

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 213**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2015 PCT/IB2015/052796**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15162532**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2015 E 15729222 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3134119**

54 Título: **Tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:
24.04.2014 US 201461983951 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2018

73 Titular/es:
**PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:
**MARTINI, JEAN-FRANCOIS ANDRE;
TARAZI, JAMAL CHRISTO y
WILLIAMS, JAMES ANDREW**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 691 213 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

Tratamiento de cáncer

Campo

5 El campo de la presente divulgación está relacionado con la biología molecular, oncología y diagnóstico clínico. La presente invención, tal como se reivindica, proporciona un procedimiento para identificar un tumor que es sensible al tratamiento con axitinib, y axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer aplicando dicho procedimiento.

Antecedentes

10 La mayoría de los fármacos contra el cáncer son eficaces en algunos pacientes, pero no lo son en otros. Esto se puede deber a la variación genética entre tumores y se puede observar incluso entre tumores dentro del mismo paciente. La respuesta variable según el paciente es particularmente pronunciada con respecto a la terapéutica dirigida. Por lo tanto, no es posible hacer realidad todo el potencial de la terapia dirigida sin realizar pruebas adecuadas para determinar cuáles serán los pacientes que se beneficiarán de dichos fármacos. De acuerdo con los Institutos Nacionales de Salud (NIH), el término "biomarcador" se define como "una característica que se mide y evalúa objetivamente como indicador de procesos biológicos o patogénicos normales o la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica."

15 El desarrollo de un mejor diagnóstico basado en el descubrimiento de biomarcadores tiene potencial para acelerar el desarrollo de nuevos fármacos al identificar con antelación a los pacientes que presentan una mayor probabilidad de presentar una respuesta clínica a un fármaco determinado. Dichos diagnósticos tienen el potencial de reducir significativamente la magnitud, la duración y el coste de los ensayos clínicos. Las tecnologías como la genómica, proteómica e imagen molecular permiten actualmente detectar de forma rápida, sensible y segura mutaciones de gen específicas, niveles de expresión de genes en particular y otros biomarcadores moleculares. A pesar de la disponibilidad de diversas tecnologías para la caracterización molecular de tumores, la utilización clínica de biomarcadores de cáncer sigue sin ponerse en práctica en gran medida porque se han descubierto relativamente pocos biomarcadores del cáncer. Por ejemplo, un reciente artículo revisado afirma: El reto es descubrir biomarcadores del cáncer. Si bien ha habido éxitos clínicos para dirigirse a subgrupos de diversos tipos de tumor definidos molecularmente – como leucemia mieloide crónica, tumor de estroma gastrointestinal, cáncer de pulmón y glioblastoma multiforme – utilizando agentes dirigidos molecularmente, la capacidad para aplicar dichos éxitos en un contexto más amplio está gravemente limitada por la falta de una estrategia eficiente para evaluar agentes dirigidos en pacientes. El problema radica principalmente en la incapacidad para seleccionar a los pacientes con cánceres molecularmente definidos para ensayos clínicos para evaluar estos nuevos fármacos prometedores. La solución requiere biomarcadores que identifiquen de forma segura a los pacientes que tienen más probabilidad de beneficiarse de un agente en particular. (Sawyers, 2008, Nature 452:548-552, at 548.)

Comentarios como los expuestos ilustran el reconocimiento de la necesidad de descubrir biomarcadores clínicamente útiles y procedimientos de diagnóstico basados en dichos biomarcadores.

35 Existen tres tipos diferenciados de biomarcadores del cáncer: (1) biomarcadores de pronóstico, (2) biomarcadores predictivos y (3) biomarcadores farmacodinámicos (PD). Se utiliza un biomarcador de pronóstico para clasificar un cáncer, p.ej., un tumor sólido, de acuerdo con la agresividad, es decir, la velocidad de crecimiento y/o metástasis y la refractividad al tratamiento. Esto se denomina a veces distinguir entre tumores de "buen resultado" y tumores de "mal resultado". Se utiliza un biomarcador predictivo para evaluar la probabilidad de que un paciente en particular se beneficie del tratamiento con un fármaco en particular. Por ejemplo, es probable que los pacientes con cáncer de mama en los que se amplifica el gen ERBB2 (HER2 o NEU) se beneficien del tratamiento con trastuzumab (HERCEPTIN®), mientras que es improbable que los pacientes sin amplificación de gen ERBB2 se beneficien del tratamiento con trastuzumab. Un biomarcador PD es una indicación del (los) efecto(s) de un fármaco en un paciente mientras el paciente consume el fármaco. Por consiguiente, generalmente se utilizan biomarcadores PD para guiar el nivel de dosificación y la frecuencia de dosificación, durante las primeras etapas de desarrollo clínico de un nuevo fármaco. En cuanto a una explicación sobre biomarcadores del cáncer véase, p.ej., Sawyers, 2008, Nature 452:548-552. Rini y col, Clinical Cancer Research, 17(11), 3841-9 (1 de junio de 2011) desvela la presión arterial diastólica como biomarcador de la eficacia de axitinib en tumores sólidos.

50 Axitinib (conocido también como Inlyta®) es un inhibidor de receptor de tirosina quinasa de molécula pequeña administrado oralmente que actúa sobre los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR). Se cree que axitinib reduce el crecimiento de tumor y la metástasis al inhibir la angiogénesis y que reduce el crecimiento de tumor y causa regresión al actuar directamente sobre células que expresan y dependen de estos receptores. Axitinib está aprobado en varios países para el tratamiento de carcinoma metastásico de células renales (mRCC) tras la progresión de la enfermedad o la resistencia a citoquinas o sunitinib (conocido también como Sutent®).

55 A pesar de la exhaustiva investigación clínica y preclínica centrada en inhibidores de VEGFR, los mecanismos responsables de la actividad anti-tumor de dichos inhibidores siguen sin comprenderse del todo. En particular, no se comprende completamente el papel de linfocitos de infiltración de tumor a la hora de influir en el pronóstico de pacientes mRCC y la sensibilidad/resistencia a agentes anti-angiogénicos (p.ej., véase Polimeno y col., 2013, BJU

Int 112:686-696). Como ocurre con otros tipos de terapia dirigida, algunos pacientes, aunque no todos, se benefician de la terapia con axitinib. Por tanto, se necesitan procedimientos de diagnóstico basados en biomarcadores predictivos que puedan utilizarse para identificar a los pacientes con tumores que tienen probabilidad (o no) de responder al tratamiento con axitinib.

5 **Sumario**

Tal como se explica con más detalle en el presente documento, la presente divulgación se refiere en parte al hallazgo de que la infiltración de mieloides de tumor (es decir, cúmulo de diferenciación 68 "CD68") (p.ej., niveles elevados de CD68 por lo que respecta al porcentaje de células CD68 positivas y densidad de células CD68 positivas) en una muestra de tejido de un tumor de mamífero guarda correlación con una mejor supervivencia sin progresión con axitinib. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona procedimientos para identificar un tumor que tiene mayor probabilidad de responder positivamente al tratamiento con axitinib, así como a axitinib para su uso en el tratamiento de sujetos con tumores que han sido identificados por tener mayor probabilidad de responder a axitinib.

Por ejemplo, en una realización, la divulgación se refiere a un procedimiento para identificar un tumor sensible al tratamiento con axitinib, que comprende: (a) medir el nivel de expresión de polipéptido CD68 en una muestra de tejido de un tumor obtenido de un paciente humano que se está considerando para el tratamiento con axitinib; y (b) comparar el nivel de expresión de CD68 en la etapa (a) frente a un nivel de expresión de CD68 umbral determinado al medir la expresión de polipéptido CD68 en muestras de tumores de tejido obtenidas de pacientes humanos tratados previamente con axitinib y que según se ha demostrado son resistentes a axitinib y pacientes humanos tratados previamente con axitinib y que según se ha demostrado son sensibles a axitinib, en el que un nivel de expresión de CD68 por encima del nivel umbral indica que el tumor es sensible al tratamiento con axitinib. En otra realización más, la etapa de medición de la expresión del polipéptido CD68 se lleva a cabo por inmunohistoquímica. En otra realización más, la etapa de medición de la expresión de polipéptido CD68 por inmunohistoquímica se lleva a cabo por análisis de imagen a partir de la exploración completa en portaobjetos, en la que se determina el porcentaje de células CD68 positivas en la muestra. En una realización más, dichos procedimientos comprenden además la etapa de determinar la densidad de células CD68 positivas en la muestra. En una realización más, el tumor de cualquiera de dichos procedimientos se selecciona del grupo que consiste en un tumor mamario, un tumor de pulmón, un tumor renal, un tumor colorrectal y un tumor de páncreas.

En una realización más, la presente divulgación proporciona axitinib para su uso en el tratamiento de mRCC que comprenden la administración de axitinib a un paciente que, según se ha determinado, tiene un tumor mRCC que es sensible a axitinib de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

En otra realización más, la presente divulgación proporciona axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer, que comprende: a) determinar el porcentaje de células CD68 positivas en un tumor de un sujeto; y b) la administración de axitinib al sujeto si dicho porcentaje es al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 4 %, al menos 4.5 %, al menos 4.6 %, al menos 4.7 %, al menos 4.8 %, al menos 4.9 %, al menos 5.0 %, al menos 5.1 %, al menos 5.2 %, al menos 5.3 %, al menos 5.4 %, al menos 5.5 %, al menos 5.6 %, al menos 5.7 %, al menos 5.8 %, al menos 5.9 %, al menos 6.0 %, al menos 6.5 %, al menos 7.0 %, al menos 8 %, al menos 9 %, al menos 10 %, al menos 15 % o al menos 20 %.

En otra realización más, la presente divulgación proporciona axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer, que comprende a) determinar la densidad celular de células CD68 positivas en un tumor de un sujeto; y b) la administración de axitinib al sujeto si dicha densidad celular es al menos 0,05 células/mm², al menos 0,06 células/mm², al menos 0,07 células/mm², al menos 0,08 células/mm², al menos 0,09 células/mm², al menos 1,0 células/mm², al menos 1,1 células/mm², al menos 1,2 células/mm², al menos 1,3 células/mm², al menos 1,4 células/mm² o al menos 1,5 células/mm².

En una realización más, la presente divulgación proporciona axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende la administración de axitinib a un sujeto con un tumor, en el que al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 4 %, al menos 4,5 %, al menos 4,6 %, al menos 4,7 %, al menos 4,8 %, al menos 4,9 %, al menos 5,0 %, al menos 5,1 %, al menos 5,2 %, al menos 5,3 %, al menos 5,4 %, al menos 5,5 %, al menos 5,6 %, al menos 5,7 %, al menos 5,8 %, al menos 5,9 %, al menos 6,0 %, al menos 6,5 %, al menos 7,0 %, al menos 8 %, al menos 9 %, al menos 10 %, al menos 15 % o al menos 20 % de las células en dicho tumor son CD68 positivas.

En una realización más, la presente divulgación proporciona axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende la administración de axitinib a un sujeto con un tumor, en el que la densidad celular de células CD68 positivas en dicho tumor es al menos 0,05 células/mm², al menos 0,06 células/mm², al menos 0,07 células/mm², al menos 0,08 células/mm², al menos 0,09 células/mm², al menos 1,0 células/mm², al menos 1,1 células/mm², al menos 1,2 células/mm², al menos 1,3 células/mm², al menos 1,4 células/mm² o al menos 1,5 células/mm².

