

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 238**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2010 PCT/EP2010/003563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10145796**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2010 E 10725045 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2443252**

54 Título: **Biomarcadores y métodos para determinar la eficacia de anticuerpos anti-EGFR en la terapia del cáncer**

30 Prioridad:

**19.06.2009 EP 09008042**

**25.09.2009 EP 09012197**

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

**28.03.2018**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)**

**Frankfurter Strasse 250**

**64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**STROH, CHRISTOPHER y**

**VON HEYDEBRECK, ANJA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 661 238 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

Biomarcadores y métodos para determinar la eficacia de anticuerpos anti-EGFR en la terapia del cáncer

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención está relacionada con biomarcadores basados en genes o productos génicos y con métodos para determinar la eficacia de los anticuerpos anti-EGFR en el tratamiento de cánceres donde se expresa el EGFR. La invención también está relacionada con la predicción de la sensibilidad o la resistencia de un paciente que padece un cáncer donde se expresa el EGFR a un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR específico. La invención preferiblemente está relacionada con la identificación de biomarcadores que posibilitan una mejor predicción del resultado clínico de un tratamiento con anticuerpos anti-EGFR en pacientes con tumores KRAS salvajes. En este contexto, la invención especialmente está relacionada con el anticuerpo anti-EGFR c225/cetuximab (Erbix®) y su uso en pacientes que padecen cáncer colorrectal (CRC).

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Los anticuerpos monoclonales suelen usarse para tratar el cáncer. Debido se trata de fármacos costosos para las instituciones médicas nacionales y tienden a provocar efectos secundarios indeseables que representan una carga adicional y más estrés para los pacientes con enfermedades graves, frecuentemente terminales, resultaría conveniente poder saber con anticipación si el tratamiento de un paciente con un anticuerpo farmacológico específico puede mejorar o incluso curar su afección. Actualmente, hay algunos parámetros clínicos e histológicos que pueden usarse para obtener un pronóstico del éxito del tratamiento de una enfermedad con un fármaco o un régimen de tratamiento específico. Sin embargo, se ha demostrado que los tumores tienden a presentar patrones genéticos diversos que pueden variar entre los individuos. Por lo tanto, la eficacia de un fármaco o un tratamiento específico útil para mejorar el estado clínico de un paciente con cáncer puede ser menor o nula en otro paciente afectado por el mismo trastorno. Por ejemplo, los pacientes que padecen cáncer colorrectal pueden responder a un anticuerpo farmacológico específico de manera diferente. En el peor de los casos, determinados pacientes pueden no responder en absoluto a un fármaco, mientras que en otros puede desarrollarse una respuesta terapéutica satisfactoria, dependiendo del patrón genético y la disposición de los tumores.

30 Aunque merced a la biología molecular y la bioquímica modernas se han descubierto cientos de genes cuyas actividades influyen en el comportamiento de las células tumorales, el estado de su diferenciación y su sensibilidad o su resistencia a determinados fármacos terapéuticos, por ejemplo, anticuerpos, generalmente no se ha estudiado el estado de estos genes para tomar decisiones clínicas sobre los tratamientos farmacológicos. Una excepción es el uso de la expresión de la proteína ErbB2 (Her2) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes para un tratamiento con el antagonista de Her2 Herceptin® (Genentech). Otra excepción es el descubrimiento de que las mutaciones en el gen KRAS en tumores donde se expresa el EGFR están asociadas a la falta de sensibilidad o respuesta a los anticuerpos anti-EGFR (Allegra et al., 2009, J. Clin. Oncol., publicación electrónica previa a la impresión).

35 En el ámbito clínico se necesitan nuevos marcadores de pronóstico y predictivos que faciliten la selección de los pacientes para la terapia y posibiliten una mejor predicción de la respuesta de los pacientes ante los tratamientos, por ejemplo, moléculas pequeñas o biológicas. La clasificación de las muestras de los pacientes es un aspecto crucial del diagnóstico y el tratamiento del cáncer. La asociación de la respuesta de un paciente a un tratamiento con marcadores moleculares o genéticos puede ser útil para abrir nuevas oportunidades para el desarrollo de tratamientos en los pacientes que no responden o seleccionar un tratamiento determinado entre otras opciones debido a una mayor confianza en su eficacia. Además, mediante la preselección de los pacientes que probablemente respondan apropiadamente ante un medicamento, una combinación de medicamentos o un régimen específico, puede disminuirse la cantidad de pacientes necesarios en los estudios clínicos o pueden acelerarse los programas de desarrollo clínico.

45 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y sus efectores de señalización ulteriores, particularmente los miembros de la vía Ras/Raf/MAP quinasa, tienen una participación importante en la biología de las células epiteliales normales y malignas (Normanno et al., Gene, 366, 2-16 (2006)) y son objetivos establecidos para el desarrollo terapéutico.

50 Se han desarrollado diversos anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o completamente humanos que reconocen e inhiben el EGFR. Dos ejemplos de anticuerpos que se han comercializado son el cetuximab (ERBITUX®) y el panitumumab (VECTIBIX®)

El anticuerpo anti-EGFR c225 (cetuximab), una IgG1 quimérica de la que se ha demostrado que inhibe el crecimiento de las células tumorales mediado por el EGF in vitro y el crecimiento de los tumores colorrectales humanos in vivo, fue aprobado en 2003. Su secuencia fue descrita por primera vez en WO 96/40210. Este

5 anticuerpo y todos los anticuerpos anti-EGFR en general parecen actuar, especialmente de manera sinérgica junto con determinados agentes quimioterapéuticos (es decir, doxorubicina, adriamicina, taxol y cisplatino) para erradicar los tumores humanos in vivo en modelos de xenoinjertos en ratones (por ejemplo, EP 0667165). Además, se ha comprobado que la combinación del anticuerpo anti-EGFR c225 con un segundo anticuerpo humanizado anti-EGFR, matuzumab (Mab h425) tiene un efecto sinérgico en modelos in vitro: una indicación de que, aunque estos dos anticuerpos están dirigidos al mismo receptor, se unen a epítomos diferentes (WO 2004/032960).

10 Se ha demostrado que en aproximadamente 75% de los pacientes tratados con anticuerpos anti-EGFR, incluyendo cetuximab, o con las moléculas pequeñas inhibitoras correspondientes, se desarrolla una erupción cutánea más o menos grave poco después del inicio del tratamiento. Aunque ésta suele ser tolerable y manejable, la dosificación debe ser interrumpida o disminuida en aproximadamente 10% de los pacientes debido a síntomas graves, e incluso puede ser necesario finalizar el tratamiento. A partir de la asociación cada vez más evidente entre la toxicidad cutánea y los resultados clínicos favorables obtenidos con los inhibidores del EGFR, se ha concluido que esta erupción es una toxicidad deseable, aunque evidentemente podría resultar problemática y podría limitar la utilidad de estos agentes. En cualquier caso, la aparición de una erupción cutánea durante un tratamiento con un anticuerpo como el cetuximab puede tomarse como un indicador sustituto confiable de una respuesta terapéutica.

Sin embargo, el uso de la aparición de una erupción cutánea como indicador sustituto no es óptimo, debido a que es imposible identificar los pacientes con cáncer que generalmente no responderán al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR antes de haberles administrado el fármaco durante un período determinado.

20 Por lo tanto, el descubrimiento de que una mutación en el gen KRAS (codón 12/13) y el producto de su expresión en los tumores donde se expresa el EGFR son responsables de la insensibilidad al tratamiento del cáncer colorrectal metastásico con inhibidores del EGFR puede considerarse una mejora en la capacidad de predicción del éxito de un tratamiento. En WO 2008/112269 se indica que el panitumumab, un anticuerpo anti-EGFR humano, solamente es eficaz en pacientes con tumores KRAS salvajes. Khambata-Ford et al. (2007, J. Clin. Oncol., 25, 3230) indicaron que los pacientes con tumores de cáncer colorrectal metastásicos con un nivel de expresión alta de los genes de la epirregulina y la ampirregulina y los pacientes con tumores KRAS salvajes tienen más probabilidades de responder apropiadamente ante un tratamiento con cetuximab.

Baker et al. (J. of Clinical Oncology, vol. 26, Nº 15S, 3512, 20 de Mayo de 2008) describieron la evaluación de la expresión de los genes tumorales y las mutaciones en KRAS en tejido de tumores FFPE como marcadores predictivos de la respuesta al cetuximab en el cáncer colorrectal metastásico.

30 Tejpar et al. (Gastrointestinal Cancer Symposium, ASCO, US, 1º de Enero de 2008, p. 1-3) indicaron que la anfirregulina y la epirregulina se expresan notablemente en los primordios colorrectales KRAS salvajes, lo cual puede ser útil para predecir la respuesta y el beneficio en la supervivencia después de un tratamiento con cetuximab e irinotecán para enfermedades metastásicas.

35 Harbinson et al. ("en respuesta", J. of Clinical Oncology, 2008, vol. 26, Nº 13, páginas 2230-2231), en la publicación Expression of Epiregulin and Amphiregulin and KRAS mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab, analizaron el valor predictivo de KRAS.

En WO 2007/025044 A2 se describen biomarcadores y métodos para determinar la sensibilidad a moduladores del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

40 A pesar de los avances recientes mencionados, subsiste la necesidad de mejorar la selección de los pacientes para regímenes específicos para tratar el cáncer en función de marcadores genéticos y/o patogénicos, de modo tal de optimizar el resultado. En el contexto del tratamiento de los tumores donde se expresa el EGFR con anticuerpos anti-EGFR que inhiben su crecimiento, sería útil poder determinar cuáles pacientes responderán bien a un tratamiento determinado, especialmente debido a que recientemente se ha descubierto que, incluso en el grupo de tumores KRAS salvajes, no todos los pacientes (aproximadamente 40%) responden bien a un tratamiento con anticuerpos anti-EGFR u otros inhibidores del EGFR.

Por ende, existe la necesidad de análisis, métodos y herramientas de diagnóstico donde se usen biomarcadores que puedan proveer rápidamente información predictiva sobre las respuestas de los pacientes ante diversas opciones de tratamiento, incluyendo las diferencias en el genotipo de los tumores entre los pacientes.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

50 En la invención se proveen biomarcadores predictivos para determinar la eficacia de un anticuerpo anti-EGFR en el tratamiento de un cáncer.

En una forma de realización de la invención, se describen biomarcadores específicos que pueden usarse para predecir antes de la administración en un paciente la eficacia de un anticuerpo anti-EGFR en el tratamiento de tumores en pacientes KRAS salvajes o en pacientes con una mutación en el gen KRAS.

5 En otra forma de realización de la invención, se describen biomarcadores específicos que pueden usarse para predecir más exactamente la eficacia o el grado de eficacia de un anticuerpo anti-EGFR en el tratamiento de tumores KRAS no mutados (KRAS salvaje) en los pacientes, que estadísticamente tienden a responder de manera positiva a una terapia con anticuerpos anti-EGFR, aunque esto no es necesariamente válido a nivel individual.

10 Otra forma de realización de la invención está relacionada con biomarcadores indicativos de una probabilidad alta de una respuesta favorable (biomarcadores positivos) o desfavorable (biomarcadores negativos) ante un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR en pacientes con cáncer colorrectal (CRC), preferiblemente cáncer colorrectal metastásico (mCRC), cáncer de células escamosas en cabeza y cuello (SCCHN) o cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC).

En una forma de realización específica de la invención, se describen biomarcadores predictivos del éxito o el fracaso de una terapia con el anticuerpo anti-EGFR cetuximab (Erbix®) sobre un tumor (sólido o metastásico).

15 En una forma de realización preferida de la invención, se describen biomarcadores predictivos del éxito o el fracaso de una terapia con el anticuerpo anti-EGFR cetuximab (Erbix®) en tumores de CRC, mCRC, SCCHN o NSCLC (sólidos o metastásicos).

20 En una forma de realización preferida de la invención, se describen biomarcadores predictivos del éxito o el fracaso de una terapia con el anticuerpo anti-EGFR cetuximab (Erbix®) en tumores CRC, mCRC, SCCHN o NSCLC (sólidos o metastásicos), donde los pacientes afectados preferiblemente presentan un patrón de genes KRAS salvajes.

25 En otra forma de realización, la invención está relacionada con un método in vitro para predecir, mediante medios de diagnóstico y/o aparatos de diagnóstico, la probabilidad de que un paciente que padece un tumor KRAS salvaje que expresa el EGFR y que es candidato a un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR, responderá o no al tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR.

Según la invención, el método comprende determinar el nivel de expresión de uno o más genes o productos génicos de pronóstico en una muestra de tejido obtenida de un paciente, donde una expresión alta o baja, en comparación con un valor de referencia clínico relevante, es una indicación de la probabilidad de que el paciente responda o no al tratamiento.

30 Según la invención, los genes o los productos génicos que presentan una expresión alta en una muestra de un tumor de un paciente y que pueden estar asociados a una probabilidad alta de responder o no a un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab, se seleccionan entre ADAMDEC1, BSDC1, C1orf144, CAPZB, CDC42, DHCR7, DNAJC8, ECSIT, EXOSC10, FADS1, GBA, GLT25D1, GOSR2, IMPDH1, KLHL21, KPNA6, KPNB1, LSM12, MAN1B1, MIDN, PPAN, SH3BP2, SQLE, SSH3, TNFRSF1B, URM1, ZFYVE26, RGMB, SPIRE2, 35 ABCC5, ACSL5, AOA, AXIN2, CD24, CEACAM5, CEACAM6, ETS2, FMNL2, GPM2, HDAC2, JUN, ME3, MED17, MYB, MYC, NEBL, NOSIP, PITX2, POF1B, PPARG, PPP1R14C, PRR15, PSMGI, RAB15, RAB40B, RNF43, RPS23, SLC44A3, SOX4, THEM2, VAV3, ZNF337, EPDR1, KCNK5, KHDRBS3, PGM2L1, STK38 o SHROOM2.

40 Según la invención, los genes o los productos génicos que presentan una expresión alta en una muestra de un tumor de un paciente y que pueden estar asociados a una probabilidad baja de responder o no a un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab, se seleccionan entre C7orf46, CAST, DCP2, DIP2B, ERAP1, INSIG2, KIF21A, KLK6, NGRN, NRIP1, PHGDH, PPP1R9A, QPCT, RABEP1, RPA1, RPL22L1, SKP1, SLC25A27, SLC25A46, SOCS6, TPD52, ZDHHC2, ZNF654, ASB6, ATM, BMI1, CDC42EP2, EDEM3, PLLP, RALBP1, SLC4A11, TNFSF15, TPK1, C11orf9, C1QC, CABLES1, CDK6, EHBP1, EXOC6, EXT1, FLRT3, GCNT2, MTHFS, PIK3AP1, ST3GAL1, TK2, ZDHHC14, ARFGAP3, AXUD1, CAPZB, CHSY1, DNAJB9, GOLT1B, HSPA5, 45 LEPROTL1, LIMS1, MAPK6, MYO6, PROSC, RAB8B, RAP2B, RWDD2B, SERTAD2, SOCS5, TERF2IP, TIAL1, TIPARP, TRIM8, TSC22D2, TGFA, VAPA y UBE2K, y son una indicación de que el paciente probablemente no responderá al tratamiento, en comparación con un valor de referencia.

50 En otra forma de realización de la invención, los biomarcadores preferidos que presentan una expresión superior al promedio y son una indicación de la probabilidad de que el paciente responda o responda mejor a un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR (por ejemplo, cetuximab) se seleccionan entre EPDR1, KCNK5, KHDRBS3, PGM2L1, SHROOM2, STK38, RGMB, SPIRE2, VAV3 o los productos de su expresión.

En otra forma de realización de la invención, los biomarcadores preferidos que presentan una expresión superior al promedio y son una indicación de la probabilidad de que el paciente responda menos o no responda a un

tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR (por ejemplo, cetuximab) se seleccionan entre ASB6, ATM, BMI1, CDC42EP2, EDEM3, PLLP, RALBP1, SLC4A11, TNFSF15, TPK1, ARFGAP3, AXUD1, CAPZB, CHSY1, DNAJB9, GOLT1B, HSPA5, LEPROTL1, LIMS1, MAPK6, MYO6, PROSC, RAB8B, RAP2B, RWDD2B, SERTAD2, SOCS5, TERF2IP, TIAL1, TIPARP, TRIM8, TSC22D2, TGFA, VAPA, UBE2K o los productos de su expresión.

5 En otra forma de realización adicional, el biomarcador preferido de acuerdo con la invención para predecir una respuesta positiva de un paciente ante un anticuerpo anti-EGFR es VAV3, y el biomarcador preferido de acuerdo con la invención para predecir una respuesta negativa o insignificante de un paciente ante un anticuerpo anti-EGFR es TGFA.

10 En otra forma de realización, se aplica un método donde se usa al menos un primer biomarcador que se expresa de manera considerable o alta, según se indicó con anterioridad y en las reivindicaciones, que es un indicador de que el paciente probablemente responderá o responderá mejor ante un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab (en comparación con un promedio clínico, una respuesta convencional y/o un valor de expresión calculado a partir de una cohorte de pacientes promedio), y al menos un segundo biomarcador que se expresa de manera considerable o alta, según se indicó con anterioridad y en las reivindicaciones, que es un indicador de que el paciente probablemente responderá menos o no responderá al tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab (en comparación con un promedio clínico, una respuesta convencional y/o un valor de expresión calculado a partir de una cohorte de pacientes promedio).

15 En otra forma de realización, se aplica un método respectivo in vitro para predecir la probabilidad de que un paciente que padece un tumor KRAS salvaje que expresa el EGFR y es candidato para un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR, responderá a un tratamiento con dicho anticuerpo anti-EGFR, que comprende determinar los niveles de expresión de uno o más de los biomarcadores específicos que se describieron antes o que se describirán más adelante en la presente, en combinación con AREG y/o EREG, en contexto con el tratamiento de un paciente que tiene un tumor con un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab.

20 Preferiblemente, se aplica un método que comprende determinar el nivel de expresión de un gen VAV3 y ARAG o EREG o un producto de su expresión en el contexto del tratamiento de un tumor en un paciente, preferiblemente un CRC o un mCRC, con un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab.

En otra forma de realización específica, se aplica un método que comprende determinar el nivel de expresión de un gen VAV3 y ARAG o EREG o un producto de su expresión en el contexto del tratamiento de un tumor en un paciente, preferiblemente un CRC o un mCRC, con un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab.

30 En otra forma de realización preferida según la invención, se aplica un método que comprende determinar el nivel de expresión de un gen TGFA y ARAG o EREG o un producto de su expresión en el contexto del tratamiento de un tumor en un paciente, preferiblemente un CRC o un mCRC, con un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab.

35 En otra forma de realización preferida según la invención, se aplica un método que comprende determinar el nivel de expresión de un gen VAV3 y TGFA o un producto de su expresión en el contexto del tratamiento de un tumor en un paciente, preferiblemente un CRC o un mCRC, con un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab.

40 En otra forma de realización preferida según la invención, se aplica un método que comprende determinar el nivel de expresión de un gen VAV3, TGFA y ARAG o EREG o un producto de su expresión en el contexto del tratamiento de un tumor en un paciente, preferiblemente un CRC o un mCRC, con un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab.

En otro aspecto, la invención está relacionada con un método in vitro para predecir la probabilidad de que un paciente que padece un cáncer KRAS salvaje donde se expresa el EGFR responda terapéuticamente ante un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab, que comprende

45 (a) determinar mediante abordajes y/o aparatos de diagnóstico en una muestra de biopsia de tejido tumoral o plasma del paciente el nivel de expresión de biomarcadores seleccionados del grupo (i), que consiste en ADAMDEC1, BSDC1, C1orf144, CAPZB, CDC42, DHCR7, DNAJC8, ECSIT, EXOSC10, FADS1, GBA, GLT25D1, GOSR2, IMPDH1, KLHL21, KPNA6, KPNB1, LSM12, MAN1B1, MIDN, PPAN, SH3BP2, SQLE, SSH3, TNFRSF1B, URM1, ZFYVE26, RGMB, SPIRE2, ABCC5, ACSL5, AOA, AXIN2, CD24, CEACAM5, CEACAM6, ETS2, FMNL2, GPM2, HDAC2, JUN, ME3, MED17, MYB, MYC, NEBL, NOSIP, PITX2, POF1B, PPARG, PPP1R14C, PRR15, PSMG1, RAB15, RAB40B, RNF43, RPS23, SLC44A3, SOX4, THEM2, VAV3, ZNF337, EPDR1, KCNK5, KHDRBS3, PGM2L1, STK38, SHROOM2, y/o el grupo (ii), que consiste en C7orf46, CAST, DCP2, DIP2B, ERAP1, INSIG2, KIF21A, KLK6, NGRN, NRIP1, PHGDH, PPP1R9A, QPCT, RABEP1, RPA1, RPL22L1, SKP1, SLC25A27, SLC25A46, SOCS6, TPD52, ZDHHC2, ZNF654, ASB6, ATM, BMI1, CDC42EP2, EDEM3, PLLP, RALBP1, SLC4A11, TNFSF15, TPK1, C11orf9, C1QC, CABLES1, CDK6, EHBP1, EXOC6, EXT1, FLRT3, GCNT2, MTHFS,

PIK3AP1, ST3GAL1, TK2, ZDHHC14, ARFGAP3, AXUD1, CAPZB, CHSY1, DNAJB9, GOLT1B, HSPA5, LEPROTL1, LIMS1, MAPK6, MYO6, PROSC, RAB8B, RAP2B, RWDD2B, SERTAD2, SOCS5, TERF2IP, TIAL1, TIPARP, TRIM8, TSC22D2, TGFA, VAPA y UBE2K;

(b) exponer ex vivo una muestra de tejido tumoral o plasma del paciente al anticuerpo anti-EGFR;

5 (c) determinar nuevamente en la muestra de tejido del paso (b) el nivel de expresión de los uno o más biomarcadores mencionados en el paso (a); y

(d) calcular la diferencia entre los niveles de expresión determinados en los pasos (b) y (c);

10 donde un incremento en el nivel de expresión de los biomarcadores del grupo (i) obtenido en el paso (c), en comparación con el paso (a), está asociado a una mayor probabilidad de que el paciente responda terapéuticamente ante el tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR, y donde un incremento en el nivel de expresión de los biomarcadores del grupo (ii) obtenido en el paso (c), en comparación con el paso (a), está asociado a una menor probabilidad de que el paciente responda terapéuticamente ante el tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR.

15 En otro aspecto, la invención está relacionada con un método in vitro según se describe en la presente, donde el paciente no solamente padece un tumor KRAS salvaje donde se expresa el EGFR, sino que también presenta una mutación en el gen EGFR en el tejido tumoral. En una forma de realización específica, esta mutación es responsable de la erupción cutánea asociada a la administración del anticuerpo anti-EGFR, preferiblemente cetuximab. Esta mutación preferiblemente provoca un polimorfismo R521K en el EGFR.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

20 Figura 1. Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente al control de la enfermedad después de seis semanas de monoterapia con cetuximab en pacientes con un gen KRAS salvaje ( $p < 0,002$ , prueba t moderada). Basado en el estudio EMR 62202-045 (tratamiento de primera línea de CRC metastásico).

25 Figura 2. Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente al control de la enfermedad después de seis semanas de monoterapia con cetuximab ( $p < 0,002$ , prueba t moderada). Basado en el estudio EMR 62202-045 (tratamiento de primera línea de CRC metastásico).

Figura 3. Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán), análisis de pacientes con un gen KRAS salvaje. Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a una respuesta global superior ( $p < 0,002$ , prueba t de Welch).

30 Figura 4. Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán). Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a una respuesta global superior ( $p < 0,002$ , prueba t de Welch).

35 Figura 5. Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán), análisis de pacientes con un gen KRAS salvaje. Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a la duración de la supervivencia global ( $p < 0,002$ , regresión de riesgos proporcionales de Cox).

Figura 6. Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán). Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a la duración de la supervivencia global ( $p < 0,002$ , regresión de riesgos proporcionales de Cox).

40 Figura 7. Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán). Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a la duración de la supervivencia libre de progreso ( $p < 0,002$ , regresión de riesgos proporcionales de Cox).

45 Figura 8. Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán), análisis de pacientes con un gen KRAS salvaje. Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a la duración de la supervivencia libre de progreso ( $p < 0,002$ , regresión de riesgos proporcionales de Cox).

Figura 9. Conjuntos de sondas Affymetrix usadas para evaluar el grado de contaminación del tejido hepático en biopsias tumorales.

- 5      Figura 10. Asociación entre la expresión inicial y el control de la enfermedad en la semana 6 en pacientes con tumores KRAS salvajes. 57 conjuntos de sondas con  $p < 0,002$ . Los valores de las proporciones logarítmicas representan los niveles medios de expresión  $\log_2$  de los pacientes con una enfermedad controlada menos los de los pacientes con una enfermedad progresiva, ajustados en función del grado de contaminación hepática de las muestras.
- 10      Figura 11. Cuarenta y siete conjuntos de sondas cuya expresión estuvo asociada a una respuesta global superior como resultado del tratamiento desde el inicio hasta la semana 4. Los valores de las proporciones logarítmicas representan los cambios en los pacientes que respondieron parcialmente al tratamiento menos los que ocurrieron en los pacientes con una enfermedad estable o progresiva, ajustados en función del grado de contaminación hepática de las muestras.
- 15      Figura 12. Genes candidatos cuya expresión estuvo asociada a una respuesta global superior como resultado del tratamiento, desde el inicio hasta la semana 4. Los valores de las proporciones logarítmicas representan los cambios en los pacientes que respondieron parcialmente al tratamiento menos los que ocurrieron en los pacientes con una enfermedad estable o progresiva, ajustados en función del grado de contaminación hepática de las muestras.
- 20      Figura 13. Asociación entre la expresión basal de genes candidatos y el control de tumores KRAS salvajes en la semana 6. Los valores de las proporciones logarítmicas son los niveles medios de expresión  $\log_2$  de los pacientes con una enfermedad controlada menos los de los pacientes con una enfermedad progresiva, ajustados en función del grado de contaminación hepática de las muestras.
- 25      Figura 14. Resultados del análisis estadístico de la evaluación del proteoma en el plasma con Luminex. Se detallan los cambios generales entre las muestras desde el inicio hasta la semana 4, las asociaciones entre los cambios en el tratamiento y la respuesta en la semana 6 en todos los pacientes y en los pacientes con tumores KRAS salvajes. En cada análisis, se proveen los valores de las proporciones  $\log_2$ , p y q para cada proteína analizada. Los valores de las proporciones  $\log_2$  representan la diferencia media entre las concentraciones  $\log_2$  entre la semana 4 y el inicio (cambio general) o la diferencia entre los individuos que respondieron y los que no lo hicieron (asociación a la respuesta).
- Figura 15. Anticuerpos usados como reactivos y condiciones para el análisis inmunohistoquímico.
- Figura 16. Identificación de muestras de ARN con una contaminación hepática alta (verde), media (roja) o baja (negra) en función de la expresión de genes propios del cáncer colorrectal (recuadros azules) o el hígado normal (recuadros púrpura). La escala de colores refleja la intensidad de la señal absoluta después de la normalización.
- 30      Figura 17. Asociación entre los cambios en la expresión como resultado del tratamiento, desde el inicio hasta la semana 4, y una respuesta global superior (respuesta parcial versus enfermedad estable más enfermedad progresiva). Se representan 47 conjuntos de sondas con  $p < 0,002$ . Los nombres de los genes, seguidos por la identificación del elemento, se proveen a la derecha de la imagen. La intensidad representa la proporción  $\log_2$  de la expresión génica en la semana 4 con relación a la inicial. Abreviaturas: PD: enfermedad progresiva, SD: enfermedad estable, PR: respuesta parcial.
- 35      Figura 18. Asociación entre los cambios en la expresión de genes candidatos como resultado del tratamiento, desde el inicio hasta la semana 4, y una respuesta global superior (respuesta parcial versus enfermedad estable más enfermedad progresiva). Los nombres de los genes, seguidos por la identificación del elemento, se proveen a la derecha de la imagen. La intensidad representa la proporción  $\log_2$  de la expresión génica en la semana 4 con relación a la inicial. Abreviaturas: PD: enfermedad progresiva, SD: enfermedad estable, PR: respuesta parcial.
- 40      Figura 19. Asociación entre la expresión inicial de genes candidatos y el control de la enfermedad (respuesta parcial más enfermedad estable versus enfermedad progresiva) en tumores KRAS salvajes. Los nombres de los genes, seguidos por la identificación del elemento, se proveen a la derecha de la imagen. La intensidad representa la proporción  $\log_2$  de la expresión génica en la semana 4 con relación a la inicial. Abreviaturas: PD: enfermedad progresiva, SD: enfermedad estable, PR: respuesta parcial.
- 45      Figura 20. Correlación entre el estado de KRAS, la tasa de respuesta y la supervivencia libre de progreso en pacientes con mCRC tratados con cetuximab (Erbitux).
- Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de marcadores asociados a la ruta de señalización del EGFR en muestras de piel (A) y tumores (B). Cambios entre las muestras apareadas en la semana 4/el inicio.
- 50      Figura 22. Proporción de pacientes con una enfermedad sin progreso en función de la duración de la supervivencia libre de progreso, en meses, en función del estado de la mutación en KRAS en los tumores.

