

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 331**

51 Int. Cl.:

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2016 PCT/NL2016/050111**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2016 WO16133387**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2016 E 16714575 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2020 EP 3258931**

54 Título: **Uso del cabazitaxel en el tratamiento del cáncer de próstata**

30 Prioridad:

17.02.2015 EP 15155470

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

07.04.2021

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM (100.0%)
Dr. Molewaterplein 50
3015 GE Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**SLEIJFER, STEFAN;
ONSTENK, WENDY y
SIEUWERTS, ANITA MARIA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 817 331 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

Uso del cabazitaxel en el tratamiento del cáncer de próstata

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo uso antitumoral del cabazitaxel en el tratamiento del cáncer de próstata, que puede ser metastásico, especialmente para pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración. En particular, la presente invención se refiere al uso del cabazitaxel en el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración, en donde dichos pacientes tienen un estado positivo para la variante V7 de empalme del receptor de andrógenos.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer de próstata afecta a una gran proporción de la población masculina en todo el mundo y generalmente se trata con terapias con intención curativa (prostatectomía radical o radioterapia) con o sin terapia de privación de andrógenos cuando la enfermedad está localizada o en casos con enfermedad avanzada que no se pueden modificar para opciones curativas con terapia de privación andrógenos, inmunoterapia, quimioterapia o radiofármacos.

20 La quimioterapia de primera línea en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) es docetaxel (vendido bajo la marca Taxotere®) en combinación con prednisona y se asocia con un beneficio en la supervivencia de 2,4 meses. El docetaxel puede combinarse con otras quimioterapias tales como estramustina o agentes de platino.

25 Hasta la fecha, docetaxel más prednisona se considera el estándar de atención como tratamiento de quimioterapia de primera línea para el CRPC metastásico.

Un problema importante con todas las terapias es que el cáncer puede volverse resistente a los agentes usados, en particular a los taxanos, lo que limita las posibles opciones de tratamiento. El documento WO 2014/047285 A1 describe la detección y/o el tratamiento de un subconjunto de pacientes con cáncer de próstata que pueden beneficiarse del tratamiento con taxanos. El método comprende probar si una variante de empalme del receptor de andrógenos (AR) está presente en una muestra de prueba obtenida del paciente, en donde la variante del receptor de andrógenos puede ser ARv5,6,7 o ARv7, o una de sus combinaciones. Recientemente, se proporcionó una nueva opción terapéutica para tratar el cáncer de próstata, especialmente para pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC) que han sido tratados previamente con un régimen basado en docetaxel. El acetato de abiraterona y la enzalutamida actúan sobre la señalización del receptor de andrógenos (AR) y mejoran la supervivencia global (OS) en el escenario previo y posterior al docetaxel. Cabazitaxel (Jevtana®), el taxano de próxima generación, se ha desarrollado para superar la resistencia al docetaxel y bloquea la división celular mediante la estabilización de los microtúbulos. Al igual que la enzalutamida y el acetato de abiraterona, el cabazitaxel proporciona un beneficio en la OS en pacientes con mCRPC previamente tratados con docetaxel. El cabazitaxel está aprobado actualmente por la FDA como tratamiento de segunda línea después del docetaxel. Se han realizado o están en curso un gran número de ensayos clínicos con cabazitaxel. Todos estos ensayos enfatizan que las cuestiones críticas que son ahora cómo secuenciar de manera óptima las líneas de tratamiento para los pacientes con mCRPC; cómo seleccionar mejor a los pacientes para cabazitaxel; y, lo que es aún más importante, cómo individualizar mejor el tratamiento. Existe una necesidad de biomarcadores que puedan predecir la respuesta/resistencia de los tumores de próstata a nuevos fármacos, lo que incluye el cabazitaxel y nuevos agentes dirigidos al receptor de andrógenos (AR) tales como el acetato de abiraterona y la enzalutamida.

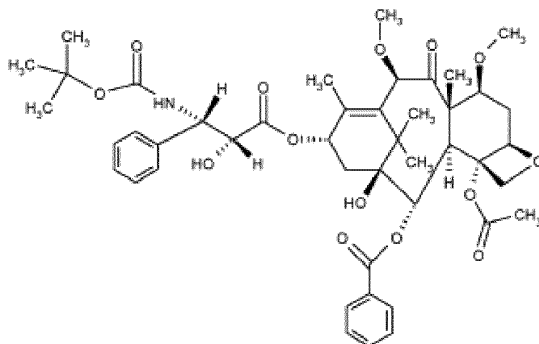
Los datos preclínicos, así como también los clínicos indican resistencia cruzada entre acetato de abiraterona, enzalutamida y docetaxel. La inhibición de la señalización del AR parece ser el mecanismo de acción compartido entre los tres agentes responsables de esta resistencia cruzada, ya que la estabilización de los microtúbulos por el docetaxel junto a la inhibición de la división celular también inhibe el transporte nuclear del AR. Por el contrario, los pacientes previamente tratados con acetato de abiraterona, enzalutamida y docetaxel todavía parecen beneficiarse del cabazitaxel. Por lo tanto, el tratamiento previo parece afectar el resultado de la terapia posterior, lo que enfatiza la necesidad de factores predictivos confiables que reflejen las características del tumor en tiempo real.

55 Las células tumorales circulantes (CTC) de la sangre periférica han atraído gran atención durante la última década. Un recuento de CTC antes y durante el tratamiento es un factor pronóstico fuerte e independiente para la supervivencia libre de progresión (PFS) y la OS en mCRPC, y supera las mediciones del antígeno prostático específico (PSA) como marcador de respuesta temprana al tratamiento. Potencialmente de mayor importancia que la enumeración de CTC, es la caracterización de las CTC. Recientemente, se evaluó la presencia de la variante 7 de empalme de ARNm del AR (AR-V7), que codifica un AR truncado y constitutivamente activo, en las CTC de pacientes con mCRPC que comienzan con enzalutamida o acetato de abiraterona (Antonarakis y otros. 2014. N Engl J Med. 371:1028-38). En la pequeña cohorte de pacientes investigados, ninguno de los pacientes con los transcritos de AR-V7 en sus CTC respondieron al acetato de abiraterona o enzalutamida, en comparación con el 68 % y el 53 %, respectivamente, de los pacientes sin AR-V7 (Antonarakis y otros. 2014). La presencia de AR-V7 se midió mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción reversa (RT-qPCR) en CTC enriquecidas por AdnaTest (AdnaGen AG, Langenhagen, Alemania), para el cual existen datos limitados sobre la validez en el mCRPC. Los resultados antes mencionados sugieren

fuertemente que los pacientes *AR-V7*-positivos no deben recibir enzalutamida ni acetato de abiraterona. Sin embargo, queda por dilucidar si el cabazitaxel sigue siendo una opción de tratamiento efectiva para estos pacientes.

Resumen de la invención

La invención se refiere a otra indicación médica del uso terapéutico farmacéutico antitumoral del cabazitaxel de fórmula:



En particular, la invención, en un primer aspecto, se refiere al cabazitaxel para su uso como medicamento en el tratamiento de un paciente que padece cáncer de próstata que comprende determinar el estado *AR-V7* en dicho paciente y administrar cabazitaxel en forma de base o en forma de un hidrato o un solvato, a dicho paciente, en combinación con un corticoide.

En modalidades preferidas del aspecto anterior, el cáncer de próstata es cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC). Sin embargo, *AR-V7* también puede detectarse en cáncer de próstata metastásico no resistente a la castración, así como también en la castración localizada o en el cáncer de próstata resistente a la castración.

En otras modalidades preferidas del aspecto anterior, la etapa de determinar el estado *AR-V7* en dicho paciente se realiza en células tumorales aisladas. En modalidades preferidas, dichas células tumorales aisladas son células tumorales circulantes (CTC).

En algunas modalidades preferidas de los aspectos mencionados anteriormente, el paciente ha sido tratado previamente con un régimen basado en docetaxel.

En algunas otras modalidades preferidas de los aspectos anteriores de la invención, el paciente es resistente al docetaxel y a nuevos agentes dirigidos al *AR*, tales como el acetato de abiraterona y/o la enzalutamida, o el paciente, cuando se trata previamente con docetaxel y/o nuevos agentes dirigidos al *AR*, aún no se ha vuelto resistente al docetaxel y/o a nuevos agentes dirigidos al *AR*. En tales modalidades, el cabazitaxel en forma de base o en forma de hidrato o solvato, en combinación con un corticoide, se usa como parte de una quimioterapia citotóxica de segunda línea para el tratamiento del cáncer de próstata, preferentemente mCRPC.

Alternativamente, en otras modalidades preferidas de los aspectos anteriores de esta invención, el paciente no ha sido tratado previamente con docetaxel y/o agentes dirigidos al *AR*. En tales modalidades, el cabazitaxel en forma de base o en forma de hidrato o solvato, en combinación con un corticoide, es parte de una quimioterapia citotóxica de primera línea para el tratamiento del cáncer de próstata, preferentemente mCRPC.

En los aspectos de la invención mencionados anteriormente, el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata comprende preferentemente administrar una cantidad efectiva del agente antitumoral cabazitaxel a dicho paciente.

Este agente antitumoral puede estar en forma de base anhidra, un hidrato o un solvato, destinado al tratamiento del cáncer de próstata, en particular a pacientes que han sido previamente tratados con un régimen basado en docetaxel. Este compuesto se administra preferentemente a un paciente con enfermedad metastásica que se ha vuelto resistente a la castración. El cabazitaxel se administra preferentemente en combinación con un corticoide elegido especialmente entre prednisona y prednisolona. Este corticoide se administra preferentemente a una dosis diaria de 10 mg por vía oral.

En algunos aspectos de la invención, el cabazitaxel se administra en combinación con prednisona para su uso como medicamento en el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata hormono-refractario que han sido tratados previamente con un régimen basado en docetaxel.

En algunos aspectos de la invención, cabazitaxel es para administración a una dosis (definida para cada administración) de entre 20 y 25 mg/m². El cabazitaxel puede estar en forma de solvato de acetona. Más particularmente, el solvato de acetona de cabazitaxel contiene entre 5 % y 8 % y preferentemente entre 5 % y 7 % en peso de acetona.

En algunos aspectos de la invención, el cabazitaxel puede ser para administración por infusión intravenosa a una dosis de entre 15 y 25 mg/m², y se repite este ciclo de administración del agente antitumoral en un intervalo de 3 semanas entre cada administración de cabazitaxel, intervalo que puede prolongarse de 1 a 2 semanas en dependencia de la tolerancia a la administración del cabazitaxel anterior.

5 En algunas modalidades, la cantidad efectiva de cabazitaxel produce al menos un efecto terapéutico seleccionado del grupo que consiste en aumento de la supervivencia global, respuesta parcial, reducción del tamaño del tumor, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, enfermedad estable o respuesta completa.

10 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que trata a pacientes con cáncer de próstata que comprende una cantidad clínicamente probada segura y efectiva de cabazitaxel.

15 La presente invención también proporciona un método para identificar pacientes con cáncer de próstata, preferentemente mCRPC, elegibles para el tratamiento con cabazitaxel en forma de base o en forma de hidrato o solvato, en combinación con un corticoide que comprende analizar una muestra biológica del paciente para la presencia de células tumorales circulantes AR-V7, como se describió anteriormente, en donde el paciente es elegible para el tratamiento con dicho cabazitaxel si AR-V7 está presente en dichas células tumorales circulantes.

20 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Diagrama de flujo del estudio que muestra la selección de pacientes para los análisis.

25 Figura 2. Gráficos en cascada de las respuestas del PSA al cabazitaxel después de 12 semanas (A.) y al final del tratamiento (B.). Las líneas discontinuas representan disminuciones del 30 % y 50 % en el PSA con relación al nivel al inicio del estudio. No se observaron diferencias en las respuestas del PSA entre pacientes AR-V7-positivos y AR-V7-negativos. Los asteriscos por encima o por debajo de las columnas indican pacientes que fueron tratados con acetato de abiraterona antes de cabazitaxel.

Figura 3. Supervivencia global en función de AR-V7 en las CTC al inicio del estudio. El valor P informado proviene de la prueba del orden logarítmico. Los datos de seguimiento de tres pacientes aún faltaban en el momento de los análisis, ya que el ensayo clínico aún estaba en curso y se estaba reclutando.

30 Figura 4. Sensibilidad y especificidad de los ensayos. (A.): Se usó material de 40 pacientes con mCRPC para evaluar la correlación lineal entre el recuento de CTC después del enriquecimiento con CellSearch y el valor promedio de C_q de *EPCAM* y *KRT19* en las correspondientes muestras de ARN. (B.). Los datos de 62 experimentos individuales con entrada de ARN de 4 a 580 células VCAP en RT-qPCR se usaron para evaluar la correlación lineal entre el valor de C_q de AR-V7 y el valor promedio de C_q de *EPCAM* + *KRT19*. Muestras con un valor promedio de C_q de *EPCAM* + *KRT19* más abajo de 26,5 C_q se consideró que contenían suficiente señal epitelial para permitir la medición de AR-V7 en estas células. Círculos: células VCAP sin aumento; cuadrados: Células VCAP adicionadas en sangre HBD. (C.). Medición de la sensibilidad y especificidad del AR-*WT* y AR-V7 por RT-qPCR en células VCAP antes y después de la adición en HBD, antes y después del enriquecimiento con CellSearch y antes y después de la preamplificación. Los datos se expresan con relación a la expresión promedio de *EPCAM* + *KRT19* (ΔC_q) medido en estas preparaciones. Dentro de una ventana de $\pm 1,1$ C_q, ambas transcripciones pueden medirse de forma reproducible en material de tan solo 2 células VCAP. Círculos azul oscuro: ΔC_q AR-*WT*; cuadrados; círculos azul claro: ΔC_q AR-V7. La figura 4C está dividida en dos partes en donde las 15 columnas que indican la densidad celular inicial corresponden a las dos partes de la figura. En la segunda parte de la Figura 4C, las primeras 11 celdas de la fila 4 (preamplificadas) indican "sí" y las 4 celdas restantes indican "no". En la segunda parte de la Figura 4C, las primeras 4 celdas de la fila 5 (WBC presente) indican "sí" y las 11 celdas restantes indican "no".

Figura 5.(A.). Niveles de transcripción de AR-*WT* frente a AR-V7. No se observó correlación (r de Spearman=0,30, $P=0,12$). (B.). Niveles de transcripción de AR-*WT* en pacientes sin AR-V7 (panel izquierdo) y con AR-V7 (panel derecho) en las CTC. Las líneas horizontales representan las medianas. No hubo diferencia en los niveles de transcripción (U de Mann Whitney, $P=0,20$).

50 Figura 6. Supervivencia global en pacientes que recibieron o no acetato de abiraterona antes del cabazitaxel (A.) y pacientes que recibieron o no acetato de abiraterona o enzalutamida después del cabazitaxel (B.). Aún faltaban datos clínicos sobre los tratamientos previos de cinco pacientes, ya que el ensayo clínico aún estaba en curso y se estaba reclutando. De un paciente aún no se disponía de los datos de seguimiento.

Figura 7. La secuencia de nucleótidos de la región que codifica el ARNm de AR-V7, proporcionada por el número de acceso de GenBank FJ235916. La secuencia de la región CE3 específica de AR-V7, que comienza en el nucleótido 2216, está subrayada. Un codón de parada dentro del marco en la posición 2263-2265 se indica en negrita.

Descripción detallada de la invención

60 Definiciones

El término "cantidad efectiva", como se usa en la presente descripción, significa una cantidad de un compuesto farmacéutico, tal como cabazitaxel, que produce un efecto sobre el cáncer a tratar.

65 El término "clínicamente probado", como se usa en la presente descripción, significa resultados de eficacia clínica que son suficientes para cumplir con los estándares de aprobación de la FDA.

El término "cáncer de próstata resistente a la castración", como se usa en la presente descripción, es sinónimo de cáncer de próstata hormono-refractario y se refiere a pacientes con cáncer de próstata que no han recibido un tratamiento destinado a reducir los niveles de andrógenos a niveles de castración.

El término "paciente", como se usa en la presente descripción, incluye tanto humanos como animales. En una modalidad, un paciente es un ser humano.

El término "receptor de andrógenos" o "AR" se refiere a la proteína receptora de andrógenos como se define por su secuencia de aminoácidos codificante conservada en una conformación estructural activa o nativa. Se han clonado y secuenciado secuencias de ácidos nucleicos que codifican receptores de andrógenos a partir de numerosos organismos. El número de acceso de GenBank® para la secuencia del receptor de andrógenos humano es NM-000044.3 (PRI 11-MAYO-2014). El receptor de andrógenos (AR) es un factor de transcripción activado por hormonas que regula la expresión génica eucariota y afecta la proliferación y diferenciación de las células diana. La proteína de longitud completa es citoplasmática en ausencia de hormona, pero se transloca al núcleo al unirse a la testosterona o la dihidrotestosterona. El receptor de andrógenos está codificado por el gen del receptor de andrógenos del cromosoma X. El gen del AR comprende 8 exones y 7 intrones. Se conocen dos isoformas del AR, A y B, de las cuales AR-B representa el receptor de longitud completa y AR-A representa una proteína N-terminal truncada que carece de los primeros 187 aminoácidos debido a proteólisis *in vitro* Gregory y otros, 2001. J Mol Endocrinol 27: 309-19). La proteína del AR prototipo contiene un dominio NH₂-terminal (N-terminal) (NTD), codificado por el exón 1, que constituye aproximadamente el 60 % de la proteína de 110 kDa de longitud completa y es la región reguladora de la transcripción de la proteína. El dominio central de unión al ADN (DBD) está codificado por los exones 2 y 3, mientras que los exones 4 a 8 codifican el dominio de unión al ligando COOH-terminal (LBD) (Hu y otros, 2009. Cancer Res 69: 16-22).

