

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 234**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2012 E 12721333 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2702409**

54 Título: **CXCR1 como un predictor de respuesta a tratamiento con agente terapéutico dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico**

30 Prioridad:

26.04.2011 GB 201106870

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

07.12.2015

73 Titular/es:

**THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST
(100.0%)
University Road
Belfast BT7 5NN, GB**

72 Inventor/es:

**WAUGH, DAVID JOHN JAMES;
WILSON, RICHARD y
OLADIPO, OLABODE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 553 234 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).

DESCRIPCION

CXCR1 como un predictor de respuesta a tratamiento con agente terapéutico dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico

Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con la determinación de un marcador molecular para uso en la predicción de sujetos que padecen cáncer y que se beneficiarían de un tratamiento con un agente terapéutico dirigido al Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR de las siglas en inglés "Epidermal Growth Factor Receptor"), específicamente, aunque sin limitación, Cetuximab y Panitumumab. Esto proporciona un método para caracterizar un tumor e indicar si el tumor responderá al tratamiento con un inhibidor de EGFR y, en consecuencia, clasificar a un
10 sujeto con un tumor como un sujeto que respondería o como un sujeto que no respondería al tratamiento con un inhibidor de EGFR.

Antecedentes de la invención

15 Se sabe que el Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y sus mecanismos de señalización derivados, principalmente los mecanismos de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK, de las siglas en inglés "mitogen-activated protein kinase") y de fosfatidil-inositol-3 quinasa (PI3K)/Akt, desempeñan un papel significativo en el crecimiento y progresión de tumores. La sobre-expresión del EGFR ha sido identificada en numerosos tumores sólidos, que incluyen cánceres de colon, rectal, de pulmón, de ovario y de cabeza y cuello. Muchos estudios clínicos han indicado que la sobre-expresión de EGFR en estos tumores está asociada a una mala prognosis y a una supervivencia global más corta en los sujetos que padecen cáncer.

20 Puesto que la señalización de EGFR parece tener una función fisiológica relevante en un adulto, se cree que la provisión de inhibidores de la señalización de EGFR permite el ataque selectivo de células malignas en un sujeto que padezca cáncer, generando únicamente una toxicidad limitada a las células normales. El EGFR se ha convertido en una diana molecular ampliamente estudiada y las principales compañías farmacéuticas han desarrollado inhibidores de molécula pequeña para el EGFR tales como Gefitinib (Astrazeneca) y Tarceva (OSI) o anticuerpos que presentan una elevada afinidad de unión y que inhiben la activación inducida por ligando del EGFR, tal como Cetuximab (Eli Lilly/BMS/Merck Serono) y Panitumumab (Amgen). Los ensayos clínicos de estos compuestos terapéuticos dirigidos a EGFR han indicado que en realidad solo obtienen un beneficio clínico de la provisión de fármacos terapéuticos dirigidos a EGFR determinados subconjuntos de pacientes. El EGFR se expresa en el 30-85% de los cánceres colorrectales y su nivel de expresión se ha relacionado con una baja supervivencia.
25 Los ensayos llevados a cabo en pacientes con cáncer colorrectal metastásico han resultado en tasas de respuesta favorables solo en el 23% de los pacientes, incluso cuando el agente terapéutico de EGFR se combina con quimioterapia, y tasas de respuesta significativamente menores, de tan solo el 11%, cuando el agente terapéutico de EGFR se usa como monoterapia (Saltz et al. J Clin Oncol 204; 22: 1201-1208; Cunningham et al., N Engl J Med 2004; 351: 337-345). Por lo tanto, un objetivo adicional de intensa investigación ha sido la identificación de qué pacientes responden de forma favorable a la provisión de fármacos terapéuticos de EGFR. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO2010/145796 describe biomarcadores y métodos para determinar la eficacia de anticuerpos anti-EGFR en terapia contra el cáncer. De forma destacada, dichos biomarcadores predictivos de respuesta de pacientes a fármacos terapéuticos de EGFR mantienen el potencial no solo de mejorar los resultados del tratamiento para pacientes específicos, sino que también permiten alcanzar el potencial total de dichos agentes terapéuticos dirigidos a moléculas.
30
35
40

Se propusieron varios candidatos iniciales como biomarcadores predictivos de la respuesta a fármacos terapéuticos de EGFR, que incluyen el nivel de expresión del propio EGFR. Sin embargo, las investigaciones en cáncer colorrectal metastásico no sirvieron para demostrar una correlación entre la expresión de EGFR determinada mediante inmunohistoquímica y la respuesta clínica a Cetuximab en combinación con quimioterapia de irinotecan
45 (Chung et al, J Clin Oncol. 2005; 23: 1803-1810). Alternativamente, mientras que el uso de mutaciones de activación en el dominio de quinasa del EGFR ha tenido éxito para predecir la respuesta a la provisión de agentes de molécula pequeña dirigidos al dominio de quinasa del receptor, dichas mutaciones son incapaces de predecir la respuesta a anticuerpos tales como Cetuximab, que se unen al ectodominio del receptor. Adicionalmente, las tasas de mutación del EGFR en determinadas enfermedades que incluyen el cáncer colorrectal son bajas, y en enfermedades en las que existen mutaciones del EGFR, éstas representan solo poblaciones pequeñas de la población completa de pacientes (habitualmente < 10%) (Janne et al. J Clin Oncol 2005; 23: 3227-3234).
50

Más recientemente, la atención se ha centrado en identificar mutaciones residentes dentro de las proteínas constituyentes de los mecanismos de transducción de señal que son activados por EGFR. Después de una serie de ensayos clínicos de Fase III llevados a cabo con la enfermedad de cáncer colorrectal de etapa avanzada, el Cetuximab ha sido aprobado para el tratamiento de sujetos con cáncer colorrectal metastásico KRAS natural (mCRC) que expresa receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en combinación con quimioterapia, sobre la base de que los tumores que no albergan mutaciones tienen mayor probabilidad de responder a estrategias de tratamiento dirigidas a EGFR. Sin embargo, ensayos de mayor tamaño que han reclutado un número de pacientes significativamente mayor han presentado posteriormente que el uso del estatus KRAS no responde-
55

predice claramente a los fármacos terapéuticos de EGFR. Por ejemplo, el estudio COIN aleatorio de fase III, en el cual tomaron parte más de 2500 pacientes, no consiguió determinar ningún beneficio de la adición de Cetuximab a quimioterapia basada en oxiplatino en el tratamiento de primera línea de pacientes con cáncer colorrectal avanzado. Aunque el estudio demostró que el Cetuximab aumenta la tasa de respuesta medida a las 12 semanas después de la terapia, no se observaron evidencias de beneficios en términos de supervivencia libre de progresión o de supervivencia global en pacientes de KRAS natural o incluso en pacientes seleccionados mediante un análisis mutacional adicional de sus tumores (Maughan et al., Lancet Oncol 2011; 377: 2103-2114). Por lo tanto, se requieren biomarcadores adicionales para seleccionar de forma precisa pacientes y diferenciar los sujetos que responden de los sujetos que no responden.

5 Dada la intención en la provisión de una terapia o uso de un agente terapéutico para mejorar el resultado clínico a través de una respuesta beneficiosa, sería ventajoso proporcionar un ensayo diagnóstico que identifique a sujetos que responden a la terapia/agente terapéutico en cuestión. Esto es particularmente ventajoso para identificar los sujetos que probablemente no se beneficien y por tanto que son expuestos innecesariamente a los efectos secundarios tóxicos de los agentes terapéuticos. Además, es ventajoso minimizar la probabilidad de incurrir en gastos innecesarios en sujetos con un tratamiento de terapia/agentes terapéuticos que probablemente no produzcan beneficios, y/o minimizar el retraso aplicado a un sujeto que esté siendo tratado con un(os) fármaco(s) alternativo(s) que podría(n) resultar ser más beneficioso(s).

Sumario de la invención

20 Los inventores han determinado que el nivel de expresión de CXCR1 en un tumor de un sujeto con cáncer puede ser indicativo de una respuesta al fármaco beneficiosa y de una supervivencia de un sujeto con cáncer tratado con un inhibidor de EGFR. En particular, los inventores han identificado el CXCR1 como un biomarcador predictivo para identificar o predecir los sujetos que se beneficiarán del tratamiento con el agente terapéutico dirigido a EGFR Cetuximab (o con otros agentes que incluyen el Panitumumab) y en particular a los sujetos con cáncer colorrectal que se beneficiarán de la adición de fármacos terapéuticos dirigidos a EGFR a una quimioterapia citotóxica (p.ej., basada en oxiplatino).

25 Por consiguiente, un primer aspecto de la invención proporciona el uso de CXCR1 como biomarcador en un método para predecir la respuesta en un sujeto al tratamiento con un agente terapéutico de Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico, en particular un inhibidor de EGFR, donde un nivel de expresión de CXCR1 en una muestra de tumor de un sujeto con cáncer que ha aumentado respecto al nivel de expresión de CXCR1 en un Control es indicativo de que el sujeto responderá al tratamiento con el agente terapéutico de EGFR.

30 Aunque estudios previos de la bibliografía sugieren que la activación inducida por ligando de receptores acoplados a proteína G puede inducir una trans-activación intracelular de receptores de factor de crecimiento, incluyendo el receptor EGFR, ((Venkatakrisnan et al., J Biol Chem 2000; 275: 6868-6875) y (Kyriakis et al. J Leukocyte Biol 2011; 90: 929-939)) y se ha indicado que la trans-activación del EGFR constituye un aspecto importante de la señalización de interleucina-8 que determina muchas respuestas celulares, incluyendo la proliferación y la supervivencia (Waugh y Wilson, Clin Cancer Res 2008; 14: 6735-6741) y (Itoh et al, Cytokine 2005; 29: 275-282), hasta la fecha los biomarcadores para fármacos terapéuticos dirigidos a EGFR han sido determinados fundamentalmente considerando los niveles de genes indicadores de respuesta tras un tratamiento con un agente terapéutico dirigido a EGFR en sujetos que responden y sujetos que no responden.

35 Por el contrario, aunque sin pretender establecer una teoría, los presentes inventores han determinado que la sensibilidad del tumor a los fármacos terapéuticos de EGFR se puede predecir en base a que el tumor presente en una señalización de EGFR robusta, donde un tumor se vuelve "adicto" al mecanismo de señalización de EGFR, y es hiper-sensible a la pérdida de señalización de EGFR, donde la dependencia del tumor con respecto al mecanismo de señalización de EGFR para la proliferación y la supervivencia puede detectarse considerando si un tumor está enriquecido en CXCR1 respecto a tumores procedentes de sujetos que no responden.

40 En las realizaciones, se considera que el receptor de IL8 CXCR1 es un predictor independiente de la respuesta terapéutica a fármacos terapéuticos dirigidos a EGFR en sujetos con cáncer colorrectal metastásico.

45 En las realizaciones, el método puede comprender las etapas de: determinar en una muestra tumoral procedente de un sujeto con cáncer el nivel de expresión de CXCR1; comparar el nivel de expresión determinado de CXCR1 con el nivel de expresión de CXCR1 en un control, por ejemplo de tumores de una población de control, donde los tumores de la población de control pueden ser tumores del mismo tejido que el tumor del sujeto, y pueden pertenecer a un estadio y grado equivalentes al tumor del sujeto, donde se determina que el nivel de expresión de CXCR1 determinado en el sujeto está incrementado respecto al nivel de expresión del control, por ejemplo el nivel de expresión de mediana dentro de una población de control, es indicativo de que el sujeto con cáncer se beneficiaría del tratamiento con un modulador de EGFR / agente terapéutico de Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico. En las realizaciones, el método puede comprender las etapas de: determinar el nivel de expresión de CXCR1 en una muestra tumoral de un tumor procedente de un sujeto, comparar el nivel determinado con el nivel de expresión de CXCR1 en una muestra de control donde el nivel de expresión de CXCR1 en el tumor procedente del sujeto es mayor que el nivel de expresión de CXCR1, de forma adecuada el nivel de expresión de mediana de CXCR1 se

caracteriza por una muestra de control del respectivo cáncer o tejido tumoral, el tumor se determina como sensible al inhibidor de EGFR y el sujeto probablemente responderá al tratamiento con un inhibidor de EGFR. En las realizaciones, la muestra de control puede determinarse sobre el nivel de expresión determinado en una población de control. En las realizaciones, una muestra de control puede proceder de un tumor representativo de un nivel de expresión de mediana de CXCR1 en tumores del mismo tipo de tejido, de forma más adecuada del mismo estadio y grado, que el del sujeto. De forma adecuada, la muestra de control puede proporcionarse sintéticamente o artificialmente en base a los resultados del tumor representativo de un nivel de expresión de mediana de CXCR1 en tumores del mismo tipo de tejido que el del sujeto.