Figura 23. Asociación entre la expresión de genes de referencia y el control de la enfermedad (respuesta parcial más enfermedad estable versus enfermedad progresiva) en la semana 6 en pacientes con tumores KRAS salvajes. Se representan 57 conjuntos de sondas con  $p < 0,002$ . Los nombres de los genes, seguidos por la identificación del elemento, se proveen a la derecha de la imagen. La escala de colores refleja la proporción  $\log_2$  para cada elemento, con relación a la media de cada conjunto de sondas en todas las muestras. Abreviaturas: PD: enfermedad progresiva, SD: enfermedad estable, PR: respuesta parcial.

Figura 24. Nivel de expresión de AREG (elemento 205239\_at), EREG (elemento 205767\_at) y TGFA (elemento 205016\_at) en muestras de referencia, en función de la respuesta en la semana 6 en todos los pacientes (paneles A, C y E, respectivamente) y en los pacientes con tumores KRAS salvajes (paneles B, D y F, respectivamente). Los valores de p representan la asociación al control de la enfermedad (PR: respuesta parcial, SD: enfermedad estable, PD: enfermedad progresiva).

Figura 25. Asociación entre los cambios en la concentración de las proteínas en el plasma como resultado del tratamiento, desde el inicio hasta la semana 4, y la respuesta en la semana 6 (respuesta parcial, PR, versus enfermedad estable, SD, más enfermedad progresiva, PD) en 45 pacientes de la población con intención de tratar (ITT) (panel A) y 24 pacientes de la ITT con tumores KRAS salvajes (panel B). Se representan todas las proteínas con  $p < 0,01$ . La intensidad de cada elemento representa la proporción  $\log_2$  entre la concentración de las proteínas en la semana 4 y la concentración al inicio del estudio.

Figura 26. Diagramas de recuadros donde se representa la asociación entre VAV3 y la respuesta. PD: enfermedad progresiva, PR: respuesta parcial, SD: enfermedad estable. Puntos verdes: pacientes con tumores KRAS y BRAF salvajes, puntos rojos: pacientes con mutaciones KRAS, puntos negros: pacientes con mutaciones BRAF, puntos azules: estado de la mutación desconocido. Los valores de p se basan en pruebas t de Welch.

Figura 27. Gráfico de Kaplan-Meier donde se representan las funciones de la distribución de la supervivencia libre de progreso determinadas en estratos en función de la expresión de VAV3. Los pacientes fueron clasificados como poseedores de una expresión alta o baja de VAV3 en función de la observación de un nivel de expresión de VAV3 inicial superior o inferior al medio, respectivamente. El valor de p se obtuvo con un modelo de riesgos proporcionales de Cox.

Figura 28. Diagrama de Kaplan-Meier donde se representan las funciones estimadas de la distribución de la supervivencia global, determinadas en estratos en función de la expresión de VAV3. Los pacientes fueron clasificados como poseedores de una expresión alta o baja de VAV3 en función de la observación de un nivel de expresión de VAV3 inicial superior o inferior al medio, respectivamente. El valor de p se obtuvo con un modelo de riesgos proporcionales de Cox.

Figura 29. Diagrama de Kaplan-Meier donde se representan las funciones estimadas de la distribución de la supervivencia libre de progreso determinadas en estratos en función de la expresión de VAV3 y el estado de la mutación en KRAS. Los pacientes fueron agrupados en cuatro estratos representativos de todas las combinaciones posibles del estado de la mutación en KRAS y la expresión de VAV3 inicial (sobre la mediana o debajo de ella).

Figura 30. VAV3 interactúa con el EGFR activado. Después de transfectar células HEK 293 con VAV3 y el EGFR, solos o combinados, se las lisó y se las sometió a una inmunoprecipitación (IP) y una transferencia Western (WB).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El cetuximab, un anticuerpo monoclonal del tipo de la inmunoglobulina (Ig)G1 dirigido al EGFR, fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado para tratar tumores sólidos.

Se realizó una investigación exhaustiva sobre biomarcadores útiles para predecir la respuesta ante el cetuximab para identificar los pacientes que se beneficiarían más significativamente con el tratamiento. Al evaluarse la expresión del EGFR en los tumores con un análisis inmunohistoquímico, se demostró que no era un biomarcador útil para determinar la eficacia de los tratamientos para el CRC guiados al EGFR. Se obtuvieron resultados más prometedores para las mutaciones en el gen KRAS, que codifica una proteína que se une a GDP/GTP que conecta la activación de un receptor dependiente de un ligando y las vías intracelulares de la cascada de señalización del EGFR. Mediante diversos estudios clínicos donde se evaluó el estado de la mutación en KRAS, que abarcaron dos estudios aleatorios de un tratamiento de primera línea para el CRC metastásico (mCRC), EMR 62202-047 y EMR 62202-013, y el estudio con distribución aleatoria C0.17 (donde se evaluó una monoterapia con cetuximab en pacientes con cáncer colorrectal metastásico que no habían podido ser tratados con quimioterapia), se demostró que el estado de la mutación en el codón 12/13 de KRAS es útil para predecir la actividad del cetuximab en el CRC. Se observaron respuestas tumorales predominantemente en aquellos subgrupos de pacientes que tenían tumores KRAS salvajes, mientras que aquellos con tumores con KRAS mutado en el codón 12/13 no se beneficiaron con la terapia con cetuximab. Por ende, el estado de la mutación en el gen KRAS parece ser un biomarcador útil para

predecir la actividad del cetuximab sobre el CRC, con el cual podrían excluirse del tratamiento las subpoblaciones poco susceptibles a beneficiarse.

5 Sin embargo, no todos los aproximadamente 60% de los pacientes de CRC con tumores KRAS salvajes se benefician con un tratamiento con cetuximab. Aproximadamente 40% de los pacientes con tumores KRAS salvajes no responden al tratamiento con cetuximab, y una fracción sustancial de ellos progresa tempranamente y tiene una supervivencia global breve.

10 Por consiguiente, existe la necesidad de identificar y usar otros biomarcadores apropiados, además del estado de la mutación en KRAS, para predecir mejor el resultado clínico de un tratamiento con cetuximab en pacientes con CRC. Más aun, es necesario identificar biomarcadores diferentes del estado de la mutación en KRAS que permitan predecir mejor la eficacia del cetuximab en el tratamiento del CRC.

15 Se realizaron análisis con microseries en biopsias frescas de metástasis de hígado congelado en dos estudios del CRC donde se usó cetuximab, EMR 62202-502 y EMR 62202-045, para identificar los genes cuya expresión está asociada a la respuesta, la supervivencia libre de progreso o la supervivencia global en la población general de pacientes y en los pacientes con tumores KRAS salvajes. La expresión de estos genes podría ser útil como un biomarcador predictivo de la eficacia del tratamiento con cetuximab en el CRC y para identificar mejor los pacientes más favorecidos por el tratamiento con cetuximab en el CRC.

20 La expresión de los genes descritos puede ser usada como biomarcador para predecir la eficacia del cetuximab y otros anticuerpos terapéuticos anti-EGFR en pacientes con CRC y facilitar las decisiones de tratamiento en la clínica, es decir, si un paciente va a recibir o no cetuximab u otro anticuerpo terapéutico anti-EGFR. A continuación se detalla la aplicación clínica práctica.

25 1. Se analiza la expresión del ARNm de estos genes en tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina (FFPE) o biopsias tumorales frescas (estas últimas deben estar congeladas directamente en nitrógeno líquido o sometidas posteriormente a un tratamiento apropiado del ARN para conservar la integridad del ARN). Las biopsias pueden obtenerse de un tumor primario o una metástasis. El análisis de la expresión del ARNm puede basarse en métodos de PCR (por ejemplo, una PCR en tiempo real o una qPCR), usando cebadores específicos para la amplificación del gen de interés o mediante hibridación del ARNm del gen de interés con sondas de hibridación inmovilizadas específicas del gen en series de genes.

30 2. Se analiza la expresión de las proteínas producidas por estos genes a partir de muestras de tumores FFPE o biopsias tumorales frescas (estas últimas congeladas directamente en nitrógeno líquido o sometidas posteriormente a un tratamiento apropiado del ARN para conservar la integridad del ARN). Las biopsias pueden obtenerse de un tumor primario o una metástasis. El análisis de la expresión de las proteínas incluye métodos tales como inmunohistoquímica, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), dispositivos Luminex, transferencias, la detección de las proteínas sobre membranas o espectrometría de masa.

35 La expresión de las proteínas solubles puede analizarse en el plasma o el suero, por ejemplo, con un ELISA, un dispositivo Luminex o una espectrometría de masa.

40 Para establecer un protocolo de diagnóstico para la práctica clínica, se evalúa el nivel de expresión uno o más genes o proteínas candidatas normalizado en función de la expresión de otros genes o proteínas (o una combinación de genes y proteínas) en una misma biopsia con un método idéntico. La "normalización" de los genes o las proteínas puede basarse en el uso de genes de mantenimiento celular, de los que se sabe que presentan una variación muy baja entre los pacientes. Como alternativa, puede evaluarse la relación entre el nivel de expresión de un gen o una proteína (o una combinación de genes o proteínas) para un "buen pronóstico" (o el término equivalente usado para designar el grupo "sensible") y un "mal pronóstico" (por ejemplo, un grupo "resistente"). De esta manera, solamente es necesario determinar el nivel de expresión de los genes o las proteínas relacionadas directamente con la eficacia de la terapia anti-EGFR. Este abordaje da como resultado un rango dinámico alto y es independiente de los genes o las proteínas de mantenimiento.

50 Antes de esto, es necesario fijar un umbral, es decir, la relación entre los niveles de expresión de los marcadores aplicados (descritos con anterioridad) que debe ser alcanzada para tomar una decisión positiva para el tratamiento de un paciente con un anticuerpo anti-EGFR. Este umbral debe ser útil para distinguir de manera óptima entre los pacientes que se beneficiarán con un tratamiento anti-EGFR y los que no lo harán. El umbral debe obtenerse a partir de muestras "de referencia" de tumores de pacientes tratados con anticuerpos anti-EGFR. Posteriormente, el umbral debe ser convalidado en un conjunto de muestras de tumores diferentes de una cantidad suficiente de pacientes para verificar su utilidad en la selección de los pacientes que se beneficiarán más con el tratamiento y la exclusión de los pacientes que no lo harán.

En dos estudios clínicos independientes (EMR 62202-502 y EMR 62202-045) del tratamiento de pacientes con CRC con cetuximab, se determinó que la expresión de los genes que se describen en la presente está asociada a la respuesta, la supervivencia libre de progreso y/o la supervivencia general.

- 5 \* Mediante la amplificación del gen EGFR, puede predecirse un resultado favorable ante una terapia anti-EGFR.
- \* En estudios posteriores, puede descubrirse una incidencia menor de la amplificación del gen EGFR.
- \* Pueden descubrirse inconvenientes en la metodología/comparación.
- \* Las mutaciones en KRAS pueden “anular” los beneficios en los pacientes con amplificaciones del gen EGFR.
- 10 \* Hasta el momento, las erupciones cutáneas probablemente son el mejor biomarcador para predecir la actividad de Erbitux (mCRC, NSCLC).
- \* Mediante el estudio con Erbitux FLEX de PhIII, se determinó que la aparición temprana de erupciones cutáneas (primeros 21 días) está asociada una supervivencia global (OS) prolongada.
- \* Se hallaron mutaciones en BRAF en 5% de los pacientes.
- 15 \* Las mutaciones en BRAF y KRAS fueron mutuamente excluyentes.
- \* La mutación en BRAF parece ser un indicador de un pronóstico malo en lugar de un marcador predictivo de la eficacia de Erbitux.
- \* La expresión de AREG y EREG en el cáncer colorrectal metastásico es independiente del estado de la mutación en KRAS.
- 20 \* Puede obtenerse un poder predictivo mayor combinando el nivel de expresión de AREG y EREG con el estado de la mutación en KRAS.

25 El tratamiento con cetuximab según los experimentos de la invención estuvo asociado a una regulación negativa sustancial de p-EGFR, p-MAPK y una proliferación y una regulación positiva sustancial de p27<sup>Kip1</sup> y el nivel de p-STAT3 en los queratinocitos basales. No hubo diferencias marcadas en estos efectos entre los diversos cronogramas y niveles de administración. La monoterapia con cetuximab solamente provocó respuestas en los pacientes con tumores KRAS salvajes (8/29 versus 0/19 para los tumores KRAS mutados, p=0,015). La supervivencia libre de progreso fue mayor en los pacientes con tumores KRAS salvajes, en comparación con los pacientes con tumores KRAS mutados (rango logarítmico, p=0,048). Mediante el análisis genómico/proteómico, se identificaron marcadores candidatos asociados a la respuesta.

30 Se cree que este estudio de la fase I con dosis crecientes de cetuximab como monoterapia es el primer intento de usar un análisis farmacogenómico/farmacoproteómico para identificar biomarcadores predictivos antes del inicio de un tratamiento con cetuximab para el cáncer colorrectal metastásico sensible en un entorno de primera línea.

35 En otro estudio clínico (detallado en otra parte), se demostró que el cetuximab puede administrarse de manera segura como una terapia de primera línea en pacientes con cáncer colorrectal metastásico cada dos semanas, en dosis de 400-700 mg/m<sup>2</sup>. La MTD no fue la dosis más alta, y no hubo diferencias marcadas en la incidencia, la gravedad de los efectos ni la actividad del cetuximab en diversas dosis. Usando piel para determinar el impacto del tratamiento y a partir de los resultados del análisis IHC para evaluar los biomarcadores farmacodinámicos, se demostró que hubo una inhibición consistente de las proteínas de señalización en la vía del EGFR en todos los grupos tratados con dosis crecientes. Esto fue un fundamento biológico a favor de la equivalencia funcional de los regímenes de dosificación con una frecuencia de una o dos semanas.

40

45 Mediante análisis con un solo brazo y estudios con distribuciones aleatorias en mCRC, se confirmó que el estado de la mutación en los codones 12 y 13 de KRAS en los tumores es un marcador predictivo importante de la actividad del cetuximab, donde el beneficio del tratamiento está asociado estrechamente al estado salvaje<sup>4,7-13</sup>. En este estudio, se abordó por primera vez la influencia del estado de la mutación en KRAS con una monoterapia con cetuximab como tratamiento de primera línea para pacientes con mCRC. En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente con pacientes quimiorrefractarios tratados con cetuximab como agente único o en combinación con una quimioterapia<sup>8,11,13</sup>, solamente se observaron respuestas objetivas con la monoterapia en aquellos pacientes con tumores KRAS salvajes (8 de los 29 pacientes, 28%), y no se observaron respuestas (0 de

- 19) entre pacientes con tumores con mutaciones ( $p=0,015$ ). Las mejores tasas de respuesta global (incluyendo las respuestas después de la adición de FOLFIRI) en los pacientes con tumores KRAS salvajes (55%) y tumores KRAS mutados (32%) fueron comparables con los resultados obtenidos en los estudios de CRYSTAL y OPUS, donde se combinó cetuximab como tratamiento de primera línea con FOLFIRI y FOLFOX<sup>4,12</sup>, respectivamente. Las respuestas observadas en los pacientes con mCRC con tumores KRAS mutados tratados con cetuximab en combinación con una quimioterapia como tratamiento de primera línea probablemente se deban al efecto de la quimioterapia. En general, la PFS fue significativamente más prolongada entre los pacientes con tumores KRAS salvajes: una indicación de la importancia clínica del estado de la mutación en KRAS como biomarcador predictivo del éxito del tratamiento con cetuximab.
- 5
- 10 Un subgrupo de pacientes con tumores KRAS salvajes no parecieron beneficiarse con el tratamiento con cetuximab. Por consiguiente, podrían identificarse nuevos biomarcadores predictivos para adaptar más precisamente el tratamiento para los pacientes que sí lo harán. Recientemente se ha descrito el valor predictivo negativo de las mutaciones en BRAF<sup>18</sup> y PI3K<sup>19,20</sup> y la desregulación de PTEN<sup>19-21</sup>. Otros marcadores moleculares potencialmente asociados a la actividad clínica del cetuximab abarcan el nivel de expresión en los tumores del VEGF, la IL-8, el EGFR y PTGS2 (COX2)<sup>22</sup>, el nivel del VEGF en la circulación durante el tratamiento<sup>23</sup>, los polimorfismos constitucionales en PTGS2 y EGFR<sup>24</sup> y el estado de la mutación en TP53 en los tumores<sup>25</sup>.
- 15

Se están desarrollando más tecnologías de alto rendimiento para buscar biomarcadores predictivos para diversos agentes anticancerígenos<sup>26-29</sup>. En el caso del cetuximab, una expresión elevada de los genes de los ligandos del EGFR AREG (anfirregulina) y EREG (epirregulina) en los tumores ha sido asociada a la actividad clínica en pacientes con mCRC, tanto con microseries<sup>10,30</sup> (en una población no seleccionada y una población con tumores KRAS salvajes) como con una PCR cuantitativa con transcriptasa inversa<sup>31</sup> (pacientes que recibieron cetuximab más irinotecán). Asimismo, en un estudio actual de primera línea, la expresión de AREG y EREG parece ser alta en los tumores de pacientes con una enfermedad sin progreso, tanto en la población general como en el subgrupo con tumores KRAS salvajes. En contraste, la expresión del gen TGF $\alpha$  (que codifica el TGF- $\alpha$ ) fue menor en los pacientes con una enfermedad sin progreso. Mediante el análisis de la expresión génica global en tumores KRAS salvajes, se identificaron 57 genes potencialmente asociados al control de la enfermedad en la semana 6 ( $p<0,002$ ). Entre estos candidatos, se hallaron seis genes (TNFRSF1B, DNAJC8, ECSIT, GOSR2, PPP1R9A y KLK6) con una tasa de descubrimiento falso  $<0,1$ . Debe evaluarse más detalladamente el valor de estos biomarcadores potenciales en la mejora de la predicción de la eficacia del cetuximab en mCRC KRAS salvaje.

20

25

Mediante el análisis Luminex de las proteínas en el plasma, se observó un incremento importante en el nivel de la anfirregulina y el TGF- $\alpha$  durante una monoterapia con cetuximab, una tendencia que también se observó para el EGF. La regulación positiva de estos ligandos del EGFR podría ser una reacción de compensación a la inhibición del EGFR. Curiosamente, el incremento en el nivel de la anfirregulina fue significativamente menor en los pacientes que respondieron al tratamiento con cetuximab. Se observó una disminución significativa en el nivel del antígeno carcinoembrionario y los antígenos del cáncer 125 y 19-9 con la monoterapia con cetuximab entre los individuos que respondieron. Sorprendentemente, la disminución en el nivel de la IL-8 también estuvo asociada significativamente a la respuesta en todos los tumores, incluso los tumores KRAS salvajes. La IL-8 es una citoquina proinflamatoria que promueve la proliferación y la supervivencia de las células tumorales y tiene efectos profundos en el microambiente tumoral<sup>32</sup>. La IL-8 parece ser un biomarcador predictivo de la eficacia del cetuximab.

30

35

Además, según la invención, pudo detectarse una interacción directa entre el EGFR y VAV3 cuando ambos EGFR y VAV3 se expresaron en células HEK 293. Esto es una indicación de una participación directa y excepcional de VAV3 en la señalización del EGFR y una relación directa entre los niveles de expresión altos observados para VAV3 y la modulación de la actividad de la terapia anti-EGFR con cetuximab.

40

En la invención se demuestra por primera vez que el tratamiento (con una frecuencia de una o dos semanas) con anticuerpos anti-EGFR, preferiblemente cetuximab como único agente en un entorno de primera línea, beneficia los pacientes con mCRC y tumores KRAS salvajes. Además, mediante el análisis de la expresión génica global de este estudio de la fase temprana, se obtuvieron resultados de interés con relación a la expresión de determinados genes y la actividad clínica del cetuximab. A partir de estas observaciones, pudo realizarse una convalidación en más pacientes usando metodologías diferentes. Los resultados de estos estudios fueron una base racional para optimizar el tratamiento de los pacientes que padecen diversos tipos de cánceres, especialmente CRC o mCRC, con cetuximab o anticuerpos anti-EGFR con una actividad similar.

45

50

#### Análisis inmunohistoquímico de los componentes de la ruta del EGFR

Se evaluaron biopsias apareadas de piel de referencia y en la semana 4 para analizar los cambios farmacodinámicos de los marcadores en hasta 35 pacientes. Se observó una regulación negativa sustancial de p-EGFR, p-MAPK y la proliferación (mediante una coloración para Ki67) después de 4 semanas, en comparación con las muestras de referencia. En paralelo, se observó una regulación positiva sustancial de p27<sup>Kip1</sup> y p-STAT3. Cuando se evaluaron diversos cronogramas de administración y dosis, no se observaron diferencias relevantes en los

55

cambios en el nivel de estos marcadores en el inicio ni los puntos de tiempo ulteriores durante el tratamiento (figura 21A).

- 5 Pudieron evaluarse biopsias apareadas de tumores de referencia y en la semana 4 de hasta 17 pacientes. Se observó una disminución en la proliferación y una regulación negativa profunda de p-EGFR y p-MAPK en las células tumorales después de la terapia (figura 21B). Sin embargo, el nivel de p27<sup>Kip1</sup>, p-STAT3 y p-AKT no se alteró notablemente con el tratamiento con cetuximab (no se detallan los resultados). Debido a la cantidad pequeña de biopsias apareadas de tumores que se evaluaron, no pudieron compararse los cambios en el nivel de los biomarcadores entre las diversas dosis y las variables relacionadas con la respuesta.

#### Análisis de la mutación en KRAS

- 10 Se detectaron mutaciones en el codón 12 ó 13 de KRAS en 19/48 (40%) muestras de pacientes (G12V, 9 pacientes; G13D, 5 pacientes; G12D, 4 pacientes; G12A, 1 paciente). Para la monoterapia con cetuximab, se observaron ocho respuestas parciales (RP) en 48 pacientes. Todas se dieron en pacientes con tumores KRAS salvajes (8/29, 28%). No se observaron respuestas en los 19 pacientes con tumores KRAS mutados ( $p=0,015$ ) (tabla 1). En un estudio general (con una monoterapia y una terapia combinada), se observaron respuestas en 16/29 (55%) de los pacientes con KRAS salvaje y 6/19 (32%) con tumores KRAS mutados ( $P=0,144$ ). La PFS fue significativamente mayor en los pacientes con tumores KRAS salvajes que en los pacientes con tumores KRAS mutados (figura 22, mediana: 9,4 versus 5,6 meses, proporción de riesgo: 0,47, rango logarítmico  $p=0,048$ ).
- 15

#### Análisis con microseries de la expresión génica

- 20 Se formaron híbridos con un total de 106 muestras derivadas de tumores en el punto de partida y después de 4 semanas con series Affymetrix GeneChip HG-U133 Plus 2.0. Se excluyeron cuatro matrices del análisis posterior debido a irregularidades en parámetros relacionados con la calidad general, y se excluyeron otras 24 muestras debido a la contaminación de los tejidos del hígado normal (figura 16, material suplementario). Después de la exclusión de los duplicados, hubo 62 conjuntos de matrices de resultados de 42 pacientes de la ITT disponibles para el análisis (36 en el punto de partida, 26 en la semana 4: 20 pares).
- 25 Se filtraron los resultados de 54675 conjuntos de sondas de las muestras de tumores evaluadas en función de la varianza, la intensidad de la señal y la identificación de la sonda (véanse los métodos complementarios). Así, se limitó el análisis de la expresión en los tumores a 15230 conjuntos de sondas representativas de 10538 genes. En las comparaciones generales de los resultados filtrados de la respuesta inicial, se comparó la enfermedad progresiva (PD,  $n=12$ ) con el control de la enfermedad después de 6 semanas ( $n=23$ , 1 paciente no evaluado) y una respuesta global superior, PD, con la enfermedad estable (SD) ( $n=19$ ) y una PR ( $n=14$ , 3 pacientes no evaluados), donde la distribución de los valores de  $p$  (no se detallan los resultados) fue esencialmente la esperada por azar, una indicación de un perfil de la expresión génica predictivo de la respuesta ausente en la población general. Sin embargo, al restringir el análisis a los tumores KRAS salvajes (8 pacientes con una PD versus 11 pacientes con una enfermedad controlada), se hallaron 57 conjuntos de sondas con patrones de expresión potencialmente asociados a control de la enfermedad en la semana 6 ( $<0,002$ , figura 23). Al establecerse un umbral para la tasa de descubrimientos falsos (FDR) de 0,1 (la definición de la FDR se detalla en la sección de métodos complementarios), se hallaron seis genes asociados significativamente al control de la enfermedad (TNFRSF1B,  $p=6,90E-07$ ; DNAJC8,  $p=1,60E-06$ ; ECSIT,  $p=6,80E-06$ ; GOSR2,  $p=3,90E-05$ , con una expresión más alta en los pacientes con una enfermedad controlada; y PPP1R9A,  $p=8,90E-07$ ; KLK6,  $p=3,00E-05$ , con una expresión más alta en los pacientes con una PD).
- 30 Se evaluaron los cambios en la respuesta asociados al tratamiento en función de los resultados en los pacientes con muestras disponibles desde el inicio hasta la semana 4. No se observaron cambios en la expresión asociados estrechamente al control de la enfermedad en la semana 6 ( $n=12$ ), en comparación con la PD ( $n=8$ ). Al tener en cuenta la combinación con una quimioterapia y comparase los perfiles para la PR ( $n=7$ ) y la SD/PD ( $n=13$ ), se descubrieron 47 conjuntos de sondas con cambios durante el tratamiento ( $p<0,002$ , prueba  $t$  moderada, figura 17).
- 35
- 40 En los pacientes con tumores KRAS salvajes y en todos los pacientes analizados, el nivel de expresión inicial de EREG (epirregulina) y AREG (anfirregulina) fue mayor en los tumores que respondieron al cetuximab (figuras 24 y 18). Estos resultados coinciden con los informados por Khambata-Ford et al<sup>10</sup>. Vale destacar que el TGFA (TGF- $\beta$ ) tuvo un patrón de expresión recíproca (figuras 24 y 18). Entre otros genes conocidos por participar directa o indirectamente en señalización del EGFR, los de los receptores ERBB y los ligandos ERBB3 (HER3) y ERBB2 (HER2) presentaron una tendencia a la regulación negativa más fuerte en los tumores con una PR como la mejor respuesta global (figura 19).
- 45
- 50

#### Análisis proteómico en el plasma

Se analizó la concentración de 97 proteínas en muestras de plasma con tecnología Luminex. El panel de proteínas abarcó ligandos del EGFR, otros factores de crecimiento, interleuquinas y otras proteínas candidatas. Durante la

monoterapia con cetuximab, la disminución en el nivel en el plasma de la interleuquina (IL)-8, la proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  y otros marcadores tumorales, tales como el antígeno carcinoembrionario o los antígenos del cáncer 125 y 19-9, entre el inicio y la semana 4, estuvo asociada significativamente ( $p < 0,01$ ) a la respuesta en la semana 6 (figura 25A). El incremento general importante en la concentración de la anfirregulina en el plasma fue significativamente ( $p < 0,01$ ) menor en los pacientes con una respuesta parcial a la monoterapia con cetuximab (figura 25). También se determinó una asociación a la respuesta en la semana 6 para el antígeno carcinoembrionario, el antígeno del cáncer 19-9, la IL-8 y la anfirregulina en el análisis restringido a los pacientes con tumores KRAS salvajes (resultados de 24 pacientes, figura 25B). Además, se observó un incremento general (independiente de la respuesta) en el nivel del TGF- $\alpha$  y el EGF y una disminución en el nivel del EGFR soluble en el plasma durante las primeras 4 semanas de la monoterapia con cetuximab.