El término "agentes dirigidos al receptor de andrógenos (AR)" o "agentes dirigidos al AR" como se usa en la presente descripción se refiere a los agentes que tienen afinidad por el receptor de andrógenos y que funcionan particularmente como antagonistas al ser capaces de inhibir la unión de hormonas androgénicas como testosterona y dihidrotestosterona al receptor de andrógenos. Estos agentes encuentran un uso particular en terapias antihormona, como por ejemplo la terapia antitestosterona. El acetato de abiraterona o la enzalutamida son ejemplos no limitantes de agentes dirigidos a AR.

El término "variante V7 de empalme del receptor de andrógenos" y su abreviatura AR-V7, como se usa en la presente descripción, se refiere a una variante de empalme del receptor de andrógenos (AR) que comprende un dominio N-terminal de transcripción/regulador, codificado por el exón 1, y la mayoría de los dos dominios de unión al ADN, codificados por los exones 2 y 3, pero carecen de una región bisagra, codificada por el exón 4, y un dominio C-terminal de unión a hormonas y una región C-terminal, codificada por los exones 5-8. En cambio, el exón 3 se empalma a una región desde dentro del intrón 3, denominada "región CE3". La variante AR-V7 (también denominada AR3) es constitutivamente activa, lo que significa que también activa la transcripción génica en ausencia de testosterona y dihidrotestosterona. La secuencia de nucleótidos de la región que codifica el ARNm de AR-V7, proporcionada por el número de acceso de GenBank FJ235916, se representa en la Figura 7. La secuencia de la región CE3 específica de AR-V7, que comienza en el nucleótido 2216, está subrayada. Un codón de parada dentro del marco en la posición 2263-2265 se indica en negrita.

El término "estado AR-V7", con referencia a una condición del paciente, se refiere a la presencia o ausencia en las células de cáncer de próstata, preferentemente en las CTC, de productos de expresión génica del receptor de andrógenos de la variante AR-V7 en forma de ARN o proteína.

El término "estado positivo de AR-V7", como se usa en la presente descripción, se refiere a la presencia (frente a ausencia en el caso de un estado negativo) de transcritos de la variante 7 de empalme de ARNm del receptor de andrógenos en una muestra. Cuando se usa la PCR para la detección, la presencia de transcritos de AR-V7 se detecta como una diferencia en el valor de C_q (es decir, el ciclo de cuantificación o el ciclo en el que se obtiene una señal detectable (fluorescencia)) entre AR-V7 y una transcripción de referencia o gen, como el valor de C_q obtenido para los marcadores epiteliales EPCAM y/o KRT19, o los genes de referencia GUSB, HMBS y HPRT1, preferentemente EPCAM y/o KRT19. Como ejemplo, en una muestra que tiene un estado AR-V7 negativo, se requieren más ciclos para detectar el AR-V7 diana que para detectar el marcador epitelial EPCAM.

El término "reacción de PCR", como se usa en la presente descripción, se refiere a una reacción de amplificación que se caracteriza por ciclos repetidos de desnaturalización del molde de ácido nucleico diana, apareamiento de cebadores y extensión (síntesis) de una nueva hebra de ácido nucleico. La especificidad de una reacción de PCR se determina sustancialmente por el % de identidad de los cebadores con la plantilla de ácido nucleico diana y la temperatura de apareamiento. El término "reacción de PCR en tiempo real", como se usa en la presente descripción, se refiere a una reacción de amplificación de PCR a la que se agrega una sonda marcada o un tinte para generar una señal. La intensidad de la señal es una medida de la cantidad de producto que se genera. La detección de la señal en tiempo real permite cuantificar la cantidad de material de partida. Una reacción de PCR en tiempo real se realiza en termocicladores especializados con sistemas de detección que detectan la señal, por ejemplo, un LightCycler 480II (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos), un Mastercycler Realplex Ep Real-Time PCR System (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) o StepOne™ Plus (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EE.UU.). Sin embargo, no es necesario que haya una sonda

separada. Algunas reacciones de PCR en tiempo real incorporan un colorante en el cebador (por ejemplo, cebadores Scorpion®; Premier Biosoft, Palo Alto, CA, EE.UU.) y están comprendidas en el alcance de la presente invención.

5 Los términos "cebador directo" y "cebador inverso", como se usan en la presente descripción, se refieren a un oligonucleótido monocatenario u oligonucleótido mimético de 15-50 bases, preferentemente 16-30 bases, que es complementario a las secuencias de ácido nucleico que flanquean la región a ser amplificada. La secuencia del cebador directo y el cebador inverso determina la especificidad de la reacción de amplificación. Los cebadores preferidos son preferentemente aproximadamente un 100 % idénticos a una región en un molde de ácido nucleico diana de manera que solo se amplifica la región entre dos cebadores en un molde de ácido nucleico diana. La distancia entre los sitios de unión del cebador en la plantilla de ácido nucleico diana determinará el tamaño del producto amplificado.

15 El término "sonda", como se usa en la presente descripción, se refiere a un oligonucleótido monocatenario o mimético de oligonucleótido de 15-50 bases, preferentemente 16-30 bases, que es complementario a una secuencia de ácido nucleico dentro de un ácido nucleico diana, tal como un amplicón de PCR. Una sonda preferida es aproximadamente 100 % idéntica a la región diana de un ácido nucleico diana. Una sonda generalmente comprende un marcador detectable en su extremo 3' o 5'.

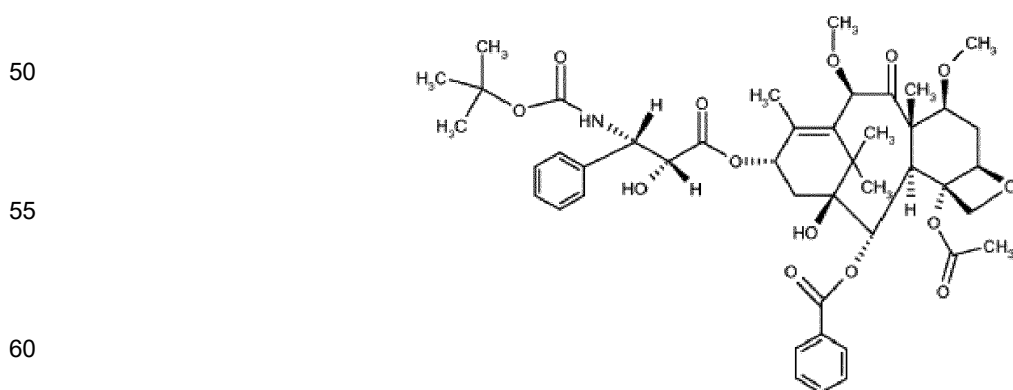
20 Los términos "molécula de ADN diana", "ácido nucleico diana (plantilla)" y "plantilla de la molécula de ADN", como se usan en la presente descripción, se refieren a un ácido nucleico cuya región entre dos cebadores, preferentemente un cebador directo y un cebador inverso, es amplificada. Una plantilla de ácido nucleico diana es un gen o un producto génico, tal como un producto de ARN, o una parte del gen o parte del producto génico.

25 El término "amplicón", como se usa en la presente descripción, se refiere a una región en una plantilla de ácido nucleico diana que se amplifica mediante el uso de dichos dos cebadores, preferentemente un cebador directo y un cebador inverso. Un amplicón comprende preferentemente una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de una sonda que reconoce específicamente dicho amplicón.

30 El término "hibridar específicamente", como se usa en la presente descripción, se refiere a moléculas de ácido nucleico que forman una molécula de ácido nucleico bicatenario en condiciones rigurosas.

35 Los términos "rigurosidad" e "hibridación rigurosa" se refieren a condiciones de hibridación que afectan la estabilidad de los híbridos, por ejemplo, temperatura, concentración de sal, pH y similares. Estas condiciones se optimizan empíricamente para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica del cebador o la sonda a su secuencia de ácido nucleico diana. El término como se usa incluye la referencia a las condiciones bajo las cuales una sonda o cebador se hibridará con su secuencia diana, en un grado mayor de manera detectable que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces respecto a los valores de fondo). Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda o cebador perfectamente coincidente. Los procedimientos de hibridación se conocen bien en la técnica y se describen por ejemplo en Ausubel y otros, 1998. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, Nueva York; y Sambrook y otros, 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

45 El término "cabazitaxel", como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto que pertenece a la familia taxoide y que tiene la fórmula:



65 El nombre químico de cabazitaxel es 4a—acetoxi—2a—benzoi—5, 20—epoxi—1—hidroxi—7,10—dimetoxi—9—oxo—11—taxen—13a—il(2R,3S)—3—fert—Butoxicarbonilamino—2—hidroxi—3—fenilpropionato. Cabazitaxel se

conoce como sinónimo (2a,5,7,10,13a)—4—acetoxi—13—(2R,3S)—3—[(tercbutoxicarbonil)amino]—2—hidroxi—3—fenilpropanoil}oxi)—1—hidroxi—7,10—dimetoxi—9—oxo—5,20—epoxitax—11— en—2—il benzoato.

5 El compuesto cabazitaxel y un método para su preparación se describen en los documentos WO 96/30355, EP 0 817 779 B1 y el documento de Estados Unidos 5 847 170, que se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad. El cabazitaxel puede administrarse en forma de base (véase la fórmula anterior) o en forma de hidrato. También puede ser un solvato, es decir, un complejo molecular caracterizado por la incorporación del solvente de cristalización en el cristal de la molécula del principio activo (véase al respecto la página 1276 de J. Pharm. Sci. 1975, 64(8), 1269—1288).
 10 En particular, puede ser un solvato de acetona y, más particularmente, puede ser el solvato descrito en el documento WO 2005/028462. Puede ser un solvato de acetona de cabazitaxel que contenga entre 5 % y 8 % y preferentemente entre 5 % y 7 % en peso de acetona (% significa contenido de acetona/contenido de acetona + cabazitaxel x 100). Un valor promedio del contenido de acetona es del 7 %, que representa aproximadamente la estequiometría de la acetona, que es del 6,5 % para un solvato que contiene una molécula de acetona. El siguiente procedimiento permite la preparación de un solvato de acetona de cabazitaxel: Se adicionan 940 ml de agua purificada a 20±5 °C (temperatura ambiente) a una solución de 207 g de 4a—acetoxi—2a—benzoiloxi—5,20—epoxi—1—hidroxi—7,10—dimetoxi—9—oxo—11—taxen—13a—il(2R,3S)—3—ferf—butoxicarbonilamino—2—hidroxi—3—fenilpropionato en aproximadamente 92 % en peso en aproximadamente 2 litros de acetona, seguido de la siembra con una suspensión de 2 g de 4a—acetoxi—2a—benzoiloxi—5,20—epoxi—1—hidroxi—7,10—dimetoxi—9—oxo—11—taxen—13a—il(2R,3S)—3—ferf—butoxicarbonilamino—2—hidroxi—3—fenilpropionato aislado de acetona/agua en una mezcla de 20 ml de agua y 20 ml de acetona. La mezcla resultante se agita durante aproximadamente 10 a 22 horas y se añaden 1,5 litros de agua purificada durante 4 a 5 horas. Esta mezcla se agita durante 60 a 90 minutos y luego la suspensión se filtra a presión reducida. La torta se lava sobre el filtro con una solución preparada a partir de 450 ml de acetona y 550 ml de agua purificada, y luego se seca en horno a 55 °C bajo presión reducida (0,7 kPa) durante 4 horas. 197 g de 4a—acetoxi—2benzoiloxi—5,20—epoxi—1—hidroxi—7,10—dimetoxi—9—oxo—11—taxen—13oíl(2R,3S)—3—fert—butoxicarbonilamino—2—hidroxi—3—fenilpropionato acetona que contiene 0,1 % de agua y 7,2 % de acetona (cantidad teórica: 6,5 % para un solvato estequiométrico).

El cabazitaxel puede administrarse por vía parenteral, tal como por vía intravenosa. Una forma galénica del cabazitaxel adecuada para la administración por infusión intravenosa es aquella en la que el cabazitaxel se disuelve en agua en presencia de excipientes elegidos entre tensioactivos, cosolventes, glucosa o cloruro de sodio, etc. Por ejemplo, puede prepararse una forma galénica de cabazitaxel al diluir una solución premezclada de cabazitaxel contenida en un vial estéril (80 mg de cabazitaxel + 2 ml de solvente + polisorbato 80) con un vial estéril que contiene una solución de 6 ml de agua y etanol (13 % en peso de etanol al 95 %) para obtener 8 ml de una solución lista para ser diluida de nuevo en una bolsa de perfusión. La concentración de cabazitaxel en esta solución lista para volver a diluir es de aproximadamente 10 mg/ml. A continuación, se prepara la perfusión al inyectar la cantidad adecuada de esta solución lista para volver a diluir en la bolsa de perfusión que contiene agua y glucosa (aproximadamente 5 %) o cloruro de sodio (aproximadamente 0,9 %).

El cabazitaxel puede administrarse en combinación con un corticoide, tal como prednisona o prednisolona, como dos preparaciones farmacéuticas distintas. También puede administrarse sin prednisona.

40 En consecuencia, un aspecto de la invención es cabazitaxel para su uso en un método de tratamiento del cáncer de próstata que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de cabazitaxel en combinación con un corticoide, tal como prednisona o prednisolona.

La combinación se administra repetidamente de acuerdo con un protocolo que depende del paciente a tratar (edad, peso, historial de tratamiento, etc.), que puede ser determinado por un médico experto. En un aspecto de la invención, el cabazitaxel se administra mediante perfusión al paciente de acuerdo con un programa intermitente con un intervalo entre cada administración de 3 semanas, que puede prolongarse de 1 a 2 semanas en dependencia de la tolerancia a la administración anterior. La mediana del número de ciclos es 6. La prednisona o prednisolona pueden administrarse diariamente, por ejemplo, en forma de una toma de dosificación por día, durante la duración del tratamiento. En la sección "Ejemplos" se dan ejemplos de dosis para los dos agentes antitumorales. La dosis actualmente recomendada es de 25 mg/m² de cabazitaxel administrado como una infusión de una hora y 10 mg por día de prednisona o prednisolona administrada por vía oral.

En algunos aspectos de la invención, el paciente que se va a tratar que expresa una variante V7 del receptor de andrógenos tiene cáncer de próstata que es resistente a la terapia hormonal (es decir, hormono-refractario) y ha sido tratado previamente con docetaxel. En algunos aspectos, el paciente tiene cáncer de próstata que progresó durante o después del tratamiento con docetaxel. En algunos aspectos, el paciente fue tratado previamente con al menos una dosis acumulativa de 225 mg/m² de docetaxel. En un aspecto particular, el paciente mostró progresión de su enfermedad en los seis meses posteriores a la terapia hormonal o durante el tratamiento con docetaxel o después del tratamiento con docetaxel. En otro aspecto particular, el paciente mostró progresión de su enfermedad en los tres meses posteriores a la terapia hormonal o después del tratamiento con docetaxel.

En algunos aspectos de la invención, el paciente a tratar que expresa una variante V7 del receptor de andrógenos tiene un tumor medible y puede mostrar progresión de la enfermedad a través de una lesión metastásica de las vísceras o de un tejido blando de al menos 1 cm determinada por resonancia magnética o mediante una tomografía axial computarizada (exploración por CT).

En algunos aspectos de la invención, el paciente a tratar que expresa una variante V7 del receptor de andrógenos tiene un tumor no medible y puede mostrar un aumento en el nivel de PSA con tres mediciones en un intervalo de 1 semana o la aparición de nuevas lesiones.

En algunos aspectos de la invención, el paciente a tratar que expresa una variante V7 del receptor de andrógenos ha sido castrado por orquidectomía o con agonistas de LHRH, eliminación de andrógenos o monoterapia con estramustina.

En un aspecto preferido, la esperanza de vida del paciente a tratar debe ser de al menos 2 meses.

En algunos aspectos, el tratamiento no incluye a pacientes que hayan recibido previamente mitoxantrona o que hayan recibido menos de 225 mg/m² de docetaxel, o que se hayan sometido a una radioterapia que haya eliminado más del 40 % de la médula, que hayan recibido un tratamiento dentro de las 4 semanas anteriores a la prueba, que tengan una neuropatía o estomatitis, que afecte al cerebro o las meninges, que hayan mostrado hipersensibilidad grave al polisorbato o prednisona, cuyo análisis de sangre muestra una disminución apreciable de neutrófilos, hemoglobina o plaquetas, un aumento de bilirrubina y/o enzimas hepáticas y creatinina, o que tienen problemas cardíacos o una infección que requiere antibióticos.

Un aspecto de la invención comprende cabazitaxel para su uso en el tratamiento de un paciente con cáncer de próstata metastásico hormono-refractario, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva clínicamente probada de cabazitaxel, opcionalmente en combinación con prednisona o prednisolona. En algunos aspectos preferidos de esta invención, el paciente que expresa una variante V7 del receptor de andrógenos ha sido tratado previamente con un régimen que contiene docetaxel. En aspectos alternativos preferidos, el paciente que expresa una variante V7 del receptor de andrógenos no ha sido tratado previamente con un régimen que contenga docetaxel.