De forma adecuada, cuando el nivel de expresión de CXCR1 de un tumor del sujeto se ve incrementado respecto a un nivel de expresión de CXCR1 de control de una muestra de tumor, preferiblemente el nivel de mediana de expresión de CXCR1 del control, el tumor se puede caracterizar como sensible al inhibidor de EGFR y el sujeto probablemente responderá de forma beneficiosa al tratamiento con un inhibidor de EGFR, y por tanto es clasificado como sujeto que responde.

En las realizaciones, el método es un método in vitro donde la etapa de determinación del nivel de expresión de CXCR1 puede comprender tomar una muestra biológica del sujeto y después medir el nivel de expresión de CXCR1 en la muestra. En las realizaciones, una muestra de tumor puede ser una muestra de tejido que comprende células de cáncer procedente del sujeto con cáncer. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de tumor a partir de un sujeto antes y después de la exposición de las células cancerígenas a un agente terapéutico dirigido a EGFR u otro agente quimioterapéutico. En las realizaciones, la muestra de tumor puede ser una célula tumoral ex vivo. La muestra tumoral puede ser, por ejemplo, una muestra de tejido que comprende células cancerosas donde la muestra de tejido está congelada, fijada, embebida en parafina, o fresca. El tejido puede proceder de una biopsia. El término también abarca células que son la progenie de un tumor del sujeto, p.ej. muestras de cultivo celular derivadas de un tumor primario o muestras que comprenden células, proteínas o ácidos nucleicos procedentes de un tumor.

En las realizaciones de la invención, el método puede incluir la etapa de analizar una muestra de tejido o células tumorales en circulación procedente de un tumor del sujeto, que incluye, aunque sin limitación, el uso de una muestra de tejido diagnóstico obtenido del sujeto en el momento de la presentación para la expresión del biomarcador. La etapa de analizar puede incluir un análisis basado en inmunohistoquímica para determinar la expresión del biomarcador predictivo CXCR1 definido como se discute en la presente memoria. En las realizaciones, la determinación de un nivel de expresión de un CXCR1 por encima o incrementado con respecto al nivel de expresión de un control, indicativo de que un sujeto de cáncer se beneficiaría del tratamiento con un agente terapéutico dirigido a EGFR, puede comprender las etapas de;

analizar una muestra de tejido procedente de un tumor del sujeto con cáncer, o células procedentes de un tumor del sujeto que incluyen el análisis de células tumorales circulantes en una muestra de sangre u otro fluido corporal tomada del sujeto,

determinar el nivel de expresión del biomarcador CXCR1,

determinar si el nivel del biomarcador es superior al de un control, donde un nivel de expresión del biomarcador por encima del control es indicativo de que el sujeto obtendrá un beneficio clínico (responderá de forma beneficiosa) a partir de la provisión de un agente terapéutico de EGFR. En las realizaciones, un control puede ser el nivel de expresión de mediana de CXCR1 de una población con cáncer con tumores del mismo tipo de tejido, preferiblemente del mismo estadio y/o grado que el tumor del sujeto.

Sujeto

Como puede apreciarse, el método proporciona la identificación de un subgrupo de sujetos de cáncer (sujetos que responden) que se beneficiarían del tratamiento con un agente terapéutico dirigido a EGFR, en particular un inhibidor de EGFR. Por consiguiente, se puede proporcionar un inhibidor de EGFR, en particular cetuximab o panitumumab, a un sujeto para uso en el tratamiento de un tumor en el sujeto, donde se ha identificado que una muestra tumoral procedente de dicho tumor tiene un nivel de expresión del biomarcador de CXCR1 que está por encima o incrementado respecto a un nivel en una muestra de control. También se proporciona el uso de un inhibidor de EGFR, en particular cetuximab o panitumumab, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto con cáncer, donde se ha identificado que un tumor procedente de dicho cáncer tiene un nivel de expresión de CXCR1 por encima del nivel de expresión de una muestra de tumor de control. Además se proporciona un método para tratar un sujeto con un tumor, donde el nivel de expresión de CXCR1 en el tumor es mayor que el nivel de expresión de CXCR1 en un control, donde el método comprende la administración de EGFR al sujeto. En las realizaciones, un sujeto puede haber sido tratado previamente con, o recibirá, quimioterapia o radioterapia que incluye radioterapia conformal estándar, radioterapia de intensidad modulada o radioterapia de ciber-cuchillo. En las realizaciones, las células procedentes de un tumor del sujeto pueden haber sido sometidas a quimioterapia antes del método de ensayo. En las realizaciones, los pacientes con cáncer colorrectal pueden haber sido sometidos previamente a tratamiento con terapia de oxaliplatino, irinotecan o fluoropirimidina antes del método de ensayo.

En las realizaciones, el sujeto con cáncer puede ser un candidato para el tratamiento con Gefitinib (Astrazeneca), Tarceva (OSI), Cetuximab (Merck Serono), Panitumumab (Amgen) o cualquier otro fármaco anti-EGFR, o para el escrutinio de fármacos con actividad anti-EGFR. En las realizaciones, el sujeto con cáncer puede ser un candidato para tratamiento con Cetuximab (Merck Serono) o Panitumumab (Amgen). En una realización, el sujeto con cáncer puede ser un candidato para tratamiento con Cetuximab (Merck Serono).

El agente terapéutico de EGFR puede exhibir grados diferenciales de selectividad o especificidad a los miembros de la familia de EGFR extendida de receptores que incluyen ErbB2, ErbB3 y ErbB4. En realizaciones particulares, el tratamiento con un inhibidor de EGFR es mediante tratamiento con Cetuximab o panitumumab, más particularmente tratamiento con Cetuximab.

10 Tumor

El tumor o cáncer puede seleccionarse entre cáncer colorrectal, preferiblemente cáncer colorrectal metastásico, tumores colorrectales, tumores NSCLC, tumores de cabeza y cuello y tumores de ovario. En las realizaciones, el sujeto con cáncer puede tener un tumor sólido, por ejemplo, dentro del colon, los pulmones, los ovarios, el colon o el tracto gastro-intestinal, o en la cabeza y cuello. En las realizaciones, el sujeto con cáncer puede tener cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gastro-esofágico y cáncer de cabeza y cuello. En las realizaciones, el sujeto con cáncer puede tener un tumor primario en el interior del colon, el recto, el tracto gastro-esofágico, los ovarios o la cabeza y cuello, con lesiones metastásicas secundarias diseminadas a otros tejidos del cuerpo. En las realizaciones, donde el cáncer se confirma patológicamente como cáncer colorrectal, se puede recurrir al uso de CXCR1 como biomarcador predictivo en relación con cualquier sujeto que esté siendo considerado para tratamiento con un inhibidor de EGFR en el establecimiento de la enfermedad adyuvante o metastásica, tal como sería el caso para llevar a cabo actualmente un análisis de mutación Ras. Alternativamente, el uso de CXCR1 como biomarcador para indicar los sujetos que responderán al tratamiento con un agente terapéutico de EGFR también puede usarse para guiar la provisión de un inhibidor de EGFR en pacientes con tumores sólidos clasificados como cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), cáncer de cabeza y cuello, y cuello de ovario, etc.

Las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácido representativas para CXCR1 se proporcionan en el listado de secuencias al final de la especificación. Como se puede apreciar, existen variantes de ácidos nucleicos o de aminoácidos de estas secuencias, que son abarcadas por la presente solicitud.

El nivel de expresión del biomarcador CXCR1 en un control puede fijarse como la media, el modo o preferiblemente el nivel de mediana de la expresión (nivel de expresión de mediana) o definido adicionalmente como observado a través de un espectro de tejido de cáncer respectivo, por ejemplo tejido de cáncer colorrectal. En las realizaciones, el nivel de expresión del biomarcador de CXCR1 en un control puede ser el nivel de expresión, de forma adecuada la media, el modo o preferiblemente el nivel de mediana de la expresión, determinado en tumores del mismo tipo de tejido que el del tumor del sujeto que está siendo evaluado. En las realizaciones, el nivel de expresión del biomarcador de CXCR1 en un control puede ser el nivel de expresión, de forma adecuada la media, modo o preferiblemente el nivel de expresión de mediana, determinado en tumores del mismo tipo de tejido y de estadio y grado equivalentes a los del tumor del sujeto que está siendo evaluado. Esto proporciona un nivel de expresión normalizado y el nivel de expresión normalizado puede usarse para determinar un nivel de expresión incrementado que es indicativo de que se observará una respuesta beneficiosa cuando se administre un inhibidor de EGFR al sujeto. Adicionalmente, los niveles de expresión de referencia para definir el rango normal de expresión del biomarcador en un(os) tumor(es) puede(n) proporcionarse considerando una sub-población de sujetos de cáncer, por ejemplo sujetos que padecen de tumores invasivos, un rango de edad de sujetos, el género de los sujetos, o una selección de sujetos en base a la expresión de otro biomarcador. Como puede apreciarse, la determinación de los sujetos a partir de los cuales se pueden proporcionar muestras puede realizarse típicamente en vista de los sujetos que vayan a ser estudiados, o de los tumores a determinar / clasificar como que responden / no responden. En las realizaciones, el nivel de expresión de CXCR1 en un tumor se puede considerar en relación a la localización celular de la expresión y de la expresión correspondiente en dicha localización celular en el control, por ejemplo el nivel de expresión de CXCR1 puede localizarse en la membrana celular, el compartimento citoplasmático de la célula, la zona nuclear y las zonas peri-nucleares de la célula, o puede residir dentro de los cuerpos exosomales dentro o fuera de la masa tumoral.

Con las expresiones “por encima, incrementado o mayor que” se pretende indicar niveles de expresión del biomarcador determinados en la muestra que superan el nivel de expresión normalizado del biomarcador en un control o un nivel de biomarcador que ha sido correlacionado con una probabilidad incrementada de que el sujeto exhiba una respuesta beneficiosa a una terapia de cáncer con inhibidor de EGFR. Una puntuación de probabilidad, que es indicativa de la probabilidad de respuesta beneficiosa a un tratamiento con inhibidor de EGFR, puede determinarse usando valores ponderados en base a un nivel de expresión de CXCR1 y a la contribución a la respuesta a terapia de cáncer con inhibidor de EGFR en base al nivel de CXCR1. Se contempla que un aumento incremental del nivel, por ejemplo, de CXCR1 por encima de un control, puede proporcionar un aumento incremental en el resultado clínico para la provisión de un agente terapéutico dirigido a EGFR. Con “respuesta beneficiosa” se pretende indicar una respuesta favorable en el sujeto a un fármaco, en oposición a una respuesta desfavorable. Una respuesta favorable en el sujeto puede establecerse mediante la determinación de una o más de pérdida de tumor

detectable, disminución del tamaño tumoral, disminución del número de tumores, control del crecimiento tumoral, potenciamiento de la respuesta inmune anti-tumoral, regresión o rechazo del tumor, alivio en un grado determinado de uno o más síntomas asociados al tumor, y/o aumento del periodo de supervivencia tras tratamiento.

5 Como puede apreciarse, los métodos de la invención pueden comprender además la etapa de diseñar un régimen de tratamiento para un sujeto. Por ejemplo, se puede administrar un anticuerpo anti-EGFR a los sujetos que incluyan un tumor que presenta una expresión de CXCR1 incrementada (o por encima de la mediana). Por el contrario, se podrían administrar otros regímenes de fármaco, por ejemplo terapias quimioterapéuticas, a un sujeto con un tumor que presente un nivel de expresión reducido de CXCR1.

10 En las realizaciones, el nivel de expresión del control puede ser como el proporcionado en los ejemplos discutidos en la presente memoria. Como podrá entenderse, el nivel de expresión del control puede generarse para tipos de cáncer específicos, o para subtipos específicos de sujetos en base a la edad o el tipo para permitir la comparación del nivel de expresión con el detectado o medido en el tumor del sujeto.