Para los genes candidatos evaluados, se observó una asociación entre el nivel de expresión y el éxito de la terapia en los pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCRC) tratados con cetuximab, donde VAV3 fue de particular interés. En el estudio EMR 62202-502, un nivel de expresión elevado del ARNm de VAV3 en los tumores no solamente estuvo asociado significativamente a una respuesta mejor ante el cetuximab en combinación con irinotecán (figura 26), sino que también estuvo asociado a la supervivencia libre de progreso (PFS) (figura 27) y la supervivencia global (OS) (figura 28). Además, el nivel de expresión alto de VAV3 en los tumores estuvo asociado a la respuesta y una PFS prolongada en los pacientes con tumores KRAS salvajes (figuras 1 y 29). Por lo tanto, la expresión de VAV3 podría ser un biomarcador útil para predecir el resultado clínico de un tratamiento con cetuximab en pacientes con CRC con tumores KRAS nativos, con el cual podría optimizarse la selección de los pacientes que pudieran beneficiarse en mayor medida con una terapia con cetuximab.

Vale destacar que se pudo detectar una interacción directa entre el EGFR y VAV3 cuando ambos EGFR y VAV3 se expresaron en células HEK 293 (figura 30). Esto sugiere una participación directa de VAV3 en la señalización del EGFR y una relación directa entre los niveles de expresión de VAV3 y la modulación de la actividad de la terapia anti-EGFR.

## 25 EJEMPLOS

### Estudios clínicos

EMR 62202-502. En este estudio con una distribución aleatoria, se aplicó una dosis creciente de cetuximab en pacientes con mCRC donde se expresaba el EGFR que no habían podido ser tratados con irinotecán. Los pacientes se distribuyeron al azar 22 días después de iniciar la administración de cetuximab, con 400 mg/m<sup>2</sup> como dosis inicial, seguidos por 250 mg/m<sup>2</sup> por semana o 180 mg/m<sup>2</sup> cada dos semanas, de no observarse reacciones cutáneas con un grado  $>1$  ni reacciones con un grado  $>2$  indicativas de tolerancia. La distribución al azar se realizó entre una dosis convencional de cetuximab (brazo A, 250 mg/m<sup>2</sup> por semana) y una dosis creciente (brazo B, donde la dosis del cetuximab se incrementó en 50 mg/m<sup>2</sup> cada dos semanas, hasta observar una toxicidad con un grado  $>2$  o la ausencia de respuesta en los tumores, con una dosis total de 500 mg/m<sup>2</sup>). Los pacientes no distribuidos (brazo C) fueron tratados con una dosis convencional de cetuximab. El objetivo primario fue comparar en biopsias de piel y tumorales tomadas antes del tratamiento y en su transcurso el efecto de la dosis creciente sobre el EGFR y los marcadores de señalización ulteriores con los resultados obtenidos con el régimen convencional con cetuximab. Los objetivos secundarios abarcaron PK, eficacia, seguridad, tolerabilidad y análisis de biomarcadores en biopsias tumorales y muestras de plasma. El estado de la mutación en KRAS se analizó a partir de biopsias tumorales.

EMR 62202-045. En este estudio se examinó la seguridad y la farmacocinética de una administración cada dos semanas de cetuximab en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Los objetivos secundarios abarcaron un análisis de biomarcadores farmacodinámicos. Los pacientes recibieron una monoterapia con cetuximab durante 6 semanas, seguida por cetuximab más FOLFIRI hasta observar el progreso de la enfermedad. Los pacientes en el brazo control recibieron 400 mg/m<sup>2</sup> de cetuximab como dosis inicial, seguidos por 250 mg/m<sup>2</sup> por semana, y los pacientes en el brazo tratado con dosis crecientes recibieron 400-700 mg/m<sup>2</sup> cada dos semanas. El estado de la mutación en KRAS se analizó a partir de biopsias tumorales.

### Material tumoral para analizar la expresión génica (microseries)

EMR 62202-502. El material tumoral fue obtenido mediante una cirugía abierta, una endoscopia o una biopsia con una aguja fina en el punto de partida (antes del tratamiento), el día 22, y de ser posible, al observarse el progreso de la enfermedad en los pacientes del grupo tratado con dosis crecientes (brazo B). Las muestras se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido.

EMR 62202-045. El material tumoral fue obtenido mediante una cirugía abierta, una endoscopia o una biopsia con una aguja fina al inicio del estudio, en la semana 4, y de ser posible, al observarse el progreso de la enfermedad. Las muestras se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido.

## Perfil de expresión del ARN

Los procedimientos experimentales relacionados con el análisis con microseries se detallan en la sección de métodos complementarios. Brevemente, se homogenizaron biopsias de tumores congelados instantáneamente y se extrajo el ARN total con RNeasy Micro Kit® (Qiagen, Hilden). Se preparó el ARNc blanco biotinilado para los experimentos de hibridación en matrices a partir de todas las muestras según el protocolo de Affymetrix Two-Cycle Eukaryotic Target. Para cada tumor analizado, se usaron 50 ng de ARN total inicial en una primera reacción de síntesis, amplificación y marcado de ADNc. El ADNc posteriormente se hizo hibridar con series de expresión Affymetrix GeneChip HG-U133 2.0 durante 16 horas a 45°C, con agitación a 60 rpm. Después de la hibridación, se colorearon las series en una estación Affymetrix Fluidics 450 y se cuantificó la señal con un dispositivo GeneChip. El control de la calidad y el procesamiento previo de los resultados de la expresión se realizaron con el programa Affymetrix SMOG y el paquete Bioconductor affyPLM.

EMR 62202-502. Después de verificar la calidad y realizar el procesamiento preliminar, se seleccionaron 68 conjuntos de resultados de matrices de 47 sujetos de la población con intención de tratar (ITT) para realizar análisis adicionales. Se tomaron muestras de referencia de 35 sujetos.

EMR 62202-045. Después de verificar la calidad y realizar el procesamiento preliminar, se seleccionaron 62 conjuntos de resultados de matrices de 42 sujetos de la población con intención de tratar (ITT) para realizar análisis adicionales. Se tomaron muestras de referencia de 36 sujetos.

Se realizaron análisis estadísticos con todos los conjuntos de sondas de Affymetrix donde se registraron los genes confiables que superaron los filtros iniciales en función de la variabilidad y la intensidad de la señal en al menos un estudio (16414 sondas fijas Affymetrix representativas de 10785 genes).

Los genes cuya expresión estuvo asociada a una respuesta clínica fueron identificados con comparaciones mediante pruebas t de Welch entre los individuos que respondieron y los que no lo hicieron (EMR 62202-502) o entre los pacientes con una enfermedad controlada después de seis semanas de monoterapia con cetuximab y aquellos con una enfermedad progresiva (EMR 62202-045). Los genes cuya expresión estuvo asociada a la supervivencia libre de progreso o la supervivencia global se identificaron con una regresión de riesgos proporcionales de Cox (EMR 62202-502). Estos análisis se realizaron para conjuntos completos de pacientes y para los pacientes con tumores KRAS salvajes.

Se realizó un meta-análisis para identificar los genes asociados a la respuesta en los dos estudios, usando los productos de los valores de p de un solo lado de un estudio como parámetros de referencia y calculando los valores de p para obtener una distribución nula.

Los valores de p inferiores a 0,01 ó 0,0001, específicamente los inferiores a 0,01, preferiblemente 0,005, más preferiblemente 0,002, aun más preferiblemente 0,0005 ó 0,0001 (en el metaanálisis para la asociación a la respuesta clínica, y a partir del análisis de EMR 62202-502, para la asociación a la supervivencia libre de progreso o global), se consideraron estadísticamente significativos. Este criterio se cumplió en 200 conjuntos de sondas Affymetrix representativas de 179 genes conocidos en al menos una de las comparaciones.

## Criterios para seleccionar los pacientes y diseño del estudio

Los criterios de selección y el diseño del estudio han sido provistos en un manuscrito separado. Brevemente, el estudio se dividió en dos partes: una monoterapia con cetuximab durante 6 semanas y una terapia combinada durante la cual los pacientes recibieron cetuximab en la misma dosis/cronograma que durante la monoterapia, más irinotecán FOLFIRI. Los pacientes fueron distribuidos consecutivamente entre el tratamiento convencional con cetuximab semanal (400 mg/m<sup>2</sup> seguidos por dosis semanales de 250 mg/m<sup>2</sup>) o un tratamiento cada dos semanas con una dosis creciente de cetuximab en diversas cohortes, hasta 400-700 mg/m<sup>2</sup>. La respuesta clínica se determinó después de 6 semanas de monoterapia con cetuximab y se expresó como la mejor respuesta global (en la monoterapia y la terapia combinada).

Recolección y almacenamiento del material de los pacientes

Se tomaron biopsias de piel al inicio del estudio y el día 26-28 (semana 4). De haber erupciones cutáneas, se tomaron muestras de las áreas libres de erupciones. Las biopsias se sumergieron inmediatamente en  $\geq 20$  veces su volumen de una solución de formaldehído neutro amortiguado a 4°C y se mantuvieron durante 8-16 horas a temperatura ambiente. Las muestras fijas se deshidrataron en xileno, con una serie graduada de etanol, y se embebieron longitudinalmente en cera de parafina a 60°C al vacío. Se extrajo material tumoral mediante una cirugía abierta, una endoscopia o una biopsia con una aguja nuclear/fina al inicio del estudio, en la semana 4, y de ser posible, al observarse el progreso de la enfermedad. Se fijó una muestra por punto de tiempo con formalina, se la embebió en parafina, según se ha descrito<sup>13</sup>, y se congelaron instantáneamente tres muestras en nitrógeno líquido.

Para obtener ADN normal, se obtuvieron 10 ml de sangre completa de cada paciente al inicio del estudio y se la almacenó a una temperatura de -20°C o menos hasta usarla. Se recolectó plasma (2,5 ml) para someterlo a un análisis Luminex en el inicio y la semana 4, y se lo almacenó a -80°C.

#### Análisis inmunohistoquímico

5 Se sometieron muestras de tejido fijadas en parafina e incorporadas en formalina (FFPE) a un análisis inmunohistoquímico (IHC) para investigar la expresión de las siguientes proteínas: EGFR, fosfo(p)-EGFR, p-MAPK, Ki67 (MIB1), p27<sup>Kip1</sup> (CDKN1B) y p-STAT3 (biopsias de piel y tumorales); así como HER2, p-HER2 y p-AKT (biopsias tumorales). El análisis inmunohistoquímico se realizó como se ha descrito<sup>13a</sup>. Pueden hallarse detalles sobre los anticuerpos y los métodos usados en la sección de métodos complementarios.

#### 10 Análisis de la mutación en KRAS

Se obtuvo tejido tumoral de archivo derivado de muestras FFPE de 48 pacientes de la población con intención de tratar (ITT). Se extrajo el ADN y se evaluó la presencia de mutaciones en los codones 12 y 13 de KRAS mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con fijación y un abordaje basado en una curva de fusión adaptado a partir de Chen et al., 2004<sup>14</sup> (LightMix, k-ras Gly12, TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania), según se ha descrito<sup>12</sup>.

#### 15 Perfiles de expresión del ARN

Los procedimientos experimentales relacionados con el análisis con microseries se detallan en la sección de métodos complementarios. Brevemente, se homogenizaron biopsias de tumores congelados instantáneamente y se extrajo el ARN total con RNeasy Micro Kit® (Qiagen, Hilden). Se prepararon los ARNc blanco biotinilados para los experimentos de hibridación en series a partir de todas las muestras según el protocolo de marcado Affymetrix Two-CycleEukaryotic Target. Para cada tumor analizado, se incluyeron inicialmente 50 ng de ARN total en una primera reacción de síntesis del ADNc de este proceso de amplificación y marcado de ARNc. El ARNc marcado se hibridizó posteriormente con las series de expresión de genes Affymetrix GeneChip HG-U133 2.0 durante 16 horas a 45°C, con agitación a 60 rpm. Después de la hibridación, se tiñeron las series en una estación Affymetrix Fluidics 450 y se cuantificó la señal con un dispositivo GeneChip Scanner. El control de la calidad de los datos de expresión sin procesar se realizó con el programa Affymetrix GCOS y el paquete Bioconductor affyPLM<sup>15</sup>. Si se disponía de réplicas de series a partir de muestras individuales, se seleccionó el conjunto de resultados con la mejor evaluación del control de calidad para el análisis. El procesamiento previo de los datos de intensidad en bruto para las sondas se realizó con el algoritmo GCRMA<sup>16</sup>.

#### Análisis proteómico.

30 Se realizó un análisis múltiple de 97 proteínas (HumanMAP versión 1.6 más anfirregulina, betacelulina, EGFR, (HB)-EGF de unión a heparina, epirregulina, interleuquina-18, factor de crecimiento transformante (TGF)-a y trombospondina-1) en el plasma usando la tecnología Luminex xMAP® (según se describe en la sección de métodos complementarios) en Rules-Based Medicine (Austin, Texas, EEUU). La betacelulina, el EGFR y el HB-EGF solamente se evaluaron en 23 muestras de pacientes que fueron incluidos posteriormente en el estudio.

#### 35 Análisis estadístico

Usando una prueba exacta de Fisher y un rango logarítmico, se comparó la tasa de respuesta y la supervivencia libre de progreso (PFS), respectivamente, definida como el período de tiempo transcurrido entre la primera infusión de cetuximab y la determinación del progreso de la enfermedad confirmado radiológicamente, entre los pacientes con tumores KRAS salvajes o mutados tratados con una combinación de cetuximab y FOLFIRI.

40 Todos los análisis estadísticos de los resultados de los análisis IHC, con microseries y proteómico (véanse los métodos complementarios) se realizaron con los programas Bioconductor<sup>15</sup> y SAS, versión 9.1. Estos análisis exploratorios fueron vistos como generadores de hipótesis.

#### Referencias (relevantes y/o citadas en la presente)

45 1. Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., et al., Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.*, 351:337-345, 2004.

2. Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Karapetis, C. S., et al., Cetuximab for the treatment of colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.*, 357:2040-2048, 2007.

3. Sobrero, A. F., Maurel, J., Fehrenbacher, L., et al., EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.*, 26:2311-2319, 2008.
- 5 4. Van Cutsem, E., Kohne, C. H., Hitre, E., et al., Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.*, 360:1408-1417, 2009.
5. Cappuzzo, F., Finocchiaro, G., Rossi, E., et al., EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients, *Ann. Oncol.*, 19:717-723, 2008.
- 10 6. Chung, K. Y., Shia, J., Kemeny, N. E., et al., Cetuximab Shows Activity in Colorectal Cancer Patients With Tumors That Do Not Express the Epidermal Growth Factor Receptor by Immunohistochemistry, *J. Clin. Oncol.*, 23:1803-1810, 2005;
7. De Roock, W., Piessevaux, H., De Schutter, J., et al., KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab, *Ann. Oncol.*, 19:508-515, 2008.
- 15 8. Di Fiore, F., Blanchard, F., Charbonnier, F., et al., Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy, *Br. J. Cancer*, 96:1166-1169, 2007.
9. Finocchiaro, G., Cappuzzo, F., Jänne, PA., et al., EGFR, HER2 and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.*, 25, 2007:(suppl; abstr 4021).
- 20 10. Khambata-Ford, S., Garrett, C. R., Meropol, N. J., et al., Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab, *J. Clin. Oncol.*, 25:3230-3237, 2007.
11. Lievre, A., Bachet, J. B., Boige, V., et al., KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab, *J. Clin. Oncol.*, 26:374-379, 2008.
- 25 12. Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Makhson, A., et al., Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.*, 27:663-671, 2009.
13. Karapetis, C. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J., et al., K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.*, 359:1757-1765, 2008.
14. Rojo, F., Tabernero, J., Albanell, J., et al., Pharmacodynamic studies of gefitinib in tumor biopsy specimens from patients with advanced gastric carcinoma, *J. Clin. Oncol.*, 24:4309-4316, 2006.
- 30 15. Chen, C. Y., Shiesh, S. C., Wu, S. J., Rapid detection of K-ras mutations in bile by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping and melting curve analysis: comparison with restriction fragment length polymorphism analysis, *Clin. Chem.*, 50:481-489, 2004.
16. Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., et al., Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics, *Genome Biol.*, 5:R80, 2004.
- 35 17. Wu, Z., Irizarry, R. A., Gentleman, R., et al., A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays, *JASA*, 99:909-917, 2004.
18. Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., et al., Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.*, 26:5705-5712, 2008;
19. Perrone, F., Lampis, A., Orsenigo, M., et al., PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients, *Ann. Oncol.*, 20:84-90, 2009.
- 40 20. Jhawer, M., Goel, S., Wilson, A. J., et al., PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab, *Cancer Res.*, 68:1953-1961, 2008.
21. Loupakis, F., Pollina, L., Stasi, I., et al., PTEN Expression and KRAS Mutations on Primary Tumors and Metastases in the Prediction of Benefit From Cetuximab Plus Irinotecan for Patients With Metastatic Colorectal Cancer, *J. Clin. Oncol.*, 27:2622-2629, 2009.

22. Vallbohmer, D., Zhang, W., Gordon, M., et al., Molecular determinants of cetuximab efficacy, *J. Clin. Oncol.*, 23:3536-3544, 2005.
23. Vincenzi, B., Santini, D., Russo, A., et al., Circulating VEGF reduction, response and outcome in advanced colorectal cancer patients treated with cetuximab plus irinotecan, *Pharmacogenomics*, 8:319-327, 2007.
- 5 24. Lurje, G., Nagashima, F., Zhang, W., et al., Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab, *Clin. Cancer Res.*, 14:7884-7895, 2008.
25. Oden-Gangloff, A., Di Fiore, F., Bibeau, F., et al., TP53 mutations predict disease control in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-based chemotherapy, *Br. J. Cancer*, 100:1330-1335, 2009.
- 10 26. Hsu, D. S., Balakumaran, B. S., Acharya, C. R., et al., Pharmacogenomic strategies provide a rational approach to the treatment of cisplatin-resistant patients with advanced cancer, *J. Clin. Oncol.*, 25:4350-4357, 2007.
27. Bonnefoi, H., Potti, A., Delorenzi, M., et al., Validation of gene signatures that predict the response of breast cancer to neoadjuvant chemotherapy: a substudy of the EORTC 10994/BIG 00-01 clinical trial, *Lancet Oncol.*, 8:1071-1078, 2007.
- 15 28. Burington, B., Barlogie, B., Zhan, F., et al., Tumor cell gene expression changes following short-term in vivo exposure to single agent chemotherapeutics are related to survival in multiple myeloma, *Clin. Cancer Res.*, 14:4821-4829, 2008.
29. Kunz, M., Genomic signatures for individualized treatment of malignant tumors, *Curr. Drug Discov. Technol.*, 5:9-14, 2008;
- 20 30. de Reynies, A., Boige, V., Milano, G., et al., KRAS mutation signature in colorectal tumors significantly overlaps with the cetuximab response signature, *J. Clin. Oncol.*, 26:2228-2230, respuesta del autor 2230-2221, 2008.
31. Tejpar, S., De Roock, W., Biesmans, B., et al., High amphiregulin and epiregulin expression in KRAS wild type colorectal primaries predicts response and survival benefit after treatment with cetuximab and irinotecan for metastatic disease. ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium, Enero 25-27 de 2008, Orlando, FL (resumen 411).
- 25 32. Waugh, D. J., Wilson, C., The interleukin-8 pathway in cancer, *Clin. Cancer Res.*, 14:6735-6741, 2008;

## REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para predecir la probabilidad de que un paciente que padece un cáncer colorrectal (CRC) KRAS salvaje donde se expresa el EGFR, un cáncer colorrectal metastásico (mCRC), que es un candidato para un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR, responda al tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR, que comprende determinar el nivel de genes o productos génicos de pronóstico en una muestra de tejido obtenida del paciente sometiéndolo a una muestra de ácidos nucleicos del tumor del paciente a una PCR, un análisis con series de ARN o ADN o una herramienta o un aparato de diagnóstico comparable, donde
- 5
- (i) una expresión alta en comparación con un valor de referencia de un gen seleccionado entre ADAMDEC1, BSDC1, C1orf144, CAPZB, CDC42, DHCR7, DNAJC8, ECSIT, EXOSC10, FADS1, GBA, GLT25D1, GOSR2, IMPDH1, KLHL21, KPNA6, KPNB1, LSM12, MAN1B1, MIDN, PPNAN, SH3BP2, SQLE, SSH3, TNFRSF1B, URM1, ZFYVE26, RGMB, SPIRE2, ABCC5, ACSL5, AOA, AXIN2, CD24, CEACAM5, CEACAM6, ETS2, FMNL2, GSPM2, HDAC2, JUN, ME3, MED17, MYB, MYC, NEBL, NOSIP, PITX2, POF1B, PPARG, PPP1R14C, PRR15, PSMG1, RAB15, RAB40B, RNF43, RPS23, SLC44A3, SOX4, THEM2, VAV3, ZNF337, EPDR1, KCNK5, KHDRBS3, PGM2L1, STK38 o SHROOM2 o un producto de éste es una indicación de que es probable que el paciente responda al tratamiento, y
- 10
- (ii) una expresión alta en comparación con un valor de referencia de un gen seleccionado entre C7orf46, CAST, DCP2, DIP2B, ERAP1, INSIG2, KIF21A, KLK6, NGRN, NRIP1, PHGDH, PPP1R9A, QPCT, RABEP1, RPA1, RPL22L1, SKP1, SLC25A27, SLC25A46, SOCS6, TPD52, ZDHHC2, ZNF654, ASB6, ATM, BMI1, CDC42EP2, EDEM3, PLLP, RALBP1, SLC4A11, TNFSF15, TPK1, C11orf9, C1QC, CABLES1, CDK6, EHBP1, EXOC6, EXT1, FLRT3, GCNT2, MTHFS, PIK3AP1, ST3GAL1, TK2, ZDHHC14, ARFGAP3, AXUD1, CAPZB, CHSY1, DNAJB9, GOLT1B, HSPA5, LEPROTL1, LIMS1, MAPK6, MYO6, PROSC, RAB8B, RAP2B, RWDD2B, SERTAD2, SOCS5, TERF2IP, TIAL1, TIPARP, TRIM8, TSC22D2, TGFA, VAPA o UBE2K o un producto de éste es una indicación de que es probable que el paciente no responda al tratamiento, donde el valor de referencia se define a partir de una o más funciones o propiedades clínicas específicas y/o un perfil de expresión específico y se obtiene de un paciente o un grupo de pacientes de referencia donde se expresa una cantidad escasa o nula del gen o el producto génico, donde los genes o los productos génicos de pronóstico abarcan al menos VAV3 y TGFA.
- 20
2. El método de la reivindicación 1, donde el tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR es una terapia de primera línea y los genes o los productos génicos del grupo (i) abarcan uno o más de los siguientes: ADAMDEC1, BSDC1, C1orf144, CAPZB, CDC42, DHCR7, DNAJC8, ECSIT, EXOSC10, FADS1, GBA, GLT25D1, GOSR2, IMPDH1, KLHL21, KPNA6, KPNB1, LSM12, MAN1B1, MIDN, PPNAN, SH3BP2, SQLE, SSH3, TNFRSF1B, URM1, VAV3 o ZFYVE26, y los del grupo (ii) abarcan uno o más de los siguientes: C7orf46, CAST, DCP2, DIP2B, ERAP1, INSIG2, KIF21A, KLK6, NGRN, NRIP1, PHGDH, PPP1R9A, QPCT, RABEP1, RPA1, RPL22L1, SKP1, SLC25A27, SLC25A46, SOCS6, TPD52, TGFA, ZDHHC2 o ZNF654.
- 25
3. El método de la reivindicación 1, donde el tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR es una terapia combinada con un agente quimioterapéutico que se administra una vez que en el paciente se ha desarrollado un tumor quimiorrefractario, los genes o los productos génicos del grupo (i) abarcan uno o más de los siguientes: RGMB, SPIRE2, ABCC5, ACSL5, AOA, AXIN2, CD24, CEACAM5, CEACAM6, ETS2, FMNL2, GSPM2, HDAC2, JUN, ME3, MED17, MYB, MYC, NEBL, NOSIP, PITX2, POF1B, PPARG, PPP1R14C, PRR15, PSMG1, RAB15, RAB40B, RNF43, RPS23, SLC44A3, SOX4, THEM2, VAV3, ZNF337, EPDR1, KCNK5, KHDRBS3, PGM2L1, STK38 o SHROOM2, y los del grupo (ii) abarcan uno o más de los siguientes: ASB6, ATM, BMI1, CDC42EP2, EDEM3, PLLP, RALBP1, SLC4A11, TNFSF15, TPK1, C11orf9, C1QC, CABLES1, CDK6, EHBP1, EXOC6, EXT1, FLRT3, GCNT2, MTHFS, PIK3AP1, ST3GAL1, TK2, ZDHHC14, ARFGAP3, AXUD1, CAPZB, CHSY1, DNAJB9, GOLT1B, HSPA5, LEPROTL1, LIMS1, MAPK6, MYO6, PROSC, RAB8B, RAP2B, RWDD2B, SERTAD2, SOCS5, TERF2IP, TIAL1, TIPARP, TRIM8, TSC22D2, TGFA, VAPA y UBE2K.
- 30
4. El método de la reivindicación 3, donde la respuesta clínica global (OR) se determina como una respuesta parcial versus una enfermedad estable o progresiva, los genes del grupo (i) abarcan uno o más de los siguientes: VAV3, RGMB o SPIRE2, y los del grupo (ii) abarcan uno o más de los siguientes: ARFGAP3, AXUD1, CAPZB, CHSY1, DNAJB9, GOLT1B, HSPA5, LEPROTL1, LIMS1, MAPK6, MYO6, PROSC, RAB8B, RAP2B, RWDD2B, SERTAD2, SOCS5, TERF2IP, TIAL1, TIPARP, TRIM8, TSC22D2, TGFA, VAPA o UBE2K, o los productos de la expresión de cualquiera de ellos.
- 35
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el valor de referencia es un valor umbral para la expresión de un gen control o la relación entre la expresión de los genes del grupo (i) y la expresión de los genes del grupo (ii), o bien es un valor umbral para la expresión definido por parámetros específicos de la respuesta clínica o las condiciones específicas del tratamiento preliminar o actual, donde el parámetro de la respuesta clínica puede ser
- 40
- 45
- 50
- 55