La variante V7 del receptor de andrógenos (AR-V7) es una variante constitutivamente activa, lo que significa que también activa la transcripción de genes en ausencia de testosterona y dihidrotestosterona. La variante AR-V7 comprende el dominio N-terminal de transcripción/regulador y la mayoría de los dominios de unión al ADN, pero carece de una región bisagra y un dominio C-terminal de unión a hormonas y una región C-terminal. Recientemente fue informado por Antonarakis y otros, (Antonarakis y otros, 2014. N Engl J Med 371: 1028-1038), que la detección de la variante 7 de empalme de ARNm del receptor de andrógenos (AR-V7) en las CTC de hombres con mCRPC se asocia con resistencia a enzalutamida y acetato de abiraterona. Por lo tanto, el estado AR-V7 puede usarse como un biomarcador para predecir la resistencia a los agentes dirigidos al AR, lo que facilita la selección del tratamiento. Se sugirió además que AR-V7 también carecería de un dominio de unión a microtúbulos, lo que haría que estas células AR-V7 positivas también fueran resistentes a tratamientos mediados por taxanos tal como la quimioterapia con docetaxel (Portella y otros, 2013. Cancer Res 73: 4081.; Thadani-Mulero y otros, 2014. Cancer Res 74: 2270-82).

Ahora se muestra que, aunque AR-V7 carece de un dominio de unión a microtúbulos y las células AR-V7 positivas son resistentes a tratamientos mediados por taxanos tal como docetaxel, las células AR-V7 positivas son sensibles al taxano cabazitaxel. Por lo tanto, el cabazitaxel todavía puede usarse como un tratamiento efectivo para pacientes con cáncer de próstata AR-V7-positivo, incluso en el caso de que los pacientes se hayan vuelto resistentes al docetaxel.

Se han descrito otras variantes del receptor de andrógenos que comprenden el dominio N-terminal regulador/transcripción y la mayoría de los dominios de unión al ADN, pero carecen de una región bisagra y un dominio C-terminal de unión a hormonas y una región C-terminal, similar a AR-V7. Estas variantes incluyen AR-V1, AR-V2, AR-V3, AR-V4, AR-V5, AR-V6, AR-V9, AR-V10 y AR-V11, de las cuales AR-V3, AR-V4 se indican que son constitutivamente activas, similar a AR-V7 (Lu y Luo, 2013. Trans Androl Urol 2: 178-186).

Los efectos secundarios de la terapia con cabazitaxel y las medidas profilácticas para evitar y/o controlar estos efectos secundarios se conocen bien por un experto en la técnica y se indican, por ejemplo, en detalle en el documento WO2011/051894, cuya publicación se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Estado del receptor de andrógenos

El estado de la variante V7 del receptor de andrógenos en un paciente se determina preferentemente en una muestra que comprende células cancerosas del paciente con cáncer de próstata. Preferentemente, dicha muestra es una muestra de tejido tal como, por ejemplo, una muestra de biopsia, o una muestra de un fluido corporal, preferentemente orina, linfa o sangre, que incluye suero. Dicho estado se determina con la máxima preferencia en las células tumorales circulantes (CTC) que están presentes en la sangre o que se han aislado de la sangre.

Las CTC pueden capturarse o aislarse de la sangre mediante el aislamiento sin marcadores de las CTC, con base en, por ejemplo, las propiedades físicas tales como un tamaño mayor y diferencias en densidad, carga y propiedades migratorias, en comparación con las células sanguíneas tal como los leucocitos (Karabacak, 2014. Nature Protocols 9, 694-710). Las CTC se aíslan preferentemente de una muestra de sangre mediante el uso de marcadores de superficie celular específicos que están ausentes de las células sanguíneas normales. Un marcador preferido para las células tumorales epiteliales es la Molécula de Adhesión de Células Epiteliales (EpCAM), porque se expresa en células de origen epitelial, pero está

ausente en las células sanguíneas o los hematocitos. La conjugación de anticuerpos contra EpCAM con perlas magnéticas, seguida de la purificación de las células capturadas a través de un campo magnético, se ha usado para enriquecer las CTC de la sangre de pacientes con cánceres de mama, próstata y colon. Los métodos y medios para el aislamiento de las CTC de la sangre son conocidos en la técnica, incluido el sistema de recuperación de células CytoQuest™ (Abnova, Taipei City, Taiwán), el kit Adna Test Prostate Cancer Select (AdnaGen, Langenhagen, Alemania) y el sistema CellSearch® (Janssen Diagnostics; South Raritan, Nueva Jersey (EE.UU.)). De estos, el sistema CellSearch®, un sistema clínicamente validado y aprobado por la FDA para la identificación, aislamiento y enumeración de las células tumorales circulantes (CTC) de la sangre, es el preferido en aspectos de esta invención debido a su sensibilidad (el límite de detección del ensayo con AR -V7 como se describió en la presente descripción fue ≥ 3 CTC epiteliales en la preparación final disponible para RT-qPCR). El sistema CellSearch® permite la enumeración de las CTC en virtud de la Prueba de Células Tumorales Circulantes CELLSEARCH®, que comprende la separación magnética de las CTC de la mayor parte de otras células en la sangre mediante el uso de nanopartículas de ferrofluido con anticuerpos que dirigen la adhesión de las células epiteliales; la tinción de las CTC con anticuerpos monoclonales de citoqueratina específicos para células epiteliales; la identificación de leucocitos que pueden haber contaminado la muestra mediante el uso de una tinción con el anticuerpo monoclonal anti-CD45; la tinción de ADN con DAPI para marcar los núcleos de las CTC y los leucocitos; la concentración de células en un cartucho de imán que aplica una fuerza magnética que tira de las células a una profundidad focal única; y escanear las CTC teñidas en el cartucho en un analizador que muestra células tumorales candidatas que son positivas para citoqueratina y DAPI, seguido opcionalmente por una revisión final de un operador de las células candidatas.

Las células capturadas se visualizan preferentemente mediante tinción con un cóctel de anticuerpos contra las citoqueratinas epiteliales citoplasmáticas (8, 18 y/o 19) y el marcador CD45 específico de leucocitos. Las células que son positivas para CD45 se excluyen de la enumeración. Las CTC prostáticas se definen como el subconjunto de células capturadas por EpCAM que son $\geq 4 \mu\text{m}$, con morfología redonda u ovalada, positivas para citoqueratinas y negativas para CD45.

Una muestra de sangre se procesa preferentemente dentro de las 96 horas posteriores a la provisión de la muestra. Preferentemente, dicha muestra se recoge en un receptáculo que contiene un conservante que mantiene la morfología y la expresión del antígeno de la superficie celular de las células. Un receptáculo preferido es el Tubo CellSave® (Janssen Diagnostics; South Raritan, NJ (EE.UU.)).

Dicho estado de la variante de V7 se determina mediante análisis de productos de expresión de ARN y/o productos de expresión de proteínas de células de cáncer de próstata, preferentemente de las CTC. Para obtener productos de expresión de ARN y/o productos de expresión de proteínas, las células de cáncer de próstata se lisan preferentemente en condiciones que preserven la calidad del ARN y/o proteína. Los ejemplos de estas condiciones de conservación son los inhibidores de ARNasa como RNAsin® (Pharmingen) o RNasequre® (Ambion), las soluciones acuosas tal como RNAlater® (Assuragen), el Efecto de Protección de solvente Orgánico mediado por tampón de ácido Glutámico Hepes (HOPE) y el RCL2 (Alphelys) y las soluciones no acuosas tal como Universal Molecular Fixative (Sakura Finetek EE.UU. Inc.).

Se conocen en la técnica los métodos y medios para la extracción de proteínas de una variedad de muestras, que incluyen, pero que no se limitan a, lisis de células con un detergente suave tal como ácido desoxicólico y agentes caotrópicos tales como cloruro de guanidinio y dodecilsulfato de sodio. Los reactivos adicionales que pueden incluirse en un tampón de aislamiento de proteínas son un quelante tal como EGTA y/o EDTA, un inhibidor de proteasa y un inhibidor de fosfatasa. Los kits conocidos para el aislamiento de proteínas de una muestra biológica incluyen PARIS™ (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.), kit de extracción de proteínas ReadyPrep (BioRad, Hercules, EE.UU.) Y Kit de aislamiento de proteínas totales sin detergente™ (Norgen Biotek, Ontario, Canadá). La presencia o ausencia de AR-V7 a nivel de proteína puede determinarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, incluida electroforesis en gel bidimensional, tecnología de identificación de proteínas multidimensional, ELISA, cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), espectrometría de masas, desorción/ionización láser asistida por matriz tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Los anticuerpos que son específicos para la variante AR-V7 están disponibles comercialmente en Precision Antibody, Columbia (EE.UU.) y Abcam, Cambridge (Reino Unido).

Dicho estado de la variante de V7 se determina en una modalidad particularmente preferida mediante amplificación de productos de expresión de ARN del gen del receptor de andrógenos en forma de transcritos. Para ello, puede aislarse el ARN de las células de cáncer de próstata, preferentemente en las CTC, mediante cualquier técnica conocida en la técnica, que incluye, pero que no se limita a Trizol (Invitrogen; Carlsbad, California), RNAqueous® (Applied Biosystems/Ambion, Austin, Tx), Qiazol® (Qiagen, Hilden, Alemania), AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), Agilent Total RNA Isolation Lits (Agilent; Santa Clara, California). Un procedimiento de aislamiento de ARN preferido implica el uso de AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

La presencia o ausencia de AR-V7 en las células tumorales puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye transferencia Northern, reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-qPCR), análisis de micromatrices y secuenciación de ARN, preferentemente secuenciación de próxima generación. Para el análisis de micromatrices, se prepara una mezcla de hibridación mediante la extracción y el marcado del ARN. El ARN extraído se convierte preferentemente en una muestra marcada que comprende ADN complementario (ADNc) o

- ARNc mediante el uso de una enzima transcriptasa reversa y nucleótidos marcados. Un marcaje preferido introduce nucleótidos marcados con fluorescencia tales como, pero que no se limita a, cianina-3-CTP o cianina-5-CTP. Los ejemplos de métodos de marcado se conocen en la técnica e incluyen Low RNA Input Fluorescent Labelling Kit (Agilent Technologies), MessageAmp Kit (Ambion) y Microarray Labelling Kit (Stratagene). Una o más sondas que se hibridan específicamente con una parte del ARNm que codifica el dominio N-terminal regulador/transcripción y/o el dominio de unión al ADN de la variante AR-V7 pueden usarse para detectar productos de expresión de ARN del receptor de andrógenos, mientras que las sondas que se hibridan específicamente con una parte del ARNm que codifica la región específica de AR-V7 en el extremo C-terminal pueden usarse para detectar productos de expresión de ARN de la variante AR-V7.
- La presencia o ausencia de AR-V7 se determina preferentemente mediante qPCR. Para ello, el ARN mensajero (ARNm) se convierte en ADN complementario (ADNc) mediante el uso de una transcriptasa reversa. El ADNc convertido se amplifica subsecuentemente mediante PCR mediante el uso de un par de cebadores que se hibridan específicamente con el ADN diana que se va a amplificar. La cantidad de producto que se amplifica puede cuantificarse mediante el uso, por ejemplo, de TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), Molecular Beacons, Scorpions® y SYBR® Green (Molecular Probes). La amplificación cuantitativa basada en la secuencia de ácido nucleico (qNASBA) puede usarse como una alternativa para la qPCR.
- El par de cebadores que se hibridan específicamente con el ADN diana incluye preferentemente un cebador que se hibrida específicamente con una región del ARNm que codifica el dominio N-terminal regulador/transcripción y/o el dominio de unión al ADN de AR-V7, preferentemente el dominio de unión al ADN de AR-V7, más preferido una región dentro del exón 3, y un cebador que se hibrida específicamente con la región CE3 como se indica en la Figura 7. Los cebadores y sondas preferidos se proporcionan en la Tabla 1.
- En la presente descripción se describe un método para tratar a un paciente AR-V7 positivo que padece cáncer de próstata que comprende determinar el estado AR-V7 en dicho paciente y administrar cabazitaxel en forma de base o en forma de hidrato o solvato, a un paciente AR-V7 positivo, en combinación con un corticoide. Preferentemente, dicho cáncer de próstata es cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC).
- En el aspecto de cabazitaxel para su uso como medicamento en el tratamiento de un paciente AR-V7 positivo que padece cáncer de próstata como se describió en la presente descripción, la etapa de determinar el estado AR-V7 en dicho paciente se realiza en células tumorales aisladas, preferentemente en las CTC.
- En un método para tratar a un paciente AR-V7 positivo que padece cáncer de próstata como se describió en la presente descripción, la etapa de determinar el estado AR-V7 en dicho paciente se realiza en las CTC aisladas mediante el uso de la Prueba de Células Tumorales Circulantes CELLSEARCH®. En un método de este tipo para el tratamiento de pacientes, el paciente se ha tratado preferentemente previamente con un régimen basado en docetaxel, y dicho paciente es preferentemente resistente al docetaxel y/o acetato de abiraterona y/o enzalutamida.
- En un método de tratamiento como se describió en la presente descripción, el paciente no ha sido pretratado con docetaxel y/o agentes dirigidos a AR, o en donde dicho paciente, cuando se trata previamente con docetaxel y/o agentes dirigidos al AR, aún no se ha vuelto resistente al docetaxel y/o agentes dirigidos al AR.
- También se describe en la presente descripción el uso de cabazitaxel en forma de base o en forma de hidrato o solvato en combinación con un corticoide para la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que padece cáncer de próstata, en donde dicho paciente es un paciente AR-V7-positivo y en donde dicho uso comprende además determinar el estado AR-V7 en dicho paciente, preferentemente dicho cáncer de próstata es cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC).
- En el uso del cabazitaxel para la fabricación de un medicamento como se describió en la presente descripción, el estado AR-V7 en dicho paciente se determina en células tumorales aisladas, preferentemente en las CTC. En tal uso del cabazitaxel para la fabricación de un medicamento como se describió en la presente descripción, dicha etapa de determinar el estado AR-V7 en dicho paciente se realiza preferentemente en las CTC aisladas mediante el uso de la Prueba de Células Tumorales Circulantes CELLSEARCH®.
- En el uso de cabazitaxel para la fabricación de un medicamento como se describió en la presente descripción, dicho paciente ha sido tratado preferentemente previamente con un régimen basado en docetaxel.
- En otro uso del cabazitaxel para la fabricación de un medicamento como se describió en la presente descripción, dicho paciente es preferentemente resistente al docetaxel.
- En un uso del cabazitaxel para la fabricación de un medicamento como se describió en la presente descripción, dicho paciente es preferentemente resistente al acetato de abiraterona y/o enzalutamida.
- En un uso del cabazitaxel para la fabricación de un medicamento como se describió en la presente descripción, dicho paciente preferentemente no ha sido previamente tratado con docetaxel y/o agentes dirigidos al AR, o en donde dicho

paciente, cuando se ha tratado previamente con docetaxel y/o agentes dirigidos al AR, todavía no se vuelve resistente al docetaxel y/o a agentes dirigidos al AR.

La invención proporciona además un método para identificar pacientes con cáncer de próstata, en particular pacientes con mCRPC, que son elegibles para el tratamiento con cabazitaxel en forma de base o en forma de hidrato o solvato, en combinación con un corticoide, el método que comprende probar una muestra biológica del paciente para la presencia de células tumorales AR-V7, en donde el paciente es elegible para el tratamiento con dicho cabazitaxel si dichas células tumorales en dicha muestra dan positivo para AR-V7. Dicho método puede ayudar en la identificación y/o clasificación de pacientes que probablemente se beneficien del tratamiento con cabazitaxel en forma de base o en forma de hidrato o solvato, en combinación con un corticoide.

Dichas células tumorales preferentemente son células tumorales circulantes, que están circulando en un fluido corporal del paciente, preferentemente orina y/o sangre, incluido el suero. Las células tumorales circulantes se separan preferentemente de esencialmente todas las demás células en dicha muestra mediante el uso de un marcador que se expresa por las células tumorales, pero que no se expresa, o no se expresa a niveles detectables, por todas las demás células en dicha muestra.

Por lo tanto, un método preferido de la invención implica el suministro de una muestra de sangre, suero y/u orina del paciente, y separar las células tumorales de otras células que están presentes en dicha muestra mediante el uso de un marcador que se expresa por las células tumorales, pero que no se expresa, o no se expresa a niveles detectables, por todas las demás células en dicha muestra.

Dicho marcador es preferentemente un marcador que se expresa en la superficie de las células tumorales, preferentemente en todas o la mayoría de las células tumorales. Un marcador preferido por las células tumorales epiteliales, tal como las células de la próstata, es el EpCAM. Preferentemente, dicho marcador es reconocido específicamente por un anticuerpo. El término "reconocido específicamente" significa que la Kd de un anticuerpo para unirse al marcador es menos de aproximadamente 10 veces, 50 veces o 100 veces la Kd para su unión a, por ejemplo, un marcador no relacionado, como se determina mediante el uso de un ensayo conocido por un experto en la técnica tal como un ensayo BIAcore.