Determinación del nivel de expresión

En las realizaciones, la determinación del nivel de expresión puede comprender al menos uno de los siguientes:

- 15 determinar la expresión de proteína CXCR1 en un tumor o en una muestra derivada del tumor tomada del sujeto,
- determinar la cantidad de ARNm que codifica CXCR1 en un tumor o en una muestra derivada del tumor tomada del sujeto,
- determinar el número de copias de CXCR1 en un tumor o en una muestra derivada del tumor tomada del sujeto,
- 20 determinar y caracterizar la expresión de cualquier polimorfismo codificante o no codificante dentro de las secuencias de nucleótido que codifican CXCR1 en un tumor, en una muestra derivada del tumor o en una muestra de tejido no tumoral tomada del sujeto.

De forma adecuada, un número de copias incrementado es indicativo de que la administración de un inhibidor de EGFR proporcionará una respuesta beneficiosa a un sujeto. Con la expresión "número de copias" se pretende indicar el número de casos discretos de un gen que codifica para un biomarcador que se indica como presente en una muestra tumoral en comparación con una muestra de referencia. El número de copias normal se definiría como la copia normal del gen determinada en sujetos sanos y en especímenes de tejido sanos. La muestra de referencia puede ser proporcionada a partir de una sub-población de sujetos con cáncer o de una cohorte seleccionada apropiadamente de pacientes normales. El número de copias puede determinarse empleando métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, ensayos basados en hibridación, ensayos basados en amplificación y ensayos de transcripción génica o ensayos de expresión de proteínas.

30 De forma adecuada, se puede usar cualquiera de las determinaciones del nivel de expresión del biomarcador, CXCR1, en combinación en los métodos de la invención.

Los métodos para determinar la cantidad de polipéptido biomarcador CXCR1 o la cantidad de ARNm que codifica biomarcador CXCR1 en una muestra se describen en la presente memoria y serán conocidos de forma general por los especialistas en la técnica. En las realizaciones, la determinación del nivel de expresión de polipéptido biomarcador, CXCR1, puede comprender la determinación del nivel de actividad del receptor, y/o la determinación del nivel de interacción entre el biomarcador (CXCR1) y una pareja de unión (p.ej., IL-8 ó GCP-2).

40 En las realizaciones de los métodos de la invención, el nivel de expresión puede medirse determinando el nivel de ARNm del biomarcador CXCR1 (medido, por ejemplo, usando reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR), metodología RT-PCR cuantitativa u otras metodologías de PCR, análisis de tinción Northern blot, hibridación in-situ, ensayo de tinción dot-blot, Taqman, ensayo de protección de ARNasa o usando hibridación de sistemas, por ejemplo microsistemas). En dichas realizaciones, se pueden usar sondas de moléculas de ácido nucleico que se puedan hibridar a ARNm del biomarcador CXCR1, en condiciones severas, para identificar el nivel de expresión del biomarcador CXCR1. Los métodos de PCR que permiten la amplificación de ácido nucleico para permitir la determinación del nivel de expresión son bien conocidos. Las reglas para diseñar cebadores de PCR están ya establecidas en la técnica.

45 Dichos métodos pueden incluir tecnologías basadas en chip para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico. En dichos métodos, pueden usarse microsistemas en los que las secuencias de polinucleótido de interés están dispuestas sobre un sustrato. Éstos pueden incluir microsistemas de oligonucleótidos o microsistemas de ADNc que comprenden uno o más de los biomarcadores que se correlacionan con la sensibilidad a un inhibidor de EGFR. Las secuencias dispuestas sobre los microsistemas se ponen a continuación en contacto en condiciones adecuadas para la hibridación específica con ADNc marcado de forma detectable generado a partir de ARNm de una muestra de ensayo. El ARNm típicamente es ARN total aislado de una muestra tumoral. En base al perfil de expresión génica de una muestra tumoral procedente de un sujeto con cáncer, por ejemplo a partir de una biopsia de tumor, se puede determinar si las células difieren de las células de control y, si así es, si presentan un perfil resistente o sensible al

tratamiento del cáncer con un inhibidor de EGFR. La cuantificación o la hibridación de cada elemento dispuesto sobre el microsistema permiten la determinación de la abundancia del correspondiente ARNm. El análisis de microsistemas puede, por ejemplo, llevarse a cabo usando equipamiento disponible comercialmente, por ejemplo usando la tecnología Affymetrix GenChip®.

5 En otra realización, el nivel de expresión se puede medir determinando el nivel de proteína del biomarcador CXCR1 (medido, por ejemplo, mediante técnicas proteómicas de inmunohistoquímica, por ejemplo usando un anticuerpo monoclonal CXCR1 disponible comercialmente, el ensayo Inmunosorbente Ligado a Enzima (ELISA), SDS-PAGE bidimensional, ensayo de transferencia Western blot, inmunoprecipitación, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o citometría de flujo). Dichos métodos pueden incluir tecnologías basadas en membranas, disolución o chips para la detección y/o cuantificación de proteína CXCR1.

10 La expresión del biomarcador CXCR1 puede detectarse y medirse usando estrategias basadas en anticuerpos, donde se pueden usar tanto anticuerpos policlonales como monoclonales específicos para el biomarcador, CXCR1, para detectar la expresión epitelial de tumor. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente al biomarcador descrito en la presente memoria, por ejemplo CXCR1, proporciona una señal de detección que resulta de la unión específica a su proteína diana y que no detecta otras proteínas en ensayos inmunoquímicos y que puede inmunoprecipitar CXCR1 desde la disolución. La determinación inmunohistoquímica del nivel de un biomarcador referenciado en la presente memoria, por ejemplo CXCR1, será esencialmente cualitativa. Sin embargo, esto aún puede permitir el agrupamiento pronóstico de un sujeto que esté siendo evaluado como un sujeto que responde o que no responde a un modulador de EGFR, por ejemplo un inhibidor.

15 La determinación del nivel de expresión de al menos un CXCR1 puede ser cualitativa (por ejemplo, superior o inferior al control, considerando por ejemplo una muestra teñida inmunohistoquímicamente) o cuantitativa. En las realizaciones, opcionalmente, el nivel de expresión de un biomarcador puede ser al menos del doble, al menos del triple, al menos del cuádruple o más, respecto a un control. En otras realizaciones, opcionalmente, se puede determinar que el nivel de expresión de un biomarcador tiene un valor-p < 0,05 en análisis Anova (test t) u otro análisis estadístico relevante.

20 En las realizaciones, los métodos de la invención pueden llevarse a cabo in vitro, por ejemplo sobre muestras obtenidas de un sujeto. En realizaciones alternativas, algunos métodos de la invención se pueden llevar a la práctica con datos generados previamente a partir del sujeto (por ejemplo, datos generados a partir de datos de microsistemas de una muestra tumoral) y por tanto no requieren el uso directo de una muestra física del paciente. Para cada aspecto de la invención, los métodos pueden incluir la etapa adicional de crear un informe para un sujeto que contiene un resumen de los niveles de expresión del biomarcador CXCR1, en una muestra tumoral. En un aspecto este informe es una forma electrónica.

25 En las realizaciones, el uso del biomarcador descrito en la invención, CXCR1, puede usarse en tándem con otros biomarcadores definidos. En las realizaciones, al menos un biomarcador usado en estos protocolos incluye CXCR1 o fragmentos del mismo que proporcionan la determinación de la expresión o la actividad de CXCR1 en una célula. En las realizaciones, se selecciona al menos un biomarcador de CXCR1.

30 En las realizaciones, el uso de CXCR1 como biomarcador, puede usarse solo o en combinación con otros biomarcadores como test predictivo o como medio para seleccionar sujetos que probablemente responderán de forma beneficiosa a

35 la administración de un agente terapéutico dirigido a EGFR, por ejemplo un inhibidor de EGFR, en combinación con quimioterapia basada en oxaliplatino como tratamiento para cáncer colorrectal de estadio IV o metastásico,

la administración de un agente terapéutico dirigido a EGFR, por ejemplo un inhibidor de EGFR, en combinación con quimioterapia basada en fluoropirimidina como tratamiento para cáncer colorrectal de estadio IV o metastásico, o

40 la administración de un agente terapéutico dirigido a EGFR, por ejemplo un inhibidor de EGFR, en combinación con otro agente quimioterapéutico aprobado contra el cáncer como adyuvante tras tratamiento quirúrgico para sujetos diagnosticados con cáncer colorrectal de estadio temprano (estadios II/III) que incluye, aunque sin limitación, una combinación de quimioterapia basada en oxaliplatino, irinotecan y/o fluoropirimidina.

45 En las realizaciones, los resultados de los métodos de la invención pueden comunicarse a partes que incluyen un médico, un investigador o un sujeto para uso en la determinación de opciones de tratamiento adicionales. En las realizaciones, los resultados se pueden proporcionar en una forma que sea transmisible a dichas partes. Los resultados pueden proporcionarse en una forma tangible tal como papel, medio legible con ordenador o similar, o en un medio intangible, por ejemplo una señal electrónica, e-mail, o a través de una página web. Alternativamente, los resultados se pueden registrar en un sonido y ser transmitidos a través de un medio adecuado tal como líneas de cable digital, cables de fibra óptica, comunicación Wireless o similar. Por consiguiente, los métodos pueden abarcar un método para producir una forma transmisible de un resultado del nivel de expresión de un biomarcador, preferiblemente CXCR1 en una muestra de tumor.

5 En un aspecto adicional, se proporciona un método para determinar la probabilidad de que un sujeto con cáncer responda terapéuticamente a un tratamiento del cáncer, donde el método comprende a) medir el nivel de expresión del biomarcador CXCR1 en una muestra biológica procedente del sujeto con cáncer, b) exponer la muestra biológica a un tratamiento de cáncer que incluye un agente terapéutico dirigido a EGFR, c) tras la etapa b) de exponer la muestra biológica al tratamiento de cáncer, medir el nivel de expresión de CXCR1 como indicador de la respuesta del tumor o de la muestra derivada del tumor, y comparar el nivel de expresión de CXCR1 como indicador de la respuesta del tumor o de la muestra derivada del tumor con el nivel de expresión del biomarcador CXCR1 en una muestra biológica procedente del sujeto con cáncer de la etapa a).

10 En las realizaciones, la medición del nivel de expresión de CXCR1 puede incluir la determinación de una lectura celular o molecular, de tal modo que el análisis predice un incremento de la probabilidad de que el sujeto con cáncer responda de forma beneficiosa a un modulador de EGFR.

15 En las realizaciones, el método permite la identificación y/o la selección de pacientes para recibir un agente terapéutico dirigido a EGFR, por ejemplo Cetuximab, para el tratamiento de cáncer, en particular de cáncer colorrectal en cualquier estadio. En las realizaciones, el método puede permitir la selección de sujetos de cáncer para recibir un agente terapéutico dirigido a EGFR, por ejemplo Cetuximab, para cáncer colorrectal de estadio II tras resección quirúrgica. En las realizaciones, los pacientes pueden recibir Cetuximab como monoterapia o como componente de tratamiento adyuvante.

20 Los métodos de la invención pueden usarse para proporcionar ensayos de escrutinio para determinar si un sujeto es susceptible o resistente al tratamiento con uno o más moduladores de EGFR / agentes terapéuticos dirigidos a EGFR. Los métodos de la invención pueden usarse para monitorizar el tratamiento de un sujeto que padezca cáncer, donde el cáncer es tratado mediante la administración de uno o más moduladores de EGFR / agentes terapéuticos dirigidos a EGFR. El biomarcador CXCR1 puede usarse para monitorizar el progreso del tratamiento de la enfermedad en los sujetos que se sometan al tratamiento para determinar si hay un cambio en la sensibilidad del tumor al tratamiento con un modulador de EGFR / agente terapéutico dirigido a EGFR. Los métodos de la invención pueden usarse para proporcionar perfiles genéticos de sujetos con cáncer que pueden permitir estrategias de tratamiento a aplicar a un sujeto específico.

Kits

La invención también proporciona kits para determinar o predecir si un sujeto es susceptible a un tratamiento contra el cáncer.