la duración de la supervivencia libre de progreso (PFS), la duración de la supervivencia global (OS), una respuesta parcial (PR), una enfermedad estable (SD), una enfermedad progresiva (PD) o una combinación de éstas.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde se usan muestras de tejido tomadas del paciente antes del tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR o en su transcurso.
- 5 7. El método de la reivindicación 6, donde el nivel de expresión de los genes o los productos génicos se compara con un valor obtenido antes del inicio del tratamiento.
8. Un método in vitro para predecir la probabilidad de que un paciente que padece un cáncer colorrectal (CRC) KRAS salvaje donde se expresa el EGFR, un cáncer colorrectal metastásico (mCRC), responda terapéuticamente ante un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR, que comprende
- 10 (a) determinar mediante abordajes y/o aparatos de diagnóstico en una muestra de biopsia de tejido tumoral o plasma del paciente el nivel de expresión de biomarcadores seleccionados del grupo (i), que consiste en ADAMDEC1, BSDC1, C1orf144, CAPZB, CDC42, DHCR7, DNAJC8, ECSIT, EXOSC10, FADS1, GBA, GLT25D1, GOSR2, IMPDH1, KLHL21, KPNA6, KPNB1, LSM12, MAN1B1, MIDN, PPAN, SH3BP2, SQLE, SSH3, TNFRSF1B, URM1, ZFYVE26, RGMB, SPIRE2, ABCC5, ACSL5, AOA, AXIN2, CD24, CEACAM5, CEACAM6, ETS2, FMNL2, 15 GPM2, HDAC2, JUN, ME3, MED17, MYB, MYC, NEBL, NOSIP, PITX2, POF1B, PPARG, PPP1R14C, PRR15, PSMG1, RAB15, RAB40B, RNF43, RPS23, SLC44A3, SOX4, THEM2, VAV3, ZNF337, EPDR1, KCNK5, KHDRBS3, PGM2L1, STK38, SHROOM2, y/o el grupo (ii), que consiste en C7orf46, CAST, DCP2, DIP2B, ERAP1, INSIG2, KIF21A, KLK6, NGRN, NRIP1, PHGDH, PPP1R9A, QPCT, RABEP1, RPA1, RPL22L1, SKP1, SLC25A27, SLC25A46, SOCS6, TPD52, ZDHHC2, ZNF654, ASB6, ATM, BMI1, CDC42EP2, EDEM3, PLLP, RALBP1, 20 SLC4A11, TNFSF15, TPK1, C11orf9, C1QC, CABLES1, CDK6, EHBP1, EXOC6, EXT1, FLRT3, GCNT2, MTHFS, PIK3AP1, ST3GAL1, TK2, ZDHHC14, ARFGAP3, AXUD1, CAPZB, CHSY1, DNAJB9, GOLT1B, HSPA5, LEPROTL1, LIMS1, MAPK6, MYO6, PROSC, RAB8B, RAP2B, RWDD2B, SERTAD2, SOCS5, TERF2IP, TIAL1, TIPARP, TRIM8, TSC22D2, TGFA, VAPA y UBE2K;
- (b) exponer ex vivo una muestra de tejido tumoral o plasma del paciente al anticuerpo anti-EGFR;
- 25 (c) determinar nuevamente en la muestra de tejido del paso (b) el nivel de expresión de los uno o más biomarcadores mencionados en el paso (a); y
- (d) calcular la diferencia entre los niveles de expresión determinados en los pasos (b) y (c);
- 30 donde un incremento en el nivel de expresión de los biomarcadores del grupo (i) obtenido en el paso (c), en comparación con el paso (a), está asociado a una mayor probabilidad de que el paciente responda terapéuticamente ante el tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR, donde un incremento en el nivel de expresión de los biomarcadores del grupo (ii) obtenido en el paso (c), en comparación con el paso (a), está asociado a una menor probabilidad de que el paciente responda terapéuticamente ante el tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR, y donde los biomarcadores abarcan al menos VAV3 y TGFA.
- 35 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde también se determina el nivel de expresión de los biomarcadores AREG o EREG.
10. El método de la reivindicación 9, donde se determina el nivel de expresión de los siguientes biomarcadores:
- (i) VAV3, TGFA, AREG y opcionalmente EGF; o
- (ii) VAV3, TGFA, EREG y opcionalmente EGF.
- 40 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el paciente padece un tumor KRAS salvaje donde se expresa el EGFR y además presenta una mutación en el EGFR en el tejido tumoral.
12. El método de la reivindicación 11, donde la mutación en el EGFR es un polimorfismo R521K
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el anticuerpo anti-EGFR es C225 (cetuximab).
- 45 14. El uso de biomarcadores genéticos seleccionados entre ADAMDEC1, BSDC1, C1orf144, CAPZB, CDC42, DHCR7, DNAJC8, ECSIT, EXOSC10, FADS1, GBA, GLT25D1, GOSR2, IMPDH1, KLHL21, KPNA6, KPNB1, LSM12, MAN1B1, MIDN, PPAN, SH3BP2, SQLE, SSH3, TNFRSF1B, URM1, ZFYVE26, RGMB, SPIRE2, ABCC5, ACSL5, AOA, AXIN2, CD24, CEACAM5, CEACAM6, ETS2, FMNL2, GPM2, HDAC2, JUN, ME3, MED17, MYB, MYC, NEBL, NOSIP, PITX2, POF1B, PPARG, PPP1R14C, PRR15, PSMG1, RAB15, RAB40B, RNF43, RPS23,

- SLC44A3, SOX4, THEM2, VAV3, ZNF337, EPDR1, KCNK5, KHDRBS3, PGM2L1, STK38, SHROOM2, C7orf46, CAST, DCP2, DIP2B, ERAP1, INSIG2, KIF21A, KLK6, NGRN, NRIP1, PHGDH, PPP1R9A, QPCT, RABEP1, RPA1, RPL22L1, SKP1, SLC25A27, SLC25A46, SOCS6, TPD52, ZDHHC2, ZNF654, ASB6, ATM, BMI1, CDC42EP2, EDEM3, PLLP, RALBP1, SLC4A11, TNFSF15, TPK1, C11orf9, C1QC, CABLES1, CDK6, EHBP1, EXOC6, EXT1, 5 FLRT3, GCNT2, MTHFS, PIK3AP1, ST3GAL1, TK2, ZDHHC14, ARFGAP3, AXUD1, CAPZB, CHSY1, DNAJB9, GOLT1B, HSPA5, LEPROTL1, LIMS1, MAPK6, MYO6, PROSC, RAB8B, RAP2B, RWDD2B, SERTAD2, SOCS5, TERF2IP, TIAL1, TIPARP, TRIM8, TSC22D2, TGFA, VAPA o UBE2K, opcionalmente en combinación con AREG y/o 10 EREG, para predecir la eficacia farmacéutica y/o la respuesta clínica en un paciente que padece un cáncer colorrectal (CRC) KRAS salvaje donde se expresa el EGFR, un cáncer colorrectal metastásico (mCRC), ante un tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR, donde la predicción es el resultado del cálculo de las diferencias entre el nivel de expresión y un valor umbral determinado a partir de parámetros clínicos subyacentes, y donde los biomarcadores genéticos abarcan al menos VAV3 y TGFA.
15. El uso de la reivindicación 14, donde la proteína que es el producto de la expresión se analiza en un fluido corporal del paciente, incluyendo el plasma.
- 15 16. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, donde el tratamiento evaluado es un tratamiento de primera línea.
17. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 14-16, donde el tratamiento evaluado es un tratamiento donde se combina un anticuerpo anti-EGFR con un agente quimioterapéutico y el paciente presenta un cáncer quimiorrefractario.
- 20 18. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, donde el anticuerpo anti-EGFR es c225 (cetuximab).

**Fig. 1:** Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente al control de la enfermedad después de seis semanas de monoterapia con cetuximab en pacientes con un gen KRAS salvaje. Basado en el estudio EMR 62202-045 (tratamiento de primera línea de CRC metastásico).

	Valor de p	Proporción log2	HUGO GeneSymbol	Designación del gen	Descripción
206134_at	0,00031	1,76	ADAMDECI	27299	ADAM, similar, decisina 1
216008_s_at	2,00E-04	0,57	ARIH2	10425	ariadne, homólogo 2 (Drosophila)
218004_at	0,00068	0,66	BSDC1	55108	BSD, dominio 1
222200_s_at	0,0017	0,65	BSDC1	55108	BSD, dominio 1
212002_at	0,00065	1,08	C1orf144	26099	cromosoma 1, marco abierto de lectura 144
228600_x_at	8,20E-05	-1,26	C7orf46	340277	cromosoma 7, marco abierto de lectura 46
37012_at	0,00075	0,82	CAPZB	832	recubrimiento, proteína (filamento de actina), músculo Z, beta
212586_at	0,00057	-1,08	CAST	831	calpastatina
208908_s_at	0,0016	-1,12	CAST	831	calpastatina
208728_s_at	0,0012	0,63	CDC42	998	ciclo de división celular 42 (GTP, proteína de unión, 25kDa)
204258_at	0,0019	-0,57	CHD1	1105	cromodominio helicasa, ADN, proteína de unión 1
235258_at	0,00097	-0,62	DCP2	167227	DCP2, recubrimiento, enzima, homólogo (S. cerevisiae)
201791_s_at	0,00094	1,19	DHCR7	1717	7-desidrocolesterol reductasa
224872_at	0,00035	-0,94	DIP2B	57609	DIP2 disco, proteína 2, homólogo B (Drosophila)
205545_x_at	1,60E-06	0,79	DNAJC8	22826	ADNJ (Hsp40), homólogo, subfamilia C, miembro 8
218225_at	6,80E-06	0,86	ECSIT	51295	ECSIT, homólogo (Drosophila)
209788_s_at	0,00045	-1,46	ERAP1	51752	retículo endoplasmático aminopeptidasa I
207541_s_at	0,0017	0,8	EXOSC10	5394	exosoma, componente 10
208963_x_at	0,0014	1,61	FADS1	3992	ácido graso desaturasa 1
210589_s_at	0,00098	0,96	GBA	2629	glucosidasa, beta, ácido (incluyendo glucosilceramidasa)
218473_s_at	0,0012	0,67	GLT25D1	79709	glucosiltransferasa 25, dominio 1
213144_at	3,90E-05	0,83	GOSR2	9570	golgi SNAP, complejo receptor, miembro 2
204169_at	7,00E-04	0,86	IMPDH1	3614	IMP (inosina monofosfato) deshidrogenasa 1
209566_at	0,00031	-1,11	INSIG2	51141	insulina, gen inducido 2
226003_at	0,0015	-0,9	KIF21A	55605	kinesina, miembro de la familia 21A
203068_at	0,0014	0,86	KLHL21	9903	kelch, similar, 21 (Drosophila)
204733_at	3,00E-05	-4,18	KLK6	5653	kallikreina, proteína relacionada, peptidasa 6
212101_at	9,00E-04	0,69	KPNA6	23633	karioferina alfa 6 (importina alfa 7)
208974_x_at	0,0013	0,69	KPNB1	3837	karioferina (importina) beta 1
212529_at	0,00035	0,82	LSM12	124801	LSM12, homólogo (S. cerevisiae)
218636_s_at	0,00084	0,78	MAN1B1	11253	mannosidasa, alfa, clase 1B, miembro 1
225954_s_at	0,0012	1,08	MIDN	90007	midnolina

**Fig 1** continuación

217722_s_at	0,00087	-0,66	NGRN	51335	neurina, asociada al crecimiento de las neuritas
202599_s_at	0,0019	-0,61	NRIP1	8204	receptor nuclear, proteína de interacción 1
201397_at	0,00077	-2,26	PHGDH	26227	fosfoglicerato deshidrogenasa
221649_s_at	0,0013	0,81	PPAN	56342	peter pan, homólogo (Drosophila)
228494_at	8,90E-07	-4,71	PPP1R9A	55607	proteína fosfatasa 1, regulador (inhibidor), subunidad 9A
221088_s_at	0,00038	-3,28	PPP1R9A	55607	proteína fosfatasa 1, regulador (inhibidor), subunidad 9A
205174_s_at	0,0018	-2,03	QPCT	25797	glutamyl-peptido ciclotransferasa (glutamyl ciclasa)
225092_at	0,0018	-1,05	RABEP1	9135	rabaptina, RAB GTPasa, proteína de unión efectora 1
201529_s_at	0,002	-0,74	RPA1	6117	replicación proteína A1 70kDa
225541_at	0,0018	-1,37	RPL22L1	200916	ribosomal proteína L22 similar 1
209370_s_at	0,00069	0,62	SH3BP2	6452	SH3-dominio, proteína de unión 2
200719_at	0,00017	-0,94	SKP1	6500	S-fasa quinasa, proteína asociada 1
230624_at	0,00049	-1,47	SLC25A27	9481	transportador de solutos, familia 25, miembro 27
212833_at	2,00E-04	-0,79	SLC25A46	91137	transportador de solutos, familia 25, miembro 46
227542_at	0,00042	-1,31	SOC56	9306	supresor, señalización de citoquinosa 6
213577_at	0,00039	1,8	SQLE	6713	escualeno epoxidasa
219919_s_at	6,00E-05	0,46	SSH3	54961	slingshot, homólogo 3 (Drosophila)
203508_at	6,90E-07	2,08	TNFRSF1B	7133	factor de necrosis tumoral, receptor, superfamilia, miembro 1B
201691_s_at	0,0019	-1,38	TPD52	7163	tumor, proteína D52
208101_s_at	3,00E-04	0,62	URM1	81605	ubiquitina, modificador relacionado 1, homólogo (S. cerevisiae)
202682_s_at	0,0016	0,47	USP4	7375	ubiquitina, peptidasa específica 4 (proto-oncogen)
222731_at	0,00046	-1,91	ZDHC2	51201	dedos de cinc, DHHC, tipo 2
37943_at	0,00084	0,59	ZFYVE26	23503	dedos de cinc, FYVE, dominio 26
241348_at	0,00099	-0,58	ZNF654	55279	dedos de cinc, proteína 654
224890_s_at	0,0013	0,63	NA	389541	similar a CG 14977-PA

**Fig. 2:**

Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente al control de la enfermedad después de seis semanas de monoterapia con cetuximab. Basado en el estudio EMR 62202-045 (tratamiento de primera línea de CRC metastásico)

	Valor de p	Proporción log2	HUGO:GeneSymbol	Designación del gen	Descripción
221815_at	0,0013	-0,73	ABHD2	11057	abhidrolasa, dominio 2
212738_at	0,00048	0,58	ARHGAP19	84986	Rho GTPasa, proteína activadora 19
227598_at	0,00047	-0,68	C7orf29	113763	cromosoma 7, marco abierto de lectura 29
228600_x_at	0,0014	-0,88	C7orf46	340277	cromosoma 7, marco abierto de lectura 46
226803_at	0,0011	-1,46	CHMP4C	92421	cromatina, proteína modificadora 4C
205545_x_at	1,90E-05	0,53	DNAJC8	22826	ADNJ (Hsp40), homólogo, subfamilia C, miembro 8
236073_at	0,00065	-0,69	EPHA10	284656	EPH, receptor A10
225023_at	0,0018	0,56	GOPC	57120	golgi PDZ y motivo espiral asociado
212439_at	0,00088	0,43	IHPK1	9807	inositol hexafosfato quinasa 1
209566_at	0,00047	-0,66	INSIG2	51141	insulina, gen inducido 2
205470_s_at	0,00024	-1,45	KLK11	11012	kalkreína, proteína relacionada, peptidasa 11
208974_x_at	0,00039	0,55	KPNB1	3837	karioferina (importina) beta 1
212473_s_at	0,0011	0,77	MICAL2	9645	microtubule, monoxigenasa asociada, calponina y LIM, dominio 2
225954_s_at	0,00025	0,71	MIDN	90007	midolnina
230518_at	0,0013	-0,76	MPZL2	10205	mielina, proteína cero, similar, 2
201710_at	0,002	1,01	MYBL2	4605	v-mib, mieloblastosis, oncogen viral, homólogo (aves), similar, 2
213328_at	0,0011	0,89	NEK1	4750	NIMA (neverina, gen de mitosis a), proteína relacionada, quinasa 1
201158_at	0,00011	0,58	NMT1	4836	N-niristoliltransferasa 1
225005_at	0,00017	0,42	PHF13	148479	PHD, dedos, proteína 13
201251_at	0,0013	-0,68	PKM2	5315	piruvato quinasa, músculo
228494_at	0,00036	-2,92	PPP1R9A	55607	proteína fosfatasa 1, regulador (inhibidor), subunidad 9A
235638_at	0,00024	-1,38	RASSF6	166824	Ras. asociación (RalGDS/AF-6), dominio, miembro de la familia 6
225541_at	0,00049	-0,95	RPL22L1	200916	Ribosoma, proteína L22, similar, 1
209257_s_at	0,0016	1,01	SMC3	9126	Mantenimiento estructural, cromosoma 3
227542_at	0,0011	-0,86	SOC36	9306	supresor, señalización de citoquinolina 6
213577_at	0,0017	1,02	SQLE	6713	escualeno epoxidasa
222634_s_at	0,00078	0,94	TBL1XR1	79718	transducina (beta), similar, 1 X, receptor asociado 1
227112_at	0,0016	-0,74	TMCC1	23023	dominio transmembrana y espiral, familia 1
203508_at	0,00012	1,37	TNFRSF1B	7133	factor de necrosis tumoral, receptor, superfamilia, miembro 1B
217975_at	0,0019	-0,93	WBP5	51186	WV, dominio, proteína de unión 5
226124_at	0,0016	0,62	ZFP90	146198	dedos de cinc, proteína 90, homólogo (ratón)
205182_s_at	0,0015	0,55	ZNF324	25799	dedos de cinc, proteína 324
227045_at	0,00022	0,87	ZNF614	80110	dedos de cinc, proteína 614

**Fig. 3:** Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán), análisis de pacientes con un gen KRAS salvaje. Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a una respuesta global superior.

	Valor de p	Proporción log2	HUGO.GeneSymbol	Designación del gen	Descripción
202211_at	0,00052	-0,76	ARFGAP3	26286	ADP, ribosilación, factor, GTPasa, proteína activadora 3
225557_at	0,00053	-0,74	AXUD1	64651	AXIN1, regulación positiva 1
201949_x_at	0,0018	-0,65	CAPZB	832	recubrimiento, proteína (filamento de actina), músculo Z, beta
203044_at	0,0019	-0,87	CHSY1	22856	condroitin sulfato sintetasa I
202842_s_at	0,0018	-1,1	DNAJB9	4189	ADNJ (Hsp40), homólogo, subfamilia B, miembro 9
218193_s_at	0,0011	-1,08	GOLT1B	51026	Golgi, transporte 1, homólogo B (S. cerevisiae)
230031_at	0,002	-1,02	HSPA5	3309	shock calorico proteína de 70kDa 5 (proteína regulada por glucosa, 78kDa)
202595_s_at	0,00071	-1,08	LEPROTL1	23484	receptor de leptina, transcripto superpuesto, similar, 1
207198_s_at	0,0017	-0,65	LIMS1	3987	LIM y senescencia, antígeno celular, similar, dominio I
207121_s_at	0,0013	-1,08	MAPK6	5597	proteína activada por mitógenos, quinasa 6
201152_s_at	0,00097	-0,58	MBNL1	4154	proteína muscular, similar, (Drosophila)
210480_s_at	0,0013	-0,92	MYO6	4646	miosina VI
202215_s_at	0,0011	-0,52	NFYC	4802	transcripción nuclear, factor Y, gamma
209384_at	0,00046	-1,12	PROSC	11212	prolinosina sintetasa, transcripción concurrente, homólogo (bacteria)
209385_s_at	0,0011	-1,06	PROSC	11212	prolinosina sintetasa, transcripción concurrente, homólogo (bacteria)
226633_at	0,0018	-0,94	RAB8B	51762	RAB8B, miembro, familia del oncogen RAS
202362_at	0,00051	-0,56	RAP1A	5906	RAP1A, miembro of, familia del oncogen RAS
213923_at	0,0017	-0,89	RAP2B	5912	RAP2B, miembro of, familia del oncogen RAS
227339_at	0,0015	2,35	RGMB	285704	RGM, dominio familia, miembro B
218377_s_at	0,0015	-1,4	RWDD2B	10069	RWD, dominio 2B
202656_s_at	0,00029	-1,16	SERTAD2	9792	SERTA, dominio 2
202657_s_at	8,00E-04	-0,98	SERTAD2	9792	SERTA, dominio 2
209648_x_at	0,00081	-0,73	SOCS5	9655	supresor, señalización de citoquinas 5
243594_x_at	0,00037	1,32	SPIRE2	84501	spire, homólogo 2 (Drosophila)
227706_at	0,00058	0,86	SPIRE2	84501	spire, homólogo 2 (Drosophila)
217790_s_at	0,0013	-0,56	SSR3	6747	secuencia señal de receptor, gamma (translocón, proteína asociada gamma)
201174_s_at	0,00063	-0,82	TERF2IP	54386	factor de repetición telomérica 2, proteína de interacción
202405_at	0,0012	-0,78	TIAL1	7073	TIA1 asociado al ARN de los gránulos citotóxicos, proteína de unión, similar, 1
212665_at	0,0019	-0,99	TIPARP	25976	TCDD, inducción, poli(ADP-ribosa) polimerasa
223132_s_at	0,0016	-0,62	TRIM8	81603	Motivo tripartito 8
204094_s_at	0,00041	-0,88	TSC22D2	9819	TSC22, dominio familia, miembro 2
202347_s_at	0,00059	-0,85	UBE2K	3093	Ubiquitina, conjugación, enzima E2K (UBC1, homólogo, levadura)
208780_x_at	0,0018	-1,02	VAPA	9218	VAMP (proteína asociada a vesículas en la membrana), proteína asociada A, 33kDa

**Fig. 4:** Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán). Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a una respuesta global superior.

Valor de p	Proporción log2	HUGO:GeneSymbol	Designación del gen	Descripción
203180_at	0,00065	-1,24 ALDH1A3	220	aldehído deshidrogenasa 1 familia, miembro A3
202211_at	0,0016	-0,73 ARFGAP3	26286	ADP, factor de ribosilación, GTPasa, proteína activadora 3
201658_at	0,00028	-0,66 ARL1	400	ADP, factor de ribosilación, similar, 1
225557_at	0,00065	-0,59 AXUD1	64651	AXIN1, regulación positiva 1
223916_s_at	0,0017	-0,72 BCOR	54880	BCL6 co-represor
211518_s_at	0,0016	-2,04 BMP4	652	proteína morfogenética osea 4
201848_s_at	0,0018	-1,13 BNIP3	664	BCL2/adenovirus E1B 19kDa, proteína de interacción 3
229399_at	0,00098	-1,1 C10orf118	55088	cromosoma 10, marco abierto de lectura 118
217893_s_at	0,0018	-0,76 C1orf108	79647	cromosoma 1, marco abierto de lectura 108
203024_s_at	0,002	-0,57 C5orf15	56951	cromosoma 5, marco abierto de lectura 15
223433_at	0,00053	0,94 C7orf36	57002	cromosoma 7, marco abierto de lectura 36
208022_s_at	0,0015	0,92 CDC14B	8555	CDC14, ciclo de división celular 14, homólogo B (S. cerevisiae)
202284_s_at	0,0015	-1,17 CDKN1A	1026	quinasa dependiente de ciclina, inhibidor IA (p21, Cip1),
213957_s_at	0,00089	-0,88 CEP350	9857	centrosoma, proteína, 350kDa
212653_s_at	0,00096	-0,66 EHP1	23301	EH, dominio, proteína de unión 1
201143_s_at	0,0011	-0,69 EIF2S1	1965	factor de traducción eucariota 2, subunidad 1 alfa, 35kDa
202815_s_at	0,00028	-0,65 HEXIM1	10614	hexametileno bis-acetamida, proteína inducible 1
218611_at	0,00044	-1,11 IER5	51278	respuesta inmediata 5
209912_s_at	0,00046	0,49 KIAA0415	9907	KIAA0415
202595_s_at	0,00065	-1,04 LEPROTL1	23484	receptor de leptina, transcripto superpuesto, similar, 1
207121_s_at	0,00067	-0,9 MAPK6	5597	proteína activada por mitógenos, quinasa 6
200797_s_at	0,0012	-0,62 MCL1	4170	leucemia mieloide, secuencia I (BCL2, similar)
213696_s_at	0,0017	-0,92 MED8	112950	complejo mediador, subunidad 8
208919_s_at	0,0015	-0,38 NADK	65220	NAD quinasa
203675_at	2,00E-04	-0,85 NUCB2	4925	nucleobindina 2
205552_s_at	0,0015	-1,37 OAS1	4938	2", 5"-oligoadenilato sintetasa I, 40/46kDa
224701_at	0,00064	-1,15 PARP14	54625	poli (ADP-ribosa) polimerasa familia, miembro 14
201939_at	0,0013	-1,33 PLK2	10769	polo, similar, quinasa 2 (Drosophila)
209384_at	0,0015	-0,9 PROSC	11212	prolinosina sintetasa, transcripción concurrente, homólogo (bacteria)
225074_at	0,00029	-0,79 RAB2B	84932	RAB2B, miembro, familia del oncogen RAS
226633_at	0,0014	-0,8 RAB8B	51762	RAB8B, miembro, familia del oncogen RAS
227339_at	0,0013	2,31 RGM B	285704	RGM, dominio familia, miembro B
202129_s_at	0,0014	-0,92 RIOK3	8780	RIO quinasa 3 (levadura)

**Fig. 4** continuación

219684_at	0,0011	-1,1	RTP4	64108	receptor (quimiosensorial), transporte, proteína 4
228531_at	0,00066	-1,54	SAMD9	54809	motivo estéril alfa, dominio 9
226603_at	0,00083	-1,53	SAMD9L	219285	motivo estéril alfa, dominio 9, similar
230036_at	0,0016	-1,02	SAMD9L	219285	motivo estéril alfa, dominio 9, similar
202657_s_at	0,001	-0,67	SERTAD2	9792	SERTA, dominio 2
202656_s_at	0,0016	-0,77	SERTAD2	9792	SERTA, dominio 2
201250_s_at	0,00023	-1,97	SLC2A1	6513	transportador de solutos, familia 2 (transportador de glucosa), miembro 1
217789_at	0,0014	-0,77	SNX6	58533	nexina 6
243594_x_at	5,10E-05	1,31	SPIRE2	84501	spire, homólogo 2 (Drosophila)
227706_at	0,00014	0,91	SPIRE2	84501	spire, homólogo 2 (Drosophila)
209436_at	0,0016	-2,14	SPONI	10418	espondina 1, matriz extracelular, proteína
221489_s_at	0,0016	-1,61	SPRY4	81848	sprouty, homólogo 4 (Drosophila)
201174_s_at	0,00059	-0,71	TERF2IP	54386	repetición telomérica, factor de unión 2, proteína de interacción
203167_at	0,00052	-1,28	TIMP2	7077	TIMP metalopeptidasa inhibidor 2
212665_at	0,001	-0,85	TIPARP	25976	TCDD, inducción, poli(ADP-ribosa) polimerasa
214168_s_at	0,0015	-0,9	TJP1	7082	unión estrecha, proteína 1 (zona occludens 1)
210260_s_at	0,00022	-1,67	TNFAIP8	25816	factor de necrosis tumoral alfa, proteína inducida 8
208296_x_at	0,0015	-1,28	TNFAIP8	25816	factor de necrosis tumoral alfa, proteína inducida 8
223132_s_at	5,90E-05	-0,63	TRIM8	81603	motivo tripartito 8
202347_s_at	0,00082	-0,71	UBE2K	3093	ubiquitin, enzima de conjugación E2K (UBC1, homólogo, levadura)
225925_s_at	0,0016	-0,55	USP48	84196	ubiquitina, peptidasa específica 48
208780_x_at	0,00049	-0,81	VAPA	9218	VAMP (proteína asociada a vesículas de la membrana), proteína asociada A, 33kDa
225198_at	8,00E-04	-1,19	VAPA	9218	VAMP (proteína asociada a vesículas de la membrana), proteína asociada A, 33kDa

**Fig. 5:** Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán), análisis de pacientes con un gen KRAS salvaje. Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a la duración de la supervivencia global.