En una realización más, la presente divulgación proporciona axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende: a) determinar el porcentaje de células CD68 positivas en un tumor de un sujeto; b) determinar la densidad celular de células CD68 positivas en el tumor; y c) la administración de axitinib al sujeto si dicho porcentaje

es al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 4 %, al menos 4,5 %, al menos 4,6 %, al menos 4,7 %, al menos 4,8 %, al menos 4,9 %, al menos 5,0 %, al menos 5,1 %, al menos 5,2 %, al menos 5,3 %, al menos 5,4 %, al menos 5,5 %, al menos 5,6 %, al menos 5,7 %, al menos 5,8 %, al menos 5,9 %, al menos 6,0 %, al menos 6,5 %, al menos 7,0 %, al menos 8 %, al menos 9 %, al menos 10 %, al menos 15 % o al menos 20 %; y dicha densidad celular es al menos 0,05 células/mm², al menos 0,06 células/mm², al menos 0,07 células/mm², al menos 0,08 células/mm², al menos 0,09 células/mm², al menos 1,0 células/mm², al menos 1,1 células/mm², al menos 1,2 células/mm², al menos 1,3 células/mm², al menos 1,4 células/mm² o al menos 1,5 células/mm².

En una realización más, la presente divulgación proporciona axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende la administración de axitinib a un sujeto con un tumor, en el que al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 4 %, al menos 4,5 %, al menos 4,6 %, al menos 4,7 %, al menos 4,8 %, al menos 4,9 %, al menos 5,0 %, al menos 5,1 %, al menos 5,2 %, al menos 5,3 %, al menos 5,4 %, al menos 5,5 %, al menos 5,6 %, al menos 5,7 %, al menos 5,8 %, al menos 5,9 %, al menos 6,0 %, al menos 6,5 %, al menos 7,0 %, al menos 8 %, al menos 9 %, al menos 10 %, al menos 15 % o al menos 20 % de las células en dicho tumor son CD68 positivas; y en el que la densidad celular de células CD68 positivas en dicho tumor es al menos 0,05 células/mm², al menos 0,06 células/mm², al menos 0,07 células/mm², al menos 0,08 células/mm², al menos 0,09 células/mm², al menos 1,0 células/mm², al menos 1,1 células/mm², al menos 1,2 células/mm², al menos 1,3 células/mm², al menos 1,4 células/mm² o al menos 1,5 células/mm².

En una realización más, la presente divulgación proporciona cualquiera de los procedimientos y usos desvelados en el presente documento, en los que dicho tumor se selecciona del grupo que consiste en un tumor mamario, un tumor de pulmón, un tumor renal, un tumor colorrectal y un tumor de páncreas. En una realización, la presente divulgación proporciona cualquiera de los procedimientos y usos desvelados en el presente documento, en el que el cáncer o el tumor es mRCC.

En otras realizaciones más, se llevan a cabo los procedimientos y usos desvelados en el presente documento en los que la etapa de medición del porcentaje o densidad celular de células CD68 positivas se lleva a cabo aplicando inmunohistoquímica y, además, en los que se recurre al uso de análisis de imagen a partir de la exploración completa en portaobjetos de una muestra de tumor.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, se lleva a cabo la medición del contenido en macrófagos midiendo la presencia o una cantidad de proteína marcadora de macrófago. En otras realizaciones, se lleva a cabo la medición del contenido en macrófago determinando el número de macrófagos en una población de células determinada. Por ejemplo, se puede realizar la medición del contenido en macrófagos por inmunohistoquímica que implica la detección de una proteína marcadora de macrófago. En otra realización, se lleva a cabo la medición del contenido en macrófagos midiendo la presencia o una cantidad de ARNm que codifica una proteína marcadora de macrófago. Entre los ejemplos de proteínas marcadoras de macrófago se incluyen CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R y MSR1. El análisis de determinación del umbral puede incluir un análisis de curva característica operativa del receptor. Los procedimientos de la presente divulgación son útiles para analizar diversos tipos de tumores, incluyendo, p.ej., tumores mamaros, tumores de pulmón, tumores renales, tumores colorrectales y tumores de páncreas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta las características demográficas y basales de sujetos que se incluyeron en el estudio A4061032.

La Figura 2 presenta un sumario del porcentaje y densidad de células positivas para biomarcadores CD3 y CD68 según los portaobjetos frente a los bloques que se recogieron como parte del estudio A4061032.

La Figura 3 presenta un gráfico Kaplan-Meier de SSP para comparar los valores inferiores a la mediana y superiores o iguales a la mediana del porcentaje y densidad de células positivas para el biomarcador CD68.

La Figura 4 presenta un gráfico Kaplan-Meier para comparar los valores inferiores a la mediana o superiores o iguales a la mediana del porcentaje y la densidad de células positivas para el biomarcador CD68 en pacientes con tratamiento previo con Sutent®.

La Figura 5 presenta un gráfico de Kaplan-Meier de SSP para comparar los valores inferiores a la mediana y superiores o iguales a la mediana del porcentaje y densidad de células positivas para el biomarcador CD3.

La Figura 6 presenta un gráfico Kaplan-Meier de SSP para comparar los valores inferiores a la mediana y superiores o iguales a la mediana del porcentaje y la densidad de células positivas para el biomarcador CD3 en pacientes con tratamiento previo con Sutent®.

La Figura 7 presenta un resumen de SG según el estrato de punto de corte inferior y superior o igual a la mediana para cada porcentaje y densidad de células positivas de cada uno de los biomarcadores CD3 y CD68.

La Figura 8 presenta un resumen de SG según el estrato de punto de corte inferior y superior o igual a la mediana para cada porcentaje y densidad de células positivas de cada uno de los biomarcadores CD3 y CD68 en pacientes con tratamiento previo de con Sutent®.

5 La Figura 9 presenta un gráfico Kaplan-Meier de SG para comparar los valores inferiores, superiores o iguales a la mediana para los biomarcadores CD3 y CD68 en cuanto al porcentaje y densidad de células positivas en pacientes con tratamiento previo con Sutent®.

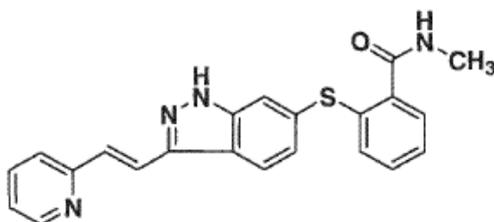
La Figura 10 presenta un resumen de los biomarcadores CD3 y CD68, porcentaje y densidad de células positivas, según la categoría de respuesta.

10 La Figura 11 presenta un resumen de los biomarcadores CD3 y CD68, porcentaje y densidad de células positivas, según la categoría de respuesta en pacientes con tratamiento previo de Sutent®.

Descripción detallada

Definiciones

15 Tal como se utiliza en el presente documento, Inlyta®, "AG-13736" y "axitinib significa 6-[2-(metilcarbamoil)fenilsulfanil]-3-E-[2-(piridin-2-il)etenil]indazol, que presenta la siguiente estructura química, incluyendo sales y polimorfos del mismo:



20 Tal como se utiliza en el presente documento, "proteína marcador de macrófago" significa una proteína de la superficie de la célula macrófago, cuya detección es útil para identificar macrófagos entre otros tipos de células presentes en una muestra de tejido de un tumor. Entre los ejemplos de proteínas marcadoras de macrófago humanas se incluyen CCR2, CD14, CD68, CD163, CSFIR y MSRI. En la puesta en práctica de la presente divulgación se pueden emplear otras proteínas marcadoras de macrófago

Tal como se utiliza en el presente documento curva de la "característica operativa del receptor" (ROC) significa un gráfico del índice falso positivo (sensibilidad) frente al índice verdadero positivo (especificidad) para un sistema clasificador binario. En la construcción de una curva ROC, se aplican las siguientes definiciones:

25 Índice de falsos negativos "IFN" = 1 – IVP

Índice de verdaderos positivos "IVP" = verdaderos positivos / (verdaderos positivos + falsos negativos)

Índice de falso positivo "IFP" = falsos positivos / (falsos positivos + verdaderos negativos)

Tal como se utiliza en el presente documento "respuesta" o "responder" a un tratamiento significa, en relación con el tumor tratado, que el tumor presenta: (a) ralentización del crecimiento, (b) cese del crecimiento o (c) regresión.

30 Tal como se utiliza en el presente documento "análisis de determinación de umbral" significa el análisis de un grupo de datos que representan un tipo de tumor determinado, p.ej., carcinoma de célula renal humano, para determinar la puntuación umbral para ese tipo de tumor en particular. El grupo de datos que representa un tipo de tumor determinado puede incluir, para cada tumor de un grupo de dichos tumores: (a) datos de respuesta de tumor reales (respuesta y falta de respuesta al tratamiento, como axitinib, y (b) contenido en macrófagos y/o niveles de expresión de CD68.

Tal como se utiliza en el presente documento, "puntuación umbral" significa una puntuación por encima de la cual se clasifica un tumor como probablemente sensible a dicho tratamiento, por ejemplo con axitinib.

40 Tal como se utiliza en el presente documento "nivel de expresión CD68 o nivel de expresión de polipéptido CD68" significa el nivel de proteína CD68 que se expresa en una muestra de tumor y que puede determinarse a través de cualquier técnica de análisis apropiada, como inmunohistoquímica. Asimismo, el "nivel de expresión de CD68" puede expresarse mediante diversos términos, entre los que se incluye el porcentaje de células en una muestra dada que se determinan como "CD68 positivas" y la densidad de células en una muestra dada que se determinan como "CD68 positivas."

Tal como se utiliza en el presente documento, "CCR2" (receptor de quimiocina (motivo C-C) también conocido como CD 192, CKR2, CMKBR2, MCP-IR, CC-CKR-2, FLJ78302, MGC103828, MGC111760 y MGC168006) significa la proteína humana codificada por el gen identificado por Entrez ID Gen No. 729230 y variantes alélicas del mismo

5 Tal como se utiliza en el presente documento, "CD14" significa la proteína humana codificada por el gen identificado por Entrez ID Gen No. 929 variantes alélicas del mismo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "CD68" (también conocido como GP110; SCARD1; y DKFZp686M 18236) significa la proteína humana codificada por el gen identificado por Entrez ID Gen No. 968 y variantes alélicas del mismo.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, una célula "CD68 positiva" es una célula en la que se detecta la presencia de CD68 a través de cualquier técnica de análisis apropiada, como inmunohistoquímica.

Tal como se utiliza en el presente documento, "CD163" (también conocido como MI 30 y MM 130) significa la proteína humana codificada por el gen identificado por Entrez ID Gen No. 9332 y variantes alélicas del mismo.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, "CSF1R" (receptor de factor de estimulación de colonia 1 también conocido como CSFR, FMS, FIM2, C-FMS y CD115) significa la proteína humana codificada por el gen identificado por Entrez ID Gen No. 1436 y variantes alélicas del mismo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "MSR1" (receptor eliminador de macrófago 1 también denominado CD204, SCARA1, SR-A, phSRI y phSR2 significa la proteína humana codificada por el gen identificado por Entrez ID Gen No. 4481 y variantes alélicas del mismo.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, "CR" significa cociente de riesgos. En las Figuras 3, 4, 5, 6 y 9, asumiendo los riesgos proporcionales, un cociente de riesgo superior a 1 indica una reducción del índice de riesgos en favor de < mediana; un cociente de riesgo inferior a 1 indica una reducción del índice de riesgos a favor de >= mediana; y se produjeron los valores p de rango logarítmico solamente cuando $N \geq 10$ en ambos grupos de comparación. En las Figuras 7 y 8, asumiendo riesgos proporcionales, un cociente de riesgo superior a 1 indica una reducción del índice de riesgo a favor de < mediana; un cociente de riesgo inferior a 1 indica una reducción del índice de riesgos a favor de >= mediana; y se produjo un valor p de rango logarítmico solamente cuando $N \geq 10$ en ambos grupos de comparación; y se produjo un cociente de riesgos estadístico solamente cuando $N \geq 5$ en ambos grupos de comparación; sin embargo, el valor p de rango logarítmico y el cociente de riesgos se eliminaron cuando se observó evento cero en cada uno de los grupos.

