

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 084**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2010 E 10734406 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2451972**

54 Título: **Métodos de clasificación de muestras biológicas para predecir la respuesta al tratamiento con inhibidor de tirosina quinasa**

30 Prioridad:

09.07.2009 US 224281 P

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

05.07.2016

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

**COON, JOHN y
MORRISON, LARRY**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 576 084 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

Métodos de clasificación de muestras biológicas para predecir la respuesta al tratamiento con inhibidor de tirosina quinasa

5

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud Provisional de los Estados Unidos número 61/224.281 presentada el 9 de julio de 2009.

10

Antecedentes

La mutación de EGFR en los exones 19 y 21 y el elevado número de copias de EGFR se han asociado con una mayor sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa de EGFR (TKI) en pacientes con CPCNP, mientras que las mutaciones KRAS, la expresión de MET, y la mutación T790M de EGFR se han relacionado con la resistencia. En modelos preclínicos, los marcadores aguas abajo de EGFR han sido importantes en la sensibilidad o la resistencia de EGFR. En este estudio los autores de la presente invención han examinado el impacto de PTEN anormal y el número de copias del gen PIK3CA sobre los resultados de los pacientes tratados con gefitinib.

15

20

La bibliografía relevante de la técnica anterior incluye:

Sos et al. (2009), J Clin Inv 119(6): 1727-40, que muestra una correlación positiva entre los beneficios de 3q26.2 y la actividad de erlotinib;

Endoh et al. (2006), J Thor. Onc. 1 (7): 629-634, que demuestra que la mayor expresión tanto de PIK3CA como de PTEN se correlacionan con una mejor respuesta a gefitinib; She et al. (2003) Clin. Cancer Res., 9

25

(12): 4340-4346, que demuestra que la pérdida de PTEN en la ubicación 10q23.3 contribuye a la resistencia a gefitinib; Sos et al. (2009), Cancer Res, 69 (8): 3256-3261, que demuestra que la pérdida de PTEN en la ubicación 10q23.3 contribuye a la resistencia a erlotinib; documento WO 2007/133516

A1 (ABBOTT LAB [USA]) (2007-11-22), que describe un método para seleccionar un paciente de cáncer que se pronostica que se beneficiaría o no se beneficiaría de la administración terapéutica de un inhibidor

30

de EGFR, que comprende: a) detectar en una muestra de células tumorales de un paciente un nivel de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en: i) un nivel de amplificación del gen EGFR; ii) un nivel de polisomía del gen EGFR; iii) un nivel de amplificación del gen HER2; y iv) un nivel de polisomía del gen HER2.

35

Métodos: Se analizaron tejidos incluidos en parafina fijados con formalina y sedimentos de células de 81 pacientes con CPCNP tratados con gefitinib mediante hibridación de fluorescencia in situ (FISH) con sondas específicas para EGFR, PTEN, PIK3CA y centrómeros (CEN) 3, 7 y 10, y 72 especímenes produjeron resultados para los 6 sondas. Los pacientes fueron tratados previamente con al menos un régimen de quimioterapia o se consideró que no eran elegibles para la quimioterapia. Las señales de FISH se enumeraron en ≥ 40 células por espécimen para obtener un número de copias para cada locus. Se obtuvieron varios clasificadores de los números de copias genómicas y se aplicó un intervalo de valores de corte para clasificar los pacientes por la respuesta objetiva (RO), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG). Se obtuvo el estado de la mutación de EGFR (exones 19 y 21) para 55 de los especímenes.

40

Resultados: La pérdida de PTEN ($\geq 20\%$ de las células con < 2 copias de PTEN) y el bajo número de copias cen7 (promedio de copias cen7/célula < 4) estuvieron significativamente asociados con un SG inferior, y un mayor número de copias PIK3CA ($\geq 40\%$ de células con > 2 copias de PIK3CA) y un bajo número de copias de EGFR ($< 75\%$ de células con > 2 copias de EGFR) mostraron tendencias hacia una SG reducida. La pérdida de PTEN y el elevado número de copias de PIK3CA combinados, o las combinaciones de 3 vías del elevado de número de copias de PIK3CA, la pérdida de PTEN, y el bajo número de copias de EGFR o el bajo número de copias de cen7, se asociaron significativamente con una menor SG y un menor SLP. Veintidós pacientes (31%) tenían tumores con alto número de copias de PIK3CA, pérdida de PTEN, y bajo número de copias de cen7, y estos pacientes mostraron una mediana de SG de 132 días en comparación con los 373 d en los otros 50 pacientes ($p < 0,0001$ análisis de Kaplan-Meier, prueba de log rank), una mediana de SLP de 62 días, en comparación con 128 d ($p = 0,0007$), y 0% de RO en comparación con el 22% ($p = 0,015$, prueba exacta de Fisher de 2 colas). En los 37 pacientes que no albergaban una mutación de EGFR, el clasificador seguía siendo significativo (mediana de SG: 128 vs 380 d, $p < 0,0001$; mediana de SLP: 62 vs 102 d, $p = 0,019$). En el análisis multivariante, que incluía el estado FISH de PIK3CA, PTEN, y cen7, el sexo, la histología y el estado de la mutación EGFR, los 3 parámetros de FISH se mantuvieron asociados significativamente con la SG.