Alternativamente, la determinación de que un anticuerpo particular se une específicamente al marcador puede hacerse fácilmente mediante el uso o la adaptación de procedimientos de rutina. Un ensayo adecuado hace uso del procedimiento de transferencia Western (descrito en muchos textos estándar, que incluye "Antibodies, A Laboratory Manual" de Harlow y Lane). Para determinar que un determinado anticuerpo que se une al marcador se une específicamente al marcador, se extraen las proteínas celulares totales de las células que no expresan el marcador, tal como, por ejemplo, una célula no epitelial, tal como una célula linfocítica, transformada con una molécula de ácido nucleico que codifica el marcador. Como control negativo, las proteínas celulares totales también se extraen de las células no transformadas correspondientes. A continuación, estas preparaciones de proteínas se someten a electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizante o desnaturizante. A continuación, las proteínas se transfieren a una membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa) mediante transferencia Western, y el agente que se va a analizar se incuba con la membrana. Después de lavar la membrana para eliminar el agente unido no específicamente, la presencia del agente unido se detecta mediante el uso de un anticuerpo generado contra el agente de prueba conjugado con un agente de detección, tal como la enzima fosfatasa alcalina; la aplicación del sustrato 5-bromo-5'-cloro-3-indolil fosfato/nitro azul tetrazolol da como resultado la producción de un compuesto azul denso por la fosfatasa alcalina inmunolocalizada. Mediante esta técnica, se demostrará que los agentes que se unen específicamente al marcador se unen a la banda del marcador (que se localizará en una posición dada en el gel determinada por su masa molecular) en el extracto de las células transformadas, mientras que poco o no se observará unión en el extracto de células no transformadas. Puede producirse una unión no específica del anticuerpo a otras proteínas y puede detectarse como una señal débil en las membranas de Western. La naturaleza inespecífica de esta unión será reconocida por un experto en la técnica por la señal débil obtenida en la membrana de Western con relación a la señal primaria fuerte que surge de la unión específica del anticuerpo-marcador. Idealmente, un anticuerpo de unión al marcador no se uniría a proteínas extraídas de las células no transformadas. Además de los ensayos de unión que usan proteínas extraídas, los anticuerpos de unión a marcadores putativos pueden probarse para confirmar su capacidad para unirse sustancialmente solo a dicho marcador *in vivo* al conjugar el anticuerpo a una etiqueta fluorescente (tal como FITC) y analizar su unión a las células epiteliales y células no epiteliales tal como, por ejemplo, células linfocíticas, mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Un anticuerpo que se une sustancialmente solo al marcador teñirá solo las células epiteliales.

Se debe entender que el término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, se refiere a una inmunoglobulina completa policlonal o monoclonal, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgE y similares, o un fragmento de inmunoglobulina, por ejemplo, regiones CDR aisladas; moléculas Fv de cadena sencilla ("scFv"), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un dominio de unión, diacuerpo (Hollinger y otros, 1993. PNAS EE.UU. 90: 6444-6448.), F(ab)2, F(ab')2, Fab, Fab' y similares, o una mezcla de los mismos. Se conocen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a una amplia variedad de ligandos, y muchos de ellos se describen en las patentes cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Muchos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a marcadores asociados a tumores se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Núm. 4,348,376, 4,361,544, 4,331,647, 4,468,457,

4,444,744, 4,460,559 y 4,460,561, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Además, el término "anticuerpo" incluye moléculas artificiales similares a anticuerpos o miméticos de anticuerpos tales como moléculas AFFIBODY® (Nord y otros, 1995. Prot Eng 8: 601-608), ANTICALINS® (Skerra, 2008. FEBS J. 275: 2677-2683) y AVIMERS® (Silverman y otros, 2005. Nat Biotechnol 23: 1556-1561).

Dicho anticuerpo se usa preferentemente para capturar células que están unidas al anticuerpo, al separar de esta manera las células tumorales de otras células en dicha muestra mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo que reacciona con el anticuerpo marcador puede unirse a una superficie, lo que permite capturar el complejo marcador-anticuerpo y las células asociadas en la superficie. Como alternativa, puede usarse la Proteína A o Proteína G, especialmente si el anticuerpo marcador es un anticuerpo IgG.

Preferentemente, dicho anticuerpo marcador está marcado con un marcador detectable. Dicho marcador detectable es un marcador que es detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (como se usan comúnmente en ELISA), biotina o haptenos y proteínas para los que se encuentran disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

Preferentemente, dicho marcador es un marcador que permite separar magnéticamente dichas células tumorales. Para ello, el anticuerpo se marca preferentemente con nanopartículas de ferrofluido. Las nanopartículas de ferrofluido preferidas están hechas de partículas de óxido de hierro de tamaño nanométrico, que pueden encapsularse o pegarse con polímeros. Las partículas magnéticas adecuadas incluyen DYNABEADS® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), MICROBEADS®, por ejemplo, en combinación con MACS® Column Technology (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, EE.UU.) y Perlas NanoLink™ y MagnaLink™ acopladas a estreptavidina (Solulink Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

La fracción de células tumorales capturadas se enriquecerá con células tumorales, con relación a otras células que están presentes en la muestra biológica del paciente. Dichas células tumorales capturadas pueden enumerarse opcionalmente al teñir las células tumorales en una muestra que comprende las células tumorales capturadas enriquecidas con una tinción de ADN nuclear, preferentemente DAPI, y un anticuerpo específico de citoqueratina, preferentemente un anticuerpo monoclonal, específico de células epiteliales, preferentemente anti-citoqueratina 18/8/19, mientras que opcionalmente se diferencian dichas células tumorales teñidas duales de los leucocitos teñidos en dicha muestra mediante el uso de una tinción con el anticuerpo monoclonal anti-CD45 específico de leucocitos. Los métodos y medios para teñir células mediante el uso de una tinción de ADN nuclear y/o anticuerpos son conocidos en la técnica y están disponibles, por ejemplo, en Life Technologies (Life Technologies, Carlsbad, CA), Abcam (Cambridge, MA, EE.UU.) Y Dako (Agilent Technologies, Glostrup, Dinamarca).

La presencia de transcritos de la variante 7 de empalme de ARNm del receptor de andrógenos en dichas células tumorales enriquecidas puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, incluido el uso de anticuerpos disponibles comercialmente que son específicos para la variante AR-V7, tales como los de Precision Antibody, Columbia (EE.UU.) Y Abcam, Cambridge (Reino Unido).

Dicho estado de la variante de V7 se determina preferentemente mediante la amplificación de productos de expresión de ARN del gen del receptor de andrógenos. Para ello, puede aislarse el ARN de las células de cáncer de próstata, preferentemente en las CTC, mediante cualquier técnica conocida en la técnica, que incluye, pero que no se limita a Trizol (Invitrogen; Carlsbad, California), RNAqueous® (Applied Biosystems/Ambion, Austin, Tx), Qiazol® (Qiagen, Hilden, Alemania), AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), Agilent Total RNA Isolation Lits (Agilent; Santa Clara, California). Un procedimiento de aislamiento de ARN preferido implica el uso de AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

Después del aislamiento, los productos de expresión de ARN se transcriben de forma reversa en ADN complementario (ADNc) mediante una ADN polimerasa dependiente de ARN, tal como la transcriptasa reversa M-MLV, o una transcriptasa reversa modificada como la transcriptasa reversa Superscript® (Invitrogen; Carlsbad, California), Superscript® VILO™ cDNA synthesis (Invitrogen; Carlsbad, California), y la Transcriptasa Reversa Quantiscript (Qiagen, Hilden, Alemania). Dicho cDNA puede sintetizarse mediante el uso de cebadores aleatorios, por ejemplo, hexámeros o nonámeros, o cebadores específicos del gen tales como cebadores que son complementarios a la región CE3 específica de AR-V7, que se subraya en la Figura 7. La generación de ADN complementario (ADNc), la preamplificación y la RT-qPCR se realizan preferentemente como se describió anteriormente (Sieuwerts y otros, 2009. Breast Cancer Res Treat 118:455-68; Sieuwerts y otros, 2011. Clin Cancer Res 17:3600-18; que se incorporan en la presente descripción como referencia).

En la presente descripción se describe además un kit de partes para determinar el estado AR-V7 en células tumorales aisladas, preferentemente células tumorales circulantes aisladas, en un fluido corporal de un paciente que padece cáncer de próstata. Preferentemente, dicho fluido corporal es una muestra de sangre, suero u orina obtenida de dicho paciente. Dicho kit comprende preferentemente cebadores de amplificación para la transcripción reversa y la amplificación de un producto de ADN complementario de transcritos de la variante 7 de empalme de ARNm del receptor de andrógenos mediante transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR). Dicho kit comprende preferentemente anticuerpos que se dirigen a marcadores de células epiteliales, preferentemente anticuerpos anti-EpCAM cargados con nanopartículas de ferrofluido, para enriquecer las células tumorales de esencialmente todas

las demás células de la muestra del paciente mediante separación magnética. Opcionalmente, dicho kit comprende además instrucciones para determinar la elegibilidad del paciente con cáncer de próstata para el tratamiento con cabazitaxel con base en los resultados de la prueba de diagnóstico para el estado AR-V7 obtenido y/o instrucciones para tratar a dicho paciente con cabazitaxel.

5

Para mayor claridad y una descripción concisa, las características se describen en la presente descripción como parte de los mismos aspectos o aspectos separados y modalidades preferidas de los mismos, sin embargo, se apreciará que el alcance de la invención puede incluir modalidades que tienen combinaciones de todas o algunas de las características descritas.

10

La invención se ilustrará ahora mediante el siguiente ejemplo, que se proporciona a modo de ilustración y no de limitación y se debe entender que se pueden realizar muchas variaciones en los métodos descritos y las cantidades indicadas sin apartarse del espíritu de la invención y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 1. Detalles de los ensayos usados en las RT-qPCR

qPCR Nombre	Símbolo del gen	Nombre aprobado del gen	Localización en la secuencia	Información de pedido Applied Biosystems	Secuencia F	Secuencia R	Secuencia de la sonda (FAM_MGB1_NFQ)	Límite del exón	Tamaño del producto (pb)	Código de acceso qPCR
AR- WT	AR	receptor de andrógenos	Xq12	Hs00171 172_m1			AGGCCTTGCCTGGC TCCGCAACTT	4->5	72	NM_00004 4.3
AR- WT/II	AR	receptor de andrógenos	Xq12	AIRSAWO	CTGCTCAAGAC GCTTCTA	ATCATTCCGGA AAGTCCA	TCCGTGCAGCCTAT TGCAG	7->8	132	NM_00004 4.3
AR-V7	AR	receptor de andrógenos	Xq12	AIPAEKK	GTCCATCTTGT CGTCTTC	GCAAGTCAGCCT TTCTTCA	GGGAGAAAAATTCC GGGTTGGC	3-> CE3	117	FJ235916
CD45	PTP RC	proteína tirosina fosfatasa	1q31-q32	Hs00236 304_m1			AGAGGCTGAATTCC AGAGACTTCCT	26-> 27	81	NM_00283 8.4
EPC AM	EPC AM	receptor tipo C, molécula de adhesión de células epiteliales	2p21	XXXXXX	AGTTTGGCGA CTGCACTTCA	AATACTCGTGAT AAATTTGGATC CA	AAGGAGATCACAAC GCGT	4/5->5	72	NM_00235 4
KRT19 GUS B	KRT 19 GUS	queratina 19, glucuronidasa	17q21.2 7q11.2.1	Hs01051 611_gH Hs99999 908_m1			ACAGCTGAGCATGA AAGCTGCCTTG TGAACAGTCACCGA CGAGAGTGCTG	5->6 11-> 12	66 81	NM_00227 6.4 NM_00018 1.3
HMBS	HMBS	beta hidroximetilbil ano sintasa	1q23.3	Hs00609 297_m1			ATGCGGGTGCAACG GCGGAAGAAAA	1->2	64	NM_00125 8208.1
HPR T1	HPR T1	hipoxantina fosforibosiltr ansferasa 1	Xq26.2	XXXXXX	TTCCTTGGTCA GGCAGTATAA TCC	GGTCCTTTTCACC AGCAAAGCT	AGATGGTCAAAGGTC GC	6->7	64	NM_00019 4

Tabla 2. Datos de RT-qPCR de todas las muestras evaluadas. Cinco donantes de sangre sanos y 11 líneas celulares de cáncer de mama y próstata – puras y después del aumento- en la sangre de los donantes de sangre sanos y el enriquecimiento con CellSearch – sirvieron como controles negativos y positivos (una señal de PCR indetectable (negativo) o detectable (positivo) sobre el umbral cuantitativo (Cq) a más tardar de 15 ciclos después del Cq promedio de EPCAM y KRT1). En total se evaluaron 44 muestras de pacientes, de las cuales 29 tuvieron suficiente calidad para entrar en el análisis. Después del enriquecimiento con CellSearch, una alícuota del 11 % se usó para evaluar el estado AV-R7. El número final calculado de las CTC usado para los análisis de PCR se derivó de la ecuación de la línea de regresión de la correlación entre el recuento de CTC de 7,5 ml de sangre – como se midió por la enumeración de CellSearch del tubo CellSave – y el Cq promedio de EPCAM y KRT19 (Figura 4A), teniendo en cuenta de esta manera que solo se usó el 11 % de la muestra original

Descripción de la muestra	Nr Teórico de la línea celular/CTC en PCR	Cq Media de los genes de referencia*		Cq Media de los genes epiteliales**		Nr calculado de las células epiteliales en PCR	ΔCq AR-WT*** (Cq epitelial-Cq AR-WT)		ΔCq AR-V7 ⁺ (Cq epitelial-Cq AR-V7)		
		antes	después	antes	después		antes	después	antes	después	
Enriquecimiento con CellSearch											
Líneas celulares											
PC3	20	2	19,28	25,85	15,86	22,26	28	3	Sin Cq	Sin Cq	Sin Cq
MPE600	66	7	20,41	23,86	15,61	23,35	103	7	-7,47	Sin Cq	Sin Cq
ZR75.1	66	7	17,05	24,28	12,98	22,6	254	9	-3,55	Sin Cq	-14,68 Sin Cq
MDA-MB-415	66	7	18,94	23,21	14,62	20,52	145	19	-2,83	-2,55 Sin Cq	Sin Cq Sin Cq
CAMA1	66	7	17,03	24,35	13,86	20,97	188	16	-2,75	-2,11 Sin Cq	Sin Cq Sin Cq
MDA-MB-453	20	2	21,12	25,07	17,86	23,89	14	.	-1,48	-1,48 Sin Cq	Sin Cq Sin Cq

SUM185PE	66	7	18,33	22,49	14,07	20,19	175	21	-0,56	-0,68	-9,90	sin Cq
LNCaP ^a	66	7	15,99	23,04	17,92	24,84	46	4	4,14	4,30	-7,79	sin Cq
LNCaP ^b	20	2	17,40	24,30	19,58	25,68	8	1	4,06	3,14	-8,09	sin Cq
VCAP	66	7	19,21	23,93	17,82	24,17	48	5	4,19	4,59	-4,19	-5,77
ZZRVI	20	2	19,97	23,55	18,83	23,32	10	2	-0,11	0,12	-4,97	-3,57
Donantes de												
sangre sanos												
HBD-1	0	0	23,75		29,26			1		sin Cq		sin Cq
HBD-2	0	0	25,34		sin Cq			0		sin Cq		sin Cq
HBD-3	0	0	28,89		sin Cq			0		sin Cq		sin Cq
HBD-4	0	0	24,89		29,97			1		sin Cq		sin Cq
HBD-5	0	0	18,62		28,79			1		1,45		sin Cq
Pacientes												
CTC1155	68	68	19,89		16,82			68		0,84		-10,30
CTC1172	8	8	23,60		21,24			15		2,31		-8,67
CTC1167	10	10	18,20		21,41			14		1,79		-7,98
CTC1184	38	38	22,47		21,82			12		0,50		-6,93
CTC1170	19	19	22,45		21,82			12		3,32		-8,61
CTC1143	7	7	21,93		22,20			11		3,31		-7,86
CTC1175	21	21	21,22		22,52			10		-0,08		sin Cq
CTC1186	34	34	23,43		22,54			9		3,34		-7,79
CTC1152	2	2	18,12		22,65			9		0,32		-10,00
CTC1183	6	6	18,99		22,74			9		4,52		-8,01
CTC1151	28	28	25,29		22,74			9		-2,42		sin Cq
CTC1147	3	3	17,72		22,77			9		0,71		-7,24
CTC1180	10	10	19,07		22,80			9		-0,12		-8,10

CTC11159	4	24,73	23,12	8	-0,21	sin Cq
CTC11169	7	19,64	23,12	8	1,17	sin Cq
CTC11134	6	24,83	23,57	7	3,96	sin Cq
CTC11160	25	25,24	24,16	5	2,51	sin Cq
CTC11181	3	24,95	24,51	5	2,21	-6,31
CTC11164	7	24,32	24,58	5	3,29	-6,41
CTC11148	4	25,19	24,72	4	-0,50	sin Cq
CTC11179	10	24,57	24,84	4	0,59	sin Cq
CTC11166	1	20,54	25,08	4	1,14	sin Cq
CTC11156	2	21,56	25,20	4	3,11	sin Cq
CTC11157	2	21,94	25,27	4	3,38	-6,20
CTC11176	3	22,57	26,21	3	3,89	sin Cq
CTC11174	1	24,65	26,23	3	0,48	sin Cq
CTC11168	13	26,11	26,28	3	1,56	sin Cq
CTC11161	4	20,41	26,33	3	1,03	-4,53
CTC11171	5	23,79	26,36	3	4,62	-5,01
Pacientes que no se usaron en el análisis final debido a la entrada demasiado baja de ARN y/o epitelial (Cq >26,5) en la RT-qPCR final						
CTC11145	3	26,28	28,72	1	2,54	sin Cq
CTC11149	1	27,40	29,49	0	1,50	sin Cq
CTC11165	3	27,46	26,69	0	3,35	sin Cq
CTC11185	1	24,64	26,65	2	-8,30	sin Cq
CTC11182	8	23,92	26,70	2	-0,15	sin Cq
CTC11153	1	22,68	26,87	2	-0,89	sin Cq
CTC11162	1	22,16	27,10	2	1,49	sin Cq
CTC11158	8	27,70	27,14	0	-0,28	sin Cq
CTC11163	1	19,85	27,61	2	1,46	sin Cq

CTC1154	1	21,29	27,70	2	-0,22	sin Cq
CTC1150	1	23,15	28,27	1	2,90	sin Cq
CTC1177	4	22,12	28,48	1	2,17	sin Cq
CTC1178	1	19,02	29,09	1	3,30	sin Cq
CTC1173	1	20,29	29,37	1	3,49	sin Cq
CTC1144	10	21,12	sin Cq	0	4,00	sin Cq

* Valores de Cq promedio de los genes de referencia *DUSB*, *HMB5* y *HPRT1*

**Valor de Cq promedio de los marcadores epiteliales *EPCAM* y *KRT19*

***Valor de Cq promedio de la medición de AR-WT de los ensayos diferentes

± Los valores positivos indican que la señal de la PCR se detectó antes de la emergencia de la señal epitelial, el valor negativo indica que la señal de la PCR se detectó después de la emergencia de la señal epitelial.