Estudios clínicos

30 Inlyta®, en adelante denominado axitinib, es un inhibidor de los receptores de tirosina quinasa de molécula pequeña administrado oralmente que actúa en los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR). Es de esperar que axitinib reduzca el crecimiento de tumor y la metástasis al inhibir la angiogénesis y que reduzca el crecimiento de tumor y cause regresión al actuar directamente sobre células que expresan y que son dependientes de estos receptores. Axitinib está aprobado en varios países para el tratamiento de carcinoma metastásico de células renales (mRCC) tras la progresión de la enfermedad o resistencia con citoquinas o sunitinib.

40 El estudio A4061032 (Identificador oficial de ensayos clínicos: NCT00678392) fue un ensayo de registro en fase 3 titulado "Axitinib (AG-013736) como terapia de segunda línea para carcinoma metastásico de células renales: ensayo Axis". El ensayo se diseñó para demostrar que axitinib es superior a sorafenib para retrasar la progresión de tumor en pacientes con mRCC tras el fracaso de un régimen de primera línea. Se planificó el reclutamiento de un total de 650 pacientes y en última estancia se reclutó para el estudio a 723 sujetos.

45 Tal como se describe con mayor detalle en los Ejemplos, se recogieron muestras de tumor fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE) de los pacientes que participaron en A4061032 y a los que se proporcionó un consentimiento específico para la recogida de la muestra de tumor. Se evaluó la infiltración de mieloide de tumor (cúmulo de diferenciación 68 "CD68") o linfocito (cúmulo de diferenciación 3 "CD3") por inmunohistoquímica (IHC) en muestras de tumor de 52 pacientes tratados con axitinib. El objetivo fue investigar la posible asociación de estos biomarcadores con la eficacia acorde a la hipótesis de que la infiltración mieloide confiere resistencia a los agentes anti-angiogénicos dirigidos a la ruta VEGF-VEGFR2 (véase Shojaei y col. (2007) Nat. Biotechnol. 25(8):911-920; and Lin y col. (2010) Eur. J. Cáncer Suppl. 8(7):191).

50 Se llevó a cabo la evaluación de CD3 y CD68 por análisis de imagen a partir de la exploración completa en portaobjetos. Se rodeó con un círculo la región de interés y se aplicó el algoritmo de análisis de imagen. Se midió el porcentaje de células positivas (número de células positivas/número de células total) y la densidad de células positivas (p.ej., el número de células positivas/mm²). Algunos de los pacientes donaron bloques FFPE y algunos donaron portaobjetos cortados de los bloques. Se analizaron las muestras de todos los pacientes, ya fueran proporcionadas como portaobjetos o bloques.

Hubo 52 pacientes evaluables en cuanto a los datos IHC, 33 de los cuales fueron tratados previamente con Sutent® (sunitinib). No hubo ninguna correlación entre los datos CD3 y cualquiera de los criterios de valoración medidos. Tal como se describe con mayor detalle en los Ejemplos, para CD68 el porcentaje de células positivas y la densidad celular estuvieron estrechamente correlacionadas y fueron dos veces más altas en pacientes con una respuesta objetivo frente a los que no respondieron.

Independientemente del tratamiento anterior, la mediana de la supervivencia sin progresión (SSP) en los pacientes con valores CD68 \geq mediana (límite = 5,21 % células positivas o densidad celular de 0,08 células/mm²) fue 12,0 meses para ambos puntos de corte frente a 3,7 y 3,8 meses, respectivamente, para pacientes con valores de biomarcador < mediana (cociente de riesgo [CR] = 0,42, valor p de rango logarítmico \leq 50,01). Para los pacientes tratados previamente con Sutent®, se observó una tendencia similar de la SSP con significancia estadística marginal (valores p: 0,066 y 0,056 para % células positivas y densidad celular, respectivamente). Se observaron tendencias similares de eficacia favorable para la respuesta objetivo y la supervivencia global (SG) para pacientes con un recuento celular CD68 relativamente más alto, si bien estas diferentes no fueron estadísticamente significativas cuando se evaluó a todos los pacientes en conjunto o cuando se evaluaron solamente los pacientes tratados previamente con Sutent®.

Se llevaron a cabo los análisis de características operativas de receptor (ROC) adicionales para comprender mejor la sensibilidad y especificidad de los niveles de CD68 de tumor basales y para optimizar la definición de los puntos de corte de CD68 a partir de la mediana de los valores de CD68 seleccionados iniciales. SE seleccionaron los valores límite por defecto de 2, 4, 6 y 8 meses de SSP y una vez más, se observó que los pacientes con un mayor porcentaje de células CD68 positivas y densidad celular tenían valores más prolongados de SSP (o lo que equivale a una menor posibilidad de progresión de la enfermedad o fallecimiento) en cada uno de los cuatro puntos temporales de SSP.

Tal como se describe con mayor detalle en los Ejemplos, se observaron los valores máximos observados de sensibilidad, especificidad y área bajo la curva (AUC) a los 2 meses de SSP, siendo las AUC de la curva ROC 0,776 y 0,809 para el porcentaje de células CD68 positivas y densidad celular, respectivamente, lo cual indica una precisión de diagnóstico global convincente en cuanto a la SSP utilizando niveles de expresión de CD68. Los puntos límite óptimos para predecir SSP a los 6 meses fueron 4,41 % y 0,06 células/mm² para porcentaje de CD68 y densidad de células positivas, respectivamente. Los valores fueron similares para pacientes tratados previamente con Sutent®.

Se utilizó el análisis ROC también para evaluar CD68 frente a TRO (tasa de respuesta objetiva). Tal como se describe con más detalle en los ejemplos, las AUC fueron 0,791 y 0,784 en cuanto al porcentaje de células CD68 positivas y densidad celular, respectivamente, lo cual indica una vez más una precisión global convincente para predecir TRO utilizando los niveles de expresión de CD68. Los puntos límite óptimos para predecir TRO fueron 9,42 % y 0,13 células/mm² en cuanto al porcentaje de células CD68 positivas y la densidad celular, respectivamente. Los valores fueron similares para los pacientes tratados previamente con Sutent®. En cuanto a la probabilidad de supervivencia a los 21 meses, el valor mediana para el ensayo, el análisis ROC no presentó ninguna asociación estadísticamente significativa, con una AUC de 0,559.

En conclusión, independientemente del tratamiento anterior, se observaron SSP favorables para los pacientes con niveles de CD68 de tumor más altos. La mediana de SSP en pacientes con valores CD68 >mediana fue 12,0 meses para ambos puntos de corte frente a 3,7 y 3,8 meses para pacientes con valores de biomarcador <mediana (CR = 0,42, valor p de rango logarítmico \leq 0,01). El análisis ROC indicó un valor predictivo convincente para estos datos a los 2, 4, 6 y 8 meses y puntos de corte refinados (a los 6 meses — 4,41 % y 0,06 células/mm² para el porcentaje de células CD68 positivas y densidad celular).

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere al hallazgo de que una mayor expresión de CD68 está asociada con una mayor TRO y SSP más prolongada para pacientes tratados con un inhibidor de VEGFR, como axitinib. La ausencia de asociación con SG puede deberse a que se confundan los tratamientos tras la progresión después de la progresión con axitinib. Estas observaciones se corresponden con un mecanismo de una mayor producción de VEGF y el estado angiogénico asociado con una mayor infiltración de macrófago y, por lo tanto, una mayor sensibilidad a los efectos de tratamiento de axitinib. El análisis ROC de la SSP, el criterio de valoración de registro, demostró una mayor sensibilidad y especificidad tras dos meses de tratamiento.

Anteriormente, se ha notificado que la expresión de CD68 está asociada con el resultado para pacientes mRCC que reciben tratamiento de tivozanib (Lin y col. (2010) Eur. J. Cáncer Suppl. 8(7):191). Asimismo, se ha demostrado anteriormente que las células mieloides (CD11b Gr+) confieren resistencia a bevacizumab en un modelo de animal de pulmón (Shojaei y col. (2007) Nat Biotechnol. 25(8):911-920). Estos datos se corresponderían con resultados más débiles para pacientes con niveles de tumor CD68 superiores. Sin embargo, esto no se observó en este estudio.

Para los pacientes RCC, se ha realizado un significativo progreso en la identificación de biomarcadores de pronóstico, pero no se han identificado marcadores predictivos de eficacia para inhibidores VEGFR dirigidos como axitinib. De acuerdo con una reciente revisión (Tonini G y col. (2011) Exper Rev Anticáncer Ther 11(6):921-930), la

selección de la terapia más apropiada para pacientes RCC sigue dependiendo de los criterios de riesgo (MSKCC) y otros criterios de pronóstico. Por otra parte, los autores afirman que estos criterios combinados proporcionan información sobre el resultado de paciente RCC y que son necesarios factores de respuesta predictivos para terapia contra mRCC. Es necesario validar posibles marcadores en ensayos clínicos aleatorizados (*id.*). Se cita asimismo la normalización de una colección de tejidos y análisis como un importante reto para desarrollar biomarcadores moleculares para una posible terapia guía (Sonpavde G and Choueiri T, (2012) Br J Cancer 107(7):1009-1016).

A continuación, se desvelan procedimientos y técnicas de análisis que se pueden utilizar para llevar a cabo la presente divulgación.

Muestra de tejido

Se puede utilizar una muestra de tejido de un tumor en un paciente humano como fuente de ARN, una fuente de proteína o una fuente de secciones finas para inmunohistoquímica (IHC), para poder determinar el nivel de expresión de CD68 en la muestra tal como se describe en la presente divulgación. Se puede obtener la muestra de tejido utilizando instrumentos y procedimientos de biopsia de tumor convencionales. Biopsia endoscópica, biopsia por escisión, biopsia por incisión, biopsia con aguja fina, biopsia con punción, biopsia por raspado y biopsia cutánea son ejemplos de procedimientos médicos reconocidos que puede utilizar la persona especializada en la materia para obtener muestras de tumor. La muestra de tejido de tumor deberá ser lo suficientemente grande como para proporcionar suficiente ARN, proteína o secciones finas para medir el gen marcador, p.ej., el nivel de expresión de CD68 o la visualización de macrófagos por IHC, p.ej., expresión de células CD68 positivas.

La muestra de tejido de tumor puede presentar cualquier forma que permita la medición del contenido en macrófago o, específicamente CD68. Es decir, la muestra de tejido deberá ser suficiente para extracción de ARN, extracción de proteína o preparación de secciones finas. Por consiguiente, la muestra de tejido puede ser reciente, conservarse a través de técnicas criogénicas adecuadas o conservarse a través de técnicas no criogénicas. Un procedimiento normal para tratar las muestras de biopsia clínicas consiste en fijar la muestra de tejido en formalina y después integrarla en parafina. Las muestras de esta forma se conocen normalmente como tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE). Las técnicas adecuadas para la preparación de tejidos para su posterior análisis son muy conocidas entre las personas especializadas en la materia.