	Valor de p	Proporción log2	HUGO.GeneSymbol	Designación del gen	Descripción
221657_s_at	0,0015	-1,83	ASB6	140459	Anquirina, repetición, caja SOCS 6
208442_s_at	0,00089	-1,88	ATM	472	ataxia telangiectasia, mutada
222696_at	0,0016	0,48	AXIN2	8313	axina 2 (conductina, eje)
202265_at	0,0017	-2,29	BMI1	648	BMI1 polcomb, anillo, dedos, oncogen
227736_at	0,001	0,48	C10orf99	387695	cromosoma 10, marco abierto de lectura 99
209850_s_at	0,00035	-2,92	CDC42EP2	10435	CDC42, proteína efectora (Rho GTPasa) 2
223243_s_at	9,00E-04	-1,51	EDEM3	80267	ER, degradación, potenciador, manosidasa alfa, similar, 3
223253_at	0,00053	0,66	EPDR1	54749	ependimina, proteína relacionada 1 (pez cebra)
219615_s_at	0,001	1,21	KCNK5	8645	canal de potasio, subfamilia K, miembro 5
209781_s_at	0,0013	0,88	KHDRBS3	10656	KH, dominio, ARN, unión, transducción de señales, 3
207457_s_at	6,80E-05	0,49	LY6G6D	58530	Linfocitos, antígeno 6, complejo, locus G6D
238417_at	0,00052	3,38	PGM2L1	283209	fosfoglucmutasa 2, similar, 1
204519_s_at	0,0018	-0,56	PLLP	51090	membrana plasmática, proteolípido (plasmolípina)
226957_x_at	0,0016	-1,86	RALBP1	10928	ralA, proteína de unión 1
204967_at	0,00037	1,03	SHROOM2	357	shroom, miembro de la familia 2
223748_at	0,0014	-0,78	SLC4A11	83959	transportador de solutos, familia 4, transportador de borato de sodio, miembro 11
1553117_a_at	0,0017	0,92	STK38	11329	serina/treonina quinasa 38
221085_at	0,00047	-1,18	TNFSF15	9966	factor de necrosis tumoral (ligando), superfamilia, miembro 15
221218_s_at	0,00059	-0,82	TPK1	27010	tiamina pirofosfocinasa 1
218806_s_at	6,70E-05	0,67	VAV3	10451	vav 3, guaninosina, factor de intercambio de nucleótidos
218807_at	8,00E-04	0,39	VAV3	10451	vav 3, guaninosina, factor de intercambio de nucleótidos
207705_s_at	1,50E-05	0,86	NA	22981	nineína, similar,
1554452_a_at	0,00048	1,38	NA	29923	inducción por hipoxia, proteína 2
218692_at	0,002	0,63	NA	55638	proteína en el Golgi

**Fig. 6:** Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán). Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a la duración de la supervivencia global.

	Valor de p	Proporción log2	HUGO.GeneSymbol	Designación del gen	Descripción
213017_at	0,0019	-1,07	ABHD3	171586	abhidrolasa, dominio 3
223253_at	0,00049	0,55	EPDR1	54749	ependimina, proteína relacionada 1 (pez cebra)
226259_at	0,0016	-1,3	EXOC6	54536	exocisto, complejo, componente 6 formina, similar,
226184_at	0,0016	0,95	FMNL2	114793	2
219020_at	0,002	1,43	HS1BP3	64342	HCLS1, proteína de unión 3
226944_at	0,00062	1,3	HTRA3	94031	Htra serinosa peptidasa 3
219615_s_at	0,00031	1,02	KCNK5	8645	canal de potasio, subfamilia K, miembro 5
205968_at	0,00081	0,69	KCNS3	3790	canal de potasio activado por voltaje, corrector retardado, subfamilia S, miembro 3
206006_s_at	0,00056	1,45	KIAA1009	22832	KIAA1009
223098_s_at	0,0011	-1,58	LONP2	83752	Peptidasa iónica 2, peroxisoma Unión a nucleótidos, oligomerización, dominio
221073_s_at	0,0018	1,4	NOD1	10392	1
243623_at	0,0017	0,81	SLC1A7	6512	transportador de solutos, familia 1 (transportador de glutamato), miembro 7
223748_at	0,0011	-0,58	SLC4A11	83959	transportador de solutos, familia 4, transportador de borato de sodio, miembro 7
203343_at	0,00034	-1,25	UGDH	7358	UDP-glucosa deshidrogenasa
218806_s_at	0,00061	0,47	VAV3	10451	vav 3 guaninosina, factor de intercambio de nucleótidos
207705_s_at	1,20E-05	0,67	NA	22981	nineína, similar, inducción por hipoxia, proteína
1554452_a_at	0,00019	1,21	NA	29923	2
205414_s_at	0,001	0,93	NA	9912	Rho, tipo GTPasa, proteína activadora RICH2

**Fig. 7:** Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán). Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a la duración de la supervivencia libre de progreso.

	Valor de p	Proporción log2	HUGO:GeneSymbol	Designación del gen	Descripción
219623_at	0,00089	1,05	ACTR5	79913	actina ARP5, proteína relacionada 5, homólogo (levadura)
39248_at	0,0013	-0,4	AQP3	360	aquaporina 3 (Gill, grupo sanguíneo)
204073_s_at	0,0015	-0,45	C11orf9	745	cromosoma 11, marco abierto de lectura 9
206387_at	0,0014	0,77	CDX2	1045	caudal, homeocaja 2
201328_at	0,0014	0,6	ETS2	2114	v-ets, virus de eritroblastosis E26, oncogen, homólogo 2 (aves)
226259_at	0,0017	-1,11	EXOC6	54536	exocisto, complejo, componente 6
219250_s_at	0,0013	-0,5	FLRT3	23767	fibronectina y leucosina, proteína transmembrana 3
230788_at	0,00045	-0,56	GCNT2	2651	glucosaminil (N-acetil) transferasa 2, enzima ramificadora I (I, grupo sanguíneo)
219615_s_at	6,40E-05	0,97	KCNK5	8645	canal de potasio, subfamilia K, miembro 5
206006_s_at	0,00085	1,34	KIAA1009	22832	KIAA1009
203713_s_at	0,0017	0,96	LLGL2	3993	letal para larvas gigantes, homólogo 2 (Drosophila)
223098_s_at	0,0015	-1,39	LONP2	83752	Peptidasa iónica 2, peroxisoma
202180_s_at	0,002	1,13	MVP	9961	proteína de almacenamiento mayor
207558_s_at	2,90E-05	1,34	PITX2	5308	homeodominio apareado similar 2
204554_at	8,00E-04	1,21	PPP1R3D	5509	proteína fosfatasa 1, regulador (inhibidor), subunidad 3D
226961_at	0,00038	0,64	PRR15	222171	prolinosina, proteína 15
203405_at	0,00022	0,82	PSMG1	8624	proteasoma (prosoma, macropaina), chaperona de ensamblaje 1
204547_at	0,0018	0,84	RAB40B	10966	RAB40B, miembro de la familia del oncogen RAS
243623_at	0,00031	0,8	SLC1A7	6512	transportador de solutos, familia 1 (transportador de glutamato), miembro 7
224959_at	0,00088	0,39	SLC26A2	1836	transportador de solutos, familia 26 (transportador de sulfato), miembro 2
222513_s_at	0,001	0,66	SORBS1	10580	sorbina y SH3, dominio 1
228036_at	0,0013	-0,36	SOX2	6657	SRY (región de determinación del sexo Y), caja 2
228867_at	0,0019	-1,15	TATDN3	128387	TatD ADNasa, dominio 3
218806_s_at	0,00013	0,5	VAV3	10451	vav3 guaninosina, factor de intercambio de nucleótidos
218807_at	0,00083	0,31	VAV3	10451	vav3 guaninosina, factor de intercambio de nucleótidos
209048_s_at	0,0019	0,8	ZMYND8	23613	dedos de cinc, MIND, tipo 8
1554452_a_at	0,00039	0,86	NA	29923	inducción por hipoxia, proteína 2
207705_s_at	0,00095	0,42	NA	22981	nineína, similar
218507_at	0,0013	0,54	NA	29923	inducción por hipoxia, proteína 2
236249_at	0,0019	-1,12	NA	121457	IKK, proteína de interacción

**Fig. 8:** Estudio EMR 62202-502 (tratamiento con cetuximab más irinotecán en pacientes con CRC metastásico refractario a irinotecán), análisis de pacientes con un gen KRAS salvaje. Genes cuya expresión en las muestras de referencia está asociada significativamente a la duración de la supervivencia libre de progreso.

	Valor de p	Coefficiente de regresión	HUGO.GeneSymbol	Designación del gen	Descripción
226363_at	0,002	1	ABCC5	10057	ATP, unión, casete, subfamilia C (CFTR/MRP), miembro 5
218322_s_at	0,0011	1,02	ACSL5	51703	acil-CoA sintetasa, cadena larga, miembro de la familia 5
205639_at	0,00062	0,95	AOAH	313	adlxiacil hidrolasa (neutrófilos)
39248_at	0,0017	-0,51	AQP3	360	aquaporina 3 (Gill, grupo sanguíneo)
222696_at	5,10E-05	0,69	AXIN2	8313	axina 2 (conductina, eje)
227736_at	8,00E-04	0,47	C10orf99	387695	chromosoma 10, marco abierto de lectura 99
204073_s_at	0,00013	-0,72	C11orf9	745	chromosoma 11, marco abierto de lectura 9
225353_s_at	0,001	-1,27	C1QC	714	complemento, componente 1, subcomponente q, cadena C
225532_at	0,0013	-1,42	CABLES1	91768	Cdk5 y Abl, sustrato de la enzima 1
208651_x_at	0,00088	0,73	CD24	934	CD24
209771_x_at	0,0018	0,82	CD24	934	CD24
216378_x_at	0,0019	0,78	CD24	934	CD24
224851_at	0,0015	-1,22	CDK6	1021	quinasa dependiente de ciclina 6
201884_at	0,00017	0,76	CEACAM5	1048	antígeno carcinoembrionario, proteína relacionada, molécula de adhesión celular 5
203757_s_at	0,00042	0,55	CEACAM6	4680	antígeno carcinoembrionario, proteína relacionada, molécula de adhesión celular 6 (sin reacción transversal específica)
211657_at	0,00064	0,69	CEACAM6	4680	antígeno carcinoembrionario, proteína relacionada, molécula de adhesión celular 6 (sin reacción transversal específica)
228915_at	0,00038	0,45	DACH1	1602	antígeno carcinoembrionario, proteína relacionada, molécula de adhesión celular 6 (sin reacción transversal específica)
212653_s_at	0,00043	-1,49	EHBP1	23301	dachshund, homólogo 1 (Drosophila)
201328_at	7,20E-05	1,06	ETS2	2114	EH, dominio, proteína de unión 1
226259_at	0,0018	-1,46	EXOC6	54536	v-ets, virus de eritroblastosis E26, oncogen, homólogo 2 (aves)
201995_at	0,00031	-1,45	EXT1	2131	exocisto, complejo, componente 6
219250_s_at	0,00023	-0,75	FLRT3	23767	exocisto (multiple) 1
222853_at	0,0015	-0,55	FLRT3	23767	fibronectina leucosina, proteína transmembrana 3
226184_at	0,0019	1,29	FMNL2	114793	fibronectina leucosina, proteína transmembrana 3
230788_at	0,00071	-0,75	GCNT2	2651	formina, similar, 2
221922_at	0,00091	0,79	GPSM2	29899	glucosaminil (N-acetil) transferasa 2, enzima ramificadora 1 (I, grupo sanguíneo)
201833_at	0,00099	1,81	HDAC2	3066	proteína G, modulador de señalización 2 (AGS3, similar, C. elegans)
201466_s_at	0,00081	1,03	JUN	3725	Histona, desacetilasa 2
207457_s_at	0,0011	0,35	LY6G6D	58530	Jun, oncogen
204663_at	0,00097	0,73	ME3	10873	Linfocito, antígeno 6, complejo, locus G6D enzima málica 3, dependiente de NADP(+), mitocondria

**Fig. 8** continuación

223115_at	0,00093	2,19	MED17	9440	complejo mediador, subunidad 17
207480_s_at	0,00074	-0,53	MEIS2	4212	Meis, homeocaja 2
203433_at	0,0011	-1,47	MTHFS	10588	5,10-metilenil-tetrahidrofolato sintetasa (5-formil-tetrahidrofolato ciclo-ligasa)
204798_at	0,00086	0,7	MYB	4602	v-mib, mieloblastosis, oncogen viral, homólogo (aves)
202431_s_at	0,0019	0,86	MYC	4609	v-mic, mielocitomatosis, viral oncogen, homólogo (aves)
203962_s_at	0,00021	0,77	NEBL	10529	nebullette
217950_at	0,00051	1,7	NOSIP	51070	óxido nítrico sintetasa, proteína de interacción
226459_at	0,001	-0,63	PIK3AP1	118788	fosfoinositide-3-quinasa, proteína adaptadora 1
207558_s_at	4,30E-05	1,85	PITX2	5308	homeodominio apareado, similar, 2
219756_s_at	0,0015	1,18	POF1B	79983	falla ovárica prematura, 1 B
208510_s_at	0,001	0,68	PPARG	5468	proliferator de peroxisomas, activación, receptor gamma
226907_at	0,00033	0,67	PPP1R14C	81706	proteína fosfatasa 1, regulador (inhibidor), subunidad 14C
226961_at	1,00E-06	1,49	PRR15	222171	prolinosina, proteína 15
203405_at	0,00034	1,05	PSMG1	8624	proteasoma (prosome, macropaina), chaperona de ensamblaje 1
221810_at	0,00056	1,29	RAB15	376267	RAB15, miembro de la familia del oncogen RAS
204547_at	0,0011	1,2	RAB40B	10966	RAB40B, miembro de la familia del oncogen RAS
218704_at	0,00015	1,07	RNF43	54894	Anillo, dedos, proteína 43
227722_at	0,0017	0,8	RPS23	6228	proteína ribosomal S23
228221_at	0,0016	1,03	SLC44A3	126969	transportador de solutos, familia 44, miembro 3
201416_at	0,0014	1,17	SOX4	6659	'SRY (región de determinación del sexo Y), caja 4
213994_s_at	0,002	-0,46	SPON1	10418	espondina 1, matriz extracelular, proteína
208322_s_at	0,00087	-0,7	ST3GAL1	6482	ST3 beta-galactosidasa alfa-2,3-sialiltransferasa 1
204565_at	0,0013	0,99	THEM2	55856	Tioesterasa, superfamilia, miembro 2
204227_s_at	0,0015	-1,68	TK2	7084	timidinosina quinasa 2, mitocondria
221085_at	0,00093	-0,88	TNFSF15	9966	factor de necrosis tumoral (ligando), superfamilia, miembro 15
221218_s_at	0,00082	-0,68	TPK1	27010	tiamina pirofosfoquinasa 1
218806_s_at	4,20E-05	0,72	VAV3	10451	vav 3 guanosina, factor de intercambio de nucleótidos
218807_at	2,00E-04	0,46	VAV3	10451	vav 3 guanosina, factor de intercambio de nucleótidos
219247_s_at	0,0017	-1,4	ZDHHC14	79683	dedos de cinc, DHHc, tipo 14
214760_at	0,0011	0,92	ZNF337	26152	dedos de cinc, proteína 337
236249_at	5,70E-05	-2,42	NA	121457	IKK, proteína de interacción
218692_at	0,00016	0,95	NA	55638	Proteína del Golgi
227862_at	0,00057	-0,85	NA	388610	Proteína hipotética LOC388610

**Fig. 9:** Conjuntos de sondas Affymetrix usadas para evaluar el grado de contaminación del tejido hepático en biopsias tumorales.

Identificación del elemento Affymetrix	Designación del gen	Expresión predominante
60474_at	<b>FERMT1</b>	Cáncer colorrectal
218687_s_at	<b>MUC13</b>	Cáncer colorrectal
203397_s_at	<b>GALNT3</b>	Cáncer colorrectal
201650_at	<b>KRT19</b>	Cáncer colorrectal
217867_x_at	<b>BACE2</b>	Cáncer colorrectal
204771_s_at	<b>TTF1</b>	Cáncer colorrectal
219520_s_at	<b>WWC3</b>	Cáncer colorrectal
202869_at	<b>OAS1</b>	Cáncer colorrectal
206606_at	<b>LIPC</b>	Hígado
207097_s_at	<b>SLC17A2</b>	Hígado
210558_at	<b>AKR1C4</b>	Hígado
210324_at	<b>C8G</b>	Hígado
206753_at	<b>RDH16</b>	Hígado
206505_at	<b>UGT2B4</b>	Hígado
206535_at	<b>SLC2A2</b>	Hígado
209976_s_at	<b>CYP2E1</b>	Hígado

**Fig. 10:** Asociación entre la expresión inicial y el control de la enfermedad en la semana 6 en pacientes con tumores KRAS salvajes.

Identificación del conjunto de sondas Affymetrix	Designación del gen	Símbolo del gen	valor de p	valor de q	Proporción log2
200719_at	6500	<i>SKP1</i>	0.00017	0.27	-0.94
201397_at	26227	<i>PHGDH</i>	0.00077	0.4	-2.26
201529_s_at	6117	<i>RPA1</i>	0.002	0.52	-0.74
201691_s_at	7163	<i>TPD52</i>	0.0019	0.52	-1.38
201791_s_at	1717	<i>DHCR7</i>	0.00094	0.41	1.19
202599_s_at	8204	<i>NRIP1</i>	0.0019	0.52	-0.61
202682_s_at	7375	<i>USP4</i>	0.0016	0.5	0.47
203068_at	9903	<i>KLHL21</i>	0.0014	0.47	0.86
203508_at	7133	<i>TNFRSF1B</i>	6.90E-07	0.0068	2.08
204169_at	3614	<i>IMPDH1</i>	7.00E-04	0.4	0.86
204258_at	1105	<i>CHD1</i>	0.0019	0.52	-0.57
204733_at	5653	<i>KLK6</i>	3.00E-05	0.091	-4.18
205174_s_at	25797	<i>QPCT</i>	0.0018	0.52	-2.03
205545_x_at	22826	<i>DNAJC8</i>	1.60E-06	0.008	0.79
206134_at	27299	<i>ADAMDEC1</i>	0.00031	0.33	1.76
207541_s_at	5394	<i>EXOSC10</i>	0.0017	0.52	0.8
208101_s_at	81605	<i>URM1</i>	3.00E-04	0.33	0.62
208728_s_at	998	<i>CDC42</i>	0.0012	0.47	0.63
208908_s_at	831	<i>CAST</i>	0.0016	0.5	-1.12
208963_x_at	3992	<i>FADS1</i>	0.0014	0.47	1.61
208974_x_at	3837	<i>KPNB1</i>	0.0013	0.47	0.69
209370_s_at	6452	<i>SH3BP2</i>	0.00069	0.4	0.62
209566_at	51141	<i>INSIG2</i>	0.00031	0.33	-1.11
209788_s_at	51752	<i>ERAP1</i>	0.00045	0.34	-1.46
210589_s_at	2629	<i>GBA</i>	0.00098	0.41	0.96
212002_at	26099	<i>C1orf144</i>	0.00065	0.4	1.08
212101_at	23633	<i>KPNA6</i>	9.00E-04	0.41	0.69
212529_at	124801	<i>LSM12</i>	0.00035	0.33	0.82
212586_at	831	<i>CAST</i>	0.00057	0.38	-1.08
212833_at	91137	<i>SLC25A46</i>	2.00E-04	0.27	-0.79
213144_at	9570	<i>GOSR2</i>	3.90E-05	0.098	0.83
213577_at	6713	<i>SQLE</i>	0.00039	0.33	1.8
216008_s_at	10425	<i>ARIH2</i>	2.00E-04	0.27	0.57
217722_s_at	51335	<i>NGRN</i>	0.00087	0.41	-0.66
218004_at	55108	<i>BSDC1</i>	0.00068	0.4	0.66
218225_at	51295	<i>ECSIT</i>	6.80E-06	0.026	0.86
218473_s_at	79709	<i>GLT25D1</i>	0.0012	0.46	0.67
218636_s_at	11253	<i>MAN1B1</i>	0.00084	0.41	0.78
219919_s_at	54961	<i>SSH3</i>	6.00E-05	0.13	0.46
221088_s_at	55607	<i>PPP1R9A</i>	0.00038	0.33	-3.28
221649_s_at	56342	<i>PPAN</i>	0.0013	0.47	0.81

**Fig. 10:** (continuación)

222200_s_at	55108	<i>BSDC1</i>	0.0017	0.52	0.65
222731_at	51201	<i>ZDHHC2</i>	0.00046	0.34	-1.91
224872_at	57609	<i>DIP2B</i>	0.00035	0.33	-0.94
224890_s_at	389541	<i>NA</i>	0.0013	0.47	0.63
225092_at	9135	<i>RABEP1</i>	0.0018	0.52	-1.05
225541_at	200916	<i>RPL22L1</i>	0.0018	0.52	-1.37
225954_s_at	90007	<i>MIDN</i>	0.0012	0.46	1.08
226003_at	55605	<i>KIF21A</i>	0.0015	0.5	-0.9
227542_at	9306	<i>SOCS6</i>	0.00042	0.33	-1.31
228494_at	55607	<i>PPP1R9A</i>	8.90E-07	0.0068	-4.71
228600_x_at	340277	<i>C7orf46</i>	8.20E-05	0.16	-1.26
230624_at	9481	<i>SLC25A27</i>	0.00049	0.34	-1.47
235258_at	167227	<i>DCP2</i>	0.00097	0.41	-0.62
241348_at	55279	<i>ZNF654</i>	0.00099	0.41	-0.58
37012_at	832	<i>CAPZB</i>	0.00075	0.4	0.82
37943_at	23503	<i>ZFYVE26</i>	0.00084	0.41	0.59

**Fig. 11.** Cuarenta y siete conjuntos de sondas cuya expresión estuvo asociada a una respuesta global superior como resultado del tratamiento, desde el inicio hasta la semana 4.

Identificación del conjunto de sondas Affymetrix	Designación del gen	Símbolo del gen	valor de p	valor de q	Proporción log2
1554078_s_at	9093	<i>DNAJA3</i>	0.00097	0.55	-0.86
1559633_a_at	1131	<i>CHRM3</i>	0.0015	0.56	1.44
1563321_s_at	8028	<i>MLLT10</i>	0.0012	0.56	1.2
200653_s_at	801	<i>CALM1</i>	0.00059	0.55	0.88
201502_s_at	4792	<i>NFKBIA</i>	0.0014	0.56	0.95
201870_at	10953	<i>TOMM34</i>	0.002	0.56	-1.02
202388_at	5997	<i>RGS2</i>	0.0011	0.56	2.08
203542_s_at	687	<i>KLF9</i>	0.00077	0.55	2.03
204040_at	9781	<i>RNF144A</i>	0.0013	0.56	1.67
204676_at	25880	<i>TMEM186</i>	0.0013	0.56	-0.91
204985_s_at	79090	<i>TRAPPC6A</i>	0.00052	0.55	-1.1
205092_x_at	22890	<i>ZBTB1</i>	0.0017	0.56	1.16
206383_s_at	9908	<i>G3BP2</i>	0.0018	0.56	1
208994_s_at	9360	<i>PPIG</i>	0.0016	0.56	0.76
210933_s_at	6624	<i>FSCN1</i>	0.00063	0.55	0.86
211948_x_at	23215	<i>BAT2D1</i>	0.00038	0.55	0.71
212451_at	9728	<i>NA</i>	0.00022	0.55	1.15
212650_at	23301	<i>EHBP1</i>	0.00041	0.55	1.78
213956_at	9857	<i>CEP350</i>	0.00023	0.55	0.94
213998_s_at	10521	<i>DDX17</i>	0.0017	0.56	2.02
214055_x_at	23215	<i>BAT2D1</i>	0.00057	0.55	0.7
214081_at	57125	<i>PLXDC1</i>	0.0014	0.56	2.4
214374_s_at	8496	<i>PPFIBP1</i>	0.00098	0.55	1.53
215280_s_at	8541	<i>PPFIA3</i>	0.00048	0.55	-1.25
216392_s_at	11196	<i>SEC23IP</i>	0.00084	0.55	0.83
217813_s_at	10927	<i>SPIN1</i>	0.00057	0.55	0.89
218324_s_at	65244	<i>SPATS2</i>	0.001	0.56	0.6
218916_at	79724	<i>ZNF768</i>	0.002	0.56	-1.02
219001_s_at	79269	<i>WDR32</i>	0.0014	0.56	-1.23
219384_s_at	23536	<i>ADAT1</i>	0.00054	0.55	-1.27
219596_at	56906	<i>THAP10</i>	7.00E-04	0.55	-1.35
222457_s_at	51474	<i>LIMA1</i>	0.0019	0.56	1.17
222527_s_at	55696	<i>RBM22</i>	0.00053	0.55	1.13
222586_s_at	114885	<i>OSBPL11</i>	0.00032	0.55	0.9
222810_s_at	9462	<i>RASAL2</i>	0.00025	0.55	1.24
222890_at	29070	<i>CCDC113</i>	0.0016	0.56	-1.75
223259_at	94103	<i>ORMDL3</i>	0.00088	0.55	-0.81
223672_at	84251	<i>SGIP1</i>	0.0018	0.56	2.16
226987_at	29890	<i>RBM15B</i>	0.00091	0.55	-1.04
227148_at	130271	<i>PLEKHH2</i>	0.0018	0.56	1.83
229586_at	80205	<i>CHD9</i>	0.00061	0.55	1.34
230629_s_at	57634	<i>EP400</i>	0.00073	0.55	1.06

**Fig. 11:** (continuación)

235192_at	112858	<i>TP53RK</i>	0.00081	0.55	-1.28
235435_at	132949	<i>AASDH</i>	0.00065	0.55	0.92
237411_at	11174	<i>ADAMTS6</i>	0.00091	0.55	1.1
239147_at	153642	<i>ARSK</i>	0.00011	0.55	0.88
35436_at	2801	<i>GOLGA2</i>	0.0014	0.56	0.91

**Fig. 12:** Genes candidatos cuya expresión estuvo asociada a una respuesta global superior como resultado del tratamiento, desde el inicio hasta la semana 4.

