(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 732 925**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2015** **PCT/EP2015/066262**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016** **WO16008975**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2015** **E 15738625 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 3170005**

(54) Título: **Método para predecir el resultado de un tratamiento con aflibercept de un paciente que se sospecha que padece un cáncer**

(30) Prioridad:

18.07.2014 EP 14306172

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2019

(73) Titular/es:

SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR

(72) Inventor/es:

CHIRON -BLONDEL, MARIELLE;
LAMBRECHTS, DIETHER;
MAGHERINI, EMMANUELLE y
THUILLIER, VINCENT

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 732 925 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

Método para predecir el resultado de un tratamiento con aflibercept de un paciente que se sospecha que padece un cáncer

La presente invención se refiere al uso de interleucina 8 (IL8) como un biomarcador para predecir el resultado del tratamiento con aflibercept, o ziv-aflibercept, de un paciente que se sospecha que padece cáncer.

Aflibercept, o ziv-aflibercept, también referido como VEGFR1R2-Fc.DELTA.C1 Flt1D2.Flk1D3.Fc.DELTA.C1 o AVE0005, es una proteína homodimérica en la que cada dímero comprende dos monómeros idénticos, cada uno de los cuales es una proteína de fusión que comprende la secuencia señal de VEGFR1 fusionada con el dominio D2 de Ig del receptor VEGFR1, fusionado él mismo con el dominio D3 de Ig del receptor VEGFR2, a su vez fusionado con el dominio Fc de IgG1.

La cadena proteica está glicosilada, con N-acetil-glucosamina, fucosa, galactosa, manosa y ácidos siálicos, contribuyendo a las estructuras de hidrato de carbono. Los oligosacáridos ligados a N consisten principalmente en estructuras bi-antena con cero, uno o dos ácidos siálicos terminales. El monómero tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU (FDA) ya aprobó aflibercept bajo el nombre comercial EYLEA® para el tratamiento de pacientes con degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular (húmeda). En particular, EYLEA® es el nombre comercial para aflibercept según se genera, procesa y formula para inyección intravítrea.

En el momento del registro de aflibercept (zaltraP) para la indicación de cáncer, y a la luz del uso aprobado de aflibercept en el tratamiento de AMD, la FDA requirió que se proporcionara un nombre diferente (ziv-aflibercept) para el uso del compuesto en el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, ziv-aflibercept es el nombre adoptado en los Estados Unidos de Norteamérica (USAN) aceptado por la FDA para designar una composición farmacéutica que comprende aflibercept según se genera, procesa y formula para inyección por infusión intravenosa. Ziv-aflibercept se ha aprobado por la FDA para venta bajo el nombre comercial ZALTRAP® para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico (mCRC).

La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) también aprobó zaltrap, sin embargo, no requirió nombres separados para el compuesto. Por lo tanto, en la Unión Europea el nombre “aflibercept” se usa independientemente de la indicación.

ZALTRAP® y EYLEA® se obtienen por procedimientos ligeramente diferentes. Ambos contienen aflibercept o ziv-aflibercept, pero la relación de agregados de aflibercept o ziv-aflibercept es ligeramente diferente en ZALTRAP® y EYLEA®.

La aprobación de ZALTRAP® se basó en los datos obtenidos del ensayo VELOUR - un ensayo de fase III, multicéntrico, aleatorizado, controlado por placebo, que comparó la eficacia de aflibercept frente a placebo en combinación con el régimen FOLFIRI para pacientes con mCRC tratados previamente con un régimen que contenía oxaliplatino.

AFFIRM, un estudio de fase II, abierto, no comparativo, se llevó a cabo para evaluar la combinación de aflibercept y FOLFOX6 modificado (mFOLFOX6) proporcionada como una terapia de primera línea en pacientes con mCRC. El criterio de valoración principal fue la supervivencia sin progresión (PFS) en 12 meses, mientras que la exploración de biomarcadores estuvo entre los objetivos secundarios. En un intento por entender los factores clave asociados con la eficacia y seguridad de aflibercept, se llevó a cabo una investigación que evaluaba biomarcadores para el tratamiento con aflibercept en tejidos tumorales recogidos de forma prospectiva y plasma muestreado de forma seriada de pacientes que participaban en el estudio AFFIRM.

Se analizaron proteínas plasmáticas y variantes genéticas, que representan bien polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes de la ruta angiogénica o mutaciones somáticas en directores oncogénicos clave de mCRC, para evaluar si podían predecir la respuesta a aflibercept respecto a PFS. Posteriormente, también se evaluó si alguno de estos marcadores se correlacionaba con AE inducidos por fármacos anti-angiogénicos, tales como perforación gastrointestinal, trombosis, hipertensión y proteinuria.

A pesar de la eficacia y la seguridad del tratamiento del cáncer con aflibercept, sigue siendo un objetivo identificar mejor a pacientes que se beneficiarían del tratamiento.

Ahora se ha descubierto que altos niveles de IL8 en la línea base se correlacionaban con tiempos más cortos de supervivencia, y los pacientes con niveles incrementados de IL8 durante el tratamiento eran más propensos a progresar. Esto sugiere que los pacientes con altos niveles de IL8, en la línea base o durante el tratamiento, presentan un riesgo incrementado de progresión de la enfermedad durante la terapia con aflibercept.

El papel de IL8 en el desarrollo y progresión tumoral se sugiere en la técnica anterior. En un ensayo de fase II, pacientes con carcinoma hepatocelular recibieron bevacizumab (Boige V, Malka D, Bourredjem A et al. Efficacy, safety, and biomarkers of single-agent bevacizumab therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Oncologist 2012; 17: 1063-1072). Se midieron las células endoteliales circulantes (CEC) y las citocinas plasmáticas y factores angiogénicos (CAF) en la línea base y a lo largo del tratamiento.

Este estudio mostró que niveles elevados en la línea base de IL-8 (por encima de 80 pg/ml) e IL-6 se correlacionaban tanto con un intervalo de supervivencia sin progresión (PFS) más corto como con un tiempo de supervivencia global (OS) más corto.

Sin embargo, los autores citan otro estudio con sorafenib en el cual, al contrario, IL-8 fue la única citocina sérica no correlacionada con el resultado de PFS.

En otro ensayo de fase II, los pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCRC) recibieron bevacizumab (Kopetz S, Hoff PM, Morris JS et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. J Clin Oncol 2010; 28: 453-459).

Se evaluaron los niveles de 37 CAF al inicio, durante el tratamiento, y durante la enfermedad progresiva (PD).

Los autores concluyen que IL8 elevada al inicio por encima del valor de la mediana de 3,7 pg/ml estaba asociado con tiempos de PFS más cortos.

Estos resultados se obtuvieron con bevacizumab, que es un anticuerpo. Aflibercept no es un anticuerpo sino una proteína de fusión, y de esta manera tiene un modo de acción diferente.

No es posible predecir el efecto de un biomarcador en la eficiencia del tratamiento del cáncer por un fármaco dado a partir de los resultados obtenidos con otro fármaco.

A fortiori, el umbral por encima o por debajo del cual un paciente se considera como un candidato para el tratamiento no se puede extrapolar entre dos fármacos diferentes.

El documento US2010216168 se refiere a un método que comprende preparar signaturas angiogénicas de células malignas cultivadas. El nivel de los factores relacionados con la angiogénesis se compara entonces con un control. Según este documento, tal método permitiría la predicción de la eficacia terapéutica del tratamiento con compuestos antiangiogénicos. Pero este documento no proporciona ninguna prueba de que tal método tendría éxito.

La invención se refiere a aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente sospechoso de padecer cáncer, en el que se ha identificado que el paciente tiene un menor nivel de interleucina-8 (IL-8) en una muestra biológica, en comparación con el nivel de referencia de la expresión de IL-8.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar si un paciente que se sospecha que padece cáncer es un candidato para terapia con aflibercept, o ziv-aflibercept para dicho cáncer, que comprende la etapa de someter una muestra biológica del paciente a al menos un ensayo para medir en la línea base el nivel de IL-8, en el que, cuando el nivel de IL-8 de la muestra biológica es bajo respecto a un nivel de referencia de la expresión de IL-8, el paciente se identifica como un candidato para terapia para cáncer.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar si un paciente que se sospecha que padece cáncer es un candidato para terapia con aflibercept, o ziv-aflibercept para dicho cáncer, que comprende la etapa de someter una muestra biológica del paciente a al menos un ensayo para medir al inicio el nivel de IL-8, en el que, cuando el nivel de IL-8 de la muestra biológica es alto respecto a un nivel de referencia de la expresión de IL-8, el paciente se identifica como que no es candidato para terapia para cáncer.