Contenido en macrófago

Al poner en práctica la presente divulgación, se puede llevar a cabo la determinación del nivel del contenido en macrófago (p.ej., el número de macrófagos o la expresión del marcador de macrófago como CD68, p.ej., expresión de proteína marcadora de macrófago o expresión de ARNm que codifica una proteína marcadora de macrófago como CD68) en una muestra de tejido (p.ej., de un tumor) a través de cualquier procedimiento adecuado, entre varios. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la medición del contenido en macrófagos indirectamente midiendo la expresión de uno o más genes conocidos como útiles como marcadores de macrófago, como CD68. Dentro de la técnica se conocen varios procedimientos para medir la expresión de gen. Se pueden aplicar dichos procedimientos para determinar el nivel de proteínas marcadoras de macrófago o ARNm que codifica proteínas marcadoras de macrófago. Entre los ejemplos de genes de marcador de macrófago humano se incluyen CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R y MSR1. Se pueden utilizar asimismo otros marcadores de macrófago.

Análisis de ARN

El análisis de micromatriz convencional y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) son ejemplos de procedimientos para determinar el nivel de expresión de gen de marcador de macrófago a nivel de ARN. En algunas realizaciones de la divulgación, se extrae ARN de las células, tumor o tejido de interés utilizando protocolos normales. En otras realizaciones, se lleva a cabo el análisis de ARN aplicando técnicas que no requieren aislamiento de ARN.

Aislamiento de ARN

Los procedimientos para extraer de forma rápida y eficiente ARNm eucariota, es decir ARN poli(a) desde muestras de tejido están perfectamente establecidos y son conocidos entre las personas especializadas en la materia. Véase, p.ej., Ausubel y col., 1997, Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons. La muestra de tejido puede ser una muestra reciente, estar congelada o estar fijada-incluida en parafina (FFPE), como puedan ser muestras de tumor de estudio clínico. En general, el ARN aislado de muestras de tejido reciente o congelado suele fragmentarse menos que ARN de muestras de FFPE. Las muestras FFPE de material de tumor, sin embargo, son más fácilmente asequibles y las muestras de FFPE son fuentes de ARN adecuadas para su uso en los procedimientos de la presente divulgación. En cuanto a una explicación de muestras de FFPE como fuentes de ARN para perfilar la expresión de gen por RT-PCR, véase p.ej., Clark-Langone y col., 2007, BMC Genomics 8:279. Véase asimismo, De Andres y col., 1995, Biotechniques 18:42044; y Baker y col., solicitud de publicación de patente estadounidense No. 2005/0095634. Está extendido y es habitual el uso de kits disponibles en el mercado con instrucciones del proveedor para la extracción y preparación de ARN. Entre los proveedores comerciales de diversos productos de aislamiento de ADN y kits completos se incluyen Qiagen (Valencia, CA), Invitrogen (Carlsbad, CA), Ambion (Austin, TX) y Exiqon (Woburn, MA).

En general, el aislamiento de ARN comienza con la interrupción del tejido/célula. Durante la interrupción del tejido/célula es deseable reducir al mínimo la degradación de ARN mediante ARNasas. Un enfoque para limitar la actividad de ARNasa durante el procedimiento de aislamiento de ARN es asegurar que entra en contacto un desnaturalizante con el contenido celular en cuanto se interrumpen las células. Otra práctica común consiste en incluir una o más proteasas en el procedimiento de aislamiento de ARN. Opcionalmente, se sumergen muestras de tejido recientes en una solución de estabilización de ARN, a temperatura ambiente, en cuanto se recogen. La solución de estabilización impregna rápidamente las células estabilizando el ARN para su almacenamiento a 4 grados centígrados para su posterior aislamiento.

En algunos protocolos, se aísla el ARN desde material de tumor interrumpido por centrifugación con gradiente de densidad con cloruro de cesio. En general, el ARNm constituye aproximadamente entre 1 por ciento y 5 por ciento del total de ARN celular. Generalmente se utiliza oligo(dT) inmovilizada, p.ej. oligo(dT) celulosa, para separar ARNm de ARN ribosómico y transferir ARN. Si se almacena tras el aislamiento, se debe almacenar el ARN en condiciones de ausencia de ARNasa. Los procedimientos para almacenar establemente ARN aislado son conocidos en la especialidad. Se dispone de varios productos comerciales para almacenamiento estable de ARN.

Micromatriz

Se puede medir el nivel de expresión de ARNm de uno o más genes que codifican proteínas marcadoras de macrófago, como CD68, aplicando la tecnología de perfil de expresión de micromatriz de ADN convencional. Una micromatriz de ADN es una colección de segmentos o sondas de ADN específicos fijados en una superficie o sustrato sólido, como vidrio, plástico o silicio, ocupando cada segmento de ADN específico una localización conocida en la matriz. La hibridación con una muestra de ARN marcado, normalmente en condiciones de hibridación rigurosas, permite la detección y cuantificación de moléculas de ARN que corresponden a cada sonda de la matriz. Tras el lavado riguroso para eliminar el material de muestra no unido específicamente, se explora la micromatriz con un microscopio de láser confocal u otro procedimiento de detección adecuado. Las micromatrices de ADN comerciales modernas, conocidas generalmente como ADN chips, contienen normalmente decenas de miles de sondas y, por tanto, pueden medir la expresión de decenas de miles de genes simultáneamente. Dichas micromatrices pueden utilizarse en la puesta en práctica de la presente invención. Alternativamente, pueden emplearse en la puesta en práctica de la presente divulgación chips a medida que contienen las sondas que son necesarias para medir la expresión de uno o más genes que codifican proteínas marcadoras de macrófago, como CD68, además de controles o patrones necesarios, p.ej., para normalización de datos.

Para facilitar la normalización de datos, puede utilizarse un lector de micromatriz en dos colores. En un sistema de dos colores (dos canales), se marcan las muestras con un primer fluoróforo que emite una primera longitud de onda, al tiempo que se marca el ARN o ADNc normal con un segundo fluoróforo que emite una longitud de onda diferente. Por ejemplo, generalmente se emplean Cy3 (570 nm) y Cy5 (670 nm) en combinación en los sistemas de micromatriz de dos colores.

La tecnología de micromatriz de ARN está perfectamente desarrollada, está disponible en el mercado y está muy extendida. Por lo tanto, al llevar a cabo los procedimientos desvelados en el presente documento, las personas especializadas en la materia podrán aplicar la tecnología de micromatriz para medir los niveles de expresión de genes que codifican proteínas marcadoras de macrófago como CD68 sin una experimentación indebida. Los chips de micromatriz de ADN, los reactivos (como los necesarios para la preparación de ARN o ADNc, el marcado de ARN o ADNc, hibridación y soluciones de lavado), los instrumentos (como lectores de micromatriz) y los protocolos son muy conocidos en la técnica y están disponibles distribuidos por diferentes fuentes comerciales. Entre los proveedores comerciales de sistemas de micromatriz se incluyen Agilent Technologies (Santa Clara, CA) y Affymetrix (Santa Clara, CA), si bien es posible utilizar otros sistemas de PCR también.

RT-PCR cuantitativa

El nivel de ARNm que representa genes individuales que codifican proteínas marcadoras de macrófago como CD68 puede medirse aplicando la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa convencional (qRT-PCR). Las ventajas de la qRT-PCR incluyen sensibilidad, flexibilidad, precisión cuantitativa y capacidad para discriminar entre ARNm íntimamente relacionados. La guía relativa al tratamiento de las muestras de tejido para PCR cuantitativa está disponible de diversas fuentes, entre las que se incluyen los fabricantes y proveedores de productos comerciales para qRT-PCR (p.ej., Qiagen (Valencia, CA) y Ambion (Austin, TX)). Los sistemas de instrumentos para la realización automática de qRT-PCR están disponibles en el mercado y se utilizan de forma rutinaria en muchos laboratorios. Un ejemplo de un sistema comercial muy conocido es el sistema PCR en tiempo Real 7900HT Fast de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Una vez aislado el ARNm, la primera etapa de perfil de expresión de gen por RT-PCR es la transcripción inversa de la matriz de ARNm en ADNc, que se amplifica después exponencialmente en una reacción de PCR. Dos transcriptasas inversas utilizadas comúnmente son la transcriptasa inversa del virus *avilo myeloblastosis* (AMV-RT) y la transcriptasa inversa de virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La reacción de transcriptasa inversa se ceba normalmente con cebadores específicos, hexámeros aleatorios y cebadores oligo(dT). El producto de ADNc resultante puede utilizarse como matriz para la reacción en cadena de la polimerasa posterior.

La etapa de PCR se lleva a cabo utilizando una polimerasa de ADN dependiente de ADN termoestable. La polimerasa más comúnmente utilizada en los sistemas de PCR es la polimerasa *Thermus aquaticus* (Taq). La selectividad de los resultados de PCR a partir del uso de cebadores que son complementarios para la región de ADN dirigida para amplificación, es decir, las regiones de ADNc de transcripción inversa de genes que codifican proteínas marcadoras de macrófago, como CD68. Por lo tanto, cuando se emplea qRT-PCR en la presente divulgación, los cebadores específicos para cada gen marcador se basan en la secuencia de ADNc del gen. Pueden utilizarse tecnologías comerciales como verde SYBR(R) o TaqMan(R) (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los niveles de ARN mensajero pueden normalizarse en cuanto a las diferencias en la carga entre las muestras comparando los niveles de genes constitutivos como beta-actina o GAPDH. El nivel de expresión de ARNm puede expresarse en relación con cualquier muestra de control simple como ARNm de tejido o células sin tumor normales. Alternativamente, se puede expresar en relación con ARNm de una agrupación de muestras de tumor o líneas de células tumorales o de un conjunto de ARNm de control disponible en el mercado.

Las personas especializadas en la materia podrán diseñar y sintetizar grupos de cebadores adecuados para análisis por PCR de los niveles de expresión de genes que codifican proteínas marcadoras de macrófago como CD68 sin una indebida experimentación. Alternativamente, se pueden adquirir de fuentes comerciales grupos de cebadores de PCR para poner en práctica la presente divulgación, p.ej., Applied Biosystems. Preferentemente, los cebadores de PCR tienen de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud. Los cebadores se pueden diseñar para que tengan una temperatura de fusión en particular (Tf), aplicando algoritmos convencionales para estimación de la Tf. El software para el diseño de cebadores y la estimación de la Tf está disponible en el mercado, p.ej., Primer Express™ (Applied Biosystems), y también están disponibles en internet, p.ej., Primer3 (Massachusetts Institute of Technology). Al aplicar los principios establecidos para el diseño de cebador de PCR, se puede emplear un gran número de diferentes cebadores para medir el nivel de expresión de cualquier gen dado, incluyendo genes marcadores de macrófago como CD14, CD68, MSR1, CSFR1, CD163 y CCR2.

En algunas realizaciones de la divulgación, se lleva a cabo el análisis de ARN aplicando una tecnología que no implica extracción o aislamiento de ARN. Dicha tecnología es ensayo de protección de nucleasa cuantitativa, que está disponible en el mercado con el nombre qNPA™ (High Throughput Genomics, Inc., Tucson, AZ). Esta tecnología puede ser ventajosa cuando las muestras de tejido de tumor que se van a analizar se encuentran en forma de material FFPE. Véase, p.ej., Roberts y col., 2007, Laboratory Investigation 87:979-997.

30 Análisis de proteína

En los procedimientos de la divulgación, la expresión de gen marcador de macrófago, como CD68, puede detectarse al nivel de proteína. Entre los ejemplos de procedimientos para medir el nivel de la expresión de gen marcador de macrófago a nivel de proteína se incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y análisis IHC.