30 En un aspecto, se proporciona un kit para uso en un método de la invención que comprende un recipiente que comprende uno o más reactivos para monitorizar el nivel de expresión de CXCR1, y uno o más moduladores de EGFR para uso en la evaluación de células procedentes de un sujeto con cáncer. En una realización, un reactivo del kit puede ser un anticuerpo con especificidad de unión con el biomarcador CXCR1. En otra realización, el reactivo del kit puede ser un microsistema que permita determinar el nivel de ARNm del biomarcador CXCR1. En otra realización, el reactivo del kit puede comprender una sonda de PCR con especificidad de unión a un ARNm de un biomarcador CXCR1 que vaya a ser determinado. En las realizaciones, el kit puede comprender además instrucciones para determinar si un sujeto con cáncer responderá o no terapéuticamente a un método de tratamiento del cáncer, específicamente un método de tratamiento del cáncer que comprende un inhibidor de EGFR. En realizaciones particulares del kit, el kit puede comprender además anticuerpos con especificidad de unión por al menos un biomarcador adicional, y/o sondas PCR con especificidad de unión por al menos un biomarcador adicional.

45 En las realizaciones, CXCR1 incluye las formas activas de CXCR1 y los fragmentos activos del mismo. En las realizaciones, se puede seleccionar al menos un biomarcador de CXCR1 tal como se indica en las SEQ ID NO: 1 ó la SEQ ID NO: 2. Otros biomarcadores adicionales pueden incluir CXCR2, CXCR4, CXCR7, CXCL12, CXCL1, CXCL5 o CXCL6.

En una realización, el kit puede determinar o predecir si un paciente será susceptible de responder a un tratamiento contra el cáncer que comprende un inhibidor de EGFR.

50 En todos los aspectos de la presente descripción, se puede proporcionar la etapa adicional de determinar el nivel de expresión de al menos un biomarcador adicional. En las realizaciones, los métodos pueden incluir la determinación de al menos tres biomarcadores, al menos cuatro biomarcadores, al menos cinco biomarcadores o más. En las realizaciones, se puede seleccionar un biomarcador adicional a partir de otros biomarcadores reportados previamente que incluyen EGFR mutante, mutaciones de ganancia-de-función en K-Ras, pérdida de p53 y/o funcionalidad p53 a través de mutación o reducción de expresión. La detección de K-Ras mutado se considera típicamente indicativo de que se producirá una probabilidad reducida de que el sujeto con cáncer responda terapéuticamente a un método de tratamiento de cáncer que comprenda la administración de un inhibidor de EGFR. Un biomarcador se puede usar en un ensayo in vitro para predecir un resultado in vivo. En una realización adicional de la invención, los biomarcadores adicionales pueden ser biomarcadores novedosos/descritos recientemente

identificados a partir de escrutinios de genoma amplios (p.ej., microsistemas) o a través de investigación dirigida por hipótesis.

Las características y realizaciones preferidas de cada aspecto de la invención se deben considerar para cada uno de los demás aspectos mutatis mutandis, a menos que el contexto dicte lo contrario.

5 Definición de términos

Las “sondas” pueden derivarse de ácidos nucleicos de cadena sencilla o doble, naturales o recombinantes, o pueden sintetizarse químicamente. Dichas sondas pueden marcarse con moléculas indicadoras. Las sondas de ácido nucleico pueden usarse en hibridaciones Southern, Northern o in situ para determinar si el ADN o el ARN que codifican un biomarcador están presentes dentro de un tipo de célula, tejido u órgano. Las sondas también pueden ser anticuerpos que presenten una especificidad de unión por un biomarcador.

Las “moléculas indicadoras” pueden ser agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, radionucleidos y enzimas que estén asociados a una sonda y que permitan la detección de la sonda.

Las “condiciones severas” se refieren a las condiciones que permiten la hibridación de secuencias de ácido nucleico sustancialmente relacionadas. Las condiciones severas, dentro del significado de la invención, son 65°C en una disolución tamponante que contiene EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5M (pH 7,2), 7% (p/v) de SDS. Por ejemplo, dichas condiciones generalmente permitirán la hibridación de secuencia con al menos un 85% de identidad, preferiblemente al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia, más preferiblemente con al menos un 95% de identidad de secuencia. Las condiciones de hibridación y las sondas pueden ajustarse de modos bien caracterizados para alcanzar una hibridación selectiva.

“Activo”, con respecto a un polipéptido de CXCR1 u otro CXCR, o polipéptidos de CXCL, se refiere a las formas, fragmentos o dominios del polipéptido de CXCR1 que retienen la actividad biológica y/o antigénica de un polipéptido de CXCR o CXCL.

Los “moduladores de EGFR o fármacos terapéuticos dirigidos a EGFR”, tal como se usan en la presente memoria, pretenden indicar un compuesto o fármaco, por ejemplo una molécula biológica o una molécula pequeña que modula directa o indirectamente el mecanismo de transducción de señal del EGFR. Los moduladores de EGFR o los fármacos terapéuticos dirigidos a EGFR pueden incluir ligandos específicos de EGFR, inhibidores de EGFR de molécula pequeña, anticuerpos monoclonales de EGFR y versiones quiméricas de dichos anticuerpos. Los moduladores de EGFR o los fármacos terapéuticos dirigidos a EGFR pueden incluir moléculas biológicas o moléculas pequeñas. Las moléculas biológicas pueden incluir todos los lípidos y polímeros de monosacáridos, aminoácidos y nucleótidos que tengan un peso molecular superior a 450 kDa. Por tanto, las moléculas biológicas incluyen, por ejemplo, oligosacáridos y polisacáridos; oligopéptidos, polipéptidos, péptidos y proteínas, y oligonucleótidos y polinucleótidos. Los oligonucleótidos y polinucleótidos incluyen por ejemplo ADN y ARN. Las moléculas biológicas incluyen además derivados de cualquiera de las moléculas descritas anteriormente. Por ejemplo, los derivados de moléculas biológicas que incluyen y derivados lipídicos y de glicosilación de oligopéptidos, polipéptidos, péptidos y proteínas. Los derivados de moléculas biológicas incluyen además derivados lipídicos de oligosacáridos y polisacáridos, p.ej., lipopolisacáridos. En el caso más habitual, las moléculas biológicas son anticuerpos o equivalentes funcionales de anticuerpos donde los equivalentes funcionales tienen características de unión comparables a las de los anticuerpos e inhiben el crecimiento de células que expresan EGFR. Dichos equivalentes funcionales pueden incluir anticuerpos quiméricos, humanizados y de cadena sencilla, así como fragmentos de los mismos. Los equivalentes funcionales de anticuerpos también pueden incluir polipéptidos con secuencias de aminoácido sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos de las regiones variable o hipervariable de los anticuerpos, por ejemplo, donde la secuencia de aminoácidos difiere de la otra secuencia en una o más sustituciones, eliminaciones y/o adiciones. Preferiblemente, se sustituyen, añaden y/o eliminan de la proteína preferiblemente menos de un 50% del número de aminoácidos de la secuencia, más preferiblemente menos del 25%, aún más preferiblemente menos del 10%.

En las realizaciones se puede seleccionar un anticuerpo de EGFR entre los anticuerpos descritos en la Patente de EE.UU. n.º 6.235.883, la Patente de EE.UU. n.º 5.558.864 y la Patente de EE.UU. n.º 5.891.996. El anticuerpo de EGFR puede ser, por ejemplo, AGX-EGF (Amgen Inc.) (también conocido como panitumumab) que es un anticuerpo monoclonal IgG2 completamente humano. La secuencia y la caracterización del ABX-EGF, que anteriormente se conoció como clon E7.6.3, se describe en la Patente de EE.UU. n.º 6.235.883 en la columna 28, línea 62 hasta la columna 29, línea 36 y en las Figuras 29-34, que se incorpora a la presente memoria a modo de referencia. El anticuerpo de EGFR también puede ser, por ejemplo, EMD72000 (Merck KGaA), que es una versión humanizada del anticuerpo de EGFR de ratón EMD 55900. El anticuerpo de EGFR también puede ser, por ejemplo: h-R3 (TheraCIM), que es un anticuerpo monoclonal de EGFR humanizado; Y10 que es un anticuerpo monoclonal de ratón activado contra un homólogo en ratón de la mutación EGFRvIII humana; o MDX-447 (Medarex Inc.).

Los moduladores de EGFR o fármacos terapéuticos dirigidos a EGFR útiles en la invención también pueden ser moléculas pequeñas. Éstas pueden incluir una molécula que no sea una molécula biológica. Algunos ejemplos de moléculas pequeñas incluyen compuestos orgánicos, compuestos organometálicos, sales de compuestos orgánicos

y organometálicos, sacáridos, aminoácidos y nucleótidos. Las moléculas pequeñas además incluyen moléculas que de otro modo serían consideradas moléculas biológicas, excepto que sus pesos moleculares no son superiores a 450 kDa. Por tanto, las moléculas pequeñas pueden ser lípidos, oligosacáridos, oligopéptidos y oligonucleótidos y sus derivados, que tengan un peso molecular de 450 kDa o menos.

- 5 Las moléculas pequeñas incluyen tanto compuestos que se encuentran en la naturaleza como compuestos sintéticos. En una realización, el modulador de EGFR es una molécula pequeña que inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan EGFR. En otra realización, el modulador de EGFR es una molécula pequeña que inhibe el crecimiento de células tumorales refractarias que expresan EGFR. ERESSA (ZD1939), que es un derivado de quinozolina que actúa como mimético de ATP para inhibir EGFR (véase la Patente de EE.UU. n° 5.616.582; la solicitud internacional de patente WO 96/33980 en la página 4) es un ejemplo de molécula pequeña antagonista de EGFR. Otro ejemplo de molécula pequeña antagonista de EGFR es TARCEVA (OSI-774), que es un derivado de 4-(fenilaminosustituido)quinozolina [hidrocloruro de 6,7-Bis(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-1-fenil)amina] inhibidor de EGFR. Véase el documento WO 96/30347 (Pfizer Inc.), por ejemplo, página 2, línea 12 hasta la página 4, línea 34, y la página 19, líneas 14-17. TARCEVA puede actuar inhibiendo la fosforilación de EGFR y sus mecanismos de transducción de señal de PI3/Akt y MAP (proteína activada por mitógeno) quinasa, dando como resultado un arresto de ciclo celular mediado por p27. Véase Hidalgo et al., resumen 281 presentado en el "37th Annual Meeting of ASCO", San Francisco, California, 12-15 de mayo de 2001.

También se ha publicado que otras moléculas pequeñas inhiben el EGFR, muchas de las cuales se piensa que son específicas del dominio de tirosina quinasa de un EGFR. Algunos ejemplos de dichos antagonistas de EGFR de molécula pequeña se describen en los documentos WO 91/116051, WO 96/30347, WO96/33980, WO 97/27199, WO 97/30034, WO 97/42187, WO 97/49688, WO 98/33798, WO 00/18761 y WO 00/31048. Los ejemplos de antagonistas de EGFR de molécula pequeña específicos incluyen C1-1033 (Pfizer Inc.), quinozalina (N-[4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinazolin-6-il]-acrilamida), que es un inhibidor de quinasas, particularmente de EGFR y que se describe en WO 00/31048 en la página 8, líneas 22-6; PK1166 (Novartis), que es un inhibidor de EGFR de pirrolopirimidina y que se describe en el documento WO 97/27199 en las páginas 10-12; GW2016 (GlaxoSmithKline), que es un inhibidor de EGFR y HER2; EKB569 (Wyeth), que se ha publicado que inhibe el crecimiento de células tumorales que sobreexpresan EGFR o HER2 in vitro e in vivo; AG-1478 (Trifostina), que es una molécula pequeña de quinazolina que inhibe la señalización tanto de EGFR como de erbB-2; AG-1478 (Sugen), que es un inhibidor bisustrato que también inhibe la proteína quinasa CK2; PD 153035 (Parke-Davis) que se ha publicado que inhibe la actividad de quinasa del EGFR y el crecimiento tumoral, que induce apoptosis en células en cultivo y que potencia la citotoxicidad de agentes quimioterapéuticos citotóxicos; SPM-924 (Schwarz Pharma), que es un inhibidor de tirosina quinasa dirigido a diana para el tratamiento de cáncer de próstata; CP-546.989 (OSI Pharmaceuticals), que se ha publicado que es un inhibidor de angiogénesis para el tratamiento de tumores sólidos; ADL-681, que es un inhibidor de quinasa de EGFR dirigido a diana para el tratamiento de cáncer; PD 158780, que es una piridopirimidina que se ha publicado que inhibe la tasa de crecimiento tumoral de xenoinjertos A4431 en ratones; CP-358.774, que es una quinozolina que se ha publicado que inhibe la autofosforilación en xenoinjertos HN5 en ratones; ZD1839, que es una quinolina que se ha publicado que presenta actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de ratón que incluyen cánceres de vulva, NSCLC, próstata, ovario y colorrectal; CGP 59326A, que es una pirrolopirimidina que se ha publicado que inhibe el crecimiento de xenoinjertos positivos para EGFR en ratones; PD 165557 (Pfizer); CGP54211 y CGP53353 (Novartis), que son dianilnoftalimidias. Los inhibidores de tirosina quinasa de EGFR derivados de forma natural incluyen la genisteína, la herbimicina A, la quercetina y la erbstatina.