En una realización, el nivel de referencia de la expresión de IL-8 está comprendido entre alrededor de 10 y alrededor de 30 pg/ml.

En una realización adicional, el nivel de referencia de la expresión de IL-8 está comprendido entre alrededor de 15 y alrededor de 25 pg/ml, o alrededor de 17 y alrededor de 21 pg/ml.

En una realización adicional, el nivel de referencia de la expresión de IL-8 es alrededor de 18 pg/ml, alrededor de 19 pg/ml o alrededor de 20 pg/ml.

En una realización de uno de los métodos descritos anteriormente, la muestra biológica se elige del grupo que consiste en sangre, suero y plasma.

En una realización de uno de los métodos descritos anteriormente, el cáncer es un cáncer de colon, un cáncer colorrectal o un cáncer rectal.

En una realización adicional de uno de los, el cáncer colorrectal es un cáncer colorrectal metastásico.

En otra realización de la invención, el sujeto se trata con aflibercept y además experimenta un tratamiento quimioterapéutico con oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU) y ácido folínico (es decir, el tratamiento FOLFOX), ácido folínico, 5-fluorouracilo e irinotecán (es decir, el tratamiento FOLFIRI), o 5-fluorouracilo y ácido folínico (es decir, el tratamiento FUFOL o LV5FU2).

El tratamiento quimioterapéutico puede combinar al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o como máximo 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 agentes, tal como, por ejemplo, una combinación de oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU) y ácido folínico (es decir, el tratamiento FOLFOX o el tratamiento FOLFOX6 modificado como se describe en el ejemplo más adelante), una combinación de ácido folínico, 5-fluorouracilo e irinotecán (es decir, el tratamiento FOLFIRI), o una combinación de 5-fluorouracilo y ácido folínico (es decir, el tratamiento FUFOL o LV5FU2).

A este respecto, la solicitud WO2012146610 se refiere a un método de tratamiento del mCRC mediante aflibercept, o ziv-aflibercept, en combinación con FOLFIRI. El contenido de esta solicitud se incorpora como referencia.

En una realización de uno de los métodos descritos anteriormente, se administran a dicho paciente cantidades terapéuticamente eficaces de aflibercept, o ziv-aflibercept, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU) y ácido folínico.

En una realización de uno de los métodos descritos anteriormente, se administran a dicho paciente cantidades terapéuticamente eficaces de aflibercept, o ziv-aflibercept, ácido folínico, 5-fluorouracilo (5-FU) e irinotecán.

En una realización adicional de uno de los métodos descritos anteriormente, se administran al paciente ácido folínico a una dosis comprendida entre alrededor de 200 mg/m^2 y alrededor de 600 mg/m^2, 5-fluorouracilo (5-FU) a una dosis comprendida entre alrededor de 2000 mg/m^2 y alrededor de 4000 mg/m^2, irinotecán a una dosis comprendida entre alrededor de 100 mg/m^2 y alrededor de 300 mg/m^2, y aflibercept a una dosis comprendida entre alrededor de 1 mg/kg y alrededor de 10 mg/kg.

En una realización adicional de uno de los métodos descritos anteriormente, se administran al paciente ácido folínico a una dosis de alrededor de 400 mg/m^2, 5-fluorouracilo (5-FU) a una dosis de alrededor de 2800 mg/m^2, irinotecán a una dosis de alrededor de 180 mg/m^2, y aflibercept a una dosis de alrededor de 4 mg/kg.

En una realización adicional de uno de los métodos descritos anteriormente, se administra ácido folínico por vía intravenosa a una dosis de alrededor de 400 mg/m^2, se administra 5-fluorouracilo (5-FU) por vía intravenosa a una dosis de alrededor de 2800 mg/m^2, se administra irinotecán por vía a una dosis de alrededor de 180 mg/m^2, y se administra aflibercept por vía intravenosa a una dosis de alrededor de 4 mg/kg, y en el que la combinación se administra cada dos semanas.

En una realización adicional de uno de los métodos descritos anteriormente, se administran ácido folínico, 5-fluorouracilo (5-FU), irinotecán y aflibercept por vía intravenosa cada dos semanas durante un período comprendido entre 9 y 18 semanas.

En una realización adicional de uno de los métodos descritos anteriormente, se administra ácido folínico por vía intravenosa inmediatamente después de la administración de aflibercept. También se puede administrar por vía intravenosa inmediatamente después de la administración de aflibercept durante un período de alrededor de 2 horas.

En una realización adicional de uno de los métodos descritos anteriormente, se administra irinotecán por vía intravenosa inmediatamente después de la administración de aflibercept. También se puede administrar por vía intravenosa inmediatamente después de la administración de aflibercept durante un período de alrededor de 90 minutos.

En una realización adicional de uno de los métodos descritos anteriormente, se administra 5-fluorouracilo (5-FU) inmediatamente después de la administración de aflibercept.

En una realización adicional de uno de los métodos descritos anteriormente, se administra una primera cantidad de 5-fluorouracilo (5-FU) por vía intravenosa inmediatamente después de la administración de aflibercept, y se administra una segunda cantidad de 5-FU por vía intravenosa después de la primera cantidad, en infusión continua.

En una realización adicional de uno de los métodos descritos anteriormente, se administran alrededor de 400 mg/m^2 de 5-fluorouracilo (5-FU) por vía intravenosa durante un período de 2 a 4 minutos después de la administración de aflibercept, y en el que se administran 2400 mg/m^2 de 5-FU por vía intravenosa durante alrededor de 46 horas después de la administración de los 400 mg/m^2 en infusión continua.

En una realización, dicho paciente ha sido tratado previamente con terapia basada en oxaliplatino o en bevacizumab.

En otra realización, dicho paciente ha fracasado con quimioterapia, radioterapia o cirugía.

La invención se refiere además a un kit para predecir si un paciente que se sospecha que padece cáncer es un candidato para terapia con aflibercept, o ziv-aflibercept, kit que comprende:

a) medios para medir el nivel de interleucina-8 (IL-8); y

b) opcionalmente, una etiqueta que proporciona instrucciones para el uso de dicho kit para predecir si un paciente que se sospecha que padece cáncer es un candidato para terapia con aflibercept, o ziv-aflibercept.

Otro aspecto de la invención se refiere además a un artículo de fabricación, que comprende:

a) un material para envasar;

b) medios para medir el nivel de interleucina-8 (IL-8); y

c) una etiqueta que proporciona instrucciones para el uso de dicho kit para predecir si un paciente que se sospecha que padece cáncer es un candidato para terapia con aflibercept, o ziv-aflibercept.

Los métodos y uso anteriores de la invención pueden ser, por ejemplo, métodos y uso in vitro o ex vivo.

Los medios para medir el nivel de expresión de la proteína IL8 son muy conocidos en la técnica, e incluyen inmunoensayo tal como ensayo ELISA. Los medios para medir la proteína IL8 incluyen anticuerpos que se unen específicamente a IL8. Dichos medios pueden estar marcados con un compuesto detectable tal como fluoróforos o compuestos radiactivos. Por ejemplo, la sonda o el anticuerpo que se une específicamente a IL8 puede estar marcado con un compuesto detectable. Alternativamente, cuando el kit comprende un anticuerpo, el mismo puede comprender además un anticuerpo secundario, marcado con un compuesto detectable, que se une a un anticuerpo no marcado que se une específicamente a IL8.

Los medios para medir el nivel de expresión de IL8 también pueden incluir reactivos, tales como, por ejemplo, amortiguadores de reacción y/o lavado. Los medios se pueden presentar, por ejemplo, en viales o placas de microtitulación, o pueden estar unidos a un soporte sólido tal como una micromatriz, como puede ser el caso para cebadores y sondas.

Aflibercept, o ziv-aflibercept, se proporciona en una formulación que no es perjudicial para el paciente que se va a tratar.

En una realización, aflibercept, o ziv-aflibercept, se proporciona en una formulación con sacarosa y polisorbato 20 (estabilizantes), cloruro de sodio, amortiguador de citrato, y amortiguador de fosfato de sodio, ajustado a pH final.

En otra realización, aflibercept, o ziv-aflibercept, se suministra en dos presentaciones de producto farmacéutico:

- una presentación a 100 mg de aflibercept, o ziv-aflibercept/4,0 ml (concentración nominal).

- una segunda presentación a 200 mg de aflibercept, o ziv-aflibercept/8,0 ml (concentración nominal).

Ambas presentaciones se fabrican a partir de la misma disolución a granel estéril a 25 mg/ml de aflibercept, o ziv-aflibercept.