ELISA

La realización de un ensayo ELISA de proteína de marcador de macrófago, p.ej., ELISA de CD68, requiere al menos un anticuerpo contra una proteína marcadora de macrófago, es decir, el anticuerpo de detección. En una realización ilustrativa, CD69 es la proteína marcadora de macrófago. Se inmoviliza la proteína CD68 de una muestra que se va a analizar en un soporte sólido, como por ejemplo una placa de microtitulación de poliestireno. Dicha inmovilización puede ser por unión no específica del CD68, p.ej., por adsorción en la superficie. Alternativamente, la inmovilización puede ser una unión específica, p.ej., por unión de la proteína CD68 desde la muestra mediante un anticuerpo de captura (anticuerpo anti-CD68 diferente del anticuerpo de detección) en un ensayo ELISA "sándwich". Una vez inmovilizado CD68, se añade el anticuerpo de detección y el anticuerpo de detección forma un complejo con el CD68 unido. Se liga el anticuerpo de detección a una enzima, ya sea directa o indirectamente, p.ej., a través de un anticuerpo secundario que reconoce específicamente el anticuerpo de detección. Normalmente, entre cada una de las etapas, se lava la placa con CD68 unido con una solución detergente suave. Los protocolos de ELISA típicos incluyen también una o más etapas de bloqueo que implican el uso de proteína de unión no específica, como albúmina de suero bovino para bloquear la unión no específica no deseada de los reactivos de proteína a la placa. Tras una etapa de lavado final, se revela la placa mediante la adición de un sustrato de enzima apropiado para producir una señal visible, que indica la cantidad de CD68 en la muestra. El sustrato puede ser p.ej., un sustrato cromogénico o un sustrato fluorogénico. Los procedimientos ELISA, los reactivos y el equipo son perfectamente conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado.

Debe entenderse que pueden medirse por ELISA los niveles de expresión de otras proteínas marcadoras de macrófago, p.ej., CCR2, CD14, CD163, CSF1R y MSR1, así como otras proteínas marcadoras específicas de macrófago utilizando anticuerpos de detección específicos para cada proteína marcadora de macrófago.

55 Inmunohistoquímica (IHC)

Puede determinarse el número de macrófagos en una población de células dada (p.ej. visualizarse) por inmunohistoquímica. Por otra parte, el porcentaje y la densidad de células en una muestra que son positivas para una proteína biomarcador dada, como CD68, puede determinarse por inmunohistoquímica. El ensayo de una proteína

5 marcadora de macrófago por IHC, p.ej., IHC de CD68, requiere al menos un anticuerpo contra una proteína
 10 marcadora de macrófago, p.ej., al menos un anticuerpo anti-CD68. Existen disponibles en el mercado numerosos
 anticuerpos anti-CD68 adecuados para IHC. Por ejemplo, pueden adquirirse anticuerpos adecuados de Dako North
 America, Inc. (Carpinteria, CA), Abcam (Cambridge, MA), Abnova (Walnut, CA), R and D Systems (Minneapolis, MN)
 o Invitrogen (Carlsbad, CA). Aplicando técnicas normales, se puede utilizar anticuerpo anti-CD68 para detectar la
 presencia de proteína CD68 en secciones, p.ej., secciones de 5 micrómetros, obtenidas de tumores, incluyendo
 secciones de tumor incluidas en parafina y congeladas. Normalmente, las secciones de tumor se tratan inicialmente
 de manera que se recupera la estructura de antígeno de las proteínas que se han fijado en el procedimiento inicial
 de recogida y conservación de material de tumor. A continuación, se bloquean los portaobjetos para evitar una unión
 no específica con el anticuerpo de detección anti-CD68. A continuación, se detecta la presencia de proteína CD68
 por unión del anticuerpo anti-CD68 con la proteína CD68. El anticuerpo de detección (primario) se liga a una enzima,
 ya sea directa o indirectamente, p.ej., a través de un anticuerpo secundario o polímero que reconoce
 específicamente el anticuerpo de detección (primario). Normalmente, se lavan las secciones de tumor y se bloquean
 con proteína no específica, como albumina de suero bovino entre una etapa y otra. Se revela el portaobjetos
 utilizando un sustrato de enzima apropiado para producir una señal visible. Se pueden contra-teñir las muestras con
 hematoxilina.

Debe entenderse que es posible detectar la expresión de otras proteínas marcadoras de macrófago, p.ej., CCR2,
 CD14, CD163, CSF1R y MSR1, así como otras proteínas marcadoras específicas de macrófago por IHC de manera
 similar utilizando anticuerpos específicos para cada proteína marcadora de macrófago.

20 Interpretación de datos

Se puede interpretar la puntuación de macrófago para un tumor con respecto a una puntuación umbral. Una
 puntuación de macrófago o el nivel de expresión de un biomarcador en particular, como CD68, que es igual o
 superior a la puntuación umbral puede interpretarse como predictiva de que el tumor tiene probabilidad de ser
 sensible (responder) al tratamiento con un inhibidor de VEGFR, como por ejemplo con axitinib. Alternativamente, las
 puntuaciones de macrófago o el nivel de expresión de un biomarcador en particular, como CD68, iguales o inferiores
 a la puntuación umbral pueden interpretarse como predictiva de que un tumor tiene probabilidad de resistir (no
 responder) al tratamiento con un inhibidor de VEGFR, como anxitinib.

Una puntuación de macrófago umbral óptimo, o nivel de expresión de CD68, puede determinarse (o al menos
 aproximarse) de forma empírica llevando a cabo un análisis de determinación de umbral. Preferentemente, el
 análisis de determinación de umbral incluye un análisis de curva característica operativa del receptor (ROC). El
 análisis de curva ROC es una técnica estadística establecida, cuya aplicación entra dentro del conocimiento de las
 personas especializadas en la materia. Para una explicación del análisis de curva ROC, véase de forma general
 Zweig y col., 1993, "Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine,"
 Clin. Chem. 39:561-577; y Pepe, 2003, The statistical evaluation of medical tests or classification and prediction,
 Oxford Press, Nueva York.

Las puntuaciones de macrófago, los niveles de expresión de CD68 y las puntuaciones umbral óptimas pueden variar
 de un tipo de tumor a otro. Por lo tanto, un análisis de determinación de umbral se lleva a cabo preferentemente en
 uno o más grupos de datos que representan cualquier tipo de tumor dado para su análisis utilizando la presente
 divulgación. El grupo de datos utilizado para el análisis de determinación de umbral incluye: (a) datos de respuesta
 real (respuesta o no respuesta) y (b) una puntuación de macrófago o nivel de expresión de CD68 para cada muestra
 de tumor de un grupo de tumores. Una vez determinada la puntuación de macrófago o el nivel de expresión de
 CD68 umbral con respecto a un tipo de tumor determinado, se puede aplicar dicho umbral para interpretar las
 puntuaciones de macrófago o los niveles de expresión de CD68 de tumores de dicho tipo de tumor.

El análisis de curva ROC puede realizarse del siguiente modo. Se identifica cualquier muestra con una puntuación
 de macrófago o nivel de expresión de CD68 mayor o igual al umbral como sensible (con respuesta).
 Alternativamente, se identifica cualquier muestra con una puntuación de macrófago o nivel de expresión de CD68
 inferior o igual al umbral como resistente (sin respuesta). Para cada puntuación de macrófago o nivel de expresión
 de CD68 de un grupo de muestras analizadas, se clasifican las que "responden" y "no responden" (invocaciones
 hipotéticas) utilizando esa puntuación como umbral. Este procedimiento permite calcular TPR (vector y) y FPR
 (vector x) para cada posible umbral, a través de la comparación de las invocaciones hipotéticas frente a los datos de
 respuesta real para el grupo de datos. A continuación, se construye una curva ROC trazando un gráfico de puntos,
 utilizando el vector TPR y vector FPR. Si la curva ROC está por encima de la diagonal desde el punto (0,0) al punto
 (1,0, 0,5), demuestra que el resultado del análisis de macrófago es un análisis mejor que el aleatorio.

La curva ROC puede emplearse para identificar el mejor punto operativo. El mejor punto operativo es aquel que
 rinde el mejor equilibrio entre el coste de falsos positivos ponderados frente al coste de falsos negativos. Estos
 costes no tienen por qué ser iguales. El coste esperado promedio de la clasificación en el punto x, y en el espacio
 ROC se determina mediante la siguiente fórmula.

$$C = (1-p) \text{alfa} * x + p * \text{beta} (1-y)$$

en la que:

alfa = coste de un falso positivo,
 beta = coste de pérdida de un positivo (falso negativo), y
 p = proporción de casos positivos.

- 5 Los falsos positivos y los falsos negativos se pueden ponderar de forma diferente asignando diferentes valores para alfa y beta. Por ejemplo, si se decide incluir más pacientes en el grupo con respuesta al coste de tratar más pacientes que no presentan respuesta, es posible poner más peso en alfa. En este caso, se asume que el coste del falso positivo y el falso negativo es el mismo (alfa es igual a beta). Por lo tanto, el coste esperado promedio de la clasificación en el punto x, y en el espacio ROC es:

10
$$C' = (1-p)*x + p*(1-y)$$

El C' mínimo puede calcularse después de utilizar todos los pares de falso positivo y falso negativo (x, y). Se calcula el umbral de puntuación óptima como la puntuación del (x, y) en C'-

- 15 Además de predecir si el tumor será sensible o resistente a un inhibidor de VEGFR, como axitinib, una puntuación de macrófago o nivel de expresión de CD68 proporciona una indicación aproximada pero útil de hasta qué punto es probable que un tumor sea sensible o resistente.

Kits de ensayo

- 20 La divulgación incluye un kit de prueba diagnóstica que comprende ciertos componentes para realizar los procedimientos de la presente divulgación. Un kit de prueba diagnóstica potencia la comodidad, velocidad y reproducibilidad en la realización de los ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, en un ejemplo de realización basado en qRT-PCR de la divulgación, un kit de prueba diagnóstica básico incluye cebadores de PCR para analizar la expresión de marcadores de macrófago, p.ej., CD68. En otras realizaciones, un kit de análisis más elaborado contiene no solamente cebadores de PCR, sino también tampones, reactivos e instrucciones detalladas para medir los niveles de expresión de CD68 aplicando tecnología PCR. En algunas realizaciones, el kit incluye un protocolo de análisis y todos los componentes consumibles necesarios para el análisis, excepto la(s) muestra(S) de ARN.

- 25 En una realización basada en micromatriz de ADN ilustrativa de la divulgación, un kit de ensayo incluye una tarjeta microfluida (matriz) diseñada para su uso con un instrumento en particular. Opcionalmente, la tarjeta microfluida es un dispositivo adaptado diseñado específicamente para medir la expresión de gen marcador de macrófago. Dichas tarjetas microfluidas adaptadas están disponibles en el mercado. Por ejemplo, la matriz TaqMan es una tarjeta (matriz) microfluida de 384 pocillos diseñada para su uso con un sistema de PCR tiempo real 7900HT Fast de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). Una tarjeta fluida ilustrativa puede incluir cualquier combinación de sondas para medir expresión de CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R y/o MSR1 más los controles o patrones necesarios, p.ej., para la normalización de datos. Se pueden incluir también en una tarjeta fluida para otras proteínas marcadoras de macrófago para la puesta en práctica de la divulgación.

- 30 En algunas realizaciones de la divulgación, el kit de ensayo contiene materiales para determinar el contenido en macrófago de tumor por IHC. Un kit de IHC, por ejemplo, puede contener un anticuerpo primario contra un marcador de macrófago humano, p.ej., un anticuerpo CD68 anti-humano de ratón, y un anticuerpo secundario conjugado con una enzima indicadora, p.ej., peroxidasa de rábano picante. En algunas realizaciones, se coloca el anticuerpo secundario con un polímero conjugado que reconoce específicamente el anticuerpo primario.