Otras moléculas pequeñas que se ha publicado que inhiben EGFR son compuestos tricíclicos tales como los descritos en la Patente de EE.UU. n° 5.679.683; derivados de quinazolina tales como los derivados descritos en la Patente de EE.UU. n° 5.616.582; y compuestos de indol tales como los compuestos descritos en la Patente de EE.UU. n° 5.196.446.

Otras moléculas pequeñas que se ha publicado que inhiben EGFR son compuestos de heteroarilo sustituidos con estirilo tales como los compuestos descritos en la Patente de EE.UU. n° 5.656.655. El grupo heteroarilo es un anillo monocíclico con uno o dos heteroátomos, o un anillo bicíclico con entre 1 y aproximadamente 4 heteroátomos, estando el compuesto opcionalmente sustituido o polisustituido.

Otras moléculas pequeñas que inhiben EGFR reportadas son los compuestos de bis mono y/o biciclo aril heteroarilo, carbocíclicos y heterocarbocíclicos descritos en la Patente de EE.UU. n° 5.646.153, el compuesto proporcionado en la Figura 1 de Fry et al., Science 265, 1093-1095 (1994), que inhibe EGFR, la tirfostinas que inhiben EGFR/HER1 y HER2, particularmente las de las Tablas I, II, III y IV identificadas en Osherov et al., J. Biol. Chem., 25; 268(15): 11134-42 (1993), el compuesto identificado como PD166285 que inhibe las familias de receptores EGFR, PDGFR y FGFR, y el PD166285, identificado como 6-(2,6-diclorofenil)-2-(4-(2-dietilaminoetoxi)fenilamino)-8-metil-8H-pirido(2,3-d)pirimidin-7-ona, que tiene la estructura mostrada en la Figura 1 de la página 1436 de Panek et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 283, 1433-1444 (1997).

Cabe destacar que las moléculas pequeñas útiles para su uso en la invención son inhibidores de EGFR, pero no necesariamente han de ser completamente específicas de EGFR. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "inhibidor de EGFR" puede referirse a cualquier agente capaz de inhibir directa o indirectamente la activación de EGFR. Esto puede incluir compuestos que inhiban directamente la actividad de quinasa del EGFR o

que inhiban el mecanismo de transducción de señal de EGFR. En las realizaciones, un inhibidor de EGFR puede inhibir directamente la actividad de quinasa del EGFR. En las realizaciones, el inhibidor de EGFR es un anticuerpo específico de EGFR, que puede unirse a cualquiera de los dominios conocidos del receptor, que incluyen el dominio de unión a ligando o los sitios de unión alternativos del receptor dentro de la estructura conocida del receptor. En otras realizaciones, el inhibidor de EGFR es una molécula pequeña, por ejemplo un inhibidor de tirosina quinasa selectivo de EGFR. En las realizaciones, un inhibidor de EGFR puede ser Gefitinib (Iressa®) (Astrazeneca), Erlotinib (Tarceva®) (OSI), Cetuximab (Erbix®) (Merck, Serono), Panitumumab (Vectibix®) (Amgen) u otros inhibidores anti-EGFR y mezclas de los mismos. En las realizaciones, los inhibidores de EGFR pueden incluir inhibidores de tirosina quinasa de EGFR como se conocen en la técnica. En las realizaciones, el inhibidor de EGFR puede ser Cetuximab (Merck Serono) o Panitumumab (Amgen). En una realización el inhibidor de EGFR puede ser Cetuximab (Merck Serono). Cetuximab (IMC-C225) es un anticuerpo monoclonal de IgG quimérico (humano/ratón), también conocido con el nombre comercial ERBITUX. Adicionalmente, el agente puede atacar a otros miembros de la familia de receptor EGFR, que incluyen el uso de Herceptina para atacar ErbB2 en el cáncer de mama.

“Quimioterapia” tal como se usa en la presente memoria puede incluir agentes de alquilación de ADN, antimetabolitos, alteradores de microtúbulos, intercaladores de ADN y terapia hormonal. En las realizaciones, la quimioterapia puede incluir, aunque sin limitación, terapia con cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, irinotecan o taxano, dependiendo del tipo de tumor que padezca el sujeto.

“Anticuerpo” tal como se usa en la presente memoria incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv, que son capaces de unirse a un epítipo de CXCR1.

“Tumor”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier crecimiento y proliferación celulares neoplásicos, tanto benignos como malignos, y a todas las células y tejidos cancerosos y pre-cancerosos.

“Cáncer” tal como se usa en la presente memoria es un nombre genérico para un amplio rango de malignidades celulares que se caracterizan por un crecimiento descontrolado, una falta de diferenciación y la capacidad para invadir tejidos locales y metastatizar. Dichas malignidades neoplásicas pueden afectar a varios tejidos y órganos del cuerpo, por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de célula escamosa de cabeza y cuello, cáncer endometrial, mieloma múltiple, cáncer rectal y cáncer esofágico. En una realización particular, el cáncer es cáncer colorrectal.

Los términos “sujeto” y “paciente” se usan en la presente memoria de forma intercambiable para referirse a un mamífero que está siendo evaluado para tratamiento y que está siendo tratado. En una realización, el mamífero es un humano.

Los términos “tratamiento”, “tratar” y similares se refieren a la administración de un agente con el fin de obtener un efecto. El efecto puede ser profiláctico y/o puede ser terapéutico. Por “terapéutico”, tal como se usa en la presente memoria, se pretende indicar la eliminación o paliación de un cáncer. Esto significa que la supervivencia o la esperanza de vida del paciente de cáncer aumentarán o que uno o más síntomas del cáncer se ven reducidos. Por ejemplo, esto puede abarcar una reducción de la tasa de crecimiento del cáncer o del volumen tumoral. La determinación del volumen tumoral se puede realizar mediante técnicas de imágenes de un paciente de cáncer, tal y como se aplican en la técnica.

Las referencias a material o información citadas contenidas en el texto no deberían entenderse como una concesión a que el material o la información formen parte del conocimiento general común o que sean conocidos en cualquier país.

A lo largo de la especificación, a menos que el contexto dicte lo contrario, los términos “comprende” o “incluye”, o variaciones de conjugación verbal de los mismos, se entenderán como que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros establecido de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

En este punto se procede a describir una realización de la presente invención únicamente a modo de ejemplo, en referencia a los figuras acompañantes.

La Figura 1 ilustra la Tabla 1 con la caracterización de la cohorte de pacientes.

La Figura 2 ilustra la Tabla 2. Regresión logística multivariable para la respuesta a las 12 semanas.

La Figura 3 ilustra la Tabla 3. Regresión logística multivariable para respuesta a cualquier tiempo.

La Figura 4 ilustra la Tabla 4. Análisis de supervivencia univariable.

La Figura 5 ilustra la Tabla 5. Análisis de supervivencia multivariable.

La Figura 6 ilustra el análisis de supervivencia de pacientes tratados con Cetuximab, aleatorizados para niveles de expresión de CXCR1 (18 bajos en CXCR1, 29 altos en CXCR1).

La Figura 7 ilustra la Tabla 6. Impacto pronóstico de CXCR1 en pacientes tratados con Cetuximab.

5 La Figura 8 ilustra el análisis de supervivencia de pacientes que no recibieron Cetuximab, aleatorizados respecto a los niveles de expresión de CXCR1 (35 bajos en CXCR1, 27 altos en CXCR1).

La Figura 9 ilustra la Tabla 7. Impacto pronóstico en pacientes tratados con Cetuximab.

La Figura 10 ilustra que la expresión elevada de CXCR1 predice el beneficio clínico de añadir Cetuximab a quimioterapia de oxaliplatino/5-FU (n=55 pacientes con alta expresión de CXCR1).

10 La Figura 11 ilustra la Tabla 8. Función de una expresión de CXCR1 elevada como marcador predictivo de la respuesta al tratamiento con Cetuximab.

La Figura 12 ilustra que la expresión baja de CXCR1 no permite predecir el beneficio clínico de añadir Cetuximab a la quimioterapia con oxaliplatino/5-FU (38 pacientes presentaron una baja expresión de CXCR1).

La Figura 13 ilustra la Tabla 9. Datos de respuesta de pacientes al tratamiento en pacientes con baja expresión de CXCR1.

15 Descripción detallada de la invención

En base a un ensayo nacional de fase III que investigó la respuesta de >2500 pacientes con cáncer colorrectal metastásico, que fueron distribuidos aleatoriamente en las siguientes categorías:

- solo quimioterapia,
- la provisión de quimioterapia intermitente, o
- 20 - quimioterapia en combinación con Cetuximab, un anticuerpo monoclonal dirigido al receptor de EGFR.

se consideró la relación de quimiocina-CXC y la expresión de receptor de quimiocina-CXC relativa a la respuesta clínica de cáncer colorrectal frente a los fármacos terapéuticos de EGFR.

Los tejidos analizados fueron obtenidos de un ensayo COIN, que se basó en la provisión de quimioterapia (basada en oxaliplatino/5-FU) y el anticuerpo dirigido a EGFR Cetuximab (Merck Serono).

25 Ejemplo 1 – Relación entre CXCR1 y el estatus mutacional de K-Ras

30 Se obtuvieron en total 116 muestras de tejido del “Central Processing Resource” del ensayo clínico de fase III COIN, bajo consentimiento ético. Para el momento del análisis se obtuvieron los datos relativos a edad, género, estatus K-Ras, respuesta y estatus del paciente. En consistencia con informes independientes relativos a la incidencia de mutaciones K-Ras en el cáncer colorrectal, se observó que el 38% de los tumores en los que el estatus de dicha proteína había sido evaluado presentaban una mutación en la proteína. Solo 10 casos no presentaron una caracterización acompañante de la proteína KRas. Los datos de los pacientes se presentan en la Tabla 1.

El análisis de regresión logística determinó que la expresión de CXCR1 fue independiente del estatus mutacional K-Ras en el tejido de cáncer colorrectal (P=0,215).

Ejemplo 2 – Relación entre la expresión de CXCR1 y la respuesta tumoral

35 El siguiente análisis fue determinar la relación de los parámetros clínicos en relación a la observación de un análisis multivariable de datos de respuesta tumoral en pacientes, determinada 12 semanas después del inicio del tratamiento, que determinó que una mayor expresión de CXCR1 en el epitelio tumoral se correlaciona con un incremento de la respuesta tumoral a las 12 semanas (p=0,005). Adicionalmente, los pacientes tratados con Cetuximab presentaron una respuesta mejorada a las 12 semanas si presentaban niveles elevados de expresión de CXCR1 (p=0,019). Cabe destacar que la correlación de la respuesta en pacientes tratados con Cetuximab al CXCR1 fue más significativa que la correlación con el estatus de KRas en esta cohorte de pacientes (p=0,053) (Tabla 2).

45 Se llevó a cabo un análisis multivariable posterior para analizar los parámetros contra la observación de una respuesta clínica del paciente al tratamiento a cualquier tiempo. Una mayor expresión de CXCR1 epitelial tumoral se correlaciona nuevamente con la observación de una respuesta clínica favorable (p=0,027) y un aumento de la respuesta en pacientes tratados con Cetuximab (p=0,05). Tal como se observa en el análisis de respuesta a las 12 semanas, el estatus de KRas no fue predictivo de la respuesta al Cetuximab en esta cohorte de pacientes (p=0,099) (Tabla 3).