Identificación del conjunto de sondas Affymetrix	Designación del gen	Símbolo del gen	valor de p	Proporción log2
1565483_at	1956	<i>EGFR</i>	0.37	0.45
201983_s_at	1956	<i>EGFR</i>	0.71	-0.13
201984_s_at	1956	<i>EGFR</i>	0.18	-0.58
216836_s_at	2064	<i>ERBB2</i>	0.06	-0.7
226213_at	2065	<i>ERBB3</i>	0.046	-0.68
202454_s_at	2065	<i>ERBB3</i>	0.011	-0.93
203821_at	1839	<i>HBEGF</i>	0.78	-0.1
205016_at	7039	<i>TGFA</i>	0.59	0.27
205239_at	374	<i>AREG</i>	0.39	-0.59
205767_at	2069	<i>EREG</i>	0.2	-1.17
38037_at	1839	<i>HBEGF</i>	0.59	0.19

**Fig. 13:** Asociación entre la expresión basal de genes candidatos y el control de tumores KRAS salvajes en la semana 6.

Identificación del conjunto de sondas Affymetrix	Designación del gen	Símbolo del gen	valor de p	Proporción log2
1565483_at	1956	<i>EGFR</i>	0.81	0.1
201983_s_at	1956	<i>EGFR</i>	0.23	0.38
201984_s_at	1956	<i>EGFR</i>	0.42	0.34
216836_s_at	2064	<i>ERBB2</i>	0.27	-0.86
226213_at	2065	<i>ERBB3</i>	0.16	-0.81
202454_s_at	2065	<i>ERBB3</i>	0.14	-0.96
203821_at	1839	<i>HBEGF</i>	0.76	-0.13
205016_at	7039	<i>TGFA</i>	0.0073	-1.63
205239_at	374	<i>AREG</i>	0.13	0.99
205767_at	2069	<i>EREG</i>	0.099	1.45
38037_at	1839	<i>HBEGF</i>	0.97	-0.01

**Fig. 14:** Resultados del análisis estadístico de la evaluación del proteoma en el plasma con Luminex

Proteína	Cambio entre el inicio y la semana 4		Asociación entre el cambio y la respuesta al tratamiento en la semana 6 en todos los pacientes		Asociación entre el cambio y la respuesta al tratamiento en la semana 6 en los pacientes con tumores KRAS salvajes			
	Proporción log2	valor de p	Proporción log2	valor de p	Proporción log2	valor de p		
Alfa -1 Antitrypsin	-0.14	0.0061	0.029	0.9	0.94	0.05	0.77	0.98
Adiponectina	0.02	0.73	0.82	0.092	0.68	0.06	0.58	0.98
Alfa -2 Macroglobulina	-0.03	0.55	0.69	0.54	0.87	-0.06	0.59	0.98
Alfa -Fetoproteína	0.05	0.5	0.69	0.23	0.87	0.03	0.85	0.99
Anfirregulina	2.56	6.60E-11	6.40E-09	0.0022	0.11	-2.8	0.0025	0.12
Apolipoproteína A1	-0.07	0.22	0.39	0.44	0.87	0	0.99	0.99
Apolipoproteína CIII	-0.02	0.81	0.87	0.41	0.87	0.09	0.61	0.98
Apolipoproteína H	-0.09	0.026	0.09	0.28	0.87	0.07	0.43	0.98
Beta-2 Microglobulina	-0.17	0.002	0.015	0.9	0.94	0.06	0.71	0.98
Betacelulina	-0.48	0.4	0.59	0.15	0.8	-2.61	0.28	0.88
Factor neurotrófico cerebral	0.3	0.15	0.31	0.94	0.95	-0.25	0.65	0.98
Complemento 3	-0.06	0.087	0.21	0.62	0.87	-0.01	0.92	0.99
Antígeno del cáncer 125	-0.25	0.047	0.13	0.0081	0.15	-0.46	0.13	0.81
Antígeno del cáncer 19-9	-0.41	0.02	0.076	0.0066	0.15	-1.45	0.0066	0.17
Calcitonina	-0.06	0.66	0.79	0.16	0.8	-0.87	0.18	0.81
CD40	-0.01	0.87	0.89	0.54	0.87	-0.24	0.17	0.81
CD40 Ligand	0.09	0.7	0.82	0.3	0.87	0.58	0.49	0.98
Antígeno carcinoembrionario	-0.57	0.0034	0.021	0.00056	0.054	-2.42	0.00019	0.019
Creatina quinasa -MB	0.13	0.045	0.13	0.36	0.87	0.13	0.49	0.98
C Proteína reactiva	-0.29	0.12	0.26	0.77	0.92	0.22	0.66	0.98
EGF	0.95	0.0083	0.036	0.37	0.87	-1.11	0.34	0.93

**Fig. 14:** (continuación)

EGF-R	-5.16	5.50E-06	0.00018	0.14	0.92	0.94	-0.18	0.93	0.99
ENA-78	0.26	0.24	0.41	-0.71	0.36	0.87	-0.89	0.34	0.93
Endotelina-1	-0.26	0.16	0.31	-0.69	0.1	0.68	-0.63	0.26	0.88
EN-RAGE	-0.1	0.65	0.78	-0.76	0.16	0.8	-0.63	0.33	0.93
Eotaxina	-0.04	0.87	0.89	-0.57	0.5	0.87	-1.11	0.26	0.88
Epiregulina	-0.07	0.43	0.62	0.32	0.15	0.8	0.4	0.19	0.81
Erythropoietina	0.12	0.49	0.68	0.06	0.8	0.93	0.25	0.5	0.98
Fatty Acid Binding Protein	0.3	0.032	0.1	0.18	0.53	0.87	0.02	0.95	0.99
Factor VII	-0.12	0.072	0.19	0.08	0.71	0.89	0.08	0.76	0.98
Ferritina	-0.37	0.0057	0.029	-0.34	0.39	0.87	-0.3	0.51	0.98
FGF basic	0.26	0.097	0.23	-0.48	0.032	0.34	-0.56	0.099	0.73
Fibrinógeno	-0.14	0.029	0.098	-0.13	0.47	0.87	0.03	0.88	0.99
G-CSF	0.61	0.00013	0.0018	0.09	0.72	0.89	-0.24	0.52	0.98
Hormona de crecimiento	-0.1	0.73	0.82	0.31	0.64	0.87	0.66	0.43	0.98
GM-CSF	0.33	0.11	0.24	0.05	0.91	0.94	-0.11	0.84	0.99
Glutación S-transferasa	-0.12	0.27	0.45	-0.2	0.6	0.87	0.06	0.85	0.99
Haptoglobina	-0.35	0.1	0.24	-0.83	0.37	0.87	0.13	0.7	0.98
HB-EGF	-0.21	0.36	0.56	-0.02	0.97	0.97	0.31	0.78	0.98
ICAM-1	-0.07	0.16	0.32	-0.18	0.32	0.87	-0.11	0.49	0.98
IFN-gamma	0.1	0.08	0.21	0.15	0.26	0.87	0.08	0.66	0.98
IgA	-0.03	0.54	0.69	-0.06	0.64	0.87	0	0.98	0.99
IgE	0.02	0.82	0.87	-0.09	0.71	0.89	-0.18	0.59	0.98
IGF-1	0.98	0.036	0.11	3.15	0.014	0.19	2.32	0.068	0.69
IgM	-0.07	0.11	0.25	-0.04	0.78	0.92	-0.02	0.9	0.99
IL-10	0.38	0.0036	0.021	0.13	0.69	0.89	-0.27	0.49	0.98
IL-12p40	0.06	0.58	0.72	0.15	0.59	0.87	0.18	0.6	0.98
IL-12p70	-0.33	0.0074	0.034	0.14	0.55	0.87	-0.01	0.98	0.99
IL-13	0.4	0.0054	0.029	0.1	0.73	0.89	-0.03	0.94	0.99

**Fig. 14:** (continuación)

IL-15	0.13	0.099	0.23	0.27	0.18	0.8	0.12	0.54	0.98
IL-16	0.02	0.76	0.85	-0.13	0.6	0.87	-0.38	0.2	0.81
IL-18	0.24	0.00098	0.0097	-0.15	0.4	0.87	-0.18	0.34	0.93
IL-1 Alfa	0.2	0.0057	0.029	0.12	0.5	0.87	0.02	0.93	0.99
IL-1beta	0.11	0.48	0.67	-0.08	0.73	0.89	0.24	0.46	0.98
IL-1ra	0.52	0.0024	0.017	0.06	0.92	0.94	-0.35	0.6	0.98
IL-2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IL-3	0.47	0.025	0.09	0.3	0.51	0.87	-0.14	0.79	0.99
IL-4	0.07	0.59	0.72	0.15	0.43	0.87	0.18	0.47	0.98
IL-5	0.34	0.17	0.33	-1.18	0.072	0.58	-1.46	0.079	0.69
IL-6	-0.21	0.36	0.56	-0.55	0.49	0.87	-0.42	0.65	0.98
IL-7	0.42	0.062	0.17	-0.12	0.72	0.89	-0.5	0.28	0.88
IL-8	-0.33	0.041	0.12	-1.33	0.0092	0.15	-1.66	0.0072	0.17
Insulina	1.07	0.0014	0.011	0.38	0.56	0.87	0.86	0.28	0.88
Leptina	-0.02	0.83	0.88	0.19	0.51	0.87	-0.04	0.89	0.99
Lipoproteína (a)	-0.28	0.00084	0.0097	0.16	0.46	0.87	0.15	0.55	0.98
Linfotaxina	0.15	0.39	0.59	1.03	0.11	0.71	0.77	0.22	0.83
MCP-1	-0.02	0.81	0.87	-0.18	0.45	0.87	-0.41	0.17	0.81
MDC	-0.12	0.21	0.38	-0.3	0.38	0.87	-0.11	0.72	0.98
MIP-1 Alfa	0.02	0.89	0.89	-0.65	0.0061	0.15	-0.69	0.016	0.3
MIP-1beta	0.24	0.0013	0.011	-0.23	0.19	0.8	-0.4	0.075	0.69
MMP-2	0.39	0.086	0.21	-1.09	0.022	0.27	-0.94	0.044	0.6
MMP-3	0.19	0.15	0.31	0.52	0.18	0.8	0.12	0.69	0.98
MMP-9	0.47	0.026	0.09	0.18	0.66	0.88	-0.03	0.95	0.99
Mieloperoxidasa	0.31	0.18	0.34	-0.32	0.63	0.87	-0.29	0.71	0.98
Myoglobina	0.08	0.55	0.69	0.36	0.2	0.8	-0.14	0.7	0.98
PAI-1	0.05	0.37	0.57	-0.1	0.29	0.87	-0.16	0.18	0.81
Fosfatasa ácida prostática	0.33	0.00012	0.0018	-0.22	0.42	0.87	-0.48	0.15	0.81
PAPP-A	0.02	0.87	0.89	0.59	0.071	0.58	0.52	0.19	0.81

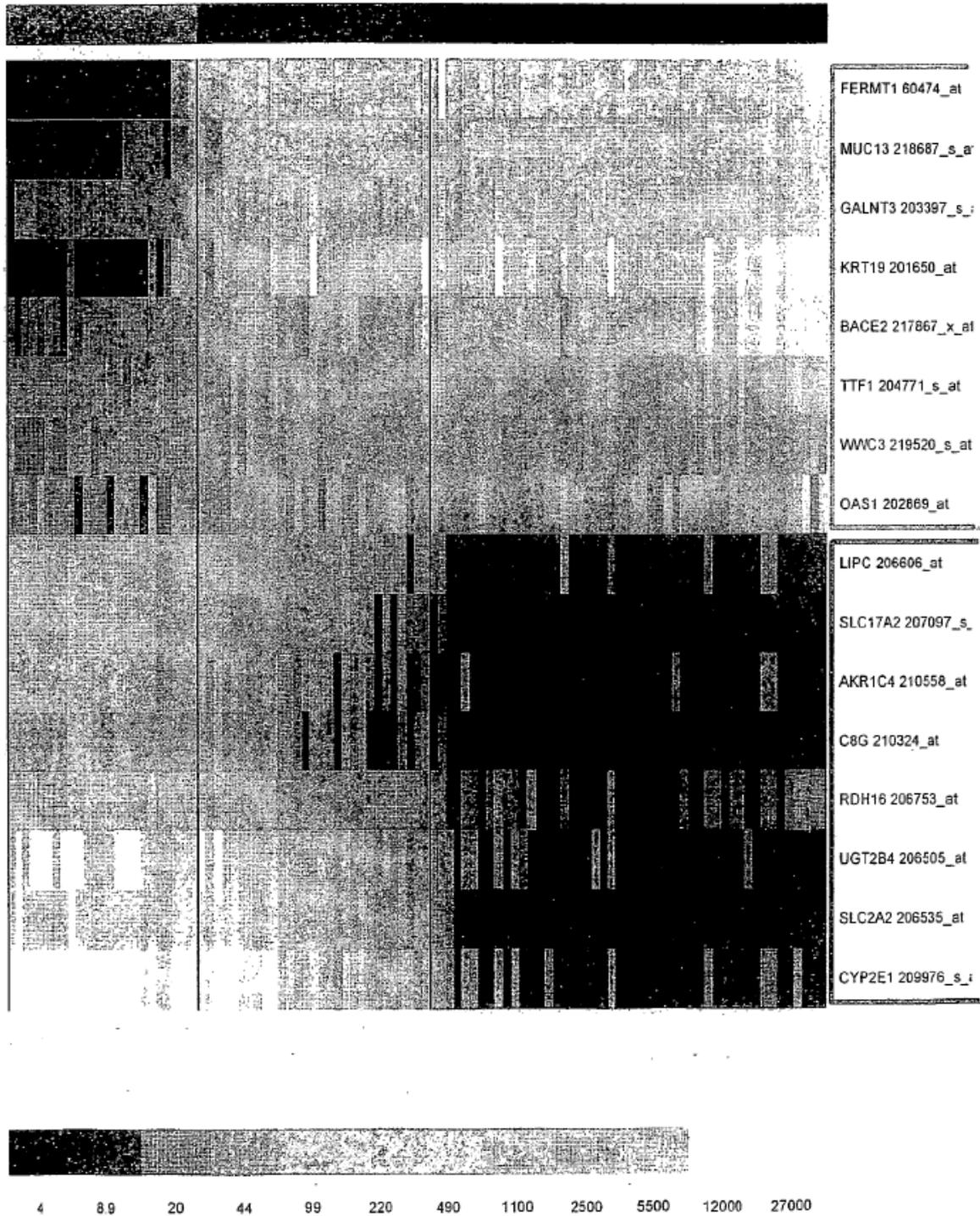
**Fig. 14:** (continuación)

Antígeno específico prostático libre	0.4	0.012	0.052	0.18	0.49	0.87	0.1	0.75	0.98
<b>RANTES</b>	0.21	0.19	0.35	0.05	0.91	0.94	-0.09	0.86	0.99
<b>Serum Amyloid P</b>	-0.21	0.00011	0.0018	0.03	0.84	0.94	0.03	0.85	0.99
Factor de células madre	0.08	0.51	0.69	-0.18	0.33	0.87	-0.58	0.029	0.47
<b>SGOT</b>	-0.15	0.52	0.69	-0.09	0.91	0.94	0.03	0.97	0.99
<b>SHBG</b>	-0.07	0.28	0.46	0.15	0.42	0.87	0.2	0.28	0.88
globulina fijadora de tiroxina	-0.1	0.019	0.074	0.08	0.54	0.87	0.08	0.59	0.98
Factor tisular	0.01	0.95	0.95	0.08	0.87	0.94	-0.26	0.45	0.98
		4.00E-							
<b>TGF-alfa</b>	1.63	0.06	0.00018	-0.7	0.35	0.87	-0.55	0.51	0.98
<b>TIMP-1</b>	-0.28	0.001	0.0097	-0.4	0.073	0.58	-0.49	0.064	0.69
<b>TNF RII</b>	-0.03	0.57	0.71	-0.08	0.61	0.87	-0.08	0.62	0.98
<b>TNF-alfa</b>	0.09	0.34	0.54	-0.22	0.31	0.87	-0.31	0.17	0.81
<b>TNF-beta</b>	0.05	0.72	0.82	0.21	0.37	0.87	0.39	0.088	0.7
Trombopoyetina	0.17	0.25	0.42	0.21	0.66	0.88	0.23	0.66	0.98
Hormona estimuladora de tiroides	-0.45	0.00013	0.0018	-0.5	0.19	0.8	-0.44	0.2	0.81
Tromboespondina-1	0.28	0.2	0.35	-0.07	0.89	0.94	-0.29	0.65	0.98
<b>VCAM-1</b>	-0.03	0.55	0.69	-0.03	0.8	0.93	-0.02	0.86	0.99
<b>VEGF</b>	-0.05	0.42	0.61	-0.03	0.87	0.94	-0.09	0.62	0.98
Factor de von Willebrand	0.03	0.78	0.86	-0.38	0.27	0.87	-0.13	0.74	0.98

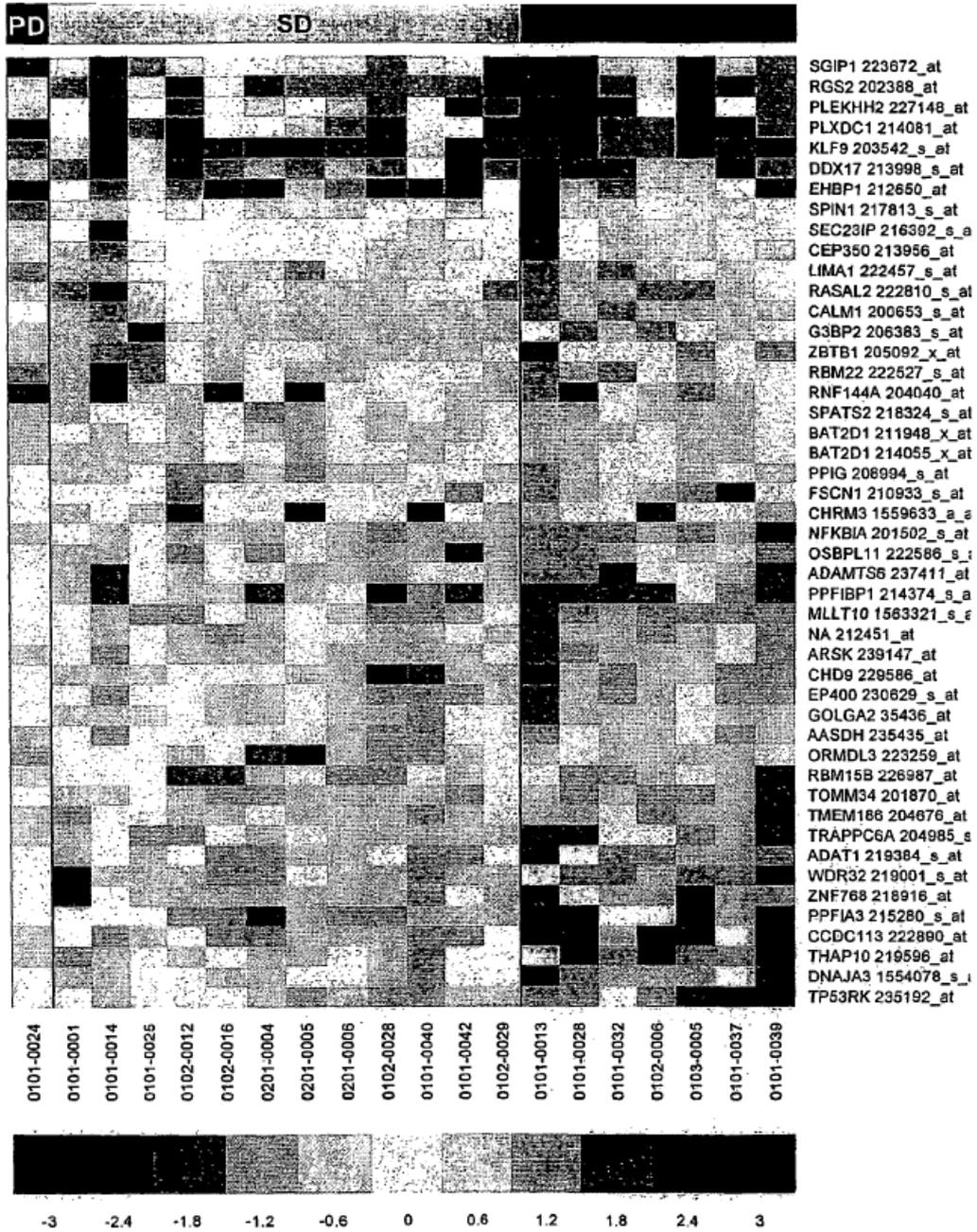
**Fig. 15** Anticuerpos usados como reactivos y condiciones para el análisis inmunohistoquímico

Sonda	Fuente	Tratamiento para recuperar el antígeno	dilatación	Duración de la incubación	Fuente	Código
<b>EGFR</b> Fosfo-EGFR	Ratón Ratón	Proteinasa K Baño de agua PH10	1:50 Listo para usar	30 min 30 min	Dako Chemicon	K1494 MAB3052
<b>HER2</b> Fosfo-HER2 (Tyr1248) Fosfo-AKT (Ser473) Fosfo-MAPK (Thr202/Tyr204) p27 <sup>Kip1</sup>	Conejo Conejo Conejo Conejo Ratón	Baño de agua PH 6 Microondas pH10 Microondas pH10 Microondas pH6 Microondas pH6	1:20 1:20 1:20 1:50 1:80	30 min 120 min 120 min 120 min 60 min	Dako Cell Signaling Technology Cell Signaling Technology Cell Signaling Technology Dako	5207 2244 9277L 9101L M7203
Fosfo-STAT3 (Tyr705) K167	Ratón Ratón	Microondas pH6 Microondas pH6	1:100 1:100	120 min 60 min	Cell Signaling Technology Dako	9131L M7240

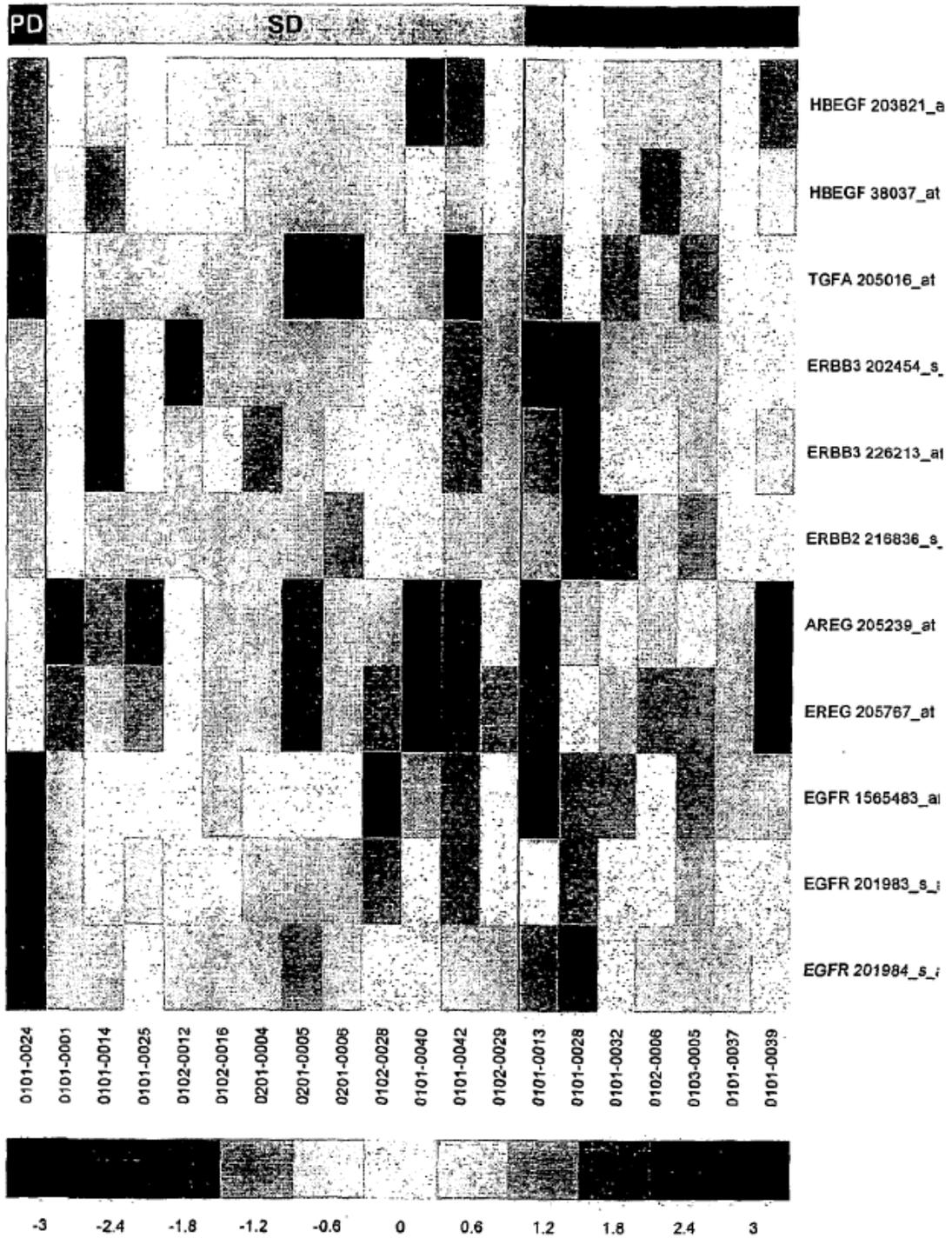
**Fig. 16:** Identificación de muestras de ARN con una contaminación hepática alta (verde), media (roja) o baja (negra) en función de la expresión de genes propios del cáncer colorrectal (recuadros azules) o el hígado normal (recuadros púrpura). La escala de colores refleja la intensidad de la señal absoluta después de la normalización.



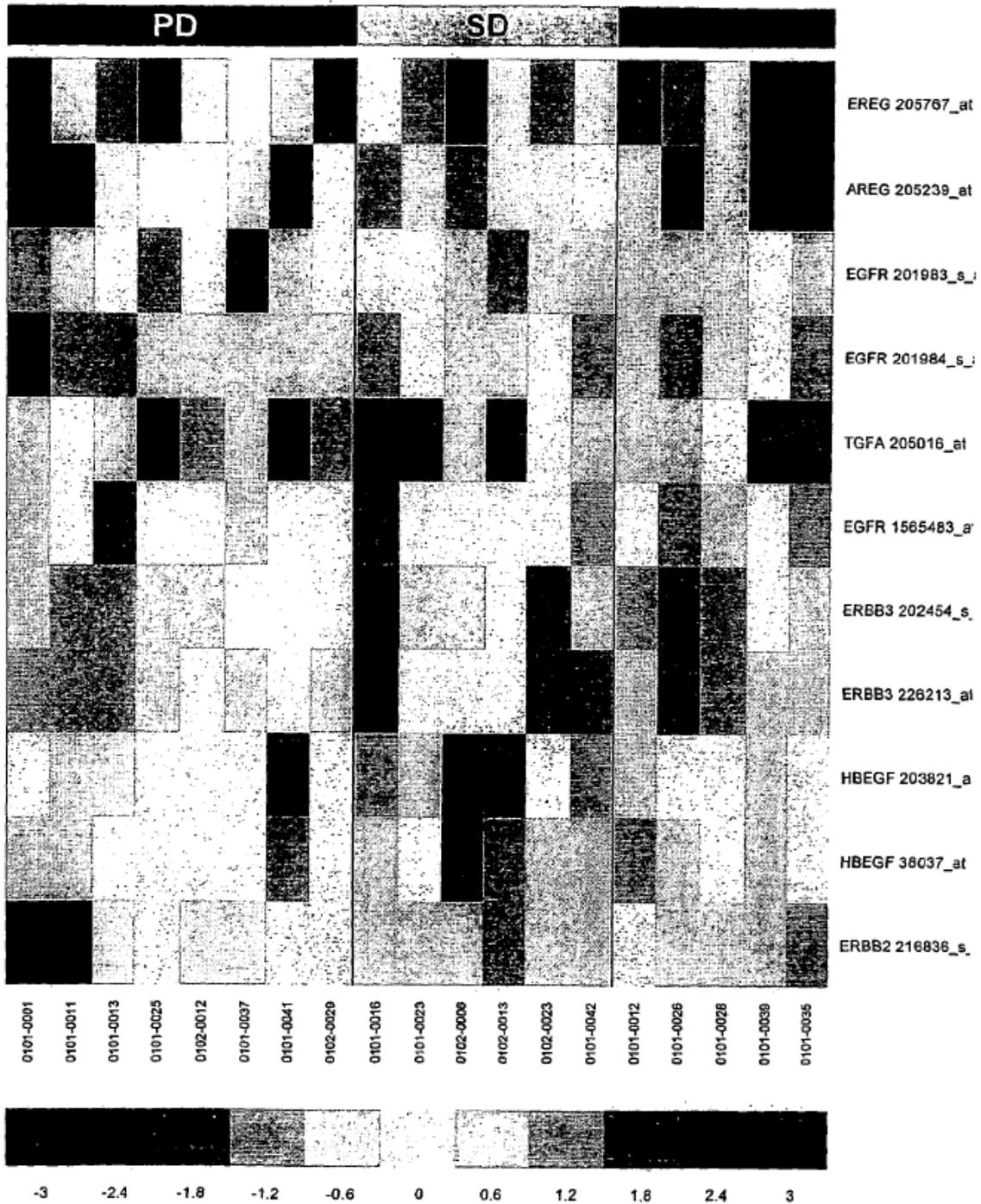
**Fig. 17:** Asociación entre los cambios en la expresión como resultado del tratamiento, desde el inicio hasta la semana 4, y una respuesta global superior (respuesta parcial versus enfermedad estable más enfermedad progresiva).