Antes de la infusión al paciente, la disolución concentrada se diluye con disolución de cloruro de sodio al 0,9% o dextrosa al 5%.

Los agentes anticancerosos usados en el método o uso citado anteriormente se proporcionan en un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable que no es perjudicial para el paciente que se va a tratar.

Los vehículos y excipiente farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones de esta invención incluyen, pero no están limitados a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de administración de fármacos auto-emulsionantes (SEDDS) tales como succinato de d-a-tocoferol polietilenglicol 1000, tensioactivos usados en las formas de dosificación farmacéuticas tales como Tweens u otras matrices de administración poliméricas similares, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Como aprecian los expertos en la técnica, las composiciones se formulan adecuadamente para ser compatibles con la ruta de administración pretendida. Los ejemplos de rutas de administración adecuadas incluyen ruta parenteral, incluyendo, por ejemplo, inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales, o intratumorales locales. También se puede usar la ruta oral, siempre que la composición esté en una forma adecuada para administración oral, capaz de proteger el principio activo de las enzimas gástricas e intestinales.

Los términos “terapia”, “terapéutico”, “tratamiento” y “tratar” se usan en la presente descripción para caracterizar un método o proceso terapéutico que tiene como objetivo (1) retardar o detener la progresión, agravamiento, o deterioro

de los síntomas del estado o afección patológica al que se aplica dicho término; (2) aliviar o proporcionar mejoras de los síntomas del estado o afección patológica al que se aplica dicho término; y/o (3) revertir o curar el estado o afección patológica al que se aplica dicho término.

Tal y como se usa en la presente descripción, los términos “interleucina-8” e “IL-8” se usan indistintamente, y se refieren a todas las isoformas naturales, incluyendo variantes de corte y empalme alternativas, variantes alélicas, e incluyen variantes naturales, SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) y formas truncadas o segregadas de la proteína IL-8.

En particular, los términos “interleucina 8” se refiere al polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente al número de acceso UniProtKB/Swiss-Prot P10145 (SEQ ID NO: 2) y/o

a) un polipéptido correspondiente a la isoforma madura del polipéptido de (a) (es decir, obtenido después de escisión del péptido señal); y/o

b) una variante alélica del polipéptido de (a) o (b); y/o

c) una variante de corte y empalme de un polipéptido de (a), (b) o (c); y/o

d) un mutante constitutivamente activo de un polipéptido de (a), (b), (c) o (d).

e) una isoforma obtenida por procesamiento proteolítico de un polipéptido de (a), (b), (c), (d) o (e).

Por “isoforma de un polipéptido” se quiere decir un polipéptido que tiene al menos alrededor de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de referencia de polipéptido de longitud completa, y tiene la misma actividad biológica. En el contexto de la presente solicitud, el porcentaje de identidad se calcula usando un alineamiento global (es decir, las dos secuencias se comparan sobre su longitud completa). Los métodos para comparar la identidad de dos o más secuencias son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el programa “needle”, que usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) para encontrar el alineamiento óptimo (incluyendo espacios) de dos secuencias cuando se considera su longitud completa. El programa “needle” está disponible, por ejemplo, en el sitio World Wide Web ebi.ac.uk. El porcentaje de identidad de acuerdo con la invención se puede calcular usando el programa EMBOSS::needle (global) con un parámetro de “Espacio Abierto” igual a 10,0, un parámetro de “Extensión del Espacio” igual a 0,5, y una matriz Blosum62.

“Isoforma” también se refiere a todas las formas modificadas post-traduccionalmente de la proteína IL8. Las isoformas modificadas post-traduccionalmente pueden incluir formas acetiladas, formiladas, lipoiladas, miristoiladas, palmitoiladas, alquiladas, metiladas, amidadas, glicosiladas, hidroxiladas, nitrosiladas, fosforiladas, sulfatadas, polisialiladas y sialiladas.

El “nivel de referencia de la expresión de IL-8” se puede determinar como un valor único o un intervalo de valores que se determina con base en el nivel de expresión de IL-8 medido, por ejemplo, en una población de sujetos sanos o en una población de sujetos que necesita una terapia con aflibercept.

En una realización, el nivel de referencia de la expresión de IL-8 se determina con base en el nivel de expresión de IL-8 medido en una población de sujetos que necesita una terapia con aflibercept.

Típicamente, la población analizada se podría dividir en percentiles con base en el nivel medido de expresión de IL-8. El nivel de referencia se podría definir como el percentil que proporciona la mejor separación entre pacientes que padecen un cáncer, en los que el tratamiento con aflibercept es eficiente y pacientes que padecen un cáncer en los que el tratamiento con aflibercept no es lo suficientemente eficiente para curarlo.

En el estudio dado a conocer en el Ejemplo 1 más adelante, el nivel de referencia de la expresión de IL-8 fue 19 pg/ml (percentil 77).

Sin embargo, el nivel de referencia de la expresión de IL-8 puede variar i) según el tamaño de la población estudiada, y ii) dependiendo del método usado para medir la expresión de IL-8.

El nivel de la proteína interleucina 8 se puede determinar, por ejemplo, usando métodos de detección inmunológicos tales como un ensayo ELISA. Los métodos implican un anticuerpo que se une a la proteína interleucina 8, por ejemplo un anticuerpo monoclonal o policlonal, una variante o fragmentos de anticuerpo tales como un anticuerpo de cadena única, un fragmento divalente, un minicuerpo, un fragmento Fv de cadena única (sc(Fv)), un anticuerpo Sc(Fv)2, un fragmento Fab o un fragmento F(ab’)2, o un anticuerpo de dominio único. Dichos anticuerpos son muy conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. También se pueden obtener principalmente por inmunización de animales (por ejemplo, conejos, ratas o ratones) con la proteína interleucina 8. Se pueden usar anticuerpos para determinar la expresión de proteína en un intervalo de ensayos inmunológicos que incluyen sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencia western, inmunohistoquímica/inmunofluorescencia (es decir, la detección de proteínas en células o tejidos fijados),

radioinmunoensayo tal como RIA (inmunoensayo ligado a radiactividad), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos de “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinamiento, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, por ejemplo FIA (inmunoensayo ligado a fluorescencia), inmunoensayos de quimioluminiscencia, ECLIA (inmunoensayo de electroquimioluminiscencia) e inmunoensayos con proteína A. Dichos ensayos son rutinarios y muy conocidos para el experto en la técnica (Ausubel et al (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York).

La expresión proteica de interleucina 8 también se puede determinar por un método proteómico tal como ensayos de espectrometría de masas (LC-MS o LC-MS/MS). Las técnicas espectrométricas de masas cualitativas y cuantitativas son conocidas y usadas en la técnica. Para este objetivo, se seleccionan péptidos diana específicos para proteínas marcadoras, y se cuantifican con base en curvas de calibración establecidas con péptidos sintéticos marcados con isótopos estables. Los digeridos enzimáticos, añadidos con una cantidad definida de péptidos diana marcados con isótopo, se analizan por cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas. La relación entre los péptidos diana marcados y no marcados se mide para evaluar las concentraciones de péptidos diana, y por lo tanto la concentración de marcador proteico.

La expresión “IL8 circulante” se pretende que signifique las proteínas IL8 presentes en sangre, suero y plasma.

Un “sujeto” o un “paciente” puede ser un mamífero humano o no humano, tal como monos, perros, gatos, cobayas, hámsters, conejos, vacas, caballos, cabras y ovejas.

Las Figuras 1 y 2 ilustran la relación entre los niveles de IL8 y la probabilidad de progresión de la enfermedad. Se representa la probabilidad de progresión de la enfermedad después de 12 meses en relación con los niveles plasmáticos de IL-8 al inicio (Figura 1), y la diferencia entre los niveles plasmáticos de IL8 al inicio y el último punto de medida antes de la progresión de la enfermedad (Figura 2). Brevemente, la figura 1 muestra que altos niveles de IL8 se correlacionan con una probabilidad incrementada de progresión de la enfermedad, y que este efecto es ligeramente más pronunciado en pacientes tratados con aflibercept frente a FOLFOX. Por otra parte, la figura 2 muestra que el incremento en IL8 respecto al inicio también corresponde con la progresión de la enfermedad. Como los incrementos en IL8 se representan en una escala logarítmica, los valores entre -3 y 0 corresponden a un incremento en IL8 < 1 pg/ml, mientras los valores entre 0 y 3 representan incrementos >1 pg/ml. Los datos muestran de esta manera que incluso pequeños incrementos en IL8 respecto al inicio ya corresponden con una probabilidad incrementada de progresión de la enfermedad en el brazo de aflibercept.