‡ Réplicas técnicas de la misma muestra de ARN

EJEMPLO

Introducción

5 En este estudio, se investigó el valor predictivo de AR-V7 en las CTC para la respuesta al cabazitaxel en pacientes con mCRPC previamente tratados con docetaxel. Se estableció un ensayo de RT-qPCR altamente específico para medir los niveles de expresión de ARNm del AR de tipo salvaje (*AR-WT*) y *AR-V7* en las CTC enriquecidas por el Sistema CellSearch (Janssen Diagnostics LLC, Raritan, NJ). Se dispone de datos extensos y sólidos sobre la relevancia clínica de las CTC enumeradas por esta técnica de pacientes con mCRPC relativamente disponible y aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). A continuación, se investigó el valor predictivo y pronóstico de la presencia de *AR-V7* en las CTC tomadas antes del inicio del cabazitaxel con el objetivo de establecer si cabazitaxel sigue siendo una opción de tratamiento válida para pacientes *AR-V7*-positivos.

Métodos

15 Pacientes

Los pacientes con mCRPC se reclutaron de un ensayo prospectivo multicéntrico aleatorizado fase II en curso, que investigaba los efectos de la budesonida oral sobre la toxicidad del cabazitaxel (CABARESC, Número de Registro del Ensayo Holandés NTR2991). Todos los pacientes recibieron previamente docetaxel y debían tener progresión de la enfermedad según lo definido por tres mediciones de PSA en aumento con al menos dos semanas de diferencia o un aumento de PSA de $\geq 2,0$ $\mu\text{g/L}$, o progresión de la enfermedad radiológica. Los criterios completos de inclusión y exclusión se enumeran a continuación:

25 Criterios de inclusión:

- Cáncer de próstata metastásico resistente a la castración con progresión de la enfermedad documentada, definida como:
 - Aumento de los niveles de PSA; al menos dos aumentos consecutivos sobre un valor de referencia y al menos con una semana de diferencia, o un aumento de PSA de $\geq 2,0$ $\mu\text{g/L}$
 - Aparición de nuevas lesiones o progresión de la enfermedad documentada en una tomografía computarizada o una gammagrafía ósea
- Tratamiento previo con docetaxel
- Edad ≥ 18 años
- 35 • Estado funcional de la OMS ≤ 1
- Función renal adecuada (creatinina sérica $\leq 1,5$ x límite superior de lo normal (ULN) y/o aclaramiento de creatinina calculado por MDRD ≥ 50 ml/min) y función hepática (bilirrubina total $\leq 1,0$ x ULN, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa $\leq 2,5$ x ULN, o en caso de metástasis hepáticas ≤ 5 x ULN y fosfatasa alcalina < 5 x ULN, o en caso de metástasis óseas < 10 x ULN), dentro de los 21 días anteriores a la aleatorización
- 40 • Recuento sanguíneo hematológico adecuado (recuento absoluto de neutrófilos $\geq 1,5 \times 10^9/\text{L}$ y plaquetas $\geq 100 \times 10^9/\text{L}$) dentro de los 21 días anteriores a la aleatorización
- Castración, ya sea quirúrgicamente o mediante terapia continua con agonistas de LHRH
- Consentimiento informado por escrito de acuerdo con ICH-GCP

45 Criterios de exclusión:

- Imposibilidad o falta de voluntad para tomar medicamentos orales.
- Enfermedad grave o condiciones médicas inestables que requieran tratamiento, metástasis sintomáticas del sistema nervioso central o antecedentes de un trastorno psiquiátrico que dificulte la comprensión y la obtención del consentimiento informado
- 50 • Uso de medicamentos o suplementos dietéticos que se sabe que inducen o inhiben el CYP3A
- Uso de agentes hormonales distintos de los agonistas de GnRH
- Hipersensibilidad conocida a los corticosteroides
- Cualquier infección bacteriana, viral o fúngica sistémica o local activa
- 55 • Colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn o enfermedad celíaca (activa o en historial médico)
- Ostmía
- Vacuna contra la fiebre amarilla simultánea planificada/activa
- Condiciones geográficas, psicológicas u otras afecciones no médicas que interfieren con el seguimiento

60 Todos los pacientes de ambos brazos de tratamiento reciben la dosis estándar de cabazitaxel de 25 mg/m². El tratamiento con cabazitaxel se continuó hasta la progresión (a criterio del médico tratante), toxicidad inaceptable o hasta que se hubieran administrado diez ciclos. La recolección de muestras de CTC fue un estudio paralelo del ensayo CABARESC. Para este estudio, se seleccionaron pacientes incluidos entre agosto de 2012 y agosto de 2014 y con ≥ 10 CTC/7,5 ml de

sangre antes del inicio de cabazitaxel para garantizar un análisis posterior sólido y específico de CTC (Figura 1). El Erasmus MC y los Consejos de Revisión Institucional locales aprobaron el estudio (METC 11-324). Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para el estudio principal, así como también para el estudio paralelo sobre enumeración y caracterización de CTC.

5

Procesamiento de muestras

La sangre se extrajo por punción venosa antes del inicio del primer y tercer ciclo de cabazitaxel. La enumeración de las CTC se llevó a cabo como se describió en detalle antes (Sieuwerts y otros, 2009. *Breast Cancer Res Treat* 118:455-68; Sieuwerts y otros, 2011. *Clin Cancer Res* 17:3600-18). Brevemente, se enumeraron las CTC a partir de 7,5 ml de sangre extraída en un tubo de conservante CellSave (Janssen Diagnostics). Las muestras de sangre se procesaron dentro de 96 horas mediante el uso del Kit de Células Epiteliales en el Sistema CellSearch (ambos de Janssen Diagnostics). En este sistema, las células epiteliales se enriquecen inmunomagnéticamente a partir de sangre completa mediante el uso de anticuerpos anti-EpCAM cargados con nanopartículas de ferrofluido. Las células enriquecidas se tiñen con el colorante nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), anti-citoqueratina 18/8/19 marcados con ficoeritrina (PE) y anti-CD45 marcados con alofococianina (APC), seguido de escaneado mediante el uso del Analizador CellTracks (Janssen Diagnostics). Se consideraron CTC todas las células $\geq 4 \mu\text{m}$, con morfología redonda u ovalada, positivas para citoqueratina y DAPI, con al menos 50 % de superposición en la señal de DAPI y citoqueratina, y negativas para CD45. Todas las muestras fueron analizadas independientes por dos revisores capacitados.

20

Para la caracterización molecular de las CTC, se procesaron 7,5 ml de sangre de un tubo con EDTA mediante el uso del Kit CellSearch Profile (Janssen Diagnostics) dentro de 24 horas para limitar la degradación del ARNm. No se realizó ninguna etapa de tinción después del enriquecimiento inmunomagnético. En su lugar, se aspiró el tampón después de la incubación en un imán manual y las células enriquecidas se lisaron en tampón RLT+ (Qiagen, Valencia, CA), seguido de almacenamiento a -80°C hasta el posterior aislamiento del ARN mediante el uso del Kit AllPrep DNA/RNA Micro (Qiagen). Después de las diluciones para la síntesis y preamplificación de cDNA, los niveles de expresión de *AR-V7* y *AR-WT* se midieron mediante RT-qPCR en una alícuota del 11 % del material de partida original mediante el uso de Ensayos de Expresión Génica Taqman (Applied Biosystems, Carlsbad, CA; Tabla 1). La generación de ADN complementario (ADNc), preamplificación y RT-qPCR se realizaron esencialmente como se describió anteriormente (Sieuwerts y otros, 2009. *Breast Cancer Res Treat* 118:455-68; Sieuwerts y otros, 2011. *Clin Cancer Res* 17: 3600-18). Los detalles de esta prueba fueron los siguientes: Para la caracterización molecular de las CTC, se procesaron 7,5 ml de sangre de un tubo con EDTA mediante el uso del Kit CellSearch Profile (Janssen Diagnostics) dentro de 24 horas para limitar la degradación del ARNm. No se realizó ninguna etapa de tinción después del enriquecimiento inmunomagnético. En su lugar, se aspiró el tampón después de la incubación en un imán manual y las células enriquecidas se lisaron en tampón RLT+ (Qiagen, Valencia, CA), seguido de almacenamiento a -80°C hasta el posterior aislamiento del ARN mediante el uso del Kit AllPrep DNA/RNA Micro (Qiagen).

35

De los 12 μL resultantes con >200 pb de ARN, se usaron 5 μL para la generación de 10 μL de ADNc (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), seguido de una etapa de ARNasa H (Ambion, Life Technologies) para degradar el ARN restante. A continuación, se usaron 3 μL de ADNc para preamplificar específicamente los transcritos generados por los nueve ensayos de Taqman representados en la Tabla 1, que se realizó en 14 ciclos de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante del kit Taqman PreAmp Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA). Después de la preamplificación, la muestra de 12 μL resultante se diluyó 15 veces antes de 35 ciclos de RT-qPCR mediante el uso de un sistema de PCR en tiempo real Mx3000P (Agilent, Amsterdam, Países Bajos). Para cada muestra, se realizaron nueve reacciones de PCR individuales en un volumen final de 20 μL que contiene 5 μL de ADNc preamplificado diluido, 30-50 % (V/V) Taqman Universal Mastermix (4326614, Life Technologies) y 0,5-1 μL de ensayo de expresión génica Taqman, que se realizó en 35 ciclos de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante de los ensayos Taqman.

45

Tres genes de referencia (*GUSB*, *HMBS*, y *HPRT1*) sirvieron como control interno de la cantidad y calidad de ARNm y ADNc aislado. Para estimar el número final de células epiteliales presentes en las preparaciones de ARN, se usó la señal promedio de *EPCAM* y *KRT19*, que se correlacionó con el recuento de CTC evaluado por CellSearch (r de Pearson = 0,71; $P < 0,01$; Figura 4A). A continuación, se calculó la entrada final de células tumorales epiteliales en la alícuota de ARN usada para el perfil mediante el uso de la ecuación derivada de la línea de regresión del gráfico de correlación y teniendo en cuenta que solo se utilizó el 11 % de la muestra original. Muestras con un valor promedio de C_q del gen de referencia $> 26,5$, indicativo de calidad baja y/o mala del ARN/ADNc, y/o un valor promedio de C_q del gen epitelial $> 26,5$, indicativo de entrada de CTC epitelial baja/nula en la muestra final de ARN/ADNc, se excluyeron de los análisis.

55

Para corregir el recuento de CTC y la entrada de células tumorales epiteliales, los valores de C_q de *AR-V7* y *AR-WT* se normalizaron al promedio del valor de C_q de los genes epiteliales de *EPCAM* y *KRT19* medido en la misma placa de PCR de la siguiente manera: $\Delta C_q \text{ AR} = \text{valor promedio de } C_q \text{ de } EPCAM \text{ y } KRT19 \text{ menos valor de } C_q \text{ de } AR-V7 \text{ o } AR-WT$.

60

La sensibilidad y especificidad de los ensayos se probaron mediante el análisis de cinco donantes de sangre sanos (HBD), y de líneas celulares de cáncer de próstata (22RV1, LNCaP, PC3 y VCaP) y mama (CAMA1, MDA-MB-415, MDA-MB-453, MPE600, SUM185PE y ZR75.1). Para este propósito, se adicionaron 100 células de las siguientes líneas celulares en 7,5 ml de sangre HBD y se enriquecieron con CellSearch para que sirvieran como controles negativos y positivos:

65

22RV1 (WT_{alto}/V7_{neg}), CAMA1 (WT_{alto}/V7_{neg}), LNCaP (WT_{alto}/V7_{bajo}), MDA-MB-415 (WT_{alto}/V7_{neg}), MDA-MB-453 (WT_{alto}/V7_{neg}), MPE600 (WT_{bajo}/V7_{neg}), PC3 (WT_{neg}/V7_{neg}), SUM185PE (WT_{alto}/V7_{bajo}), VCaP (WT_{alto}/V7_{alto}), ZR75.1 (WT_{bajo}/V7_{bajo}). Todas las muestras se procesaron de manera similar a las muestras de sangre de los pacientes.

5 Normalización y análisis estadístico

5 Tres genes de referencia (*GUSB*, *HMBS*, y *HPRT1*) sirvieron como controles internos de la cantidad y calidad de ARNm aislado. Para corregir el recuento de CTC y la entrada de células tumorales epiteliales, los valores de C_q de *AR-V7* y *AR-WT* se normalizaron al valor promedio C_q de los genes epiteliales *EPCAM* y *KRT19*, que se correlacionaron con el recuento de CTC (Figura 4A). La entrada final de células tumorales epiteliales en la alícuota de ARN usada para el perfil se calculó mediante el uso de la ecuación derivada de la línea de regresión de la correlación entre los genes epiteliales y el recuento de CTC, teniendo en cuenta de esta manera que solo se usó el 11 % de la muestra original. Muestras con un valor promedio de C_q del gen de referencia > 26,5, indicativo de calidad de ARN baja y/o mala, y/o un valor promedio del gen de referencia C_q > 26,5, indicativo de entrada de CTC epitelial baja/nula en la muestra de ARN final, se excluyeron de los análisis clínicos finales. Se determinó un valor de corte de positividad para *AR-V7* basado en los experimentos de la línea celular (Tabla 2).

20 El criterio principal de valoración de este estudio fue la tasa de respuesta (RR) de CTC al cabazitaxel, definida como una disminución de ≥ 10 CTC a $< 5/7,5$ ml de sangre después de dos ciclos de tratamiento. Los objetivos secundarios fueron la respuesta del PSA (30 % o 50 % de disminución del PSA desde el inicio del estudio hasta las 12 semanas o antes en caso de interrupción del tratamiento), la mejor respuesta del PSA durante el tratamiento y la OS (intervalo entre el registro y la muerte o la última fecha de vida conocida). Los criterios de valoración informados están de acuerdo con las directrices del Prostate Cancer Working Group 2 (PCWG2) (Scher y otros, 2008. J Clin Oncol 26:1148-59.).

25 Las pruebas estadísticas aplicadas fueron la prueba X^2 para diferencias entre variables categóricas, la prueba t de Student para distribuciones normales y la prueba U de Mann-Whitney para otras variables continuas. Las correlaciones fueron probadas por Pearson o la prueba no paramétrica de Spearman, en dependencia de la distribución. La supervivencia se visualizó mediante gráficos de Kaplan Meier y las diferencias se calcularon mediante pruebas del orden logarítmico. Todas las pruebas estadísticas fueron de dos colas. Un valor de $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

30 Resultados

AR-WT y AR-V7 en las CTC

35 Primero se probó la sensibilidad y especificidad de los ensayos. La señal promedio de *EPCAM* y *KRT19* se correlacionó con el recuento de CTC evaluado por CellSearch (r de Pearson=0,71; $P < 0,01$; Figura 4A) y se usó para estimar el número final de células epiteliales presentes en las alícuotas de ARN. Para corregir las diferencias en la entrada epitelial entre pacientes, se evaluó el estado de AR con relación a la expresión de la señal promedio de *EPCAM* y *KRT19*. Al comparar las fracciones de ARN aisladas de las células de líneas celulares de cáncer de mama y próstata puras y adicionadas (100 células en 7,5 ml de sangre HBD) seguidas de enriquecimiento con CellSearch, se pudo determinar el estado *AR-V7* mediante RT-qPCR en material aislado de ≥ 3 células epiteliales enriquecidas. Este valor de corte se confirmó en nuestras muestras clínicas, donde dos pacientes con ARN de 3 CTC dieron positivo para *AR-V7*, pero ninguno de los pacientes con CTC < 3 mostró una señal *AR-V7* positiva (Tabla 2). El valor de fondo de leucocitos no influyó en los resultados de los análisis, ya que los niveles de expresión de *AR-WT* y *AR-V7* antes y después de la adición y antes y después del enriquecimiento con CellSearch mostró una fuerte correlación (Figura 4B/C). Por lo tanto, el límite de detección inferior del ensayo de *AR-V7* se estableció en las CTC epiteliales ≥ 3 en la preparación final disponible para RT-qPCR. Se probaron cinco HBD masculinos, de los cuales cuatro resultaron negativos para la expresión de *AR-WT* y *AR-V7* (Tabla 2). Un hombre HBD de 67 años de edad tenía detectable *AR-WT* en la sangre periférica. Dado que este donante era anónimo, no se realizaron seguimientos ni diagnósticos adicionales.

50 A continuación, se analizaron las muestras de los pacientes. Para este estudio exploratorio, se seleccionaron pacientes con CTC ≥ 10 al inicio del estudio para limitar las variaciones estocásticas entre la enumeración de CTC y el aislamiento, al asegurar la entrada epitelial en los análisis de RT-qPCR. Se identificaron veintinueve pacientes con suficiente calidad y cantidad de ARN en las muestras de CTC (Figura 1). Las características de los pacientes se muestran en Tabla 3.