**Fig. 18:** Asociación entre los cambios en la expresión de genes candidatos como resultado del tratamiento, desde el inicio hasta la semana 4, y una respuesta global superior (respuesta parcial versus enfermedad estable más enfermedad progresiva). Abreviaturas: PD: enfermedad progresiva, SD: enfermedad estable, PR: respuesta parcial.



**Fig. 19:** Asociación entre la expresión inicial de genes candidatos y el control de la enfermedad (respuesta parcial más enfermedad estable versus enfermedad progresiva) en tumores KRAS salvajes. Abreviaturas: PD: enfermedad progresiva, SD: enfermedad estable, PR: respuesta parcial.



**Fig. 20:**

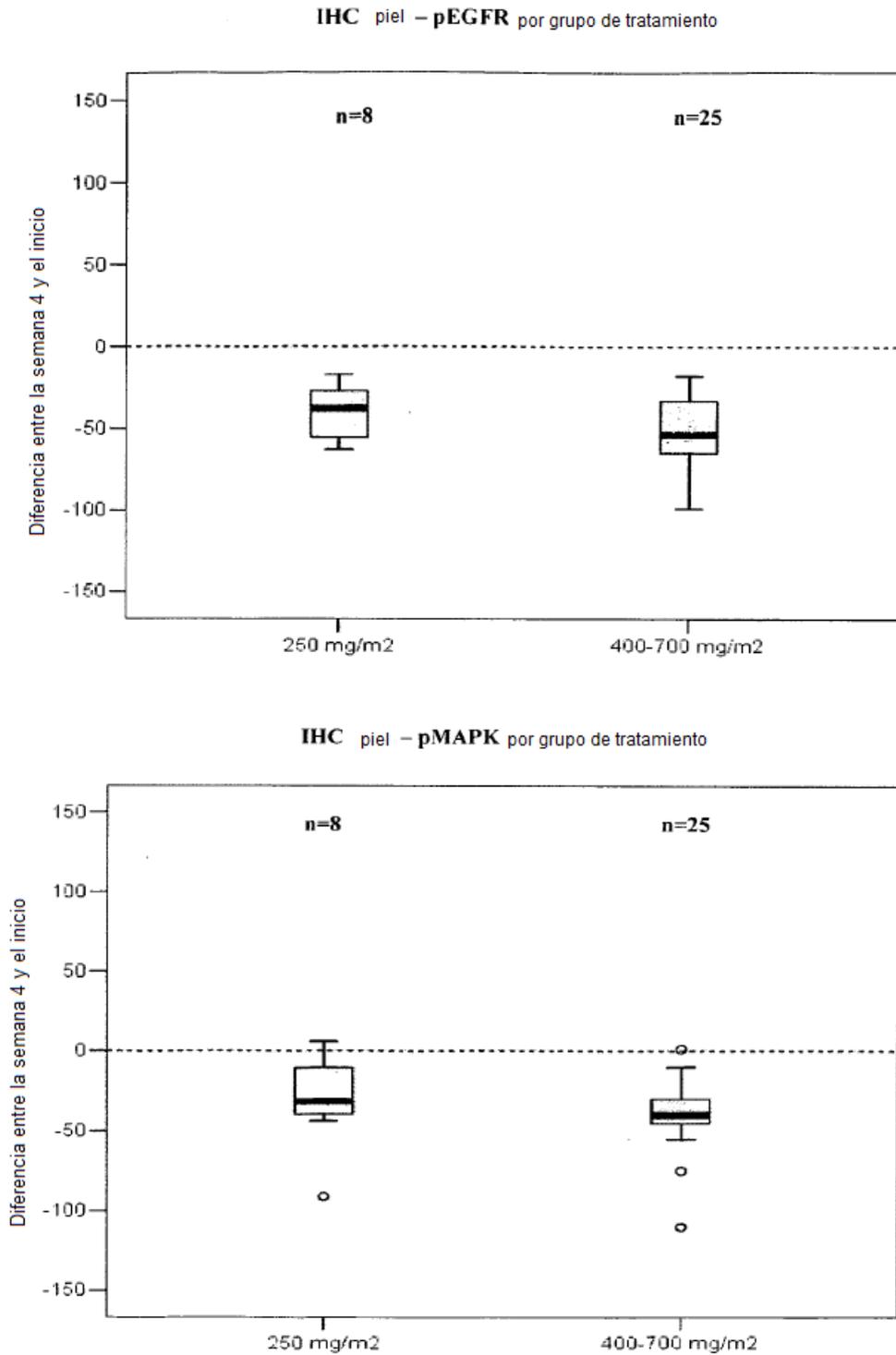
Correlación entre el estado de KRAS, la tasa de respuesta y la supervivencia libre de progreso

	Monoterapia con cetuximab		Cetuximab más FOLFIRI	
	Estado de KRAS en el tumor		Estado de KRAS en el tumor	
	Salvaje N=29	Mutado N=19	Salvaje N=29	Mutado N=19
<b>Response, N (%)</b>				
Respuesta completa	0	0	0	0
Respuesta parcial	8 (28)	0	16 (55)	6 (32)
Enfermedad estable	12 (41)	11 (58)	11 (38)	10 (53)
Enfermedad con progreso	9 (31)	8 (42)	0	3 (16)
No evaluable	0	0	2 (7)	0
<b>Overall response rate, N (%)</b>	<b>8 (28)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>16 (55)</b>	<b>6 (32)</b>
<b>[95% CI]</b>	<b>[13 a 47]</b>	<b>[0 a 18]</b>	<b>[36 a 74]</b>	<b>[13 a 57]</b>
Valor de p*	0.015		0.144	
<b>PFS Mediana, Meses</b>	-	-	9.4	5.6
<b>[95% CI]</b>			<b>[7.0 a 11.3]</b>	<b>[3.3 a 12.2]</b>
Proporción de riesgo			0.47	
Valor de p**			0.0475	

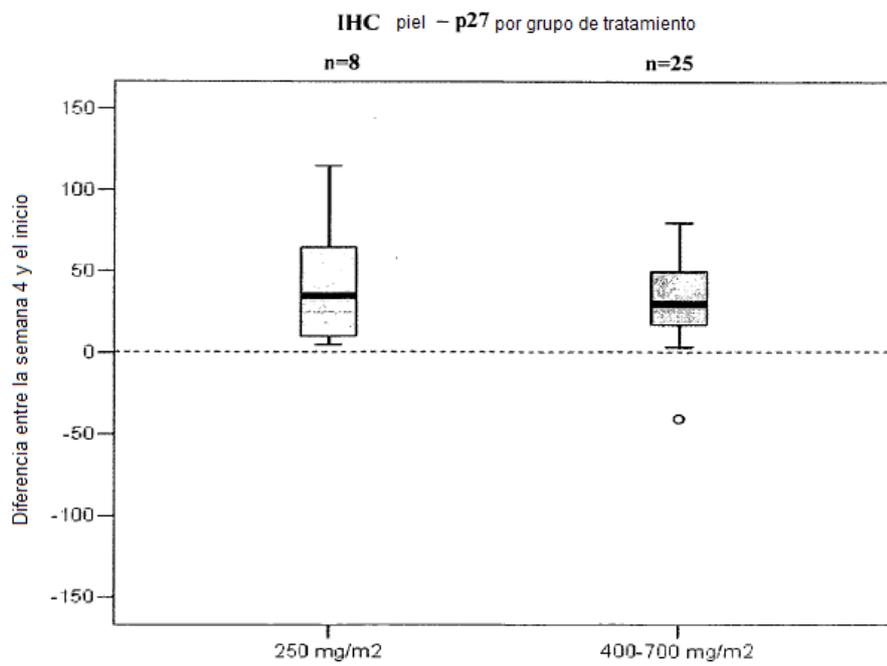
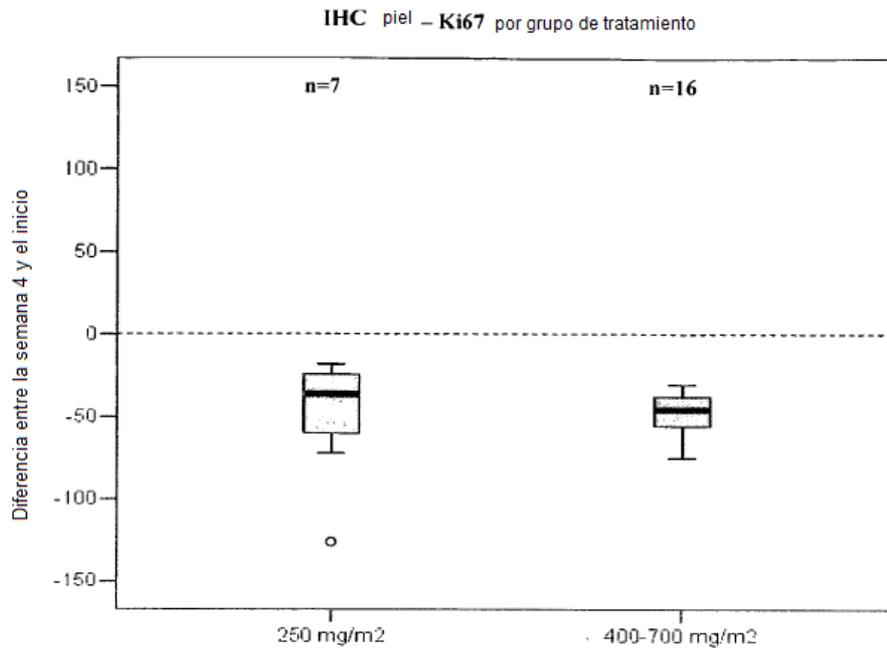
\*Prueba exacta de Fisher, \*\*Prueba de rango logarítmico

Abreviatura: PFS: supervivencia libre de progreso

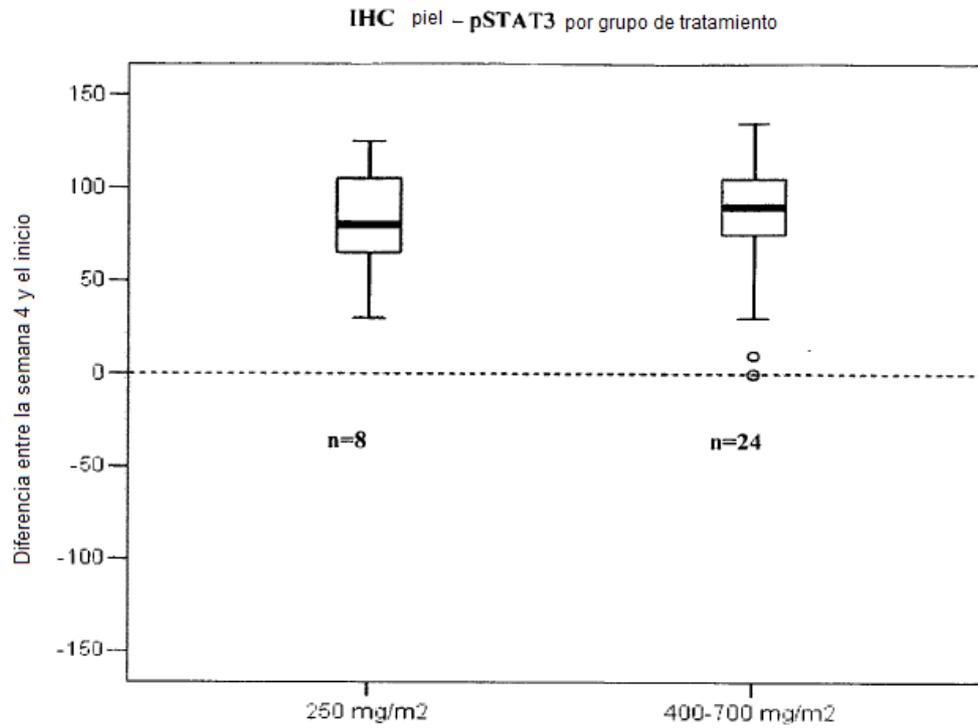
**Fig. 21.:** A: Piel



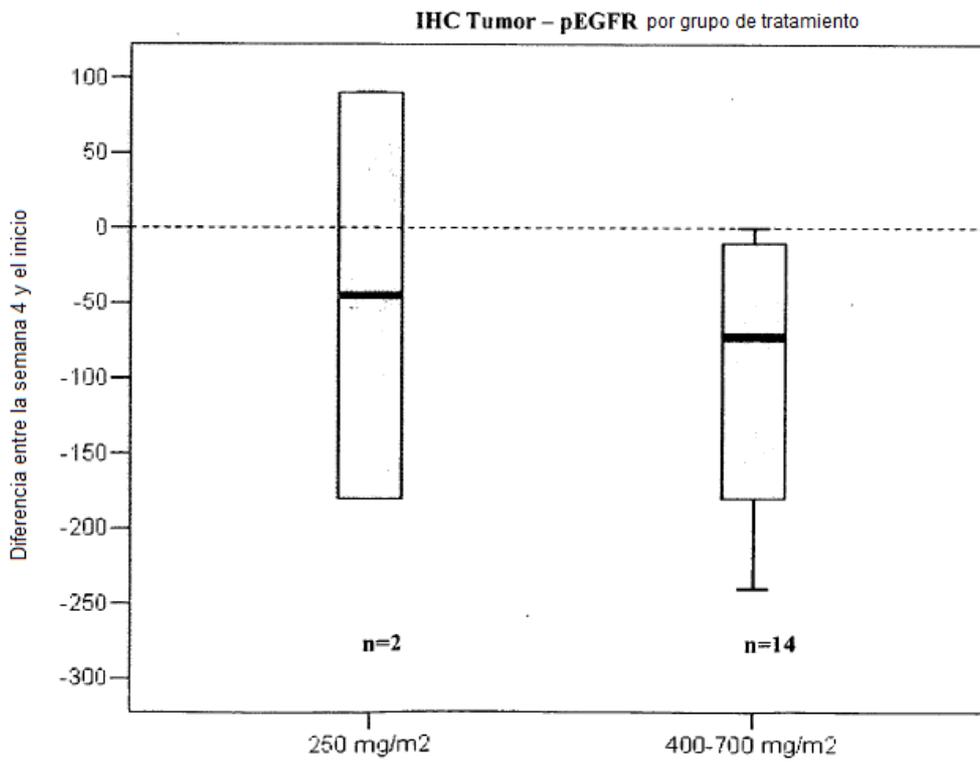
**Fig. 21** (continuación)



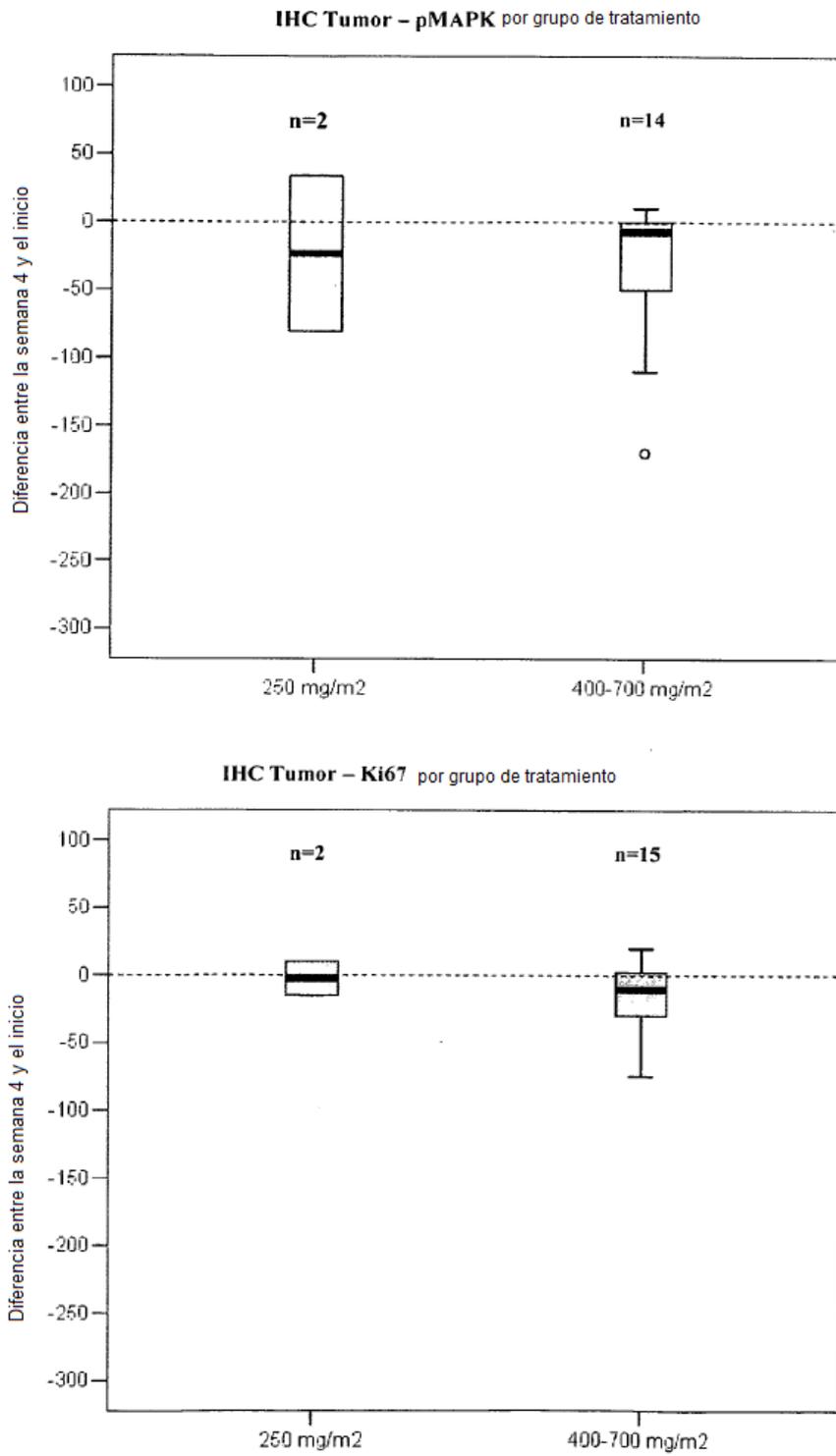
**Fig. 21** (continuación)



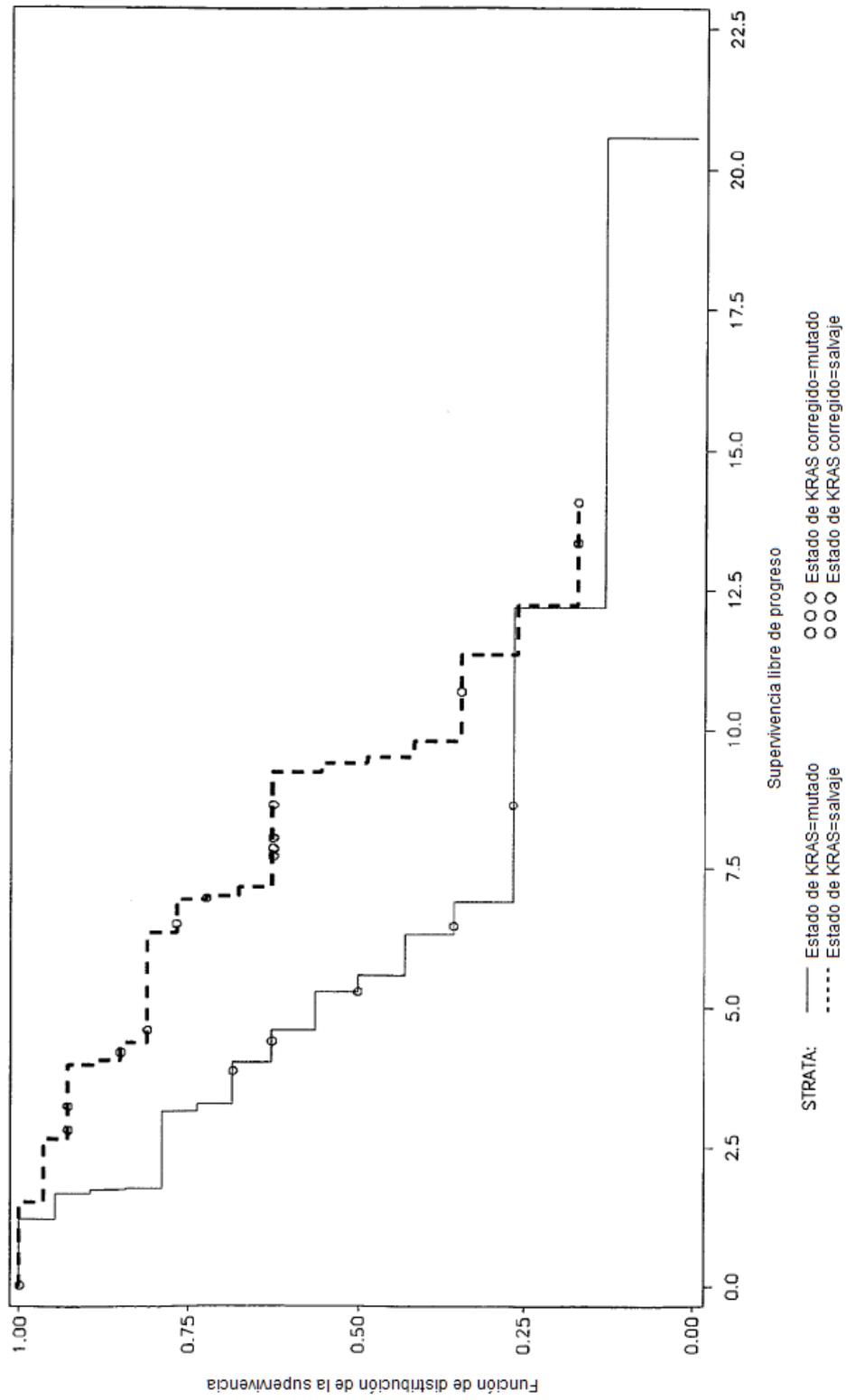
**B: Tumor:**



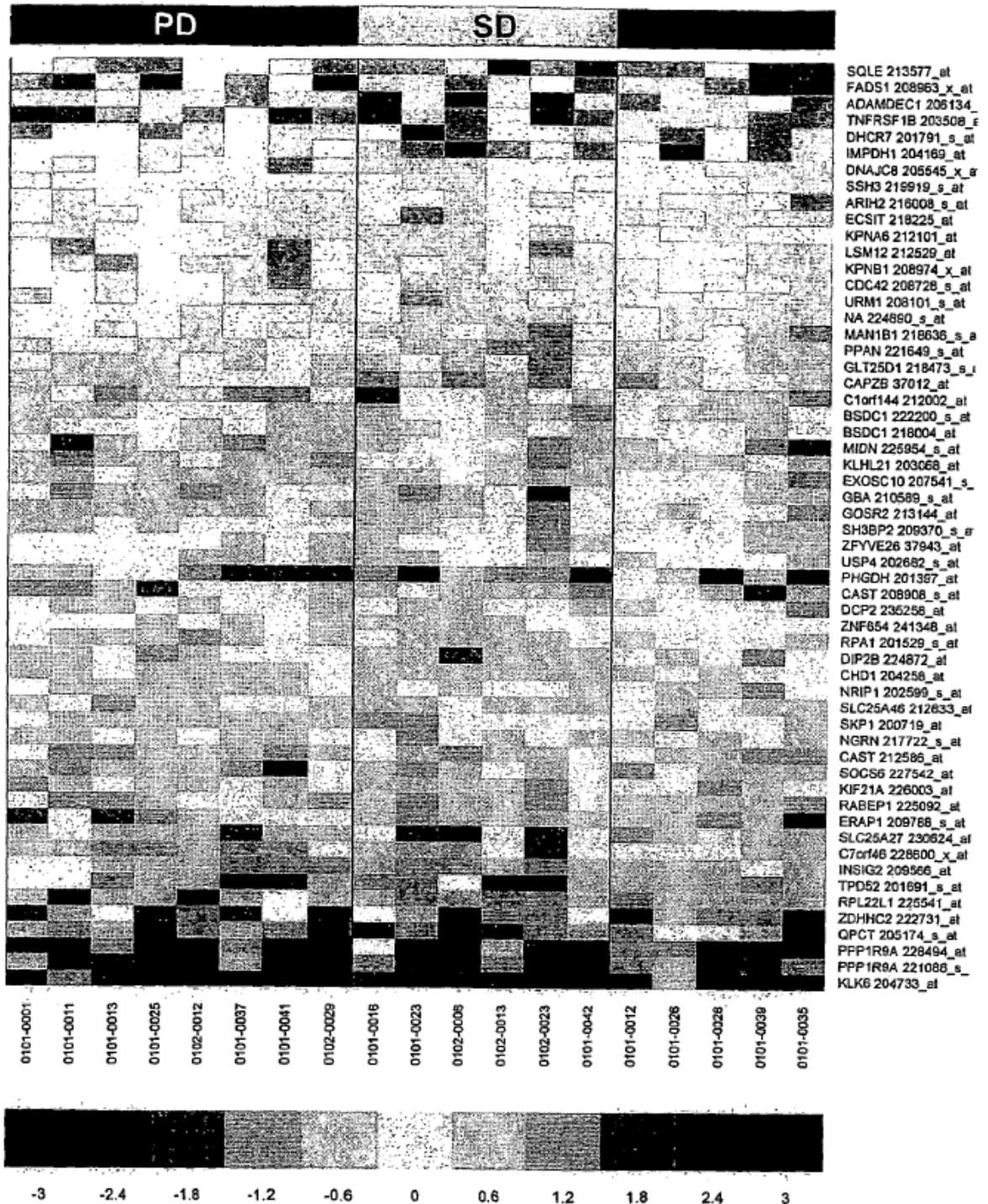
**Fig. 21** (continuación)



