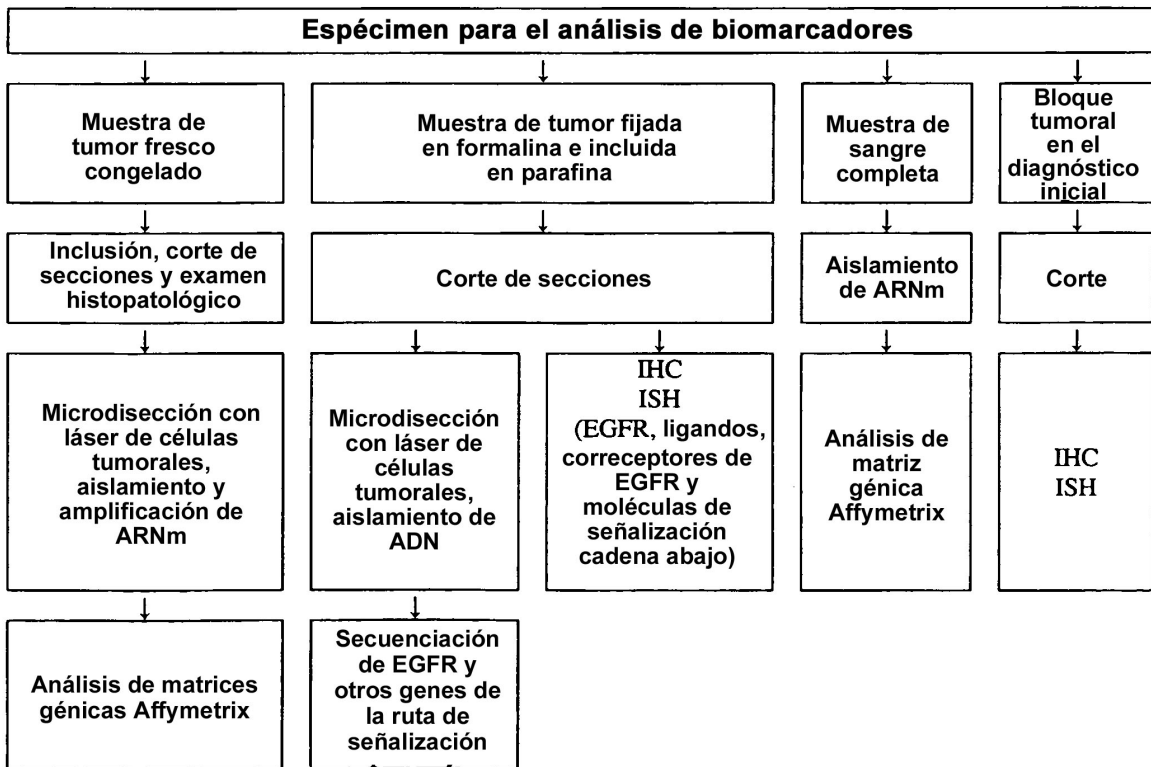


Fig. 3a

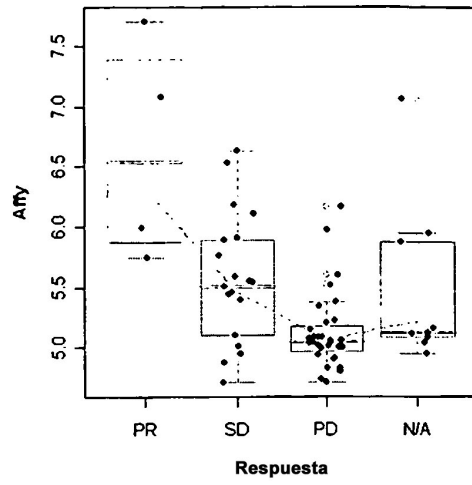


Fig. 3b

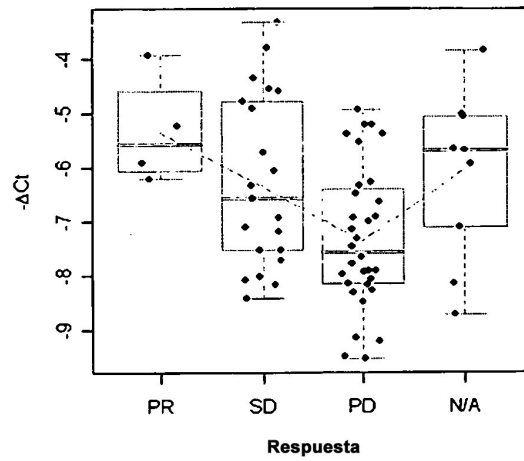


Fig. 3c