50

55

60

Conclusiones: Estos datos indican que gefitinib es relativamente ineficaz en los tumores con pérdida de PTEN relativamente alta y aumento de PIK3CA, y bajos niveles de EGFR o cen7, ya sea en el grupo de estudio completo o el subgrupo sin mutaciones de EGFR. Si se confirma en estudios posteriores, se deben tener en cuenta tratamientos alternativos, incluyendo potencialmente agentes seleccionados para la combinación con TKI de EGFR para pacientes cuyos tumores tienen este perfil.

Descripción

5 El método de la invención es un análisis de laboratorio clínico utilizado para clasificar muestras de tejido de
pacientes con cáncer o que se sospecha que tienen cáncer en perfiles de número de copias separados, indicativos
de la respuesta a los inhibidores de tirosina quinasa, tales como gefitinib, que es un inhibidor de molécula pequeña
de la proteína receptora EGFR. La invención consiste en el uso de un análisis de hibridación in situ, preferiblemente
basado en hibridación fluorescente in situ (FISH), utilizando sondas de hibridación cromosómica para determinar el
10 número de copias en dos, o tres loci de cromosomas humanos: 10q23.3, 3q26.3 y el cromosoma 7, preferiblemente
su centrómero o el locus 7p12. La determinación del número de copias en estos loci en células de una muestra de
tejido de pulmón se puede utilizar para clasificar la muestra por tener un perfil de número de copias indicativo de
resistencia o respuesta a un inhibidor de tirosina quinasa. En las realizaciones preferidas, la muestra de tejido que
se determina que tiene una pérdida relativa de 10q23.3, ganancia relativa de 3q26.3 y un número relativamente bajo
15 de copias del cromosoma 7, en comparación con el número de copias normal en estos loci, se clasifica por tener un
perfil de número de copias de pérdida de 10q23.3, aumento 3q26.3 y bajo número de copias del cromosoma 7, lo
que marca la resistencia a estos inhibidores. Cuando la muestra se clasifica por tener cualquier otro perfil de número
de copias para estos loci, el perfil marca sensibilidad o respuesta a estos inhibidores. En otra realización preferida, el
perfil de número de copias es de dos loci 10q23.3 y 3q26.3. Se cree que la invención es útil con todas las formas de
20 inhibidores de tirosina quinasa de genes en la vía de EGFR.
La invención también es notable porque la clasificación del perfil de número de copias es independiente del estado
de mutación de EGFR en la muestra de tejido.

La invención también es ventajosa porque el perfil de número de copias era estadísticamente significativo a lo largo
de intervalos relativamente amplios de porcentajes de células evaluables en las muestras que tenían la anomalía
25 cromosómica concreta, es decir la pérdida de 10q23.3 o el aumento de 3q26.3. Para la pérdida de 10q23.3, el
intervalo de células es de aproximadamente 13 a aproximadamente 35% de las células evaluadas que muestran
pérdida relativa, preferiblemente de aproximadamente 20%. Para el aumento de 3q26.3, el intervalo de células es de
aproximadamente 20 a aproximadamente 62,5% de las células evaluadas que muestran un aumento relativo,
preferiblemente de aproximadamente 40%. La medida del número de copias del cromosoma 7 mostró resultados
30 estadísticos robustos para el número de copias del cromosoma 7 medido en el intervalo de aproximadamente 2,7 a
aproximadamente 5,1 de las células evaluadas, preferiblemente aproximadamente 4 copias por célula.