Ejemplos

- 40 La presente divulgación quedará mejor ilustrada con los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 – Porcentaje y densidad de células CD3 y CD68 positivas con portaobjetos frente a bloques

- 45 Este estudio fue un estudio en fase 3 multicéntrico, sin ocultación, aleatorizado, de 2 grupos de axitinib frente a sorafenib en pacientes con carcinoma metastásico de células renales (mRCC), tras el fracaso de un régimen de primera línea sistemático anterior que contenía uno o más de los siguientes agentes: sunitinib, bevacizumab + IFN α, temsirolimus o citoquinas(s). En general, se seleccionaron al azar 723 pacientes con mRCC y se reclutaron para el estudio, entre los cuales 52 pacientes tratados con axitinib se pudieron evaluar por análisis de inmunohistoquímica (IHC), 33 de los 52 pacientes habían sido tratados previamente con Sutent®.

- 50 Tal como se muestra en la Figura 1, la mayoría de los pacientes incluidos en el análisis ICH fueron blancos (90,4 % de los pacientes), hombres (69,2 % de los pacientes) y de Norteamérica (57,5 % de los pacientes) y Europa (32,7 %). La edad, altura y peso medios globales (desviación típica) fueron 58,3 (11,0) años, 173,0 (10,0) cm y 84,6 (19,1) kg, respectivamente. Todos los pacientes tenían una escala ECOG de 0 (51,9 % de los pacientes) o 1 (48,1 % de los pacientes). Globalmente, 23,1 % de los pacientes clasificados como pacientes de pronóstico favorable y 34,6 % y 42,3 % de intermedio, malo, respectivamente, según el modelo de supervivencia de factores del grupo de pronóstico Memorial Sloan-Kettering Cáncer Center (MSKCC). Por otra parte, se derivaron los grupos de riesgo

MSKCC utilizando los siguientes cuatro factores de riesgo: lactato dehidrogenasa alto (> 1,5 x límite por encima del normal), hemoglobina en suero baja (menos del límite por debajo del normal), calcio en suero corregido alto (> 10 mg/dl) y ausencia de nefrectomía anterior.

5 Los 52 pacientes fueron evaluables tanto para CD3 como CD68. De entre los pacientes evaluables para CD3 y CE68, 26 donaron bloques de tumor fijados en formalina incluidas en parafina (FFPE), y 26 donaron portaobjetos para análisis. Mosai Laboratories proporcionó material FFPE que representaba material normal humano y cáncer humano. Se obtuvieron las muestras en virtud el protocolo revisado por IRB (MOS001) que permite el uso de muestras humanas, remanentes, no identificadas o anónimas para análisis *in vitro* según las directrices que definen la "exención de investigación de sujetos humanos", tal como lo define la Oficina para la Protección de Seres Humanos en Estudios de Investigación. Se adquirió el anticuerpo KP1 monoclonal de ratón CD68 (Catálogo# M0814, Lote# 46406, fecha de expiración: sept. 2011) de Dako (Carpinteria, California, Estados Unidos) y se almacenó a 2-8 °C de acuerdo con la documentación adjunta. El anticuerpo de control isotipo IgG de ratón (Lote# 37211, Fecha de expiración: Jul 2010) se adquirió de Dako y se almacenó a 2-8 °C de acuerdo con la documentación adjunta. Se realizó IHC de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de Mosaic Laboratories. El ensayo IHC de CD68 se diseñó y validó como compatible con las Guía CLIA para validación de ensayo clase I "casero".

20 Un patólogo evaluó la tinción y la evaluación de la reactividad implicó una combinación de lo siguiente: localización celular de tinción de CD68: intensidad de tinción; localización subcelular y porcentajes de tinción de células en el componente primario del tipo de tejido de interés. Se adquirieron fotomicrografías (aumento de 20x) con un dispositivo de cámara acoplado para carga enfriada Spot Insight QE Modelo 4.2 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, Estados Unidos) fijada en un microscopio Nikon Eclipse 50i.

25 El porcentaje medio de células CD3 y CD68 positivas fue ligeramente inferior en los portaobjetos que en los bloques; 13,61 % frente a 17,95 % para CD3 y 5,83 % frente a 8,21 % para CD68. De manera similar, se observó una densidad celular ligeramente más baja en los portaobjetos que en los bloques; 489,15 células/mm² frente a 590,50 células/mm² para CD3, y 0,08 células/mm² frente a 0,13 células/mm² para CD68 (Figura 2).

Ejemplo 2 – Niveles de expresión de CD68 mayores se correlacionan positivamente con TRO y SSP favorables, pero no SG

30 Para el análisis de biomarcador IHC, se utilizó el Conjunto de Análisis de Biomarcador, que incluyó a todos los pacientes que recibieron al menos una dosis de tratamiento de estudio. Se analizaron los siguientes criterios de valoración de la eficacia: SSP, SG y tasa de respuesta objetiva (TRO). Se proporciona el resumen estadístico para el porcentaje y la densidad de células positivas mediante categoría de respuesta (respuesta completa [RC]+ respuesta parcial [RP] frente a enfermedad estable [EE]+ enfermedad progresiva [EP]) para cada marcador). Se realizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para determinar la diferencia entre las categorías de respuesta. Se aplicó la prueba exacta de Fisher para determinar la asociación entre la categoría de respuesta y el estrato de marcador utilizando el valor mediana como punto de corte. Se comparó la distribución de SG y SSP entre el estrato de biomarcador según el valor mediana del biomarcador como punto de corte utilizando el procedimiento de Kaplan-Meier: los valores p no se desplegaron cuando N<10 en ninguno de los estratos. Se registraron el cociente de riesgo estimado (CR) y los intervalos de confianza de 9% de 2 caras (IC) y la mediana de la duración del evento y su IC de 95 % de dos caras. Se comparó el mejor porcentaje de respuesta de cambio en el volumen de tumor entre los estratos de biomarcador con el valor mediana como punto de corte utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

45 Para unos resultados de ensayo significativos (p < 0,05) en los análisis TRO, SSP y SG entre el estrato de biomarcador, se generó la curva de características operativas de receptor (ROC) para evaluar mejor el potencial de utilidad como marcadores de selección de pacientes. Se llevó a cabo el análisis ROC sobre los valores CD68 basales como marcadores de diagnóstico continuos para predecir la respuesta objetiva de paciente binaria (RC+RP frente a EE+EP). Para los resultados clínicos dependientes del tiempo de SSP y SG, se aplicó una ROC dependiente del tiempo, representada como ROC(t), en la que t indica el punto temporal de interés, para analizar los valores CD68 basales en la predicción de resultados de supervivencia utilizando un estimator²⁰ de Kaplan-Meier. Se obtuvo el punto de corte óptimo del valor CD68 para predecir el resultado clínico partir del punto de la curva ROC que tenía la distancia mínima desde el punto con valores de sensibilidad y especificidad de 1. Se calculó la AUC utilizando la regla trapezoidal.

55 Se observó la expresión de CD68 superior asociada con SSP más prolongadas y TRO superior. Sin embargo, no se observó ninguna correlación entre la expresión de CD68 y SG en los pacientes. Independientemente del primer tratamiento, la mediana de SSP en los pacientes con valores CD68 ≥ mediana (límite = 5,21 % células positivas o 0,08 células/mm²) fue 12,0 meses para ambos puntos de corte frente a 3,7 meses y 3,8 meses respectivamente para los pacientes con valores de biomarcador < mediana (CR = 0,42, valor p de rango logarítmico ≤ 0,01) cuando se evaluó a todos los pacientes independientemente del tratamiento anterior (Figura 3). Sin embargo, para todos los pacientes tratados previamente con Sutent®, se observó una tendencia similar, pero no estadísticamente significativa con la SSP (Figura 4). No hay ninguna asociación estadísticamente significativa entre los niveles de

CD3 y SSP, ya sea independientemente del tratamiento anterior o para los pacientes tratados previamente con Sutent® (Figuras 5 y 6).

5 Asimismo, independientemente del tratamiento anterior, la mediana de SG en los pacientes con valores CD68 \geq mediana (límite = 5,21 % células positivas o 0,08 células/mm²) fue 20,0 meses y 22,6 meses frente a 21,8 meses o 17,8 meses respectivamente para pacientes con valores de biomarcador <mediana (CR>0,6 en todos los casos, no estadísticamente significativo) cuando se evaluó a todos los pacientes independientemente del tratamiento anterior (Figura 7). Para los pacientes tratados previamente con Sutent® no se observaron asociaciones estadísticamente significativas con SG. No hubo ninguna asociación estadísticamente significativa entre los niveles de CD3 y la SG ya sea independientemente del tratamiento o en los pacientes tratados previamente con Sutent® (Figura 8). Aplicando el análisis ROC, se observó SG favorable para los pacientes con un recuento de células CD68 superior, si bien el valor AUC de 0,559 indica una baja confianza en el valor predictivo de los niveles de CD68 (Figura 9).

15 Finalmente, independientemente del tratamiento anterior, los niveles de CD68 medidos según el porcentaje de células positivas (valor p = 0,0059) o densidad celular (valor p = 0,0071) fueron dos veces más altas en los pacientes con respuesta (RC+RP) frente a los que no respondieron (EE+EP) (Figura 10). Para los pacientes tratados previamente con Sutent®, los niveles de CD68 medidos según el porcentaje de células positivas (valor p = 0,407) o la densidad celular (valor p = 0,0762) fueron 2 veces más altos en los pacientes con respuesta que en los que no tuvieron respuesta (Figura 11). En los análisis TRO para los pacientes evaluables para biomarcador, los pacientes con un porcentaje CD68 más alto y densidad de células positivas tienden a tener una mayor posibilidad de respuesta objetiva de tumor. El análisis ROC presenta una precisión predictiva de 0,818 y 0,795 con porcentaje de CD68 y densidad de células positivas, respectivamente. Las AUC de 0,791 y 0,784, indican una precisión predictiva global alta para TRO utilizando biomarcador CD68. Los puntos de corte óptimos para predecir TRO fueron 9,42 % y 0,13 células/mm² para el porcentaje de células CD68 positivas, respectivamente.