EJEMPLO: Efecto de interleucina 8 en PFS en el Estudio AFFIRM

Estudio ECF10668 (AFFIRM)

EFC10668 se diseñó como un estudio aleatorizado, multinacional, que compara la aparición de efectos adversos en pacientes con cáncer colorrectal metastásico (MCRC) tratados con:

i) un FOLFOX6 modificado (una combinación de oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU) y ácido folínico) proporcionado por vía intravenosa cada 2 semanas como tratamiento de primera línea (brazo A); o

ii) aflibercept a 4 mg/kg combinado con un FOLFOX6 modificado proporcionado por vía intravenosa cada 2 semanas como tratamiento de primera línea; o

Calendario de administración

Se administró a los pacientes por vía intravenosa ya sea aflibercept inmediatamente seguido de oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU) y ácido folínico (régimen FOLFOX6 modificado) o FOLFOX6 modificado solo, dependiendo del brazo al que fueron asignados,

Este tratamiento se repitió cada 2 semanas hasta la progresión (o toxicidad inaceptable, o abandono consentido).

Dosificación

Los pacientes aleatorizados en el brazo de aflibercept recibieron 4 mg/kg IV cada 2 semanas.

Lo siguiente se administró a pacientes en ambos grupos de tratamiento:

• Oxaliplatino (Eloxatin®)

• Ácido folínico (también conocido como leucovorina)

• 5-fluorouracilo

Formulaciones de oxaliplatino, 5-fluorouracilo, y ácido folínico:

• Los productos usados fueron aquellos disponibles en la farmacia del hospital/clínica

• Ruta de administración: IV

Dosis: Se administraron oxaliplatino, ácido folínico, y 5-fluorouracilo de acuerdo con un régimen mFOLFOX6, como sigue:

• Oxaliplatino 85 mg/m^2 como una infusión IV de 2 horas en el día 1

• Ácido folínico 350 mg/m^2 como una infusión IV de 2 horas en el día 1

• 5-fluorouracilo 400 mg/m^2 como un bolo IV en el día 1, y después 2400 mg/m^2 como una infusión continua IV de 46 horas empezando el día 1

En el caso de área superficial corporal >2,0 m^2, las dosis reales de oxaliplatino y de 5-FU se tuvieron que ajustar a un BSA máximo de 2,0 m^2 por razones de seguridad. La reducción de la dosis y/o retraso en el tratamiento y/o interrupción del tratamiento se planearon en el caso de toxicidad grave. El régimen con FOLFOX6 modificado se administró después de la administración de aflibercept.

Duración del tratamiento:

El tratamiento para un paciente individual se administró hasta la progresión o hasta que ocurrió toxicidad inaceptable, o el paciente abandonó de forma voluntaria.

La duración del tratamiento se estimó que era aproximadamente 12 meses.

Características demográficas y de línea base

La Tabla 1 siguiente compara las características demográficas y de pacientes en la línea base entre poblaciones de biomarcadores evaluables y no evaluables.

La “población de biomarcadores evaluable” se define como la población de pacientes que proporcionó una muestra de sangre/tumor para la evaluación del biomarcador; mientras la “población de biomarcadores no evaluable” corresponde a los pacientes que no proporcionaron muestra de sangre/tumor para la evaluación del biomarcador (por ejemplo, los pacientes que no dieron su consentimiento para el estudio del biomarcador).

Todas las características son similares entre poblaciones, excepto para la región de origen de los pacientes: Europa Oriental tiende a estar sobre-representada, y los demás países tienden a estar sub-representados en la población de biomarcadores evaluable comparado con la población de biomarcadores no evaluable.

Tabla 1: Sumario de la demografía de los pacientes y de las características de los pacientes en la línea base - Población evaluable

	Población de biomarcadores no evaluable		Población de biomarcadores evaluable		Valor de p
	mFolfox6 (N=57)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=70)	
Género [n(%)]					1,0000[a]
Número	57	49	60	70	
Hombre	32 (56,1%)	33 (67,3%)	36 (60,0%)	43 (61,4%)	
Mujer	25 (43,9%)	16 (32,7%)	24 (40,0%)	27 (38,6%)	
Edad (Años)					0,2811[b]
Número	57	49	60	70	
Mediana	66,0	62,0	62,0	62,5	
Media (SD)	63,7 (10,0)	61,8 (9,5)	61,3 (9,4)	61,7 (8,7)	
Mín : Máx	44 : 87	29 : 75	37 : 81	41 : 79	

	Población de biomarcadores no evaluable		Población de biomarcadores evaluable		Valor de p
	mFolfox6 (N=57)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=70)	
Clase de edad [n(%)]					0.2421[a]
Número	57	49	60	70	
<65	27 (47,4%)	28 (57,1%)	38 (63,3%)	42 (60,0%)	
≥65 pero <75	23 (40,4%)	20 (40,8%)	20 (33,3%)	25 (35,7%)	
≥75	7 (12,3%)	1 (2,0%)	2 (3,3%)	3 (4,3%)	
Raza [n(%)]					0,0640[a]
Número	57	49	60	70	
Caucásica/Blanca	41 (71,9%)	37 (75,5%)	49 (81,7%)	60 (85,7%)	
Negra	0	0	0	1 (1,4%)	
Asiática/Oriental	16(28,1%)	11 (22,4%)	11 (18,3%)	9 (12,9%)	
Otra	0	1 (2,0%)	0	0	
Región					0,0029[a]
Número	57	49	60	70	
Europa Occidental	37 (64,9%)	30 (61,2%)	37 (61,7%)	45 (64,3%)	
Europa Oriental	3 (5,3%)	3 (6,1%)	12 (20,0%)	12 (17,1%)	
Otros países	17 (29,8%)	16 (32,7%)	11 (18,3%)	13 (18,6%)	
BSA (m2)					0,1091[b]
Número	57	49	60	70	
Mediana	1,8	1,8	1,8	1,8	
Media (SD)	1,7 (0,2)	1,8 (0,2)	1,8 (0,2)	1,8 (0,2)	
Mín : Máx	1 : 2	1 : 2	1 : 2	1 : 2	
Peso (kg)					0,0838[b]
Número	57	49	60	70	
Mediana	67,6	70,0	73,2	71,4	
Media (SD)	67,3 (14,1)	71,1 (16,6)	74,0 (17,0)	71,5 (15,6)	
Mín : Máx	40 : 107	40 : 115	48 : 134	40 : 117	

[a]comparación de la distribución de frecuencias basado en ensayo exacto de Fisher - bilateral. [b]Usando ANOVA (tipo 3) con factores:BIOPOP, BIOPOP. Los registros con valores ausentes para factores o respuesta se excluyeron de los análisis estadísticos. La distribución de frecuencias de co-variables se compara entre poblaciones evaluables y no evaluables

	Población de biomarcadores no evaluable		Población de biomarcadores evaluable		Valor de p
	mFolfox6 (N=57)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=70)	
Nota: Europa Occidental = Alemania, Italia, España, Reino Unido; Europa Oriental = Federación Rusa; Otros países = Australia, Corea					

Características de la enfermedad en la línea base

Las características de la enfermedad en la línea base fueron similares en las dos poblaciones (véanse las Tablas 2 y 3 a continuación).

Tabla 2: Sumario de las características de la enfermedad en el diagnóstico inicial

	Población de biomarcadores no evaluable		Población de biomarcadores evaluable		Valor de p
	mFolfox6 (N=57)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=70)	
Sitio primario [n(%)]					0,7045[a]
Número	57	49	60	70	
Colon	27 (47,4%)	26 (53,1%)	31 (51,7%)	33 (47,1%)	
Recto sigmoide	9 (15,8%)	15 (30,6%)	16 (26,7%)	19 (27,1%)	
Recto	21 (36,8%)	8 (16,3%)	13 (21,7%)	18 (25,7%)	
Tipo de histología [n(%)]					
Número	57	49	60	70	
Adenocarcinoma	57 (100%)	49 (100%)	60 (100%)	70 (100%)	
Etapa en el diagnóstico [n(%)]					0,2297[a]
Número	56	48	57	68	
Etapa I	1 (1,8%)	0	2 (3,5%)	2 (2,9%)	
Etapa II	2 (3,6%)	1 (2,1%)	6 (10,5%)	4 (5,9%)	
Etapa III	5 (8,9%)	3 (6,3%)	3 (5,3%)	4 (5,9%)	
Etapa IV	48 (85,7%)	44 (91,7%)	46 (80,7%)	58 (85,3%)	
Tiempo desde el diagnóstico hasta la aleatorización (meses)*					0,6620[b]
Número	57	49	60	69	
Mediana	1,4	1,8	1,6	1,7	
Media (SD)	12,6 (30,9)	9,2(16,9)	9,8 (19,8)	9,7 (17,5)	
Mín : Máx	0 : 149	0 : 80	0 : 84	0 : 80	