55 Tabla 3. Características de los pacientes en todos los pacientes, pacientes *AR-V7*-negativos, y pacientes *AR-V7*-positivos. Los valores P informados son de muestras independientes, prueba t de Student (edad), prueba U de Mann-Whitney no paramétrica (química y recuento de CTC al inicio del estudio) y pruebas de X^2 (variables categóricas). IQR: rango intercuartílico; sd: desviación estándar. *Los valores que faltan se excluyeron del análisis. †Faltan tres pacientes, los tres *AR-V7* positivos. ††Límite superior de lo normal: lactato deshidrogenasa: 247 U/L; fosfatasa alcalina 114 U/L; antígeno prostático específico 6,4 μ g/L.

65

		AR-V7 en las CTC al inicio del estudio						
		Todos los pacientes		Ausente		Presente		Valor de P*
5	N	29	100 %	13	100 %	16	100 %	
	Edad al momento del registro (media ± ds)	70 ± 7,2		68 ± 8,9		71 ± 5,5		0,30
10	Desempeño de la OMS puntuación							0,27
	0	9	31 %	6	46 %	3	19 %	
	1	16	55 %	7	54 %	9	56 %	
15	Desconocido	4	14 %	-		4	25 %	
	Tipo de castración							0,49
	Quirúrgico	3	10 %	1	8 %	2	13 %	
20	Agonista de LHRH	22	76 %	12	92 %	10	62 %	
	Desconocido	4	14 %	-		4	25 %	
	Número de líneas de quimioterapia previas							0,90
25	Una (docetaxel)	22	76 %	12	92 %	10	63 %	
	Dos	2	7 %	1	8 %	1	6 %	
	Desconocido	5	17 %	-		5	31 %	
	Anti-andrógenos previos para mCRPC							
30	Acetato de abiraterona	5	17 %	0	0 %	5	31 %	0,009
	Orteronel	3	10 %	3	23 %	0	0 %	0,09
	Química al inicio del estudio							
35	Lactato deshidrogenasa (U/l, mediana (IQR))* ^{††}	460(325-651)		431(310-616)		467(351 - 768)		0,49
	Fosfatasa alcalina (U/l, mediana (IQR))* ^{††}	162(100-382)		160(96 - 358)		270(100 - 387)		0,08
40	Antígeno prostático específico (µg/l, mediana (IQR))* ^{††}	347(75 - 700)		107(68 - 439)		698(79 - 952)		0,04
	Recuento de CTC al inicio del estudio (mediana (IQR))	100(50-243)		94(38 - 260)		110(52 - 254)		0,58

45

Cinco pacientes habían recibido acetato de abiraterona antes de la inscripción. La expresión de *AR-WT* en las CTC se detectó en todos los pacientes. En 16 pacientes (55 %) se midió la expresión de *AR-V7*. Los cinco pacientes que habían sido tratados previamente con acetato de abiraterona expresaron *AR-V7* en comparación con siete de los 20 pacientes (35 %) que no habían recibido acetato de abiraterona ($P=0,009$). Los pacientes con CTC *AR-V7*-positivas tenían niveles medios de PSA más altos que los pacientes *AR-V7*-negativos (698 frente a 107 µg/L; $P=0,04$). Los niveles de expresión de *AR-V7* en las CTC no se correlacionaron con los niveles de expresión en *AR-WT* (r de Spearman=0,30, $P=0,12$; Figura 5A). No hubo diferencia en niveles de expresión de *AR-WT* entre pacientes con y sin *AR-V7* en las CTC ($P=0,20$; Figura 5B).

55

AR-V7 y respuesta al cabazitaxel

60

El criterio principal de valoración de este estudio fue la respuesta de CTC después de dos ciclos de cabazitaxel, definida como una disminución de las CTC ≥ 10 al inicio del estudio a CTC/7,5 ml de sangre < 5 después de dos ciclos. De 25 pacientes se dispuso de una muestra secundaria de CTC; en tres pacientes se perdió la segunda extracción y un paciente murió después del segundo ciclo debido a un evento no relacionado con la enfermedad. De estos 25 pacientes, 15 eran *AR-V7*-positivo y 10 eran *AR-V7*-negativo. Se observó una respuesta de CTC al cabazitaxel en cinco de los 25 pacientes (20 %), tres de los cuales expresaron *AR-V7* en las CTC al inicio del estudio. Las CTC-RR tanto en los grupos de pacientes *AR-V7*-positivo como *AR-V7*-los grupos fueron del 20 % (tabla 4).

Tabla 4. Presencia de AR-V7 en las CTC al inicio del estudio frente a la respuesta al cabazitaxel después de dos ciclos, respuesta de PSA después de 12 semanas y mejor respuesta de PSA al final del tratamiento. *Los números incluyen pacientes con una respuesta de PSA ≥ 50 %.

5

		Respuesta de CTC		Respuesta de PSA después de 12 semanas			Mejor respuesta de PSA			
		No	Sí	No	≥ 30 %*	≥ 50 %	No	≥ 30 %*	≥ 50 %	
AR-	No	8	2	9	3	2	7	4	2	
V7	Sí	12	3	12	2	1	12	3	1	
		X ² P = 1,00			X ² P = 0,74			X ² P = 0,59		

10

15

20

Los niveles secuenciales de PSA durante el cabazitaxel para la evaluación de la respuesta de PSA después de 12 semanas y la respuesta de PSA máxima al final del tratamiento estuvieron disponibles en 26 pacientes. Cinco (17 %) y tres pacientes (10 %) lograron una respuesta de PSA ≥ 30 % y ≥ 50 %, respectivamente, después de 12 semanas de tratamiento. Al final del tratamiento, la mejor respuesta de PSA fue ≥ 30 % en siete pacientes (24 %) y ≥ 50 % en tres pacientes (10 %). Las diferencias entre el 30 % y el 50 % de PSA-RR después de 12 semanas y al final del tratamiento entre pacientes con y sin AR-V7 en las CTC no fueron estadísticamente significativas (Tabla 4, Figura 2). El tratamiento previo con acetato de abiraterona no influyó en el CTC-RR y el PSA-RR durante el tratamiento con cabazitaxel.

AR-V7 y Supervivencia

25

30

Se dispuso de veintiocho pacientes para el análisis de OS. La mediana del tiempo de seguimiento desde la fecha de registro de los 12 pacientes que aún estaban vivos fue de 6,6 meses (rango de 1,7 - 26,7 meses). Cuatro pacientes seguían recibiendo tratamiento con cabazitaxel. La mediana de la OS en todos los pacientes fue de 9,5 (IC del 95 %: 5,8-13,2) meses. La presencia de AR-V7 en las CTC al inicio del estudio no se asoció con la OS (Figura 3). La mediana de OS en pacientes con AR-V7 fue de 9,5 (95 % CI 4,5-14,5) meses en comparación con 7,7 (95 % CI 3,3-12,1) meses en pacientes sin AR-V7 (orden logarítmico P=0,45). El tratamiento con acetato de abiraterona antes o después del cabazitaxel no influyó en la OS (Figura 6).

35

40

Se muestra en la presente descripción que el análisis repetitivo de las características moleculares de las células tumorales (circulantes) durante la trayectoria del tratamiento puede ser muy beneficioso para los tratamientos personalizados, ya que las características del tumor pueden cambiar con el tiempo y estos cambios pueden afectar el resultado de los tratamientos sistémicos. La caracterización de las CTC proporciona una forma mínimamente invasiva de monitorear los cambios en las características de los sitios de tumores metastásicos, lo que potencialmente incluye heterogeneidad de lesiones intra e intertumoraes. Sin embargo, se necesitan métodos avanzados y extremadamente sensibles para el aislamiento y caracterización de las CTC, dado su bajo número en la circulación. Entre los numerosos ensayos de aislamiento desarrollados, el Sistema CellSearch es el único certificado por la FDA para uso clínico. Hasta ahora no se ha validado ningún ensayo de caracterización de CTC.

45

50

Sin embargo, recientemente se ha demostrado la viabilidad y relevancia clínica de medir AR-V7 en las CTC de pacientes con mCRPC tratados con enzalutamida o acetato de abiraterona (Antonarakis y otros 2014). En este estudio, las CTC se enriquecieron a partir de sangre periférica mediante el uso de un método de aislamiento basado en ARNm, para el que existen datos limitados sobre la relevancia clínica en mCRPC. En el presente estudio, se exploró la factibilidad de medir el AR-WT y el AR-V7 en las CTC después del enriquecimiento de sangre periférica mediante el ensayo CellSearch. Con base en los experimentos de adición mediante el uso de líneas de células cancerosas, pudimos detectar de manera confiable AR-V7 en ≥ 3 CTC en 7,5 ml de sangre. Se estableció un valor de corte para la positividad de AR-V7 con base en los experimentos con la línea celular y se aplicó a las muestras de los pacientes. Las diferencias en la entrada epitelial se corrigieron mediante la normalización mediante el uso de los marcadores epiteliales que se correlacionaron fuertemente con el recuento de CTC. En conjunto, se describió un método robusto para medir el AR-WT y el AR-V7 en las CTC aisladas mediante el uso del Sistema CellSearch.

55

60

65

Dado el papel predictivo recientemente descrito de AR-V7 para la resistencia al acetato de abiraterona, enzalutamida y docetaxel, se evaluó subsecuentemente la asociación entre la presencia de AR-V7 en las CTC y el resultado al cabazitaxel. A diferencia del docetaxel, para el que se ha descrito resistencia cruzada con acetato de abiraterona y enzalutamida, los pacientes que no siguieron los tratamientos antes mencionados todavía parecen beneficiarse del cabazitaxel. En nuestra cohorte de pacientes de mCRPC previamente tratados con docetaxel con CTC ≥ 10 , se detectó AR-V7 en 16 de los 29 (55 %) pacientes, lo que es mayor que el anterior donde se encontró un 29 % de pacientes tratados con enzalutamida y acetato de abiraterona, de los cuales el 40 % había sido tratado con docetaxel. La mayor prevalencia de AR-V7 en el estudio podría reflejar el peor pronóstico general del grupo de pacientes en comparación con el grupo de estudio anterior, donde también se incluyeron pacientes con CTC < 10 . De acuerdo con el estudio anterior, la prevalencia de AR-V7 fue significativamente mayor en pacientes resistentes al acetato de abiraterona. La presencia de AR-V7 se encontró que predice la resistencia al acetato de abiraterona y enzalutamida (Antonarakis y otros 2014). En la presente descripción se mostró que la presencia de AR-V7 en las CTC tomadas antes del tratamiento no fue asociado con el resultado del cabazitaxel con CTC-RR del 20 % tanto en pacientes con o sin AR-V7. También por el contrario con los

hallazgos en pacientes tratados con acetato de enzalutamida y abiraterona, la OS después del tratamiento con cabazitaxel no fue asociada con la presencia de AR-V7 en las CTC. Estos resultados siguen siendo una opción de tratamiento válida para pacientes AR-V7 positivos.

5 Se eligió usar el CTC-RR, definido como una disminución en el recuento de CTC a $<5/7,5$ ml de sangre después de dos ciclos de cabazitaxel, como criterio de valoración principal para la eficacia del tratamiento. La solidez de este criterio de valoración se estableció en varios estudios previos que muestran que los números de CTC están fuertemente asociados con la PFS y la OS en pacientes con mCRPC y que los pacientes con un recuento alto de CTC al inicio del estudio de CTC ≥ 5 pero una disminución a <5 por 7,5 ml de sangre, están mejor que los pacientes que permanecieron en un número alto de CTC. Además, la combinación del recuento de CTC y los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) demostraron cumplir con todos los criterios para la subrogación de supervivencia, lo que respalda el uso de CTC como criterio de valoración sustituto para la OS en ensayos clínicos. Dado que todavía se usa ampliamente, también se analizó el PSA-RR como criterio de valoración secundario. No se observaron diferencias entre los pacientes AR-V7-positivos y AR-V7-negativos y respuesta del PSA después de 12 semanas y al final del tratamiento.

15 La falta de valor predictivo de AR-V7 en las CTC al inicio del estudio para la respuesta al cabazitaxel es novedoso y sorprendente y el cabazitaxel está indicado como una opción de tratamiento válida para pacientes AR-V7-positivos, posiblemente incluso para pacientes con menos CTC que el límite actual de detección de AR-V7 en muestras que contienen CTC epiteliales ≥ 3 .

20 En conclusión, aquí demostramos la viabilidad de medir el AR-V7 en las CTC después del enriquecimiento con CellSearch en pacientes con mCRPC. Se demostró que el resultado al cabazitaxel en estos pacientes no está asociado con la presencia de esta variante de empalme particular. Estos resultados agregan información importante a la evidencia existente de que las CTC proporcionan una herramienta invaluable para personalizar los tratamientos del cáncer y mejorar el pronóstico de los pacientes con mCRPC al permitir una secuenciación óptima del tratamiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cabazitaxel para su uso como medicamento en el tratamiento de un paciente AR-V7 positivo que padece cáncer de próstata, que comprende determinar el estado AR-V7 en dicho paciente y administrar cabazitaxel en forma de base o en forma de hidrato o solvato, a un paciente AR-V7 positivo, en combinación con un corticoide.
2. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho cáncer de próstata es cáncer de próstata metastásico resistente a la castración.
- 10 3. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho corticoide es prednisona o prednisolona.
- 15 4. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha etapa de determinar el estado AR-V7 en dicho paciente se realiza en células tumorales aisladas, preferentemente células tumorales circulantes (CTC).
- 20 5. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho paciente ha sido tratado previamente con un régimen basado en docetaxel.
- 25 6. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho paciente es resistente al docetaxel.
7. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho paciente ha sido tratado previamente con y/o es resistente al acetato de abiraterona y/o enzalutamida.
- 30 8. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho cabazitaxel tiene forma de solvato de acetona.
9. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el solvato de acetona contiene entre un 5 % y un 8 % de acetona.
- 35 10. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, administrado a una dosis de entre 15 y 25 mg/m², con la administración de prednisona o prednisolona a una dosis de 10 mg/día.
- 40 11. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, administrado a una dosis de 25 mg/m².
12. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende repetir la administración de dicho compuesto como un nuevo ciclo cada 3 semanas.
- 45 13. Cabazitaxel para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la mediana del número de ciclos es 6.
14. Un método para identificar pacientes con cáncer de próstata, elegibles para el tratamiento con cabazitaxel en forma de base o en forma de hidrato o solvato, en combinación con un corticoide que comprende analizar una muestra biológica del paciente para detectar la presencia de células tumorales circulantes AR-V7, en donde el paciente es elegible para tratamiento con dicho cabazitaxel si las células tumorales circulantes en dicha muestra dan positivo para AR-V7.
- 50 15. El método de la reivindicación 14, en donde dicha etapa de analizar una muestra biológica del paciente para detectar la presencia de células tumorales circulantes AR-V7 comprende:
 - (a) proporcionar una muestra de sangre, suero u orina del paciente,
 - (b) separar magnéticamente dichas células tumorales de esencialmente todas las demás células en dicha muestra mediante el uso de nanopartículas de ferrofluido con anticuerpos que se dirigen a la adhesión de células epiteliales, para proporcionar una muestra de células tumorales enriquecida;
 - 55 (c) enumerar opcionalmente dichas células tumorales aisladas en dicha muestra de células tumorales enriquecida mediante la tinción de dichas células tumorales en dicha muestra con una tinción de ADN nuclear, y un anticuerpo monoclonal de citoqueratina específico para las células epiteliales, mientras que opcionalmente se diferencian dichas células tumorales con doble tinción de los leucocitos teñidos en dicha muestra mediante el uso de una tinción con el anticuerpo monoclonal anti-CD45 específico de leucocitos, y
 - 60 (d) determinar la presencia de transcritos de la variante 7 de empalme de ARNm del receptor de andrógenos en células tumorales en dicha muestra de células tumorales enriquecida mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR).