Ejemplo 3 – Determinación de parámetros clínicos contra la supervivencia de pacientes

La supervivencia fue independiente de la Rama de Tratamiento del ensayo, mientras que la edad del paciente roza la significación. La expresión de CXCR1 epitelial tumoral o el nivel de expresión de CXCL8 dentro del infiltrado inflamatorio no se correlacionaron con una supervivencia mejorada del paciente a lo largo de la cohorte, en el análisis univariable. Sin embargo, una expresión elevada de CXCR1 se correlacionó con una mejora de la supervivencia en los pacientes tratados con Cetuximab ($p=0,007$). Por el contrario, el estatus de K-Ras no se asoció a la supervivencia global ($p=0,305$) o incluso a la respuesta a Cetuximab ($p=0,746$) (Tabla 4). La realización de un análisis multivariable confirmó que una elevada expresión de CXCR1 se correlaciona con una mejoría en la supervivencia global en pacientes tratados con Cetuximab ($p=0,019$) (Tabla 5).

Ejemplo 4 – Impacto pronóstico de la expresión de CXCR1 en pacientes tratados con Cetuximab

Los pacientes fueron estratificados en dos cohortes en base a una expresión de CXCR1 elevada o baja, que fue determinada usando el nivel de expresión de mediana como umbral de discriminación. Tras esta estratificación, se consideró que 18 pacientes que habían recibido Cetuximab presentaban una baja expresión de CXCR1 mientras que 29 pacientes presentaban una elevada expresión de CXCR1. Los pacientes con una baja expresión de CXCR1 presentaron una supervivencia global de mediana de 7,97 meses, mientras que los pacientes con una alta expresión de CXCR1 presentaron una supervivencia global de mediana de 19,033 meses ($p=0,001$) (Figura 6; Tabla 6). En una determinación paralela llevada a cabo en pacientes que no recibieron Cetuximab, no se observó ninguna diferencia en la supervivencia global de mediana de los pacientes con una baja expresión de CXCR1 (10,33 meses) o con una alta expresión de CXCR1 (10,73 meses) (Figura 8; Tabla 7). En conjunto estos análisis demuestran la especificidad de la expresión de CXCR1 en relación con la supervivencia del paciente en pacientes tratados con Cetuximab.

Ejemplo 5 – Capacidad de la expresión de CXCR1 para predecir el resultado clínico de pacientes en la terapia con Cetuximab

El análisis de pacientes que habían recibido solo quimioterapia o quimioterapia en combinación con Cetuximab determinó una baja expresión de CXCR1 en 38 pacientes, de los cuales 18 recibieron Cetuximab además de quimioterapia. En los pacientes con una baja expresión de CXCR1, la adición de Cetuximab en realidad presentó un efecto adverso sobre la supervivencia global de dichos pacientes, reduciendo la supervivencia global de mediana de 10,5 meses a 7,97 meses (Figura 12; Tabla 9).

El análisis de pacientes con niveles de expresión de CXCR1 tumorales elevados presentó un perfil muy diferente. De los 55 pacientes con una expresión elevada de CXCR1, 33 pacientes recibieron Cetuximab en combinación con quimioterapia. En dichos pacientes, la adición de Cetuximab mejoró la supervivencia global de 10,73 meses a 18,03 meses ($p=0,013$) (Figura 10; Tabla 8). Por lo tanto, estos datos revelan claramente que una expresión elevada de CXCR1 tumoral predice que dichos pacientes derivarán un beneficio clínico de la provisión de Cetuximab a un régimen de quimioterapia basada en oxaliplatino/5-fluorouracilo.

En resumen, ese análisis indicó que el receptor de quimiocina de CXCR1 es un factor pronóstico robusto y un marcador predictivo de la respuesta del paciente a Cetuximab en el cáncer colorrectal.

En los ejemplos anteriores, la expresión de CXCR1 se determinó usando un protocolo de inmunohistoquímica optimizado, utilizando un anticuerpo monoclonal de CXCR1 disponible comercialmente.

Listado de secuencias

A continuación se proporcionan las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos del gen y la proteína de CXCR1 descritos en la presente memoria. Otros refinamientos y/o caracterizaciones adicionales de transcritos adicionales a los que se asignan estos nombres de gen se consideran incluidos en el alcance de las reivindicaciones, y además los polimorfismos existentes o definidos y/o las mutaciones de dichos genes están incluidos en las definiciones de dichos genes y entran dentro del alcance de las reivindicaciones enumeradas en la presente solicitud de patente.

Definición molecular de CXCR1

La secuencia de nucleótidos de CXCR1 es accesible en bases de datos públicas a través del número de acceso NM_000634 y se proporcionan en la presente memoria como SEQ ID NO: 1. En las realizaciones, el término CXCR1 incluye las formas activas de CXCR1 y los fragmentos activos del mismo.

SEQ ID NO: 1

tattcatcaa gtgcctcta gctgtaagt cactctgac tctgactgca gctcctactg
ttggacacac ctggccggtg cttcagttag atcaaaccat tgctgaaact gaagaggaca
tgtcaaatat tacagatcca cagatgtggg attttgatga tctaaattc actggcatgc
cacctgcaga tgaagattac agcccctgta tgctagaaac tgagacactc aacaagtatg
tttgatcat cgcctatgcc ctagtgtcc tctgagcct gctgggaaac tccttggtga
tgctggtcat cttatacagc agggctggcc gctccgtcac tgatgtctac ctgctgaacc
tggccttggc cgacctactc tttgccctga ccttgcccat ctgggcccgc tccaaggatga
atggctggat ttttggcaca ttctgtgca aggtggtctc actcctgaag gaagtcaact
tctacagtgg catcctgctg ttggcctgca tcagtgtgga ccgttacctg gccattgtcc
atgccacag cacactgacc cagaagcgtc acttggtcaa gtttgtttgt cttggctgct
ggggactgct tatgaatctg tcctgcctc tcttctttt ccgccaggct taccatcaa
acaattccag tccagtttgc tatgaggctc tgggaaatga cacagcaaaa tggcggatgg
tgttgccgat cctgcctcac acctttggct tcctctgccc gctgtttgct atgctgttct
gctatggatt caccctgctg aactgttta aggccacat ggggcagaag caccgagcca
tgagggtcat ctttctgctc gtctctatct tctgctttg ctggctgccc tacaacctgg
tctgctgctc agacacctc atgaggacc aggtgatcca ggagagctgt gagcgccgca
acaacatcgg ccgggccctg gatgccactg agattctggg attttccat agctgcctca
acccatcat ctacgcctc atcgccaaa atttcgcca tggattcctc aagatcctgg
ctatgcatgg cctggctcagc aaggagtct tggcacgtca tctgttacc tctacactt
cttctctgt caatgtctt tccaacctt gaaaaccatc gatgaaggaa tatctcttct
cagaaggaaa gaataaccaa caccctgagg ttgtgtgtgg aaggatctt ggctctggac
aggcactatc tgggttttgg ggggacgcta taggatgtgg ggaagttagg aactggtgct
ttcaggggccc acaccaacct tctgaggagc ttttgaggta cctccaagga ccggcctttg
cacctccatg gaaacgaage accatcattc ccgttgaacg tcacatcttt aaccactaa
ctggctaatt agcatggcca catctgagcc ccgaatctga cattagatga gagaacaggg
ctgaagctgt gtctcatga gggctggatg ctctcgttga cctcacagg agcatctct
caactctgag tgtaagcgt tgagccacca agctggtgct tctgtgtgct ctgatccgag

ES 2 553 234 T3

ctcagggggg tggttttccc atctcaggtg tgttcagtg tctgctggag acattgaggc
aggcactgcc aaaacatcaa cctgccagct ggccttgta ggagctggaa acacatgttc
cccttggggg tggtgatga acaaagagaa agagggttg gaagccagat ctatgccaca
agaacccctt ttaccccat gaccaacatc gcagacacat gtgctggcca cctgctgagc
cccaagtgga acgagacaag cagcccttag ccctcccct ctgcagcttc caggctggcg
tgcagcatca gcatccctag aaagccatgt gcagccacca gtccattggg caggcagatg
ttcctaataa agcttctgt cctgctgtt cctgtggaa gtatcttgg tgtgacagag
tcaaggtgt gtgcagcatt gttggctgt cctgcagtag aatgggggca gcacctcta
agaaggcacc tctctgggtt gaagggcagt gttccctggg gctttaactc ctgctagaac
agtctctga ggcacagaaa ctctgttca tgccatacc cctggccaag gaagatccct
ttgtccaca gtaaaaggaa atgctctcc agggagtctc agcttcacc tgaggtgagc
atcatcttct gggtaggcc ttgctagge atagccctgc ctaagctat gtgagctcac
cagtccctcc ccaaagtct tccatgagtt gcagttttt cctagtctgt tttccctct
tggagacagg gcctgtcgg tttattcact gtatgtcctt ggtgcctgga gcctactaa
tgctcaataa ataatgatca caggaaaaaa aaaaaaaaaa aa

La secuencia de aminoácidos de CXCR1 se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO: 2.

MSNITDPQMWFDDLNFTGMPPADEDYSPCMLETETLNKYVVIIAYALVFLSLLGNSLV
MLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLKEVNF
YSGILLACISVDRYLAIVHATRRLTQKRHLVKFVCLGCWGLSMNLSLPFFLFRQAYHPNN
SSPVCYEVLGNDTAKWRMVLRLPHTFGFIVPLFVMLFCYGFTLRTLKFAHMGQKHRAM
RVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQESCERRNNIGRALDATEILGFLHSLNPII
YAFIQNFRHGFLKILAMHGLVSKEFLARHRVTSYTSSSVNVSSNL

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> The Queen's University of Belfast
Waugh, David J
Wilson, Richard
5 Oladipo, Olabode
<120> Predictor de la respuesta al tratamiento con un agente terapéutico de Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico
<130> P118284.WO.01
<150> GB1106870.7
10 <151> 2011-04-26
<160> 2
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 2502
15 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 1

ES 2 553 234 T3

tattcatcaa	gtgccctcta	gctgttaagt	cactctgatc	tctgactgca	gctcctactg	60
ttggacacac	ctggccggtg	cttcagttag	atcaaaccat	tgctgaaact	gaagaggaca	120
tgtcaaatat	tacagatcca	cagatgtggg	atcttgatga	tctaaatttc	actggcatgc	180
cacctgcaga	tgaagattac	agcccctgta	tgctagaaac	tgagacactc	aacaagtatg	240
ttgtgatcat	cgcctatgcc	ctagtgttcc	tgctgagcct	gctgggaaac	tccctggtga	300
tgctggtcat	cttatacagc	agggtcggcc	gctccgtcac	tgatgtctac	ctgctgaacc	360
tgcccttggc	cgacctactc	tttgccctga	ccttgcccat	ctgggccgcc	tccaaggtga	420
atggctggat	ttttggcaca	ttcctgtgca	agggtgtctc	actcctgaag	gaagtcaact	480
tctacagtgg	catcctgctg	ttggcctgca	tcagtgtgga	ccgttacctg	gccattgtcc	540
atgccacacg	cacactgacc	cagaagcgtc	acttgggtcaa	gtttgtttgt	cttggctgct	600
ggggactgtc	tatgaatctg	tccctgccct	tcttcctttt	ccgccaggct	taccatccaa	660
acaattccag	tccagtttgc	tatgaggtcc	tgggaaatga	cacagcaaaa	tggcggatgg	720
tgttgccgat	cctgcctcac	acctttggct	tcacgtgcc	gctgtttgtc	atgctgttct	780
gctatggatt	caccctgcgt	acactgttta	aggcccacat	ggggcagaag	caccgagcca	840
tgagggtcat	ctttgctgtc	gtcctcatct	tcttgccttg	ctggctgccc	tacaacctgg	900
tcttgcctggc	agacaccctc	atgaggaccc	aggatgatcca	ggagagctgt	gagcgccgca	960
acaacatcgg	ccgggccctg	gatgccactg	agattctggg	atttctccat	agctgcctca	1020
accccatcat	ctacgccttc	atcggccaaa	atcttcgcca	tggattcctc	aagatcctgg	1080
ctatgcatgg	cctggtcagc	aaggagttct	tggcacgtca	tcgtgttacc	tctacactt	1140