	Población de biomarcadores no evaluable		Población de biomarcadores evaluable		Valor de p
	mFolfox6 (N=57)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=70)	

[a]comparación de la distribución de frecuencias basada en el ensayo exacto de Fisher - bilateral. [b]Usando ANOVA (tipo 3) con factores:BIOPOP, BIOPOP. Los registros con valores ausentes para factores o respuesta se excluyeron de los análisis estadísticos. La distribución de frecuencias de co-variables se compara entre poblaciones evaluables y no evaluables

*Si el día de la fecha inicial del diagnóstico no se conoce, se considera como el primer día del mes

Tabla 3: Sumario de los órganos implicados en la línea base

	Población de biomarcadores no evaluable		Población de biomarcadores evaluable		Valor de p
	mFolfox6 (N=57)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=70)	
Número de órganos metastásicos implicados en la línea base (excluyendo el sitio primario) [n(%)]					0,1711[a]
Número	57	49	60	70	
0	0	0	1 (1,7%)	0	
1	16 (28,1%)	15 (30,6%)	15 (25,0%)	12 (17,1%)	
>1	41 (71,9%)	34 (69,4%)	44 (73,3%)	58 (82,9%)	
Órganos metastásicos implicados en la línea base (excluyendo el sitio primario) [n(%)]*	57 (100%)	49 (100%)	59 (98,3%)	70 (100%)	
Hígado	44 (77,2%)	42 (85,7%)	47 (78,3%)	57 (81,4%)	
Pulmón	27 (47,4%)	18 (36,7%)	25 (41,7%)	28 (40,0%)	
Ganglios linfáticos	26 (45,6%)	25 (51,0%)	30 (50,0%)	38 (54,3%)	
Músculo / tejido blando	9 (15,8%)	6 (12,2%)	14 (23,3%)	10 (14,3%)	
Peritoneo	8 (14,0%)	7 (14,3%)	8 (13,3%)	16 (22,9%)	
Pleura	5 (8,8%)	7 (14,3%)	2 (3,3%)	1 (1,4%)	
Adrenal	2 (3,5%)	0	1 (1,7%)	1 (1,4%)	
Hueso	2 (3,5%)	1 (2,0%)	4 (6,7%)	4 (5,7%)	
Riñones	1 (1,8%)	0	0	0	
Bazo	1 (1,8%)	1 (2,0%)	1 (1,7%)	1 (1,4%)	
Vejiga	0	0	1 (1,7%)	1 (1,4%)	
Órganos metastásicos implicados en la clase de la línea base (excluyendo el sitio primario) [n(%)]					0,3536[a]
Número	57	49	60	70	

	Población de biomarcadores no evaluable		Población de biomarcadores evaluable		Valor de p
	mFolfox6 (N=57)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=70)	
Sin metástasis hepática, o metástasis hepáticas y otras metástasis	49 (86,0%)	39 (79,6%)	51 (85,0%)	63 (90,0%)	
Solamente metástasis hepáticas	8 (14,0%)	10 (20,4%)	9 (15,0%)	7 (10,0%)	
[a]comparación de la distribución de frecuencias basada en el ensayo exacto de Fisher - bilateral. Los registros con valores ausentes para factores o respuesta se excluyeron de los análisis estadísticos. La distribución de frecuencias de co-variables se compara entre poblaciones evaluables y no evaluables *Los porcentajes no son aditivos (suma mayor que 100%)					

Evaluación de seguridad

A. Grado de exposición

La Tabla 4 siguiente muestra que los pacientes en la población de biomarcadores evaluable estuvieron expuestos ligeramente más tiempo a tratamiento que los pacientes en la población de biomarcadores no evaluable (número de ciclos de la mediana: 12 frente a 9 o 10).

No hubo diferencia en la exposición entre los brazos de tratamiento en la población de biomarcadores evaluable.

Tabla 4: Sumario de la exposición global al tratamiento del estudio

	Población de biomarcadores no evaluable		Población de biomarcadores evaluable	
	mFolfox6 (N=56)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=70)
Número de ciclos recibidos por el paciente				
Suma	614	572	770,0	865,0
Media (SD)	11,0(7,0)	11,7 (9,5)	12,8 (7,0)	12,4 (7,9)
Mediana	10,0	9,0	12,0	12,0
Mín : Máx	1 : 43	1 : 44	3 : 33	1 : 42
Número de ciclos recibidos por el paciente				
1	2 (3,6%)	3 (6,1%)	0	2 (2,9%)
2	2 (3,6%)	2 (4,1%)	0	2 (2,9%)
3	3 (5,4%)	1 (2,0%)	2 (3,3%)	2 (2,9%)
4	3 (5,4%)	4 (8,2%)	5 (8,3%)	8 (11,4%)
5	1 (1,8%)	0	1 (1,7%)	2 (2,9%)
6	1 (1,8%)	6 (12,2%)	0	4 (5,7%)
7	1 (1,8%)	5 (10,2%)	1 (1,7%)	3 (4,3%)
8	6 (10,7%)	1 (2,0%)	11 (18,3%)	2 (2,9%)

	Población de biomarcadores no evaluable		Población de biomarcadores evaluable	
	mFolfox6 (N=56)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Aflibercept/ mFolfox6 (N=70)
9	6 (10,7%)	3 (6,1%)	0	5 (7,1%)
10	5 (8,9%)	2 (4,1%)	4 (6,7%)	3 (4,3%)
11-15	16 (28,6%)	11 (22,4%)	21 (35,0%)	13 (18,6%)
16-20	7 (12,5%)	4 (8,2%)	6 (10,0%)	14 (20,0%)
21-25	1 (1,8%)	3 (6,1%)	5 (8,3%)	6 (8,6%)
>25	2 (3,6%)	4 (8,2%)	4 (6,7%)	4 (5,7%)
Duración de la exposición (semanas)				
Número	56	49	60	70
Media (SD)	25,2 (16,0)	27,5 (22,4)	29,5 (16,4)	28,7 (18,7)
Mediana	24,1	23,1	27,3	25,4
Mín : Máx	2 : 95	2 : 106	6 : 77	2 : 88
Duración de la exposición = ((Primera fecha del último ciclo + 14) - Primera fecha del primer ciclo)/7 SD: desviación estándar				

B. Perfilado del plasma

La concentración plasmática de 27 citocinas, factores de crecimiento o receptores solubles se determinó mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) usando dos kits Fluorokine® MAP (el panel A de angiogénesis humano y el panel de citocinas de alta sensibilidad humano; R&D Systems). Los experimentos de competición se llevaron a cabo para ensayar la interferencia de aflibercept con la detección de VEGF-A, VEGF-D y factor de crecimiento placentario (PlGF). Se evaluaron la angiopoyetina-2 (ANGPT2), SDF1-α, HGF, VEGF-C, receptor soluble de VEGF 3 (sFLT4, SVEGFR3) y SVEGFR2 por ELISA único (R&D Systems). Los marcadores plasmáticos se analizaron en la línea base, a 30 y 60 días después de la primera infusión de tratamiento del estudio y 30 días después de la última infusión de aflibercept.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los pacientes con biomarcadores evaluables y los pacientes sin biomarcadores evaluables se evaluaron usando un ensayo exacto de Fisher bilateral para variables categóricas y ANOVA para variables continuas. Los biomarcadores se analizaron como variables cuantitativas, mediante la codificación de la ausencia o presencia de una mutación somática como 0 o 1, y genotipos SNP como 0, 1 o 2 dependiendo del número de alelos menores presentes. Los efectos lineales de los biomarcadores en la línea base en PFS se evaluaron usando un modelo de riesgo proporcional de Cox con las co-variables siguientes: estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (0-1 frente a 2), metástasis solo en el hígado (sí/no), y el número de órganos con metástasis distantes (1 frente a >1), un efecto del tratamiento, un efecto del biomarcador, y un efecto de interacción biomarcador-tratamiento. La significancia de los últimos dos efectos se ensayó conjuntamente por un ensayo de Wald de dos grados de libertad. Los métodos estadísticos ampliados se describen en métodos suplementarios.