**Fig. 22.**



**Fig. 23.**



**Fig. 24.**

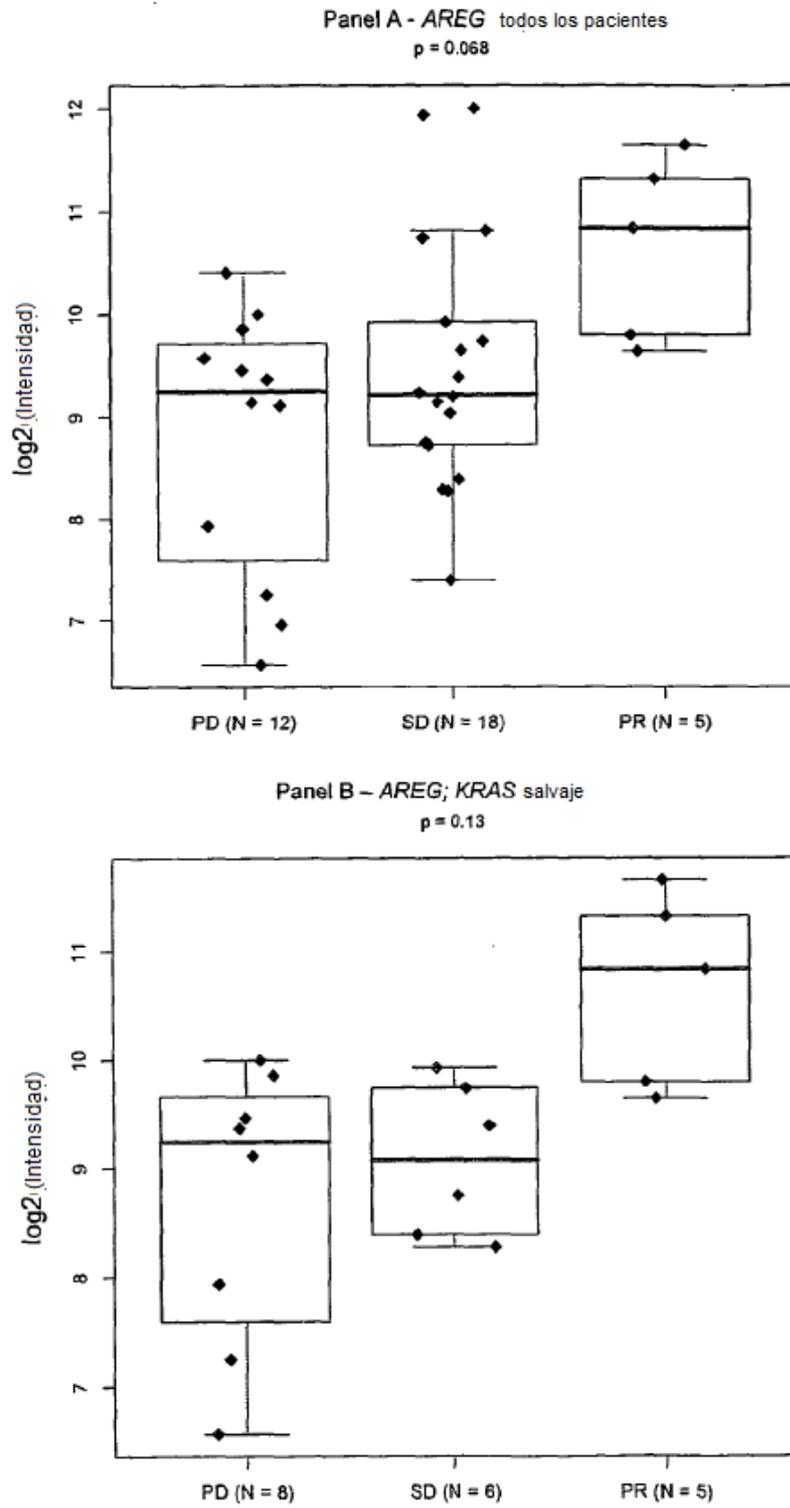


Fig. 24 (continuación)

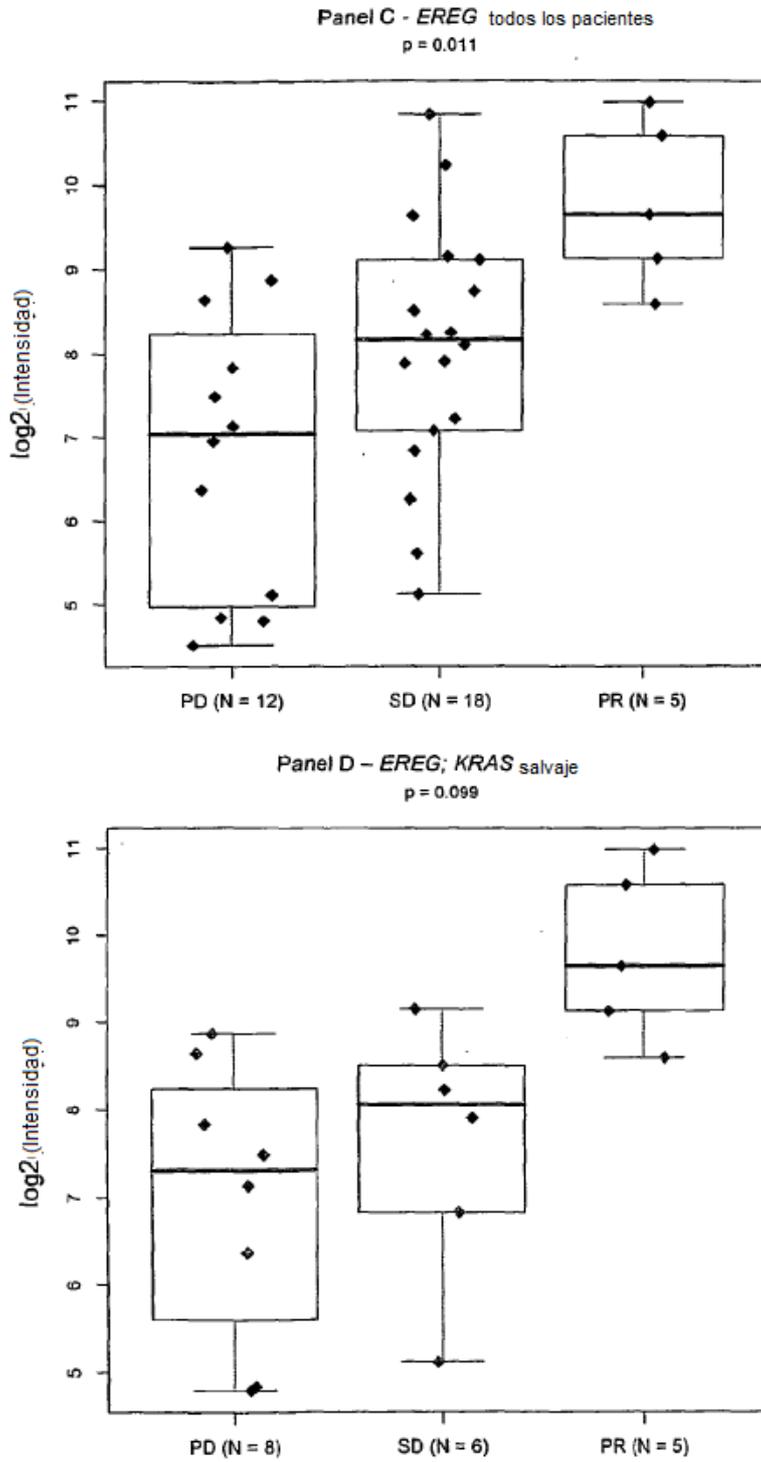
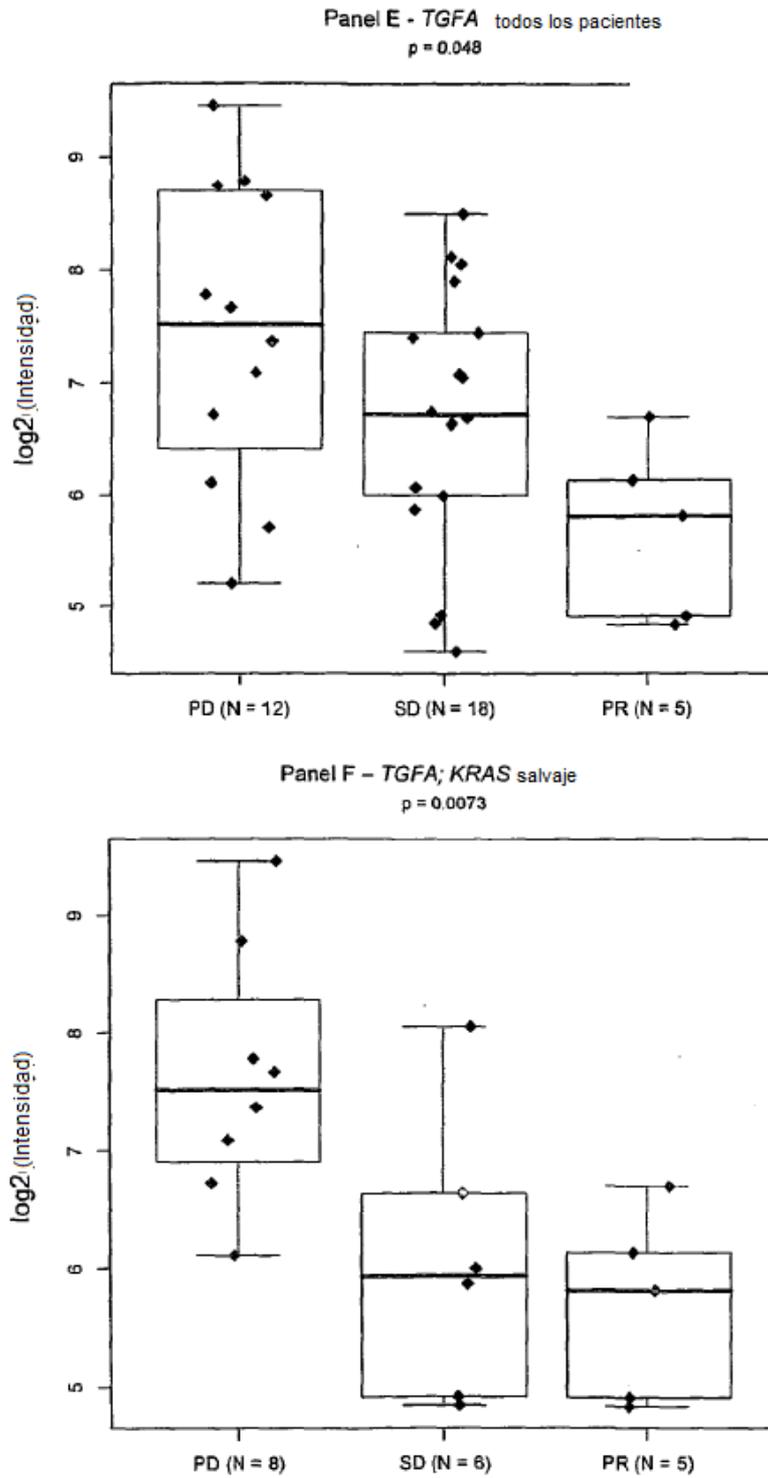


Fig. 24 (continuación)



**Fig. 25.**

**A**

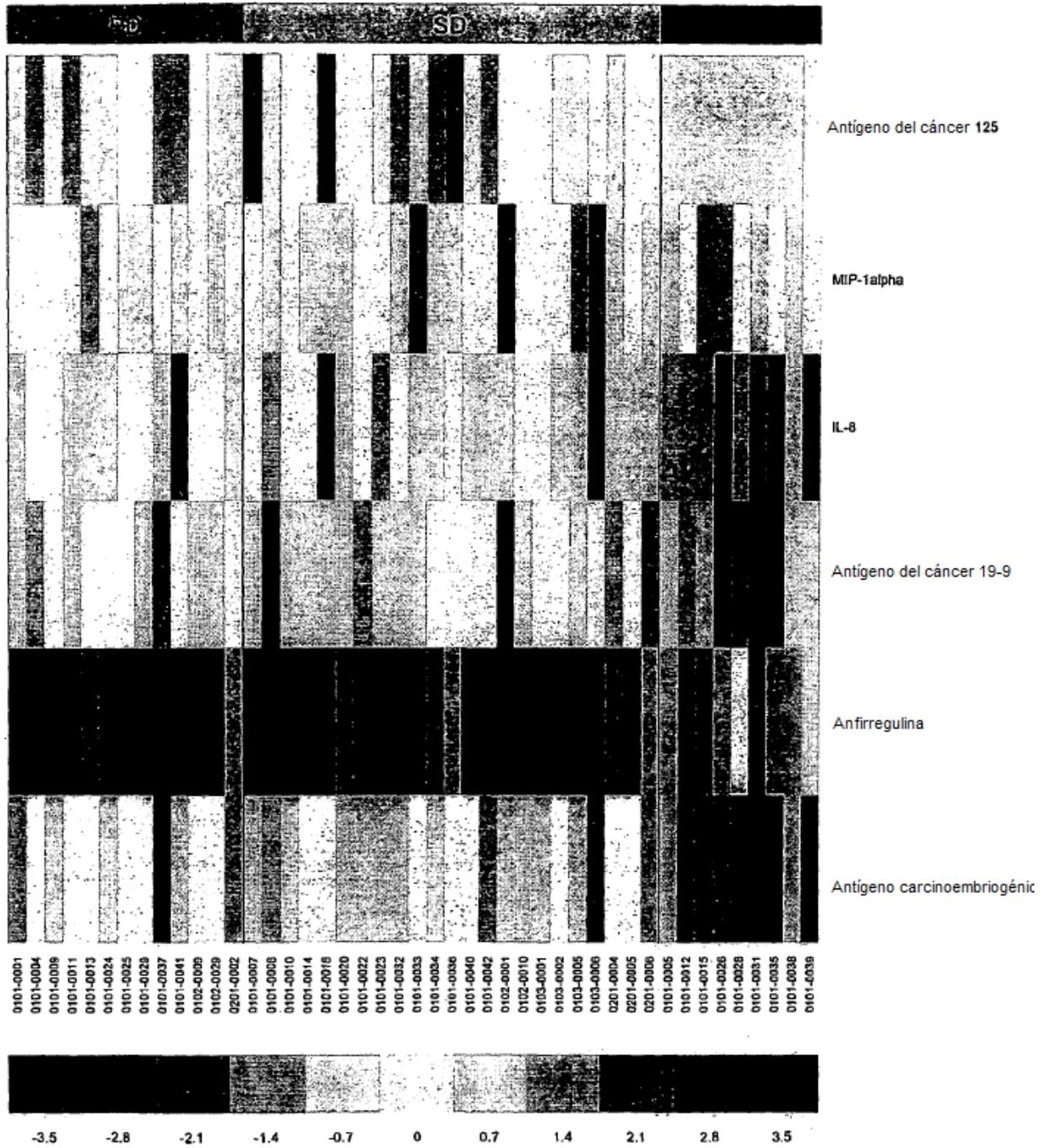
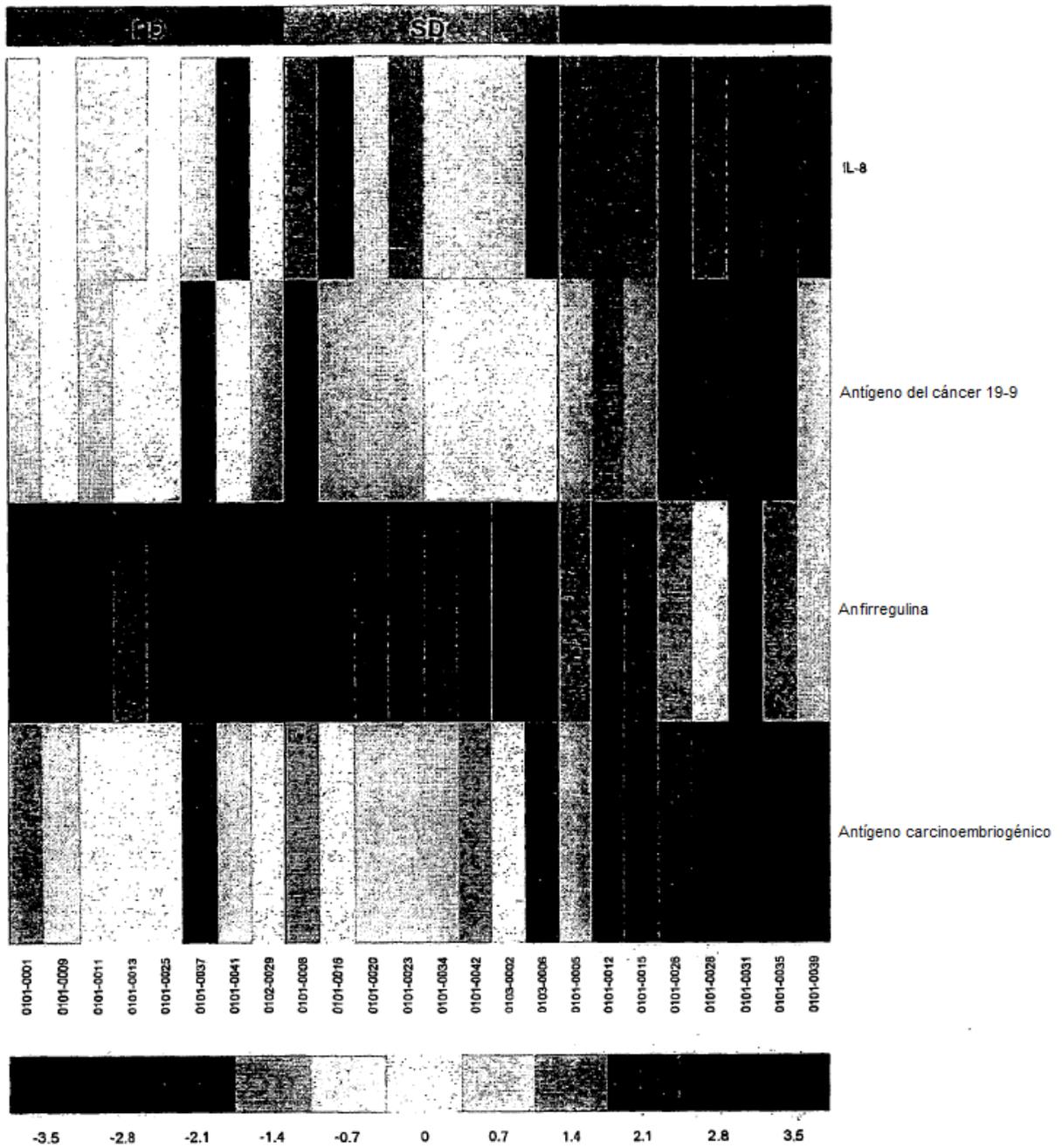


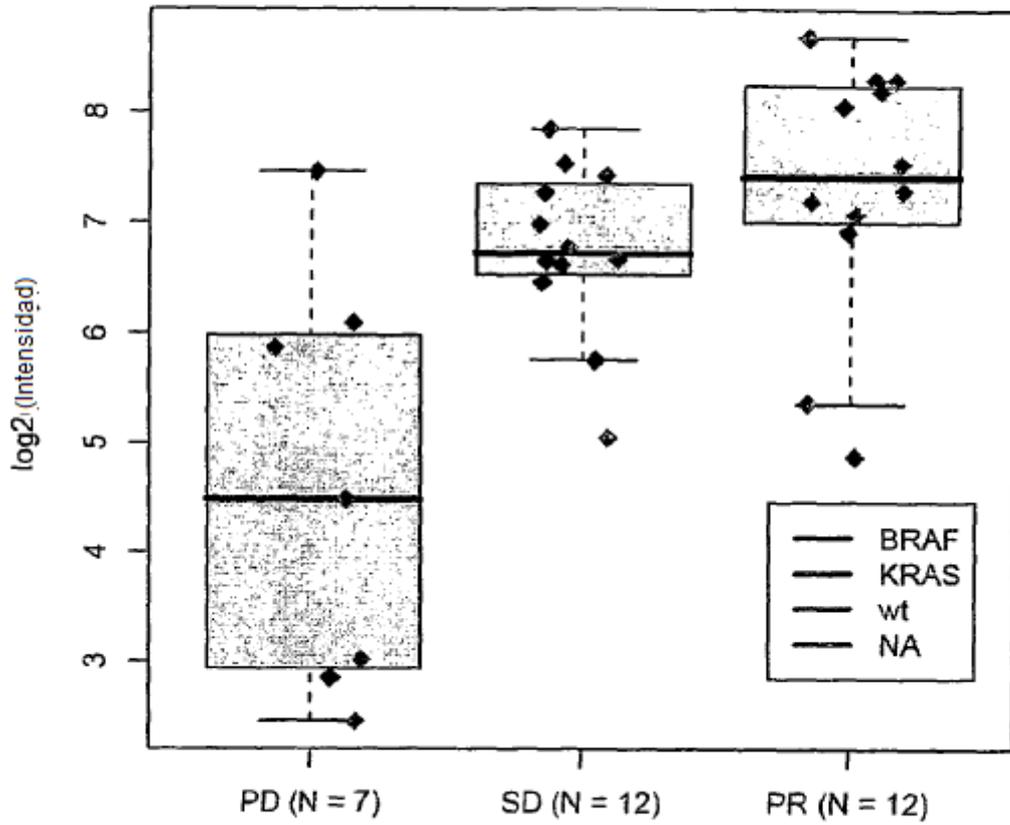
Fig. 25 (continuación)

**B**

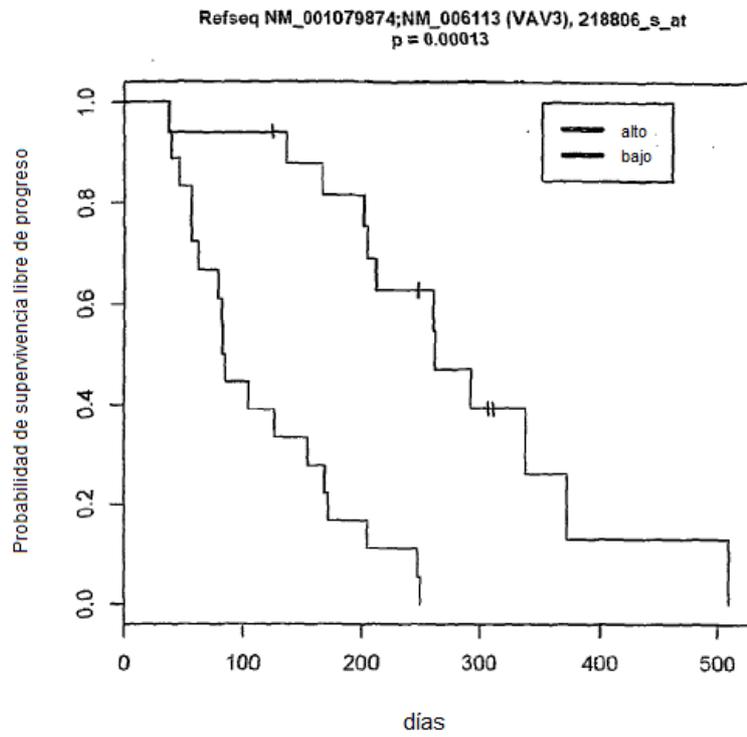


**Fig. 26:**

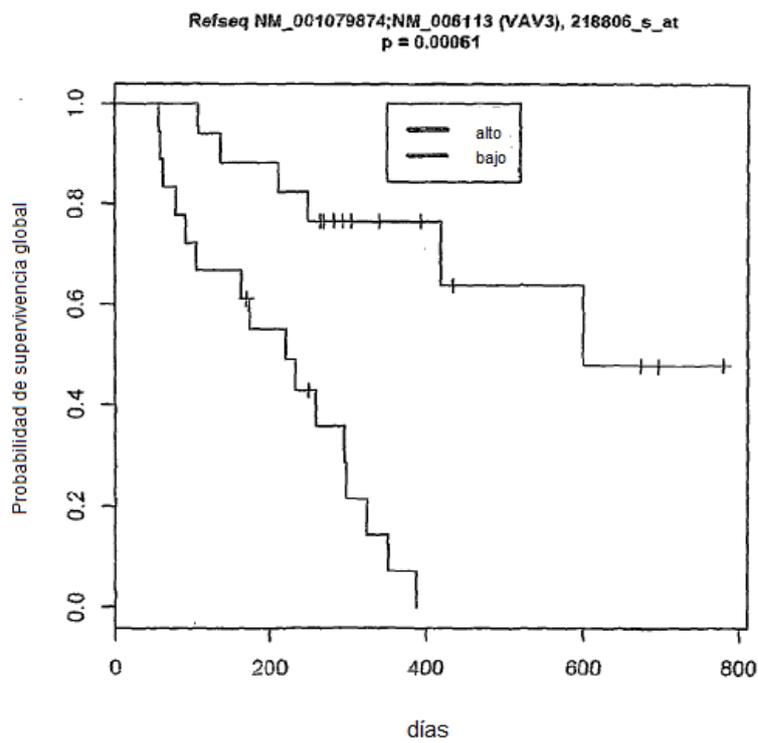
Refseq NM\_001079874;NM\_006113 (VAV3), 218806\_s\_at  
p = 0.015 (baseline, PD vs PR/SD)  
p = 0.012 (baseline, PR vs SD/PD)



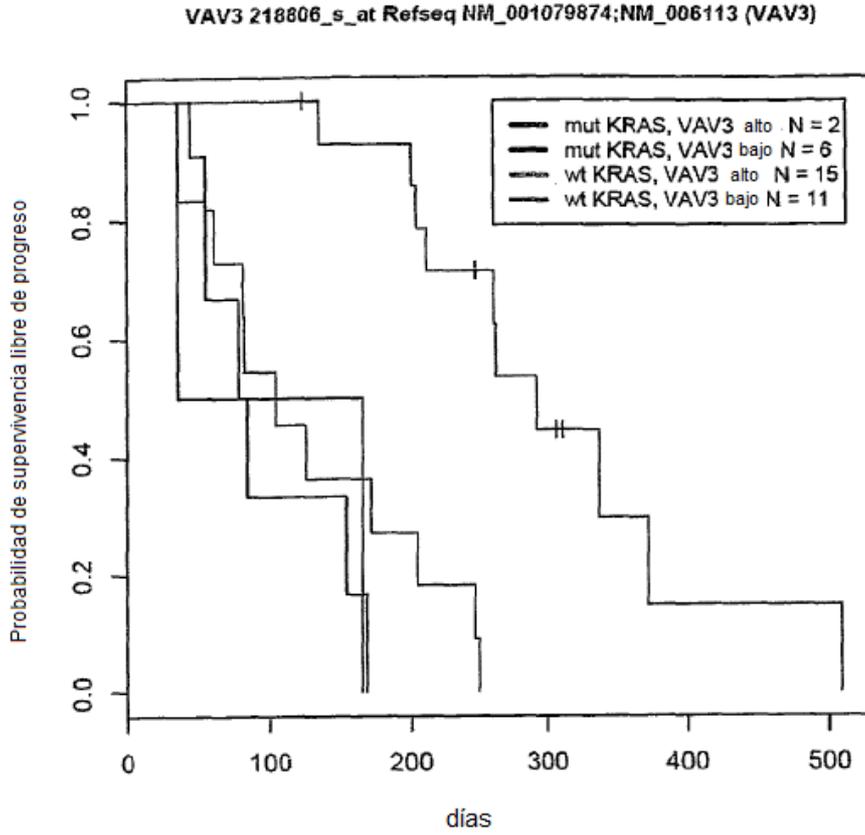
**Fig. 27:**



**Fig. 28**



**Fig. 29:**



**Fig. 30:**