ES 2 553 234 T3

cttcgtctgt caatgtctct tccaacctct gaaaaccatc gatgaaggaa tatctcttct	1200
cagaaggaaa gaataaccaa caccctgagg ttgtgtgtgg aaggatgatct ggctctggac	1260
aggcactatc tgggttttgg ggggacgcta taggatgtgg ggaagttagg aactgggtgc	1320
ttcaggggcc acaccaacct tctgaggagc tgttgaggta cctccaagga cgggcctttg	1380
cacctccatg gaaacgaagc accatcattc cggttgaacg tcacatcttt aaccactaa	1440
ctggctaatt agcatggcca catctgagcc ccgaatctga cattagatga gagaacaggg	1500
ctgaagctgt gtccctcatga gggctggatg ctctcgttga ccctcacagg agcatctcct	1560
caactctgag tgttaagcgt tgagccacca agctgggtggc tctgtgtgct ctgatccgag	1620
ctcagggggg tggttttccc atctcaggtg tgttgccagt tctgctggag acattgaggc	1680
aggcactgcc aaaacatcaa cctgccagct ggccttgtga ggagctggaa acacatgttc	1740
cccttggggg tgggtgatga acaaagagaa agagggtttg gaagccagat ctatgccaca	1800
agaacccctt ttaccccat gaccaacatc gcagacacat gtgctggcca cctgctgagc	1860
cccaagtgga acgagacaag cagcccttag cccttcccct ctgcagcttc caggctggcg	1920
tgcagcatca gcatccctag aaagccatgt gcagccacca gtccattggg caggcagatg	1980
ttcctaataa agcttctggt ccgtgcttgt ccctgtggaa gtatcttggg tgtgacagag	2040
tcaagggtgt gtgcagcatt gttggctggt cctgcagtag aatgggggca gcacctcta	2100
agaaggcacc tctctgggtt gaagggcagt gttccctggg gctttaactc ctgctagaac	2160
agtctcttga ggcacagaaa ctccctgttca tgcccatacc cctggccaag gaagatccct	2220
ttgtccacaa gtaaaaggaa atgctcctcc agggagtctc agcttcaccc tgaggtgagc	2280
atcatcttct gggttaggcc ttgcctaggc atagccctgc ctcaagctat gtgagctcac	2340
cagtccctcc ccaaagtctt tccatgagtt gcagtttttt cctagtctgt tttccctcct	2400
tggagacagg gccctgtcgg tttattcact gtatgtcctt ggtgcctgga gcctactaaa	2460
tgctcaataa ataatgatca caggaaaaaa aaaaaaaaaa aa	2502

<210> 2

<211> 350

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 553 234 T3

Met Ser Asn Ile Thr Asp Pro Gln Met Trp Asp Phe Asp Asp Leu Asn
1 5 10 15

Phe Thr Gly Met Pro Pro Ala Asp Glu Asp Tyr Ser Pro Cys Met Leu
20 25 30

Glu Thr Glu Thr Leu Asn Lys Tyr Val Val Ile Ile Ala Tyr Ala Leu

ES 2 553 234 T3

	35					40					45				
Val	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Gly	Asn	Ser	Leu	Val	Met	Leu	Val	Ile
	50					55					60				
Leu	Tyr	Ser	Arg	Val	Gly	Arg	Ser	Val	Thr	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Asn
65					70					75					80
Leu	Ala	Leu	Ala	Asp	Leu	Leu	Phe	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Ile	Trp	Ala
				85					90					95	
Ala	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Trp	Ile	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Cys	Lys	Val
			100					105					110		
Val	Ser	Leu	Leu	Lys	Glu	Val	Asn	Phe	Tyr	Ser	Gly	Ile	Leu	Leu	Leu
		115					120					125			
Ala	Cys	Ile	Ser	Val	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ile	Val	His	Ala	Thr	Arg
	130					135					140				
Thr	Leu	Thr	Gln	Lys	Arg	His	Leu	Val	Lys	Phe	Val	Cys	Leu	Gly	Cys
145					150					155					160
Trp	Gly	Leu	Ser	Met	Asn	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Phe	Leu	Phe	Arg	Gln
				165					170					175	
Ala	Tyr	His	Pro	Asn	Asn	Ser	Ser	Pro	Val	Cys	Tyr	Glu	Val	Leu	Gly
			180					185					190		
Asn	Asp	Thr	Ala	Lys	Trp	Arg	Met	Val	Leu	Arg	Ile	Leu	Pro	His	Thr
		195					200					205			
Phe	Gly	Phe	Ile	Val	Pro	Leu	Phe	Val	Met	Leu	Phe	Cys	Tyr	Gly	Phe
	210					215					220				
Thr	Leu	Arg	Thr	Leu	Phe	Lys	Ala	His	Met	Gly	Gln	Lys	His	Arg	Ala
225					230					235					240
Met	Arg	Val	Ile	Phe	Ala	Val	Val	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Cys	Trp	Leu
				245					250					255	
Pro	Tyr	Asn	Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Asp	Thr	Leu	Met	Arg	Thr	Gln	Val
			260					265					270		
Ile	Gln	Glu	Ser	Cys	Glu	Arg	Arg	Asn	Asn	Ile	Gly	Arg	Ala	Leu	Asp
		275					280					285			

ES 2 553 234 T3

Ala Thr Glu Ile Leu Gly Phe Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Ile Ile
290 295 300

Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Asn Phe Arg His Gly Phe Leu Lys Ile Leu
305 310 315 320

Ala Met His Gly Leu Val Ser Lys Glu Phe Leu Ala Arg His Arg Val
325 330 335

Thr Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Val Asn Val Ser Ser Asn Leu
340 345 350

REIVINDICACIONES

1. El uso de CXCR1 como biomarcador en un método para predecir la respuesta en un sujeto con cáncer al tratamiento con un agente terapéutico dirigido a Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR).
2. El uso reivindicado en la reivindicación 1, donde el método comprende las etapas de:
 - 5 - determinar en una muestra tumoral procedente de un sujeto con cáncer el nivel de expresión de CXCR1;
 - comparar el nivel de expresión de CXCR1 determinado en la muestra tumoral procedente del sujeto con el nivel de expresión de CXCR1 en un Control, donde cuando el nivel de expresión de CXCR1 determinado en la muestra tumoral procedente del sujeto está incrementado respecto al nivel de expresión del Control esto es indicativo de que el sujeto de cáncer se podría beneficiar del tratamiento con un agente terapéutico dirigido al Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico.
3. El uso reivindicado en la reivindicación 2, donde el Control es una población de control de sujetos de cáncer y el nivel de expresión de CXCR1 del Control es el nivel de expresión de CXCR1 de mediana en la población de control.
4. El uso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la muestra tumoral procede de un tumor seleccionado de un tumor colorrectal, un tumor NSCLC, un tumor de cabeza y cuello o un tumor de ovario.
- 15 5. El uso como el reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones previas, donde el agente terapéutico dirigido a EGFR es una molécula biológica o una molécula pequeña que modula directa o indirectamente el mecanismo de transducción de señal de EGFR seleccionado entre al menos uno de Cetuximab, Panitumumab, Gefitinib y Tarceva.
6. El uso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones previas, donde el agente terapéutico de EGFR es Cetuximab o Panitumumab.
- 20 7. El uso reivindicado en la reivindicación 6, donde el agente terapéutico dirigido a EGFR es Cetuximab.
8. El uso reivindicado en la reivindicación 6, donde el agente terapéutico dirigido a EGFR es Cetuximab o Panitumumab y se proporciona como monoterapia.
9. El uso reivindicado en la reivindicación 6, donde el tumor es tratado con Cetuximab o Panitumumab en combinación con un agente de quimioterapia citotóxico convencional aprobado clínicamente.
- 25 10. El uso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, donde la etapa de determinación del nivel de expresión de CXCR1 comprende al menos una de:
 - determinar el nivel de expresión de proteína de CXCR1,
 - determinar el nivel de ARNm que codifica CXCR1,
 - determinar el número de copias de CXCR1, ó
 - 30 - determinar el nivel de expresión de cualquier polimorfismo codificador o no codificar dentro de la secuencia de nucleótidos de CXCR1.
11. El uso reivindicado en la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
 - a) determinar en una muestra tumoral procedente del sujeto con cáncer el nivel de expresión de CXCR1;
 - b) exponer la muestra tumoral procedente del sujeto con cáncer a un agente terapéutico dirigido a EGFR;
 - 35 c) tras la etapa b) determinar en una muestra tumoral procedente del sujeto con cáncer el nivel de expresión de CXCR1;
 - d) comparar el nivel de expresión de CXCR1 determinado en el tumor en la etapa a) con el nivel de expresión de CXCR1 determinado para el sujeto en la etapa c).
12. El uso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, donde la muestra tumoral es una muestra de tejido que comprende células de cáncer donde la muestra de tejido está congelada, fijada, embebida en parafina o fresca, o células que son la progenie del tumor de un sujeto, o células, proteínas o ácidos nucleicos desprendidos del tumor.
- 40 13. Un kit para uso en los métodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende un recipiente que comprende uno o más reactivos para monitorizar el nivel de expresión de CXCR1 y al menos un agente terapéutico de Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) para uso en la evaluación de células tumorales procedentes de un sujeto con cáncer, donde al menos uno o más de los reactivos para monitorizar el nivel de expresión de CXCR1 se selecciona entre:
 - 45

- un anticuerpo con especificidad de unión a CXCR1, ó
- un microsistema para permitir la determinación del nivel de un ARNm de CXCR1, ó
- una sonda de PCR con especificidad de unión a un ARNm de CXCR1.

5 **14.** Un kit como el reivindicado en la reivindicación 13 donde el kit comprende al menos un reactivo adicional para determinar el estatus de BRAF, el estatus de PTEN o el estatus de KRAS.

15. Un inhibidor de EGFR para uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto, donde se ha identificado que una muestra tumoral procedente de dicho tumor tiene un nivel de expresión del biomarcador de CXCR1 que está por encima del nivel de expresión de CXCR1 en un Control.

FIGURA 1

Tabla 1.

	Nº de Pacientes (n=116)	%
<u>Edad (años)</u>	65	
Mediana	35-80	
Rango		
<u>Género</u>	74	63,8
Masculino	42	36,2
Femenino		
<u>Rama de estudio</u>	42	36,2
A	51	44,0
B	23	19,8
C		
<u>¿Recibió Cetuximab?</u>	51	44,0
Sí	65	56,0
No		
<u>Estatus de KRAS</u>	68	58,6
Natural	38	32,8
Mutante	10	8,6
No evaluado		
<u>¿Respuesta tras 12 semanas?</u>	48	41,4
Sí	53	45,7
No	15	12,9
No evaluado		
<u>¿Respuesta a cualquier tiempo?</u>	50	43,1
Sí	60	51,7
No	6	5,2
No evaluado		
<u>Estatus</u>	94	81,0
Muerto	22	19,0
Censurado		

FIGURA 2

Tabla 2. Regresión logística multivariable para respuesta a 12 semanas

	Relación de Probabilidad	P	I.C. 95% para ratio de prob.	
			Inferior	Superior
Expresión de CXCR1 epitelial tumoral	0,578	0,005	0,394	0,848
Cetuximab por expresión de CXCR1	1,802	0,019	1,101	2,949
Cetuximab por estatus mutacional KRAS	0,346	0,053	0,118	1,015

FIGURA 3

Tabla 3. Regresión logística multivariable para respuesta a cualquier tiempo

	Relación Probab.	P	IC 95% relación prob.	
			Inferior	Superior
Expresión de CXCR1 epitelial tumoral	0,684	0,027	0,489	0,958
Cetuximab por CXCR1	1,576	0,050	1,000	2,482
Cetuximab por estatus mutacional KRAS	0,420	0,099	0,150	1,178

FIGURA 4**Tabla 4. Análisis de supervivencia univariable**

	Relación de peligro	P	I.C. 95% para relación de peligro	
			Inferior	Superior
Rama de tratamiento	0,776	0,437	0,410	1,470
Edad	1,027	0,058	0,999	1,055
Expresión de CXCR1 epitelial tumoral	1,132	0,259	0,912	1,405
Expresión de CXCL8 de infiltrado inflamatorio	0,763	0,285	0,465	1,252
Cetuximab por CXCR1	0,652	0,007	0,479	0,887
KRAS	1,426	0,305	0,724	2,811
Cetuximab por KRAS	1,180	0,746	0,433	3,220