Resultados

De los 236 pacientes en la población ITT del ensayo AFFIRM, 227 (96%) fueron evaluables para respuesta. De éstos, 130 (57%) proporcionaron al menos una muestra biológica, 60 (46%) y 70 (54%) de los cuales participaron en los brazos de mFOLFOX6 y mFOLFOX6 más aflibercept, respectivamente. No hubo una diferencia importante a un valor de P ajustado por la tasa de descubrimientos falsos (FDR) de 0,05 entre los pacientes que proporcionaron una muestra biológica y aquellos que no lo hicieron en términos de biométrica, etnicidad, y características de la enfermedad de los pacientes en la línea base, o en los criterios de valoración de eficacia y seguridad (Tabla 1). De

aquellos que proporcionaron al menos una muestra biológica, 51 (39%) proporcionaron muestras para cada uno de los 3 tipos de biomarcadores, con 88 (68%) y 97 (74%) pacientes proporcionando muestras para 2 o 1 de los tipos de biomarcadores, respectivamente. Cada tipo de biomarcador se analizó separadamente, para evitar grupos de pacientes que eran demasiado pequeños para subanálisis.

Perfilado de marcadores plasmáticos para eficacia

Se midieron los niveles plasmáticos de 27 marcadores en diferentes puntos de tiempo (es decir, en la línea base [87 pacientes]; 30 y 60 días después del inicio del tratamiento [82 y 73 pacientes]; y 30 días después del último tratamiento [56 pacientes] como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5: Número de observaciones por punto de tiempo - total, por debajo del límite de cuantificación (LOQ) y de detección (LOD)

	Línea base			Día 30			Día 60			EOT + 30 Días		
Total	Total	<LOQ	<LOD	Total	<LOQ	<LOD	Total	<LOQ	<LOD	Total	<LOQ	<LOD
ANGPT1	87	1	1	80	1	0	73	0	0	56	0	0
ANGPT2	86	1		82	1		72	0		55	1	
CSF2	84	28	17	80	38	16	72	32	17	54	25	16
CXCL12	86	0	0	82	2	2	72	0	0	55	0	0
FGF1	87	14	14	80	16	16	73	18	18	56	8	8
Endostatina	87			80			73			56		
FGF2	87	19	11	80	20	15	73	19	11	56	10	5
FIGF	87	12	12	80	4	4	73	1	1	56	1	1
HGF	86	0	0	82	7	7	72	1	1	55	1	1
IFNG	84	6	4	80	8	3	72	6	2	54	11	8
IL10	84	0	0	80	1	1	72	2	2	54	0	0
IL12	84	3	3	80	1	1	72	3	3	54	8	7
IL1B	84	1	1	80	0	0	72	1	1	54	4	4
IL2	84	3	2	80	3	1	72	1	1	54	8	6
IL4	84	2	2	80	1	1	72	2	2	54	7	7
IL5	84	2	1	80	3	0	72	1	0	54	1	1
IL6	84	0	0	80	2	1	72	0	0	54	1	1
IL8	84	0	0	80	1	1	72	0	0	54	0	0
PGF	87	8	8	80	6	6	73	2	2	56	1	1
TNF	84	2	1	80	2	1	72	1	0	54	2	1
PDGFA	87			80			73			56		
VEGFA	84	6	1	80	4	1	72	2	0	54	4	0
PDGFB	87			80			73			56		
VEGFC	86	1	1	82	0	0	72	0	0	55	1	0
sFLT4	86	0	0	82	7	7	72	1	1	55	1	1
THBS2	87			80			73			56		
sKDR	86	0	0	82	7	7	72	1	1	55	1	1

Todas las citocinas se midieron en pg/ml, pero se aplicaron algunas transformaciones cuando fue necesario para obtener una distribución simétrica o valores numéricos menores (ng/ml) para los modelos de asociación, como se representa en la tabla 6.

Tabla 6 - Transformaciones seleccionadas de niveles plasmáticos de citocinas originales (pg/ml)

Citocina	Transformación
ANGPT1	log
ANGPT2	log
CSF2	raíz cuadrada
CXCL12	ng/ml
FGF1	raíz cúbica
Endostatina	log
FGF2	raíz cuadrada
FIGF	raíz cúbica
HGF	log
IFNG	raíz cuadrada
IL10	raíz cúbica
IL12	Ninguna
IL1B	raíz cúbica
IL2	raíz cuadrada
IL4	Ninguna
IL5	Log
IL6	Log
IL8	Log
PGF	ng/ml
TNF	raíz cuadrada
PDGFA	log
VEGFA	Log
PDGFB	log
VEGFC	Log
sFLT4	raíz cuadrada (ng/ml)
THBS2	log
sKDR	raíz cuadrada (ng/ml)

Se evaluó la asociación de cada marcador plasmático en la línea base con PFS, mientras se permitía una interacción con el tratamiento (Tabla 7). El valor de P más bajo se obtuvo para IL8 (P = 0,0211; FDR = 0,596 y P = 0,0218 para interacción).

Tabla 7: Efecto de los biomarcadores plasmáticos en la línea base sobre PFS. Se muestran los valores de P asociados con el efecto combinado, el efecto combinado corregido por FDR, el efecto del biomarcador plasmático y el biomarcador con interacción del tratamiento.

Proteína	Valores de *P*			
	Efecto conjunto	Efecto conjunto corregido por FDR	Efecto del nivel plasmático	Tratamiento mediante el efecto del nivel plasmático
IL8	0,0221	0,5962	0,6701	0,0218
THBS2	0,1408	0,6523	0,0545	0,2234
CXCL12	0,1610	0,6523	0,0573	0,1640
IL10	0,1669	0,6523	0,0647	0,1311
Ang1	0,1768	0,6523	0,0724	0,0831
FIGF	0,1974	0,6523	0,6826	0,1704
FGF2	0,2063	0,6523	0,1722	0,0768
sVEGFR2	0,2171	0,6523	0,1616	0,0812
PDGFA	0,2474	0,6523	0,1155	0,1052
IL6	0,2689	0,6523	0,1061	0,1838
FGF1	0,3185	0,6523	0,4759	0,1536
VEGF-A	0,3202	0,6523	0,2549	0,7133
CSF2	0,3272	0,6523	0,4278	0,1679
IL12	0,3587	0,6523	0,3664	0,1808
IFNg	0,3855	0,6523	0,8662	0,2984
IL4	0,3866	0,6523	0,7326	0,4796
PIGF	0,5008	0,7955	0,3018	0,2595
PDGFB	0,5442	0,8163	0,4795	0,2963
IL1B	0,6025	0,8439	0,3183	0,3595
HGF	0,6286	0,8439	0,3369	0,5093
IL2	0,6564	0,8439	0,7696	0,4093
Endostatina	0,9021	0,9783	0,7429	0,9824
sFLT4	0,9063	0,9783	0,6849	0,8668
TNF	0,9461	0,9783	0,8736	0,7442
Ang2	0,9698	0,9783	0,9279	0,9747
VEGF-C	0,9772	0,9783	0,8375	0,8307
IL5	0,9783	0,9783	0,8813	0,8501

El modelo de Cox asume una relación lineal entre el marcador plasmático y el log de la función de riesgo de PFS, pero como esta hipótesis se puede violar cuando se analizan marcadores continuos que varían considerablemente, puede ser más relevante un efecto umbral. Se exploró esta posibilidad buscando el nivel de corte óptimo que maximiza la interacción con el tratamiento y el marcador plasmático. Para IL8, el corte óptimo fue a 19 pg/ml (percentil 77). Un modelo, en el cual IL8 se analizó como una variable binaria con este umbral, se ajustó mejor que un modelo con niveles continuos de IL8 (AIC de 469,3 en comparación con 477,6). Los pacientes con bajos niveles

de IL8 (≤19 pg/ml, 77% de los pacientes) presentaron una PFS mayor en el brazo de aflibercept/mFLOFOX6 que en el brazo de mFOLFOX6 (Tabla 8).

Tabla 8: Estimaciones de Kaplan-Meier del efecto de biomarcadores en meses de PFS.

	Mediana de mFOLFOX6 (99% CI)	Mediana de Aflibercept más mFOLFOX6 (99% CI)	Relación de riesgo frente a mFOLFOX6 (99% CI)
Marcadores proteicos del plasma			
Todos los pacientes	8,8 (6,57-10,02)	8,5 (6,67-10,05)	0,979 (0,505-1,897)
IL8 ≤ 19 pg/ml	8,8 (5,62-10,91)	9,3 (7,52-11,10)	0,764 (0,363-1,607)
IL8 > 19 pg/ml	8,8 (5,09-15,64)	4,1 (2,33-8,54)	2,71 (0,735-9,984)

CI, intervalo de confianza; mt, mutante; wt, tipo salvaje.