Figura 1

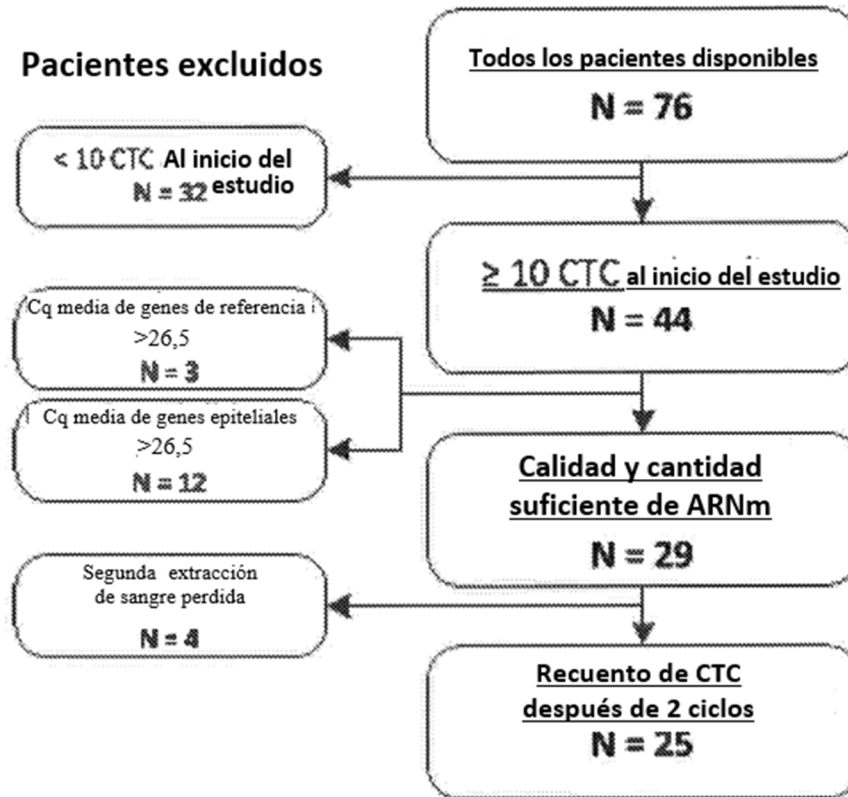


Figura 2A

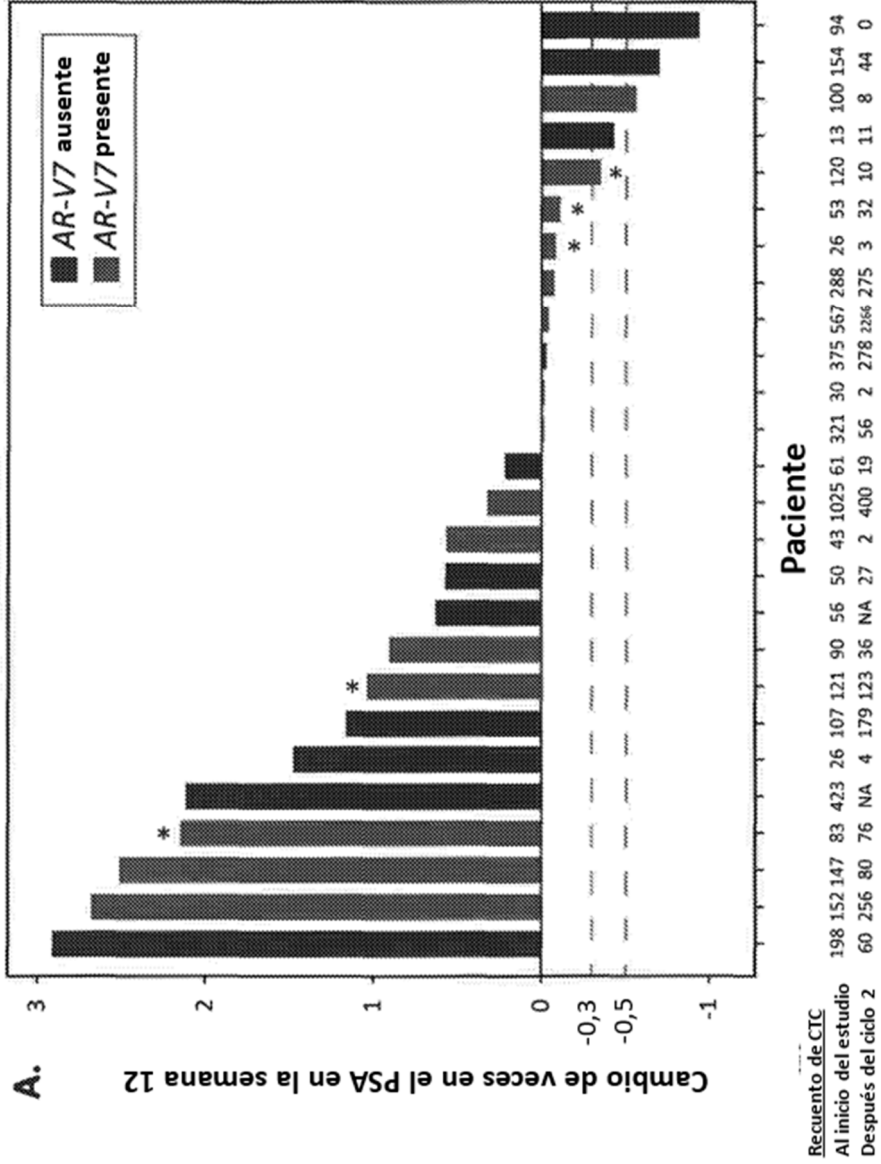


Figura 2B

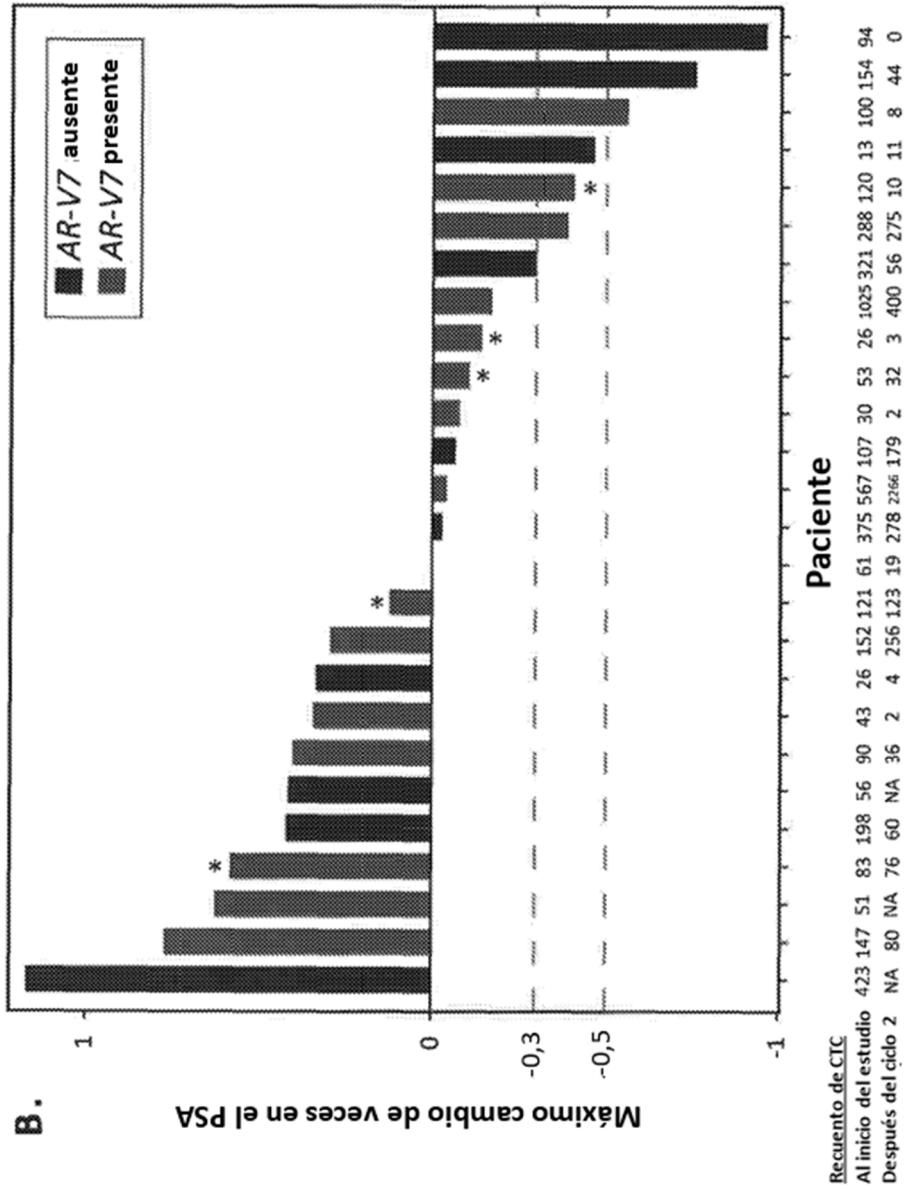


Figura 3

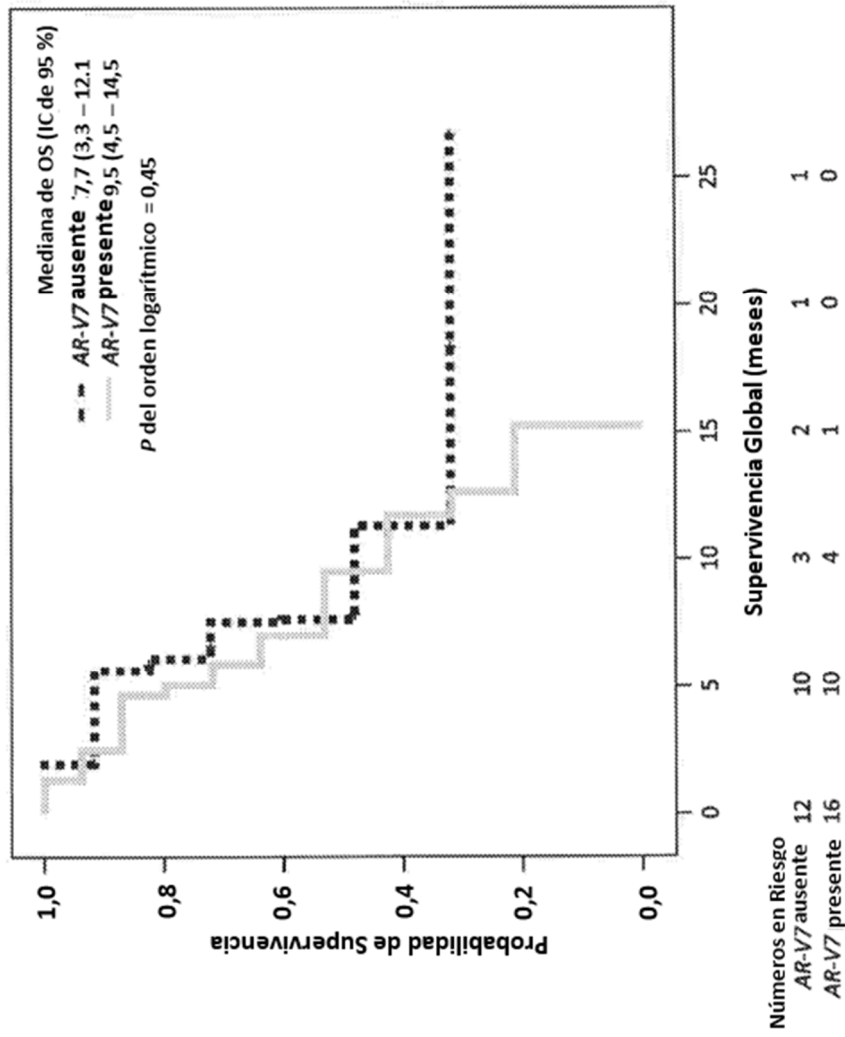


Figura 4A

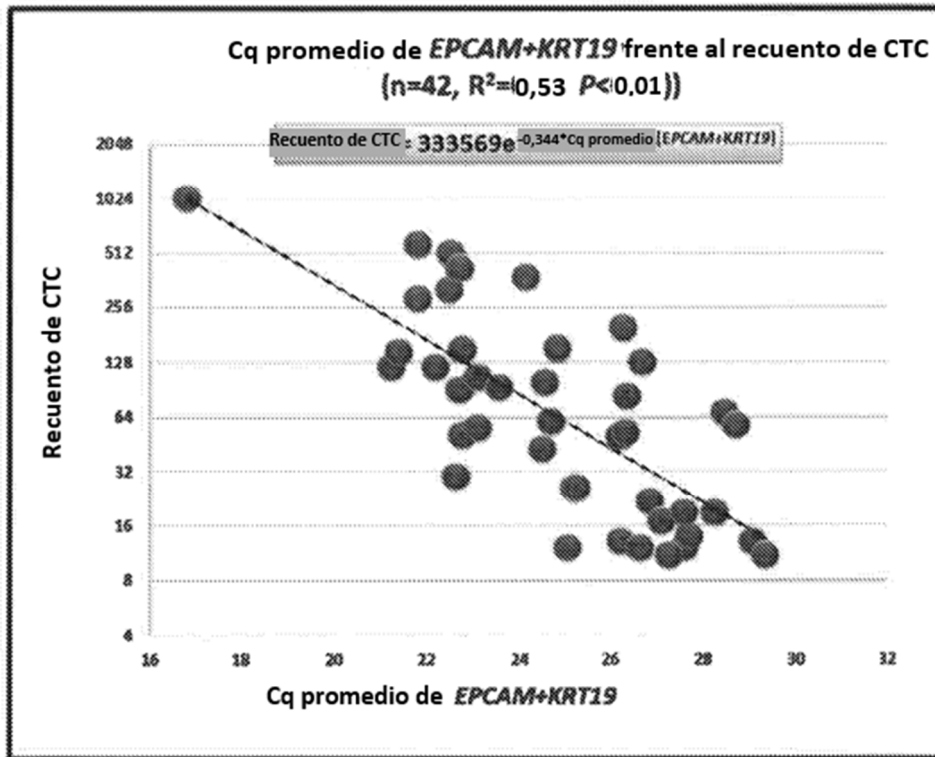
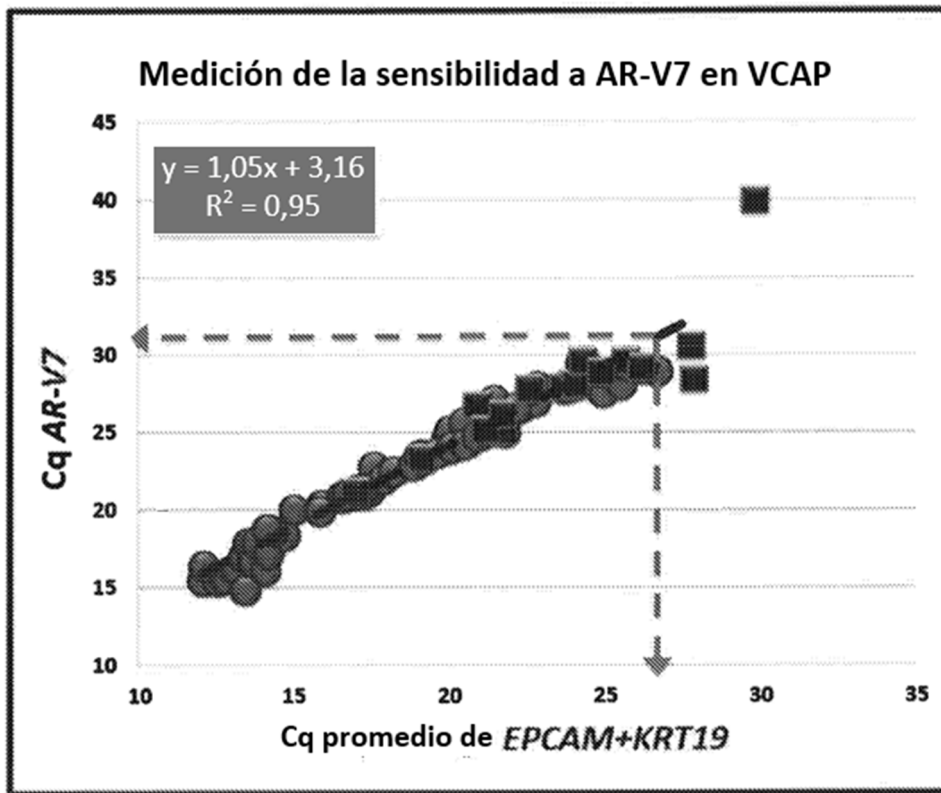


Figura 4B



● **AR-V7 en VCAP**

■ **AR-V7 en VCAP+WBC**

Figura 4C

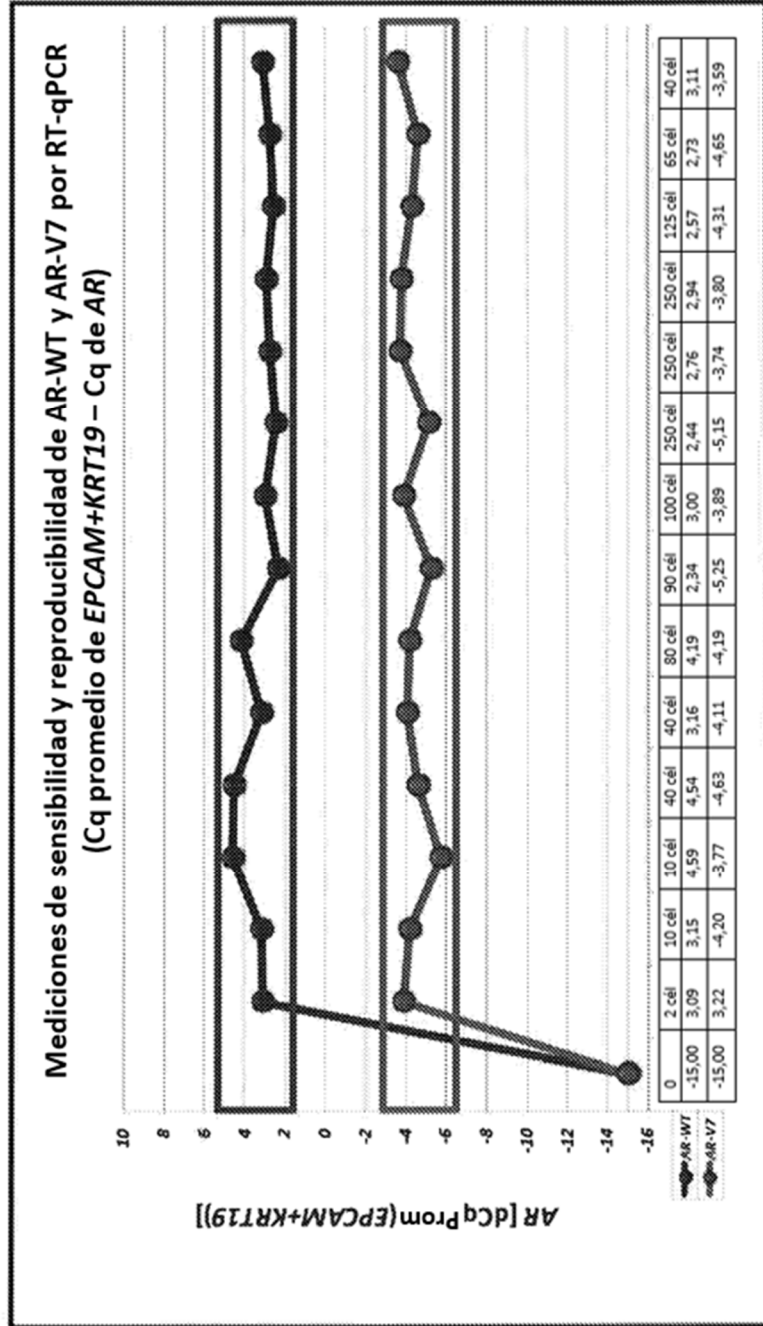


Figura 4C (Continuación)

fecha	23-Jul-14	26-Nov-14	25-Ago-14	23-Ago-14	22-Sep-14	25-Ago-14	28-Jul-14	22-Sep-14	30-Jul-14	22-Sep-14	30-Jul-14	22-Sep-14	30-Jul-14	22-Sep-14	22-Sep-14
Descripción de la muestra	HBD	VCAP en HBD	VCAP en HBD	VCAP enriquecidas con CellSearch	VCAP	VCAP	VCAP	VCAP	VCAP	VCAP	VCAP	VCAP	VCAP	VCAP	VCAP
Entrada # de células en RT-PCR	0	2	10	10	40	40	80	90	100	250	250	250	250	250	125
Preamplificado	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
WBC presente	si	si	si	si	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
dCq	6,16	6,47	5,81	3,67	Sin Cq	Sin Cq	Sin Cq	Sin Cq	Sin Cq	Sin Cq	Sin Cq	Sin Cq	Sin Cq	Sin Cq	Sin Cq
PTPRC/CD45	22,30	21,50	21,64	23,93	21,13	21,49	19,21	19,12	18,93	16,75	15,99	25,87	24,89	28,32	30,80
Cq media de 3 genes de referencia	Sin Cq	25,70	23,68	24,17	19,92	19,99	17,82	17,54	17,38	14,97	14,68	24,64	23,06	26,71	29,55
Cq media de 2 marcadores de referencia	Sin Cq	29,58	27,87	29,94	24,54	24,10	22,01	22,79	21,27	20,12	18,41	28,44	27,37	31,35	33,14