25 Se observaron resultados similares en los análisis TRO para pacientes evaluables para biomarcador con tratamiento previo de Sutent®. Los pacientes con un porcentaje más alto de células CD68 positivas y densidad tienden a tener una mejor posibilidad de respuesta objetiva de tumor. El análisis ROC presenta una precisión predictiva de 0,777 y 0,852 con porcentaje de células CD68 positivas y densidad, respectivamente. Las AUC de 0,809 y 0,764 indican la precisión de diagnóstico global para TRO utilizando biomarcador CD68. Los puntos de corte óptimos para predecir TRO son 5,20 % y 0,16 células/mm² por porcentaje de células CD68 positivas y densidad, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de un tumor que es sensible al tratamiento con axitinib, que comprende: (a) medir el nivel de expresión de polipéptido CD68 en una muestra de tejido de un tumor obtenido de un paciente humano que está siendo considerado para el tratamiento con axitinib; y (b) comparar el nivel de expresión de CD68 de la etapa (a) frente a un nivel de expresión de CD68 umbral determinado midiendo la expresión de polipéptido CD68 en muestras de tejido de tumores obtenidas de pacientes humanos tratados previamente con axitinib y que han demostrado ser resistentes a axitinib y de pacientes humanos tratados previamente con axitinib y que han demostrado ser sensibles a axitinib, en el que un nivel de expresión de CD68 por encima del nivel umbral indica que el tumor es sensible al tratamiento con axitinib.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de medición de la expresión del polipéptido CD68 se lleva a cabo por inmunohistoquímica.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la etapa de medición de la expresión de polipéptido CD68 por inmunohistoquímica se lleva a cabo por análisis de imagen a partir de una exploración completa en portaobjetos, determinándose el porcentaje de células CD68 positivas en la muestra.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende además la etapa de determinar la densidad de células CD68 positivas en la muestra.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tumor se selecciona del grupo que consiste en un tumor mamario, un tumor de pulmón, un tumor renal, un tumor colorrectal un tumor de páncreas y, preferentemente, es un tumor de carcinoma metastásico de células renales (mRCC)
6. Axitinib para su uso en el tratamiento de carcinoma metastásico de células renales (mRCC) mediante administración de axitinib a un paciente que se ha determinado que tiene un tumor mRCC que es sensible a axitinib de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer mediante (a) determinación del porcentaje de células CD68 positivas en un tumor de un sujeto; y (b) administración de axitinib al sujeto si dicho porcentaje es al menos 5 %.
8. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer mediante (a) determinación de la densidad celular de células CD68 positivas en un tumor de un sujeto; y (b) administración de axitinib al sujeto si dicha densidad celular es al menos 0,08 células/mm².
9. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer mediante administración de axitinib a un sujeto con un tumor, en el que al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 4 %, al menos 4,5 %, al menos 4,6 %, al menos 4,7 %, al menos 4,8 %, al menos 4,9 %, al menos 5,0 %, al menos 5,1 %, al menos 5,2 %, al menos 5,3 %, al menos 5,4 %, al menos 5,5 %, al menos 5,6 %, al menos 5,7 %, al menos 5,8 %, al menos 5,9 %, al menos 6,0 %, al menos 6,5 %, al menos 7,0 %, al menos 8 %, al menos 9 %, al menos 10 %, al menos 15 % o al menos 20 % de las células de dicho tumor son CD68 positivas.
10. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 9, mediante administración de axitinib a un sujeto con un tumor, en el que al menos 5 % de las células de dicho tumor son CD68 positivas.
11. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer mediante administración de axitinib a un sujeto con un tumor, en el que la densidad celular de células CD68 positivas en dicho tumor es al menos 0,05 células/mm², al menos 0,06 células/mm², al menos 0,07 células/mm², al menos 0,08 células/mm², al menos 0,09 células/mm², al menos 1,0 células/mm², al menos 1,1 células/mm², al menos 1,2 células/mm², al menos 1,3 células/mm², al menos 1,4 células/mm² o al menos 1,5 células/mm².
12. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 11, mediante administración de axitinib a un sujeto con un tumor, en el que la densidad celular de células CD68 positivas en dicho tumor es al menos 0,08 células/mm².
13. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer mediante (a) determinación del porcentaje de células CD68 positivas en un tumor de un sujeto; (b) determinación de la densidad celular de células CD68 positivas en el tumor; y (c) administración de axitinib al sujeto si dicho porcentaje es al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 4 %, al menos 4,5 %, al menos 4,6 %, al menos 4,7 %, al menos 4,8 %, al menos 4,9 %, al menos 5,0 %, al menos 5,1 %, al menos 5,2 %, al menos 5,3 %, al menos 5,4 %, al menos 5,5 %, al menos 5,6 %, al menos 5,7 %, al menos 5,8 %, al menos 5,9 %, al menos 6,0 %, al menos 6,5 %, al menos 7,0 %, al menos 8 %, al menos 9 %, al menos 10 %, al menos 15 % o al menos 20 %; y dicha densidad celular es al menos 0,05 células/mm², al menos 0,06 células/mm², al menos 0,07 células/mm², al menos 0,08 células/mm², al menos 0,09 células/mm², al menos 1,0 células/mm², al menos 1,1 células/mm², al menos 1,2 células/mm², al menos 1,3 células/mm², al menos 1,4 células/mm² o al menos 1,5 células/mm².

14. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 13, mediante (a) determinación del porcentaje de células CD68 positivas en un tumor de un sujeto; (b) determinación de la densidad celular de células CD68 positivas en el tumor; y (c) administración de axitinib al sujeto si dicho porcentaje es al menos 5 % y dicha densidad celular es al menos 0,08 células/mm².
- 5 15. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en el que dicho tumor se selecciona del grupo que consiste en un tumor mamario, un tumor de pulmón, un tumor renal, un tumor colorrectal y un tumor de páncreas y es preferentemente un tumor de carcinoma metastásico de células renales (mRCC).
- 10 16. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 7, 8, 13 o 14, en el que la etapa de medición del porcentaje o densidad celular de células CD68 positivas se lleva a cabo utilizando inmunohistoquímica.
17. Axitinib para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 16, en el que la etapa de medición del porcentaje o densidad celular de células CD68 positivas se realiza utilizando inmunohistoquímica y el uso de análisis de imagen a partir de una exploración completa en portaobjetos.
- 15 18. Uso de un kit de prueba diagnóstica que comprende ciertos componentes para realizar los procedimientos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, incluyendo componentes (a) para un kit basado en la reacción en cadena de polimerasa por transcriptasa inversa cuantitativa (aRT-PCR), cebadores PCR para analizar la expresión del marcador de macrófagos CD68 y, opcionalmente, tampones, reactivos e instrucciones detalladas para medir los niveles de expresión de CD68, utilizando tecnología PCR; b) para un kit basado en micromatriz de ADN, una tarjeta microfluídica (matriz) diseñada para su uso con un instrumento en particular; o (c) materiales para determinar el contenido de macrófagos tumorales por IHC.
- 20

FIG. 1

AG-013736
5,0 mg (BID)

	SEXO		SEXO FEMENINO		TOTAL	
Número (%) de sujetos	38		14		52	
Edad (años):						
<65	25	(65,8)	11	(78,6)	36	(69,2)
>=65	13	(34,2)	3	(21,4)	16	(30,8)
Mediana	61,5		54,0		61,0	
Media	59,2		55,6		58,3	
DT	10,0		13,5		11,0	
Intervalo	39-82		22-78		22-82	
Raza:						
BLANCA	35	(92,1)	12	(85,7)	47	(90,4)
ASIÁTICA	2	(5,3)	2	(14,3)	4	(7,7)
OTRAS	1	(2,6)	0		1	(1,9)
Peso (kg):						
Mediana	87,5		67,5		84,8	
Media	90,0		69,8		84,6	
DT	15,4		20,8		19,1	
Intervalo	62,4-121,2		41,0-106,2		41,0-121,2	
N	38	(100,0)	14	(100,0)	52	(100,0)
Altura (cm)						
Mediana	177,3		159,0		174,6	
Media	177,9		159,6		173,0	
DT	5,7		5,8		10,0	
Intervalo	169,2-194,0		151,5-174,0		151,5-194,0	
N	38	(100,0)	14	(100,0)	52	(100,0)
ECOG:						
0	20	(52,6)	7	(50,0)	27	(51,9)
1	18	(47,4)	7	(50,0)	25	(48,1)
Región geográfica:						
NORTEAMÉRICA	23	(60,5)	7	(50,0)	30	(57,7)
EUROPA	13	(34,2)	4	(28,6)	17	(32,7)
ASIA	1	(2,6)	2	(14,3)	3	(5,8)
OTROS	1	(2,6)	1	(7,1)	2	(3,8)
MSKCC:						
Favorable	8	(21,1)	4	(28,6)	12	(23,1)
Intermedio	14	(36,8)	4	(28,6)	18	(34,6)
Malo	16	(42,1)	6	(42,9)	22	(42,3)

FIG. 2

AG-013736
5,0 mg (BID)

Biomarcadores	Portaobjetos N=26	Bloques N=26	Total N=52
CD3 % positivo			
n	26	26	52
Media	13,61	17,95	15,78
Desviación típica	10,328	13,031	11,846
%CV	75,9	72,6	75,1
25° Percentil	5,00	7,00	7,00
Mediana	11,37	15,21	12,66
75° Percentil	20,50	29,40	24,00
(Min, Máx)	(0,57, 31,1)	(0,08, 44,85)	(0,08, 44,85)
CD3 densidad celular			
n	26	26	52
Media	489,15	590,50	539,83
Desviación típica	516,170	513,747	512,448
%CV	105,5	87,0	94,9
25° Percentil	77,00	264,00	168,00
Mediana	336,50	414,50	399,50
75° Percentil	801,00	775,00	781,50
(Min, Máx)	(14,2241)	(1,2056)	(1,2241)
CD68 % Positivo			
n	26	26	52
Media	5,83	8,21	7,02
Desviación típica	6,456	6,859	6,704
%CV	110,8	83,5	95,5
25° Percentil	1,00	4,00	2,80
Mediana	3,94	7,08	5,21
75° Percentil	8,10	10,00	9,70
(Min, Máx)	(0,2, 20,92)	(2,48, 36,89)	(0,2, 36,89)
CD68 densidad celular			
n	26	26	52
Media	0,08	0,13	0,11
Desviación típica	0,087	0,101	0,096
%CV	103,3	80,5	91,2
25° Percentil	0,00	0,10	0,00
Mediana	0,05	0,10	0,08
75° Percentil	0,10	0,20	0,20
(Min, Máx)	(0, 0,29)	(0,03, 0,53)	(0, 0,53)