También se analizó si los cambios relacionados con el tratamiento en los marcadores plasmáticos podían predecir el resultado del tratamiento con aflibercept. El modelo de Cox incluyó el efecto de los niveles plasmáticos de la línea base y la diferencia en la expresión medida en la línea base y el último punto de tiempo antes de la interrupción, progresión de la enfermedad o muerte (es decir, a los 30 días o 60 días de tratamiento), mientras se permitía la interacción con el brazo de tratamiento. IL8 fue el único marcador con un efecto significativo de cambio desde la línea base sobre PFS (P = 0,0018; FDR = 0,0478; Tabla 9). Este efecto no fue diferente entre los brazos de tratamiento (P = 0,2028). Los niveles altos de IL8 en la línea base o los incrementados después de la línea base correspondieron a una mayor probabilidad de progresión de la enfermedad a los 12 meses (Figuras 1 y 2).

Tabla 9: Efecto de los cambios en marcadores plasmáticos desde la línea base sobre PFS. Se muestran los valores de *P* (y FDR) de los efectos combinados de marcador plasmático y tratamiento por interacciones de marcadores plasmáticos. También se presentan los valores de P para el cambio desde la línea base y la interacción.

	Valores de *P*			
Proteína	Efecto conjunto	Efecto conjunto corregido por FDR	Cambio desde el efecto de la línea base	Tratamiento mediante cambio desde el efecto de la línea base
IL8	0,0018	0,0478	0,0006	0,2028
IL10	0,0342	0,4525	0,5214	0,8204
VEGFA	0,0619	0,4525	0,0189	0,0704
CXCL12	0,0670	0,4525	0,1714	0,0318
CSF2	0,0855	0,4619	0,0266	0,1682
VEGFC	0,1127	0,5072	0,0742	0,9355
IL5	0,1886	0,7275	0,0684	0,1657
Endostatina	0,2418	0,7882	0,9988	0,2668
PDGFA	0,3092	0,7882	0,1508	0,9922
TNF	0,3209	0,7882	0,1770	0,1554
IL4	0,3211	0,7882	0,1938	0,7631
FGF2	0,3851	0,8191	0,6468	0,3957
sFLT4	0,3944	0,8191	0,2533	0,1729
THBS2	0,4677	0,8426	0,2387	0,6683
FGF1	0,4770	0,8426	0,4669	0,2242

Valores de *P*

Proteína	Efecto conjunto	Efecto conjunto corregido por FDR	Cambio desde el efecto de la línea base	Tratamiento mediante cambio desde el efecto de la línea base
PGF	0,4993	0,8426	0,2501	0,2755
ANGPT2	0,5638	0,8924	0,3373	0,8394
IL1B	0,6261	0,8924	0,3345	0,5414
PDGFB	0,6583	0,8924	0,3730	0,6009
IL12	0,6611	0,8924	0,7934	0,7744
IL2	0,7984	0,9482	0,9352	0,6027
sKDR	0,8375	0,9482	0,6009	0,5613
HGF	0,8383	0,9482	0,5804	0,5665
IFNG	0,8559	0,9482	0,6923	0,9101
ANGPT1	0,8814	0,9482	0,6269	0,8538
FIGF	0,9131	0,9482	0,6838	0,7528
IL6	0,9963	0,9963	0,9893	0,9594

Cuando los biomarcadores plasmáticos se midieron solo en la línea base, IL8 tuvo el efecto más prominente sobre PFS, que se describió mejor como un efecto umbral con alta IL8 circulante (IL8 > 19 pg/ml) asociado con una PFS más corta en los pacientes tratados con aflibercept.

Cuando los biomarcadores plasmáticos se midieron en la línea base y durante el tratamiento, altos niveles de IL8 circulante en la línea base, junto con niveles incrementados de IL8 medidos durante el tratamiento, estuvieron asociados significativamente con PFS reducida (FDR = 0,0478).

Conclusiones

Se identificó que altos niveles de IL8 en la línea base se correlacionaban con tiempos de supervivencia más cortos, y los pacientes con niveles incrementados de IL8 durante el tratamiento eran más propensos a progresar.

Esto sugiere que los pacientes con altos niveles de IL8, en la línea base o durante el tratamiento, presentan un riesgo incrementado de progresión de la enfermedad durante la terapia con aflibercept.

Listado de secuencias

<110> SANOFI

<120> MÉTODO PARA PREDECIR EL RESULTADO DE UN TRATAMIENTO CON AFLIBERCEPT DE UN PACIENTE QUE SE SOSPECHA QUE PADECE UN CÁNCER

<130> FR2014-007 EP

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

< 211> 431

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Aflibercept

<400> 1

Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr
195 200 205

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
210 215 220

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
225 230 235 240

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
245 250 255

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
260 265 270

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
275 280 285

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
290 295 300

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
305 310 315 320

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
325 330 335

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
340 345 350

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
355 360 365

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
370 375 380

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
385 390 395 400

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
405 410 415

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
420 425 430

<210> 2

< 211> 99

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ile Ser
1               5                   10                  15

Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu
            20                  25                  30

Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe
        35                  40                  45

Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr
    50                  55                  60

Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro
65                  70                  75                  80

Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala
                85                  90                  95