Figura 5

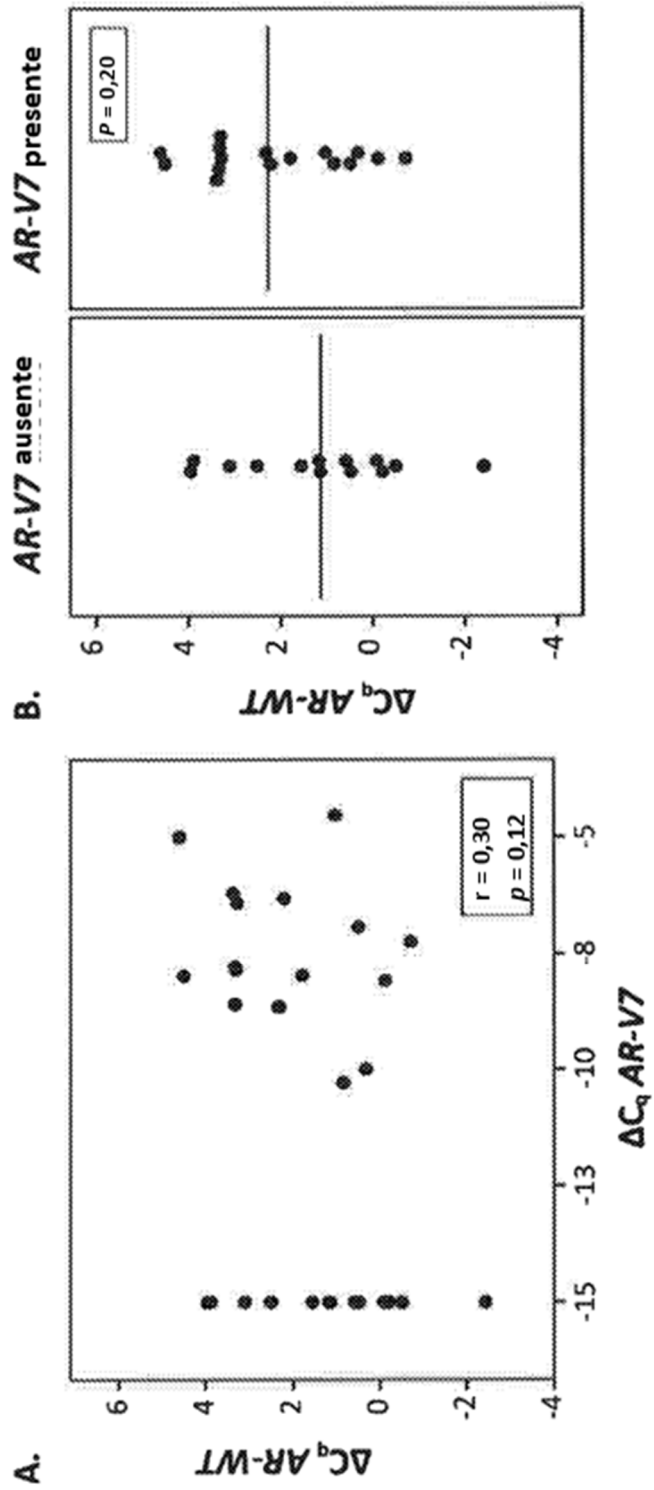
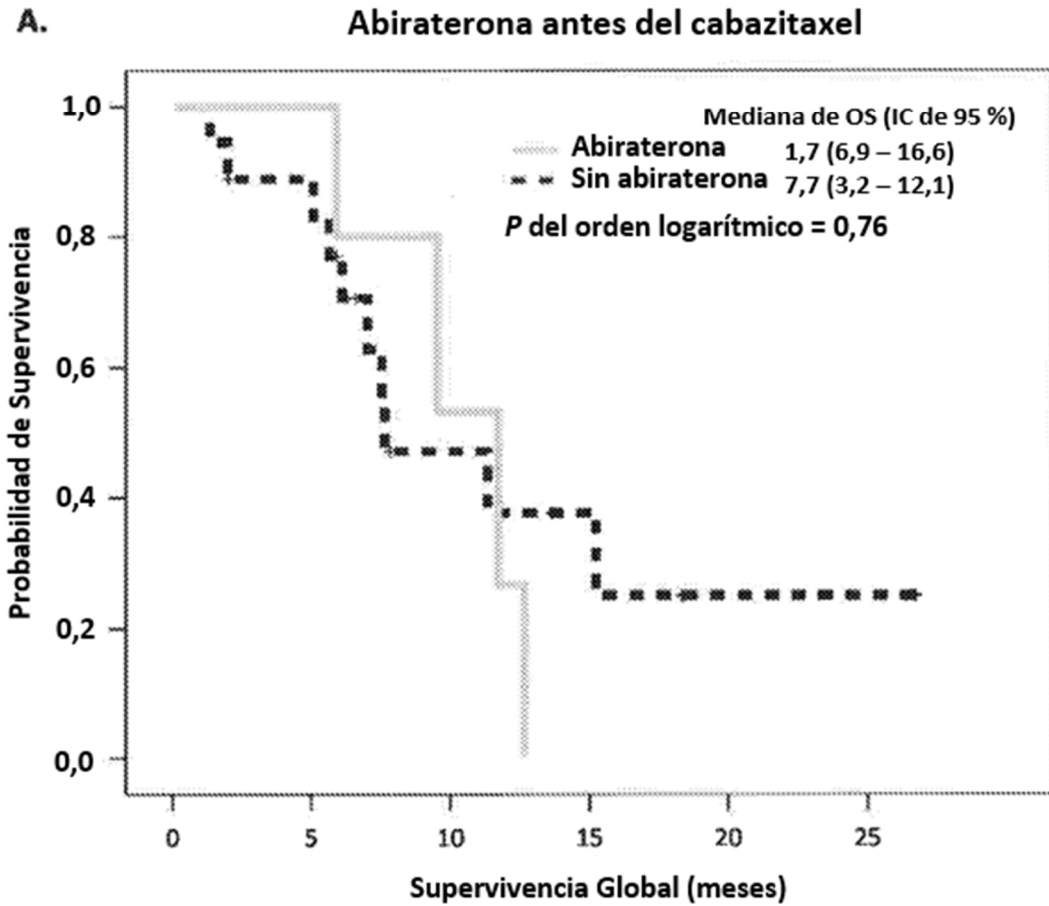


Figura 6A

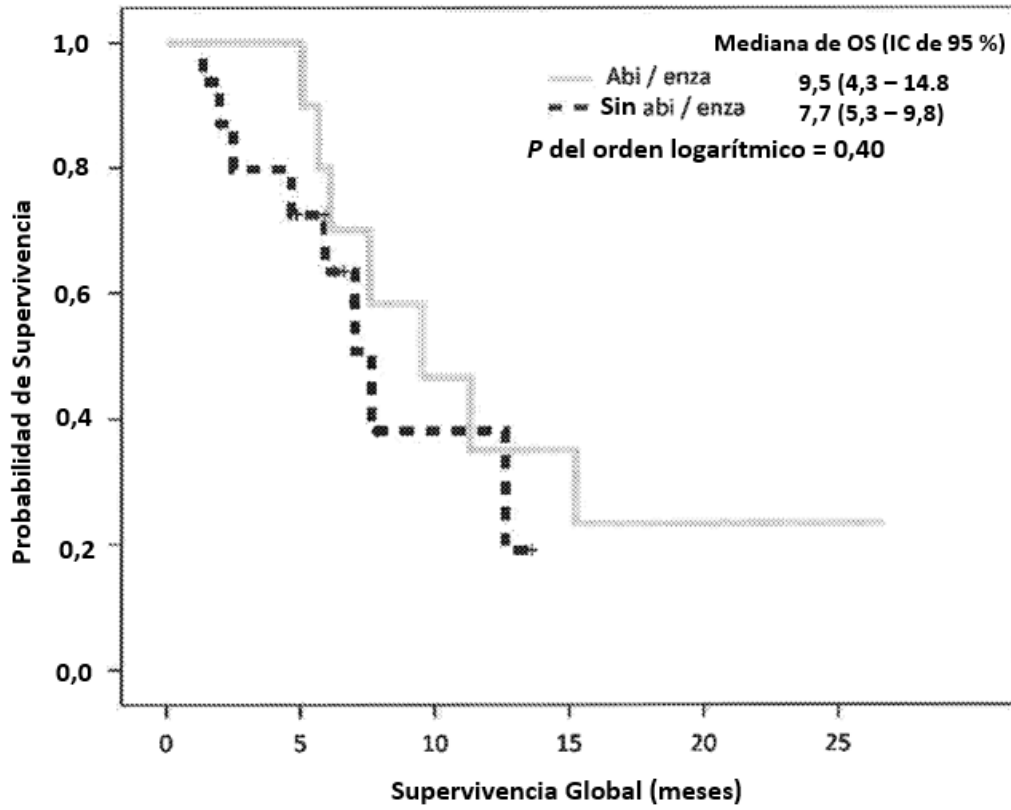


Números en Riesgo

Abiraterona	5	5	2	0	0	0
Sin abiraterona	18	15	5	3	1	1

Figura 6B

B. Abiraterona o enzalutamida después del cabazitaxel



Números en Riesgo		0	5	10	15	20	25
Abi / enza	11	10	4	3	1	1	
Sin abi / enza	16	9	2	0	0	0	

Figura 7

1 gacactgaat ttggaagggtg gaggatttttg tttttttctt ttaagatctg ggcactcttt
 61 gaatctacoc ttcaagtatt aagagacaga ctgtgagcct agcagggcag atcttgtcca
 121 ccgtgtgtct tottctgcac gagactttga ggctgtcaga gcgctttttg cgtggttgtc
 181 cccgcaagtt tocttctctg gagcttcccg caggtgggca gctagctgca ggcactaccg
 241 catcatcaca gcctgttgaa ctcttctgag caagagaagg ggaggcgggg taagggaggt
 301 aggtggaaga ttcaagcaag ctcaaggatg gaagtgcagt tagggctggg aagggctctac
 361 cctcgccgcg cgtccaagac ctaccgagga gctttccaga atctgttcca gagcgtgcgc
 421 gaagtgtcca agaaccggg cccagggcac ccagagggcg cgagcgcagc acctccggc
 481 gccagtttgc tgctgcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag
 541 cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc aagagactag cccagggcag
 601 cagcagcagc agcaggggtga ggatggttct ccccaagccc atcgtagagg cccacagggc
 661 tacctggctc tggatgagga acagcaacct tcacagccgc agtcggccct ggagtgcac
 721 cccgagagag gttgctgcc agagcctgga gcccgcgtgg cggccagcaa ggggctgccc
 781 cagcagctgc cagcacctcc ggacgaggat gactcagctg ccccatccac gttgtccctg
 841 ctgggccccca ctttcccggt ctttaagcagc tgctccgctg acctaaaga cctccctggc
 901 gaggccagca ccatgcaact ccttcagcaa cagcagcagc aagcagtatc cgaaggcagc
 961 agcagcggga gagcagggga ggctcgggg gctcccactt cctccaagga caattactta
 1021 gggggcaact cgaccatttc tgacaacgcc aaggagttgt gtaaggcagt gtcgggtgctc
 1081 atgggcctgg gtgtggaggc gttggagcat ctgagtcacg gggaaacagct tccgggggat
 1141 tgcattgacg ccccactttt gggagttcca cccgctgtgc gtcccactcc ttgtgccccca
 1201 ttggccgaat gcaaagggtc tctgttagac gacagcgcag gcaagagcac tgaagatact
 1261 gctgagttat cccctttcaa gggaggttac accaaagggc tagaaggcga gaggcctaggc
 1321 tgctctggca gcgctgcagc agggagctcc gggacacttg aactgcctc taccctgtct
 1381 ctctacaagt cccgagcact ggacgaggca gctgcgtacc agagtccgga ctactacaac
 1441 ttccactggg ctctggcccg accgcccgc cctccgccc ctcccactc ccacgctcgc
 1501 atcaagetgg agaaccgct ggactacggc agcgcctggg cggctgcggc ggcgcagtg
 1561 cgtatgggg acctggcgag cctgcatgac gggggtgcag cgggaccggg ttctgggtca
 1621 cctcagccg ccgcttctct actctggcac actctctca cagccgaaga agccagttg
 1681 tctgaccctg gtggtggtg tgggggtggt ggcggggggc gggcggggc cggcggggc
 1741 ggcggcggcg agggcgggagc tgtagccccc tacggctaca ctgggcccc tcaggggctg
 1801 gggggccagg aaagcgactt caccgcacct gatgtgtggt acctggcgg catggtgagc
 1861 agagtgcct atcccagtc cacttgtgtc aaaagcgaaa tgggcccctg gatggatagc
 1921 tactccggac cttacgggga catgcgttg gagactgcca gggaccatgt tttgccatt
 1981 gactattact ttccaccca gaagacctg ctgatctgt gagatgaagc ttctgggtgt
 2041 cactatggag ctctcacatg tggaaagtc aaggtctct tcaaaagagc ccgtcaggg
 2101 aaacagaagt acctgtgcgc cagcagaat gattgcacta ttgataaait ccgaaggaaa
 2161 aattgtccat cttgtcgtct tggaaaatg tatgaagcag ggatgactct gggagaaaaa
 2221 ttccgggttg gcaattgcaa gcactcaca atgaccagac cctgaagaaa ggctgacttg
 2281 cctcattcaa aatgaggct ctagaggct ctagtggata gctgagaa acctggcctc
 2341 tgaggcttaq gacctaggt tttgctct caacacaqac tttgacgttg ggggtggggg
 2401 ctactctctt gattgctgac tccctccagc gggaccaata gttttctct acctcacagg
 2461 gatgtgtga gacgggctg tagaagtaat agtggttacc actcatglag ttgtgagtat
 2521 catgattatt gtttctgta atgtggcttg gcattggcaa agtgcctttt gattgtctt
 2581 gatcacatat gatgggggac aggcactgac tcaggcggat gaagtgaagc tctggctcag
 2641 tgccttctt ttcgtggtg gctgccagga agaaacttg ctgatgggac tcaagggtc
 2701 accttgaca agaagcaact gtgtctgtct gaggttctg tggccatctt taktgtgta
 2761 ttaggcaatt cgtatttccc ccttaggtc tagcctctg gatcccagcc agtgacctag
 2821 acttagcct cagccctgt cactgactg aaggtagtac ctgatccaca gaagttcagt
 2881 aaacaaggac cagatttctg cttctccagg agaagaagcc agccaacccc tctcttcaa
 2941 cacactgaga gactacagtc cgactttccc tcttacctct agccttactg tagccacact
 3001 ccttgattgc tctctcacat cacatgctc tcttcatcag ttgtaagcct ctcatcttc
 3061 tcccagcca gactcaata ttgtattgat gtcaaaagaa aatcacttag agtttggat
 3121 atcttgtct ctctctgctc catagcttc atattgacac cagtttctt ctagtggaga
 3181 agtggagct glgaaqccag ggaacacac atgtgaggt cagaaggact ctccctgact

Figura 7 (continuación)

```
3241 tgocctggggc ctgtctttcc cacctttctcc agtctgtcta aacacacaca cacacacaca  
3301 cacacacaca cacacacaca cacacgtctct ctctctctct cccccccaa cacacacaca  
3361 ctctctctct cacacacaca cacatacaca cacacttctt totctttccc ctgactcagc  
3421 aacattctgg agaaaagcca aggaaggact tcaggagggg agtttccccc ttctcagggc  
3481 agaattttta tctccagacc aacaagaagt tccctaatgt ggattgaaag gctaatgagg  
3541 tttattttta actactttct atttgttga atgttgcata tttctactag tgaattttc  
3601 ccttaataaa gccattaata cacccaaaaa aaaaaaaaaa a
```