Las sondas cromosómicas de hibridación in situ adecuadas para su uso en esta invención incluyen las sondas de los
centrómeros de EGFR y el cromosoma 7 descritas en la solicitud de los Estados Unidos co-pendiente del mismo
cesionario "Diagnostic methods for determining treatment", L.E. Morrison y J.S. Coon, presentada el 8 de mayo de
35 2007, publicada como documento US 20070275403 A1. Las sondas cromosómicas de hibridación in situ adecuadas
para su uso para determinar el número de copias en el locus de PIK3CA se pueden fabricar utilizando los métodos
descritos en la solicitud de los Estados Unidos del mismo cesionario, co-pendiente S.N. 12/268.797, "Prognostic Test
for Early Stage Non Small Cell Lung Cancer", L.E. Morrison y J.S. Coon, presentada el 11 de noviembre de 2008, en
40 la presente memoria "Morrison II", a partir de clones que contienen ADN de insertos humanos que contienen
secuencias de ácidos nucleicos en los loci de PIK3CA. La solicitud de Morrison II también describe una sonda
adecuada, diseñada para hibridar con el locus PTEN, para su uso en la presente memoria. Las sondas útiles en la
presente memoria no se limitan a sondas basadas en ADN, sino que incluyen sondas basadas en ácidos nucleicos
peptídicos. El método de hibridación in situ utilizado para determinar los perfiles de número de copias de esta
45 invención se describe en las solicitudes de los Estados Unidos co-pendientes de los autores de la presente
invención. El número de copias de cada locus del cromosoma está determinando preferiblemente mediante el
análisis de formación de imágenes FISH convencionales, ya sea manual o utilizando métodos basados en un
soporte lógico de formación de imágenes digital.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la clasificación de una muestra biológica con respecto al tratamiento con un inhibidor de la actividad de la tirosina quinasa de EGFR, comprendiendo el método:
- 5 (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente humano con un conjunto de sondas de hibridación cromosómicas en condiciones suficientes para permitir la hibridación de las sondas a los cromosomas en la muestra en donde (i) una sonda está diseñada para detectar el número de copias del locus del cromosoma humano 10q23.3 en las células de la muestra y (ii) una sonda está diseñada para detectar el número de copias del locus del cromosoma humano 3q26.3 en las células de la muestra;
- 10 (b) determinar el número de copias para cada uno del locus del cromosoma humano 10q23.3 y el locus del cromosoma humano 3q26.3; y
- (c) clasificar la muestra como resistente al tratamiento con un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de EGFR basándose en los resultados de la etapa (b), por tener un perfil de número de copias de pérdida de 10q23.3 y aumento de 3q26.3, en relación con el número de copias normal de cada uno.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente en la etapa (a) poner en contacto la muestra biológica con (iii) una sonda diseñada para detectar el número de copias del Cromosoma humano 7 en las células de la muestra; y en la etapa (b) determinar el número de copias para el Cromosoma 7; y en donde la etapa (c) comprende la clasificación de la muestra como resistente al tratamiento con un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de EGFR basándose en los resultados de la etapa (b), por tener un perfil del número de copias de pérdida de 10q23.3, aumento de 3q26.3, y pérdida del Cromosoma 7, en relación con el número de copias normal de cada uno.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, en donde una de las sondas está diseñada para hibridar con al menos una secuencia de ácido nucleico en el centrómero del Cromosoma humano 7.
- 25 4. El método de la reivindicación 2, en donde una de las sondas está diseñada para hibridar con al menos una secuencia de ácido nucleico presente en un gen PTEN en el locus 10q23.3, una de las sondas está diseñada para hibridar con al menos una secuencia de ácido nucleico presente en un gen PIK3CA en el locus 3q26.3, y una de las sondas está diseñada para hibridar con al menos una secuencia de ácido nucleico en el centrómero del Cromosoma humano 7.
- 30 5. El método de la reivindicación 2, en donde cada una de las sondas está marcada con fluorescencia y son detectables simultáneamente.
- 35 6. El método de la reivindicación 2, en donde una de las sondas está diseñada para hibridar con al menos una secuencia de ácido nucleico en el gen EGFR humano en el locus 7p12.
- 40 7. El método de la reivindicación 6, en donde una de las sondas está diseñada para hibridar con al menos una secuencia de ácido nucleico presente en un gen PTEN en el locus 10q23.3, y una de las sondas está diseñada para hibridar con al menos una secuencia de ácido nucleico presente en un gen PIK3CA en el locus 3q26.3.
- 45 8. El método de la reivindicación 2, en donde la etapa de determinación del número de copias (c) comprende la evaluación de al menos 40 células de la muestra.
- 50 9. El método de la reivindicación 2, en donde el perfil del número de copias de la pérdida de 10q23.3 comprende la determinación de que el número medio de copias del Cromosoma 7 en células evaluables de la muestra es menor de 4.
- 55 10. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde la muestra biológica es una muestra de biopsia de pulmón.
11. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde la muestra biológica es de un paciente al que previamente se le ha diagnosticado que tiene cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 60 12. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde una de las sondas está diseñada para hibridar con al menos una secuencia de ácido nucleico presente en un gen PTEN en el locus 10q23.3.
13. El método de la reivindicación 1, en donde una de las sondas está diseñada para hibridar con al menos una secuencia de ácido nucleico presente en un gen PTEN en el locus 10q23.3, y una de las sondas está diseñada para hibridar con al menos una secuencia de ácido nucleico presente en un gen PIK3CA en el locus 3q26.3.
14. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde el perfil del número de copias de la pérdida de 10q23.3 comprende la determinación de que $\geq 20\%$ de las células tienen menos de 2 copias de PTEN.

15. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde el perfil de número de copias de la pérdida de 10q23.3 comprende la determinación de que $\geq 40\%$ de las células evaluables en la muestra tiene más de 2 copias de PIK3CA.