Glu Asn Ser
```

REIVINDICACIONES

1. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente que se sospecha que padece cancer, en el que se ha identificado que el paciente tiene un menor nivel de interleucina-8 (IL-8) en una muestra biológica en comparación con el nivel de referencia de la expresión de IL-8.

2. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según la reivindicación 1, en el que el nivel de referencia de la expresión de IL-8 está entre 10 y 30 pg/ml.

3. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el nivel de referencia de la expresión de IL-8 es 19 pg/ml.

4. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra biológica se elige del grupo que consiste en sangre, suero y plasma.

5. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el cáncer es cáncer de colon, un cáncer colorrectal o un cáncer rectal.

6. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según la reivindicación 5, en el que el cáncer colorrectal es un cáncer colorrectal metastásico.

7. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el nivel de IL-8 que se determina es el nivel circulante.

8. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se administran a dicho paciente cantidades terapéuticamente eficaces de aflibercept, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU) y ácido folínico.

9. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se administran a dicho paciente cantidades terapéuticamente eficaces de aflibercept, ácido folínico, 5-fluorouracilo (5-FU) e irinotecán.

10. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho paciente ha sido tratado previamente con terapia basada en oxaliplatino o en bevacizumab.

11. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho paciente ha fracasado con quimioterapia, radioterapia o cirugía.

12. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 a 11, en el que se administran al paciente ácido folínico a una dosis comprendida entre 200 mg/m^2 y 600 mg/m^2, 5-fluorouracilo (5-FU) a una dosis comprendida entre 2000 mg/m^2 y 4000 mg/m^2, irinotecán a una dosis comprendida entre 100 mg/m^2 y 300 mg/m^2, y aflibercept a una dosis comprendida entre 1 mg/kg y 10 mg/kg.

13. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 a 12, en el que se administran al paciente ácido folínico a una dosis de 400 mg/m^2, 5-fluorouracilo (5-FU) a una dosis de 2800 mg/m^2, irinotecán a una dosis de 180 mg/m^2, y aflibercept a una dosis de 4 mg/kg.

14. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 a 13, en el que se administra ácido folínico por vía intravenosa a una dosis de 400 mg/m^2, se administra 5-fluorouracilo (5-FU) por vía intravenosa a una dosis de 2800 mg/m^2, se administra irinotecán por vía intravenosa a una dosis de 180 mg/m^2, y se administra aflibercept por vía intravenosa a una dosis de 4 mg/kg, y en el que la combinación se administra cada dos semanas.

15. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 a 14, en el que el ácido folínico, 5-fluorouracilo (5-FU), irinotecán y aflibercept se administran por vía intravenosa cada dos semanas durante un periodo comprendido entre 9 y 18 semanas.

16. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 a 15, en el que el ácido folínico se administra por vía intravenosa inmediatamente después de la administración de aflibercept.

17. Aflibercept para uso en el tratamiento de un paciente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 a 16, en el que el ácido folínico se administra por vía intravenosa inmediatamente después de la administración de aflibercept durante un periodo de 2 horas.

18. Uso ex vivo de interleucina-8 (IL-8) como un biomarcador para predecir el resultado del tratamiento con aflibercept, o ziv-aflibercept, de un paciente que se sospecha que padece un cáncer.

19. Un método para determinar si un paciente que se sospecha que padece cáncer es un candidato para terapia con aflibercept para dicho cáncer, que comprende la etapa de someter una muestra biológica del paciente a al menos a un ensayo para medir en la línea base el nivel de IL-8, en el que cuando el nivel de IL-8 de la muestra biológica es bajo con respecto a un nivel de referencia de la expresión de IL-8, el paciente se identifica como un candidato para la terapia para cáncer, y cuando el nivel de IL-8 en la muestra biológica es alto con respecto a un nivel de referencia de la expresión de IL-8, el paciente se identifica como que no es un candidato para la terapia para cáncer.

Fig 1

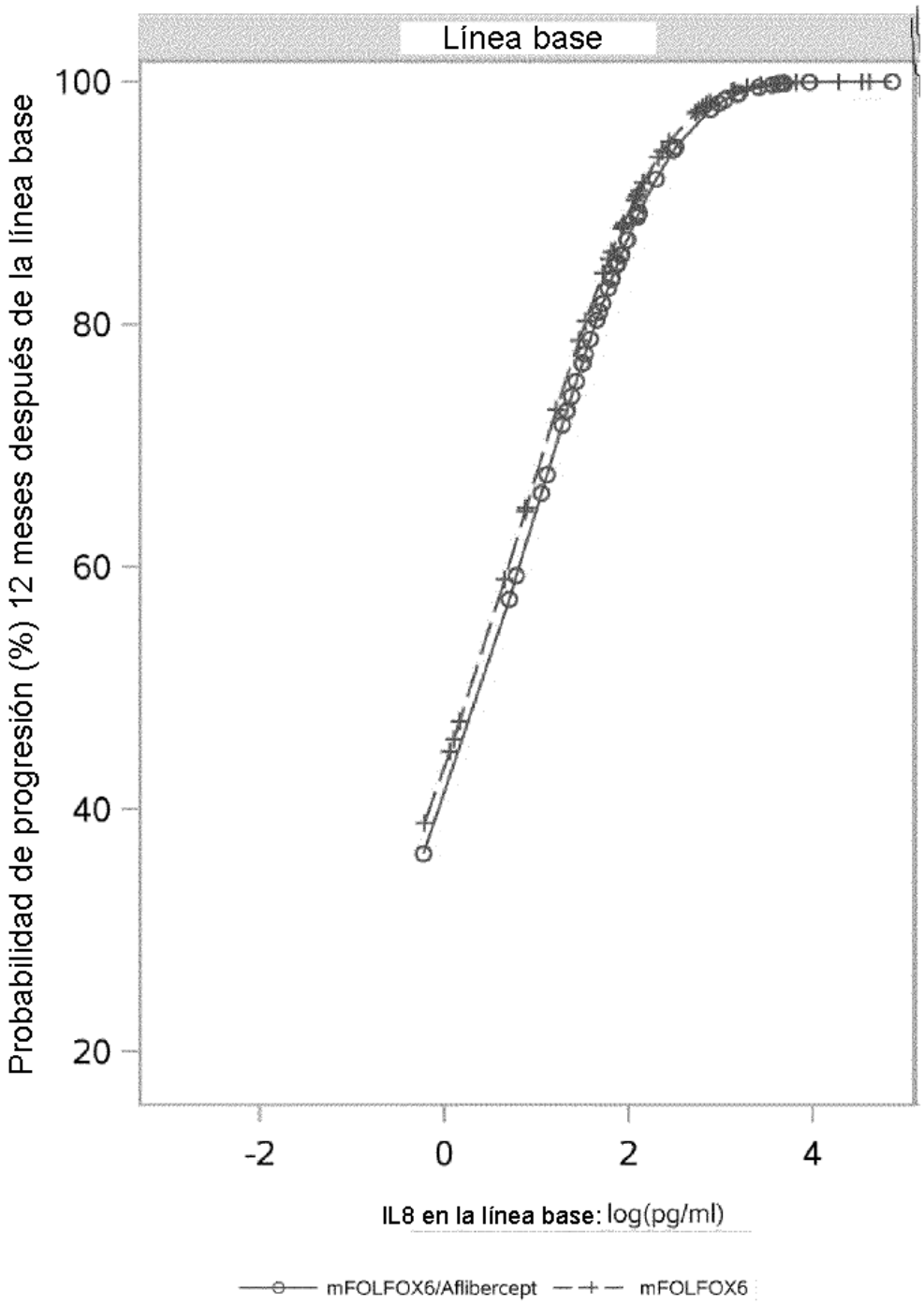
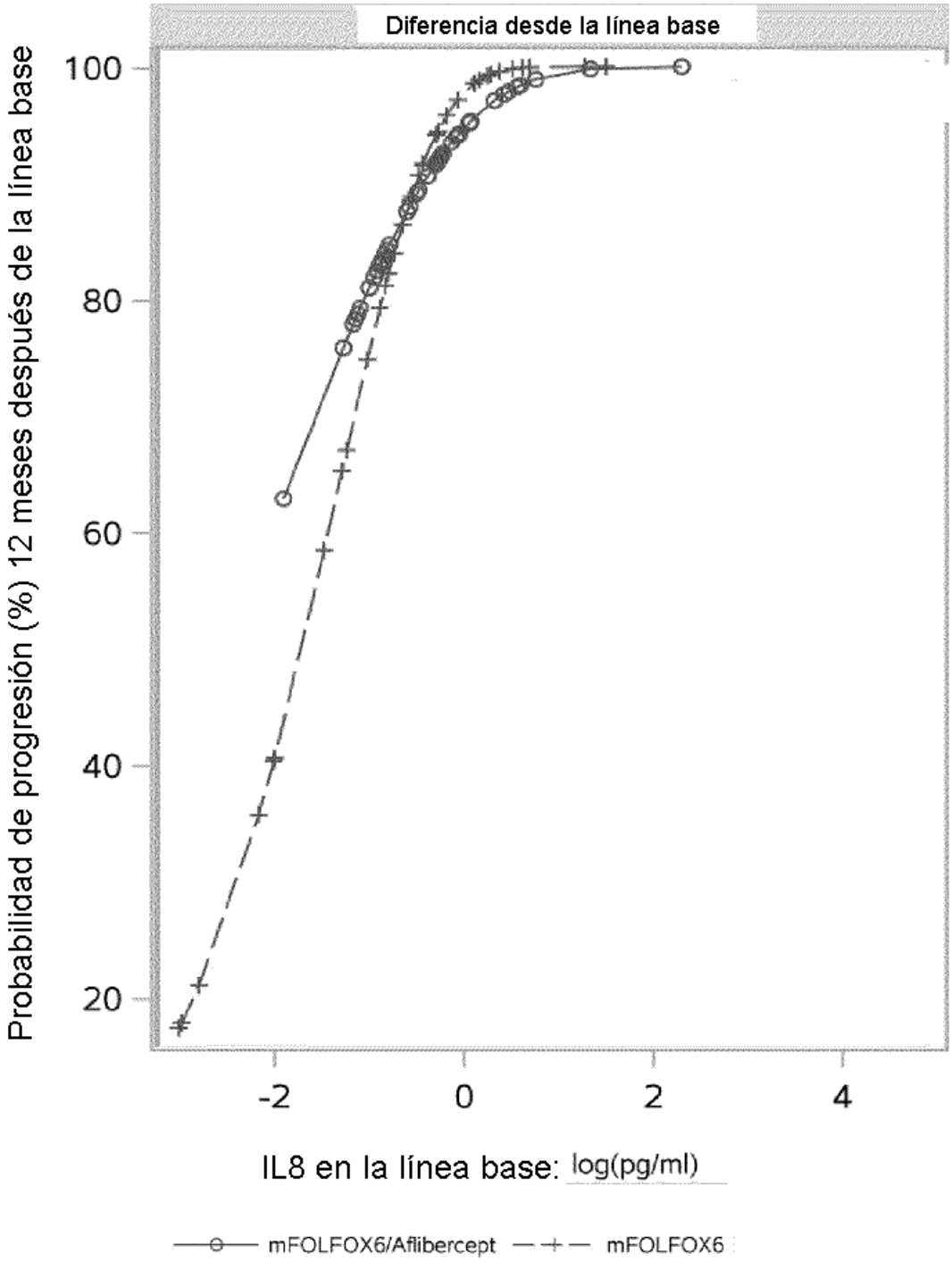

Línea base
Probabilidad de progresión (%) 12 meses después de la línea base
100
80
60
40
20
-2
0
2
4
IL8 en la línea base: log(pg/ml)
mFOLFOX6/Aflibercept
mFOLFOX6

Fig 2


Diferencia desde la línea base
Probabilidad de progresión (%) 12 meses después de la línea base
100
80
60
40
20
-2
0
2
4
IL8 en la línea base: log(pg/ml)
mFOLFOX6/Aflibercept
mFOLFOX6