FIGURA 5

Tabla 5. Análisis de supervivencia multivariable

	Relación de peligro	P	I.C. 95% relación peligro	
			Inferior	Superior
Edad	1,026	0,055	0,999	1,053
Cetuximab por CXCR1	0,885	0,019	0,799	0,980

FIGURA 6

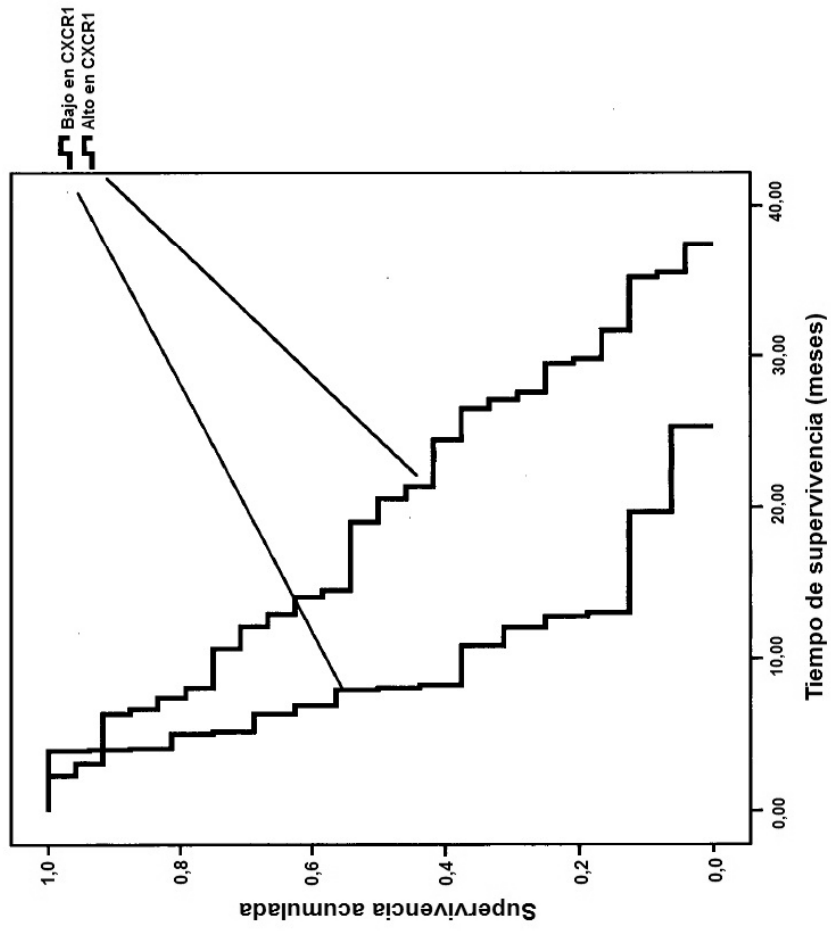


FIGURA 7

Tabla 6. Impacto pronóstico de CXCR1 en pacientes tratados con Cetuximab

Expresión de CXCR1	Nº de eventos	OS mediana (meses)	Intervalo Confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Baja (n=18)	16	7,967	5,680	10,253
Alta (n=29)	24	19,033	10,272	27,795
Global (n=47)	40	12,133	8,931	15,336
Test log-rank: P=0,001				

FIGURA 8

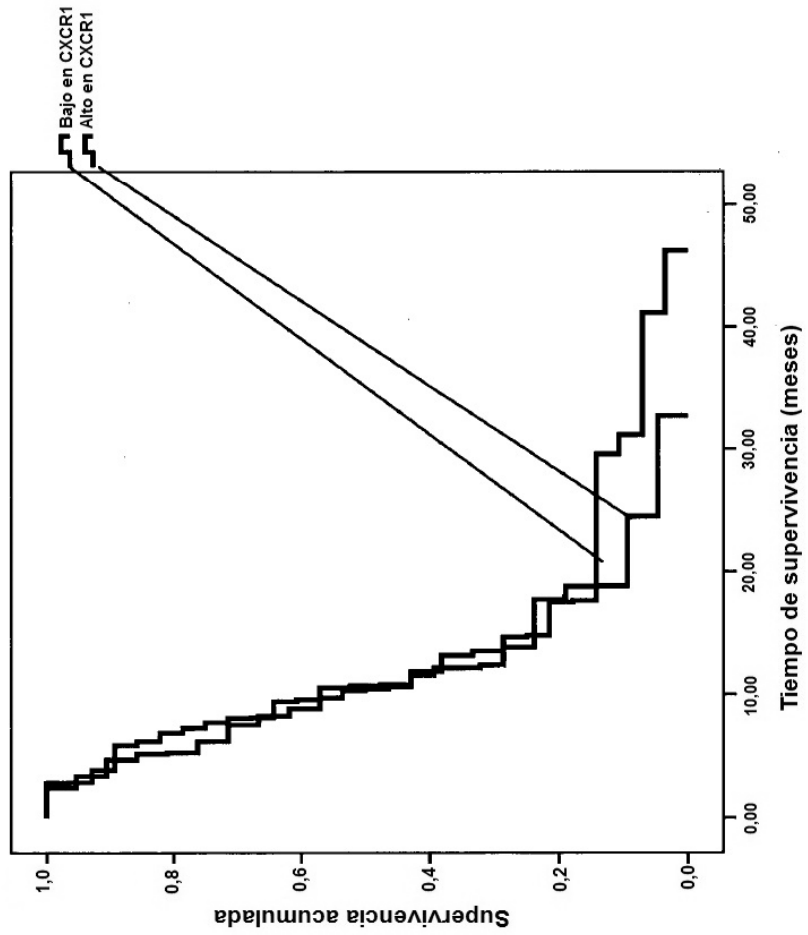


FIGURA 9

Tabla 7. Impacto pronóstico en pacientes no tratados con Cetuximab

Expresión de CXCR1	Nº de eventos	OS Mediana (meses)	Intervalo de Confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Baja (n=35)	28	10,333	8,907	11,759
Alta (n=27)	21	10,733	7,793	13,674
Global (n=62)	49	10,600	9,274	11,926
Test Log-Rank: P=0,739				

FIGURA 10

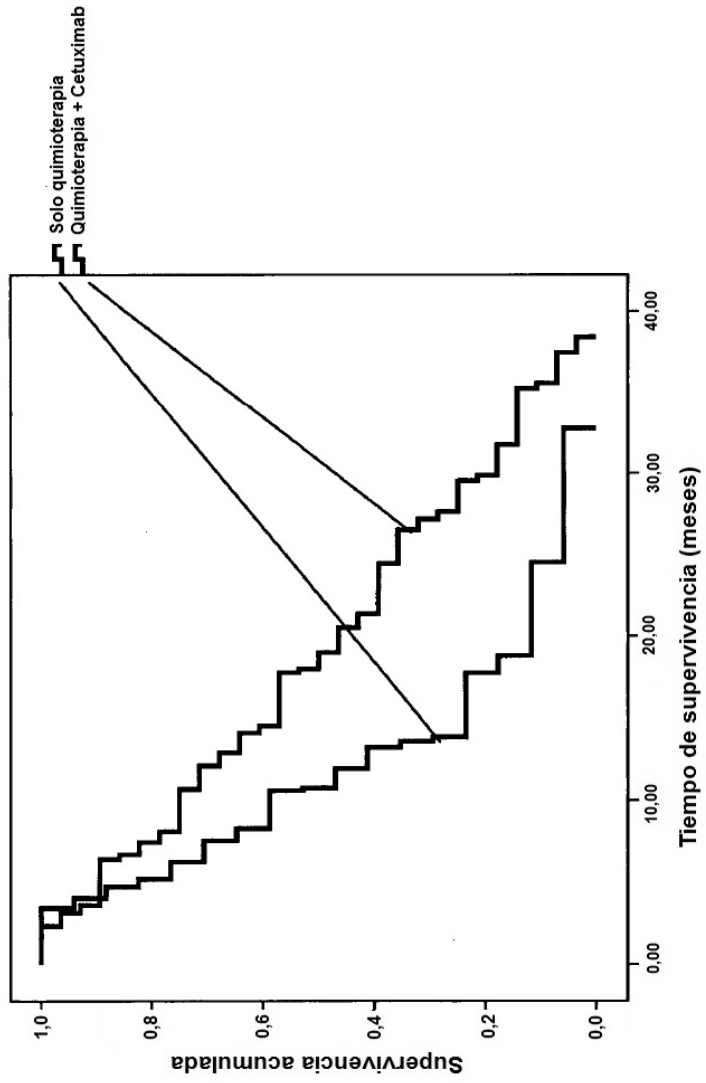


FIGURA 11

Tabla 8. Función de una función elevada de CXCR1 como marcador predictivo de la respuesta al tratamiento con Cetuximab

Rama de tratamiento	Nº de eventos	OS mediana (meses)	Intervalo de Confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
No Cetuximab (n=22)	17	10,733	5,848	15,619
Cetuximab (n=33)	28	18,033	10,212	25,855
Global	45	13,867	11,763	15,970
Test Log-Rank: P=0,013				

FIGURA 12

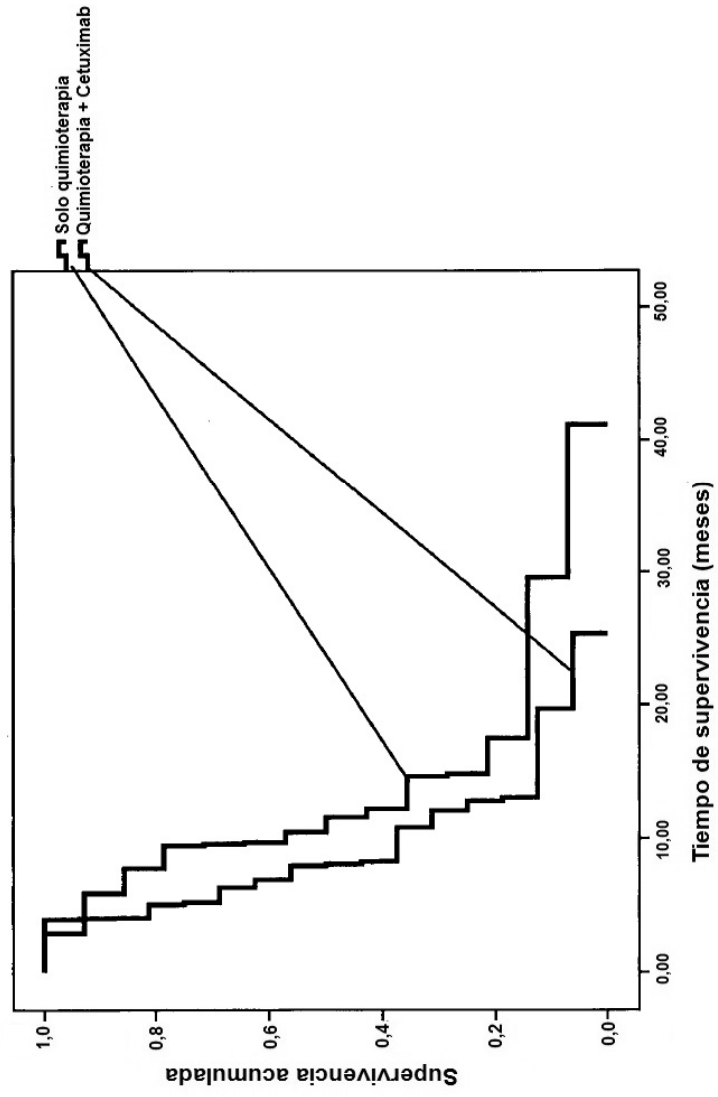


FIGURA 13

Tabla 9. Datos de respuesta de paciente al tratamiento en pacientes con baja expresión de CXCR1

Rama de tratamiento	Nº de eventos	OS Mediana (meses)	Intervalo de Confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
No Cetuximab (n=20)	14	10,500	7,078	13,922
Cetuximab (n=18)	16	7,967	5,680	10,253
Global	30	9,600	6,648	12,552
Test Log-Rank: P=0,140				