FIG. 3

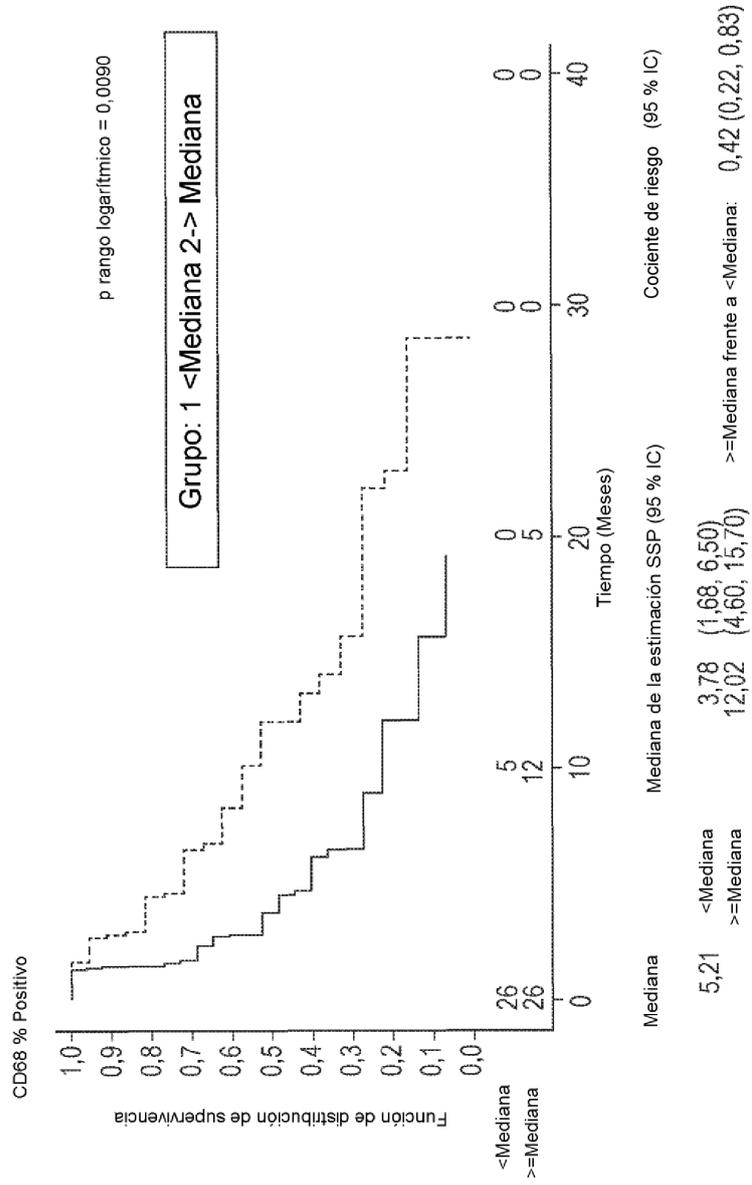


FIG. 4

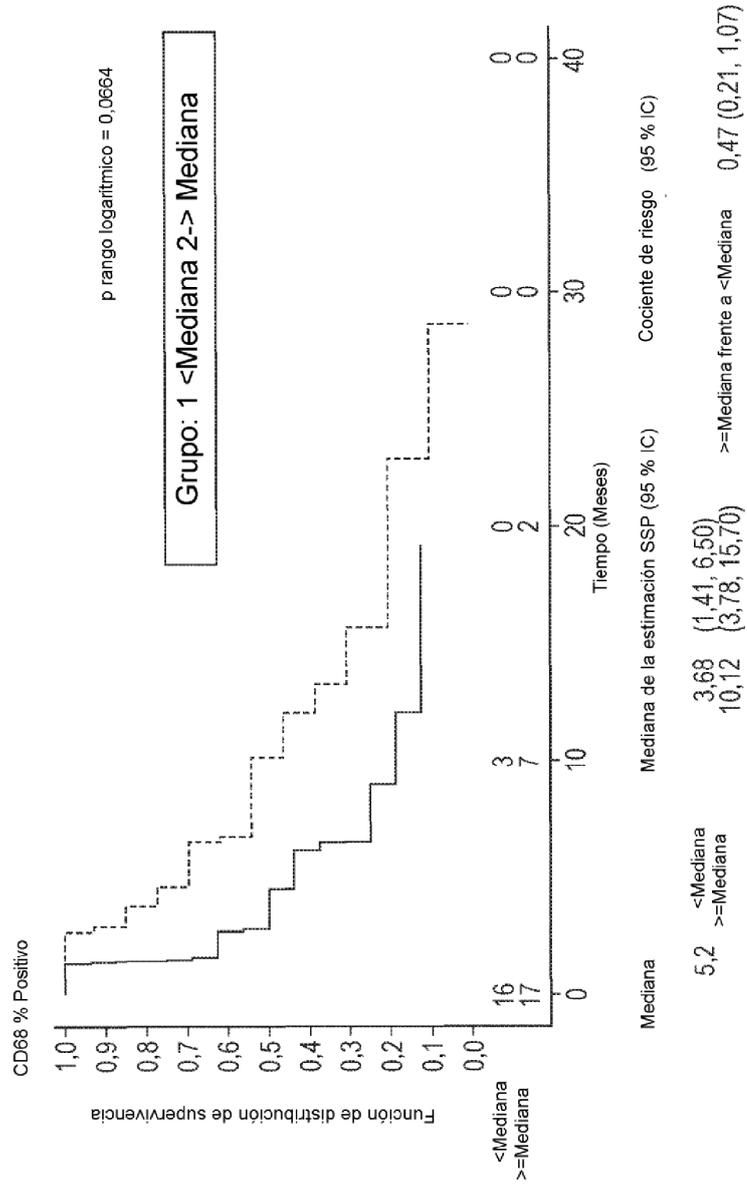


FIG. 6

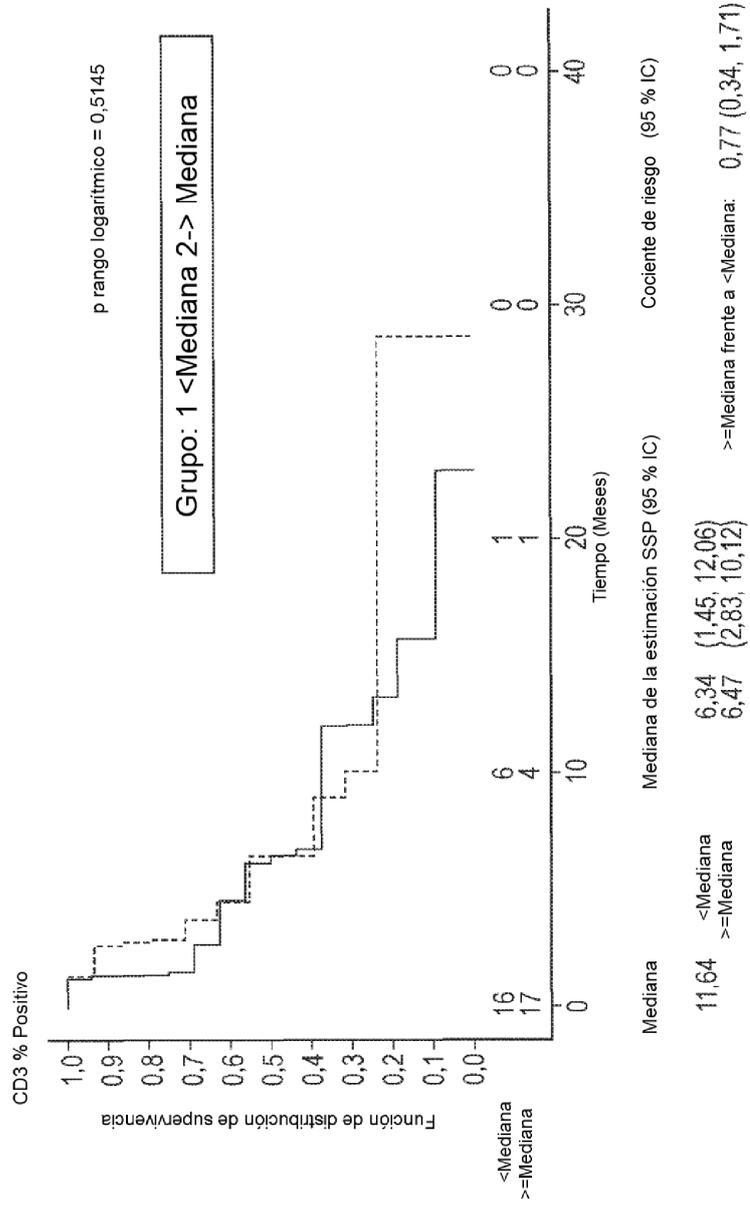


FIG. 7

Variable	Mediana de SG (Meses)						
	Mediana valor BM	N	<Mediana Valor BM (95 % IC)	N	>=Mediana Valor BM (95 % IC)	Valor-p rango logarítmico	Cociente de riesgo (95 % IC)
CD3 % Positivo	12,66	26	20,0 (11,53, 32,36)	26	21,8 (9,33, 23,82)	0,5668	1,222 (0,615, 2,426)
CD3 Densidad celular	399,50	26	19,2 (10,61, 32,36)	26	22,6 (13,08, 24,41)	0,8153	0,922 (0,465, 1,826)
CD68 % Positivo	5,21	26	21,8 (11,53, .)	26	20,0 (10,61, 32,36)	0,9901	0,996 (0,497, 1,994)
CD68 % Densidad celular	0,08	23	17,8 (7,03, 24,41)	29	22,6 (13,47, .)	0,1733	0,619 (0,308, 1,243)

FIG. 8

Variable	Mediana de SG (Meses)				Cociente de riesgo(95 % IC)	
	Mediana valor BM	N	<Mediana valor BM (95 % IC)	>=Mediana valor BM (95 % IC)		Valor-p rango logarítmico
CD3 % Positivo	11,64	16	21,4 (6,87, 32,36)	20,0 (5,65, 23,82)	0,6444	1,225 (0,517, 2,900)
CD3 Densidad celular	334,00	16	19,2 (10,61, 32,36)	21,8 (4,73, 24,41)	0,6802	1,198 (0,508, 2,824)
CD68 % Positivo	5,20	16	18,2 (7,00, .)	23,8 (5,65, 32,36)	0,6576	0,818 (0,337, 1,989)
CD68 % Densidad celular	0,06	15	16,7 (4,27, 21,82)	24,1 (10,61, .)	0,0777	0,451 (0,182, 1,116)

FIG. 10

Biomarcadores	AG-013736 5,0 mg (BID)			Total N=44
	CR+PR N=11	SD+PD N=33	*Valor P	
CD3 % Positivo				
n	11	33	0,1364	44
Media	19,54	12,93		14,58
Desviación típica	13,168	10,265		11,274
%CV	67,4	79,4		77,3
25º Percentil	9,20	5,00		6,00
Mediana	11,20	11,60		11,40
75º Percentil	30,20	19,20		19,90
(Min, Máx)	(5,01,44,85)	(0,57,39,15)		(0,57, 44,85)
CD3 Densidad celular				
n	11	33	0,174	44
Media	683,18	455,39		512,34
Desviación típica	635,836	479,921		524,766
%CV	93,1	105,4		102,4
25º Percentil	223,00	93,00		162,00
Mediana	415,00	295,00		356,00
75º Percentil	936,00	643,00		715,50
(Min, Máx)	(159,2241)	(14,2056)		(14,2241)
CD68 % Positivo				
n	11	33	0,0059	44
Media	10,21	4,58		5,98
Desviación típica	6,206	4,235		5,328
%CV	60,8	92,6		89,0
25º Percentil	4,40	1,30		2,10
Mediana	10,02	3,73		4,34
75º Percentil	15,50	6,50		8,30
(Min, Máx)	(1,18, 20,66)	(0,2, 20,92)		(0,2, 20,92)
CD68 Densidad celular				
n	11	33	0,0071	44
Media	0,15	0,07		0,09
Desviación típica	0,085	0,055		0,072
%CV	58,3	82,0		82,4
25º Percentil	0,10	0,00		0,00
Mediana	0,16	0,05		0,08
75º Percentil	0,20	0,10		0,10
(Min, Máx)	(0,02, 0,29)	(0, 0,22)		(0, 0,29)

*El valor P de la Prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon es una aproximación t de dos caras.

FIG. 11

AG-013736
5,0 mg (BID)

Biomarcadores	CR+PR N=05	SD+PD N=22	*Valor P	Total N=27
CD3 % Positivo				
n	5	22	0,1912	27
Media	17,83	11,88		12,98
Desviación típica	10,975	9,995		10,235
%CV	61,6	84,1		78,8
25° Percentil	9,20	4,50		5,00
Mediana	11,20	8,25		9,16
75° Percentil	29,40	18,60		19,40
(Min, Máx)	(9,15, 30,21)	(0,57, 39,15)		(0,57, 39,15)
CD3 Densidad celular				
n	5	22	0.4071	27
Media	744,20	410,23		472,07
Desviación típica	862,342	422,772		525,592
%CV	115,9	103,1		111,3
25° Percentil	223,00	93,00		111,00
Mediana	401,00	267,50		271,00
75° Percentil	697,00	643,00		697,00
(Min, Máx)	(159,2241)	(14,1744)		(14,2241)
CD68 % Positivo				
n	5	22	0,0407	27
Media	10,15	3,52		4,74
Desviación típica	7,429	2,611		4,570
%CV	73,2	74,3		96,4
25° Percentil	5,40	0,90		1,00
Mediana	10,81	3,47		3,92
75° Percentil	12,70	5,20		6,50
(Min, Máx)	(1,18, 20,66)	(0,2, 8,71)		(0,2, 20,66)
CD68 densidad celular				
n	5	22	0,0762	27
Media	0,14	0,06		0,07
Desviación típica	0,102	0,045		0,066
%CV	74,0	80,8		92,6
25° Percentil	0,10	0,00		0,00
Mediana	0,16	0,05		0,05
75° Percentil	0,20	0,10		0,10
(Min, Máx)	(0,02, 0,28)	(0, 0,16)		(0, 0,28)

*El valor P de la Prueba de Suma de Eangos de Wilcoxon es una aproximación t de dos caras.