



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 372 236**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/50
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **08857392 .8**

(96) Fecha de presentación: **26.11.2008**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2220492**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2010**

(54) Título: **POLIMORFISMOS DE VEGF Y TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESIS.**

(30) Prioridad:
30.11.2007 US 991616 P
21.03.2008 US 38699 P

(73) Titular/es:
Genentech, Inc.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.01.2012

(72) Inventor/es:
Schneider, Bryan P.;
Radovich, Milan y
Sledge, George W.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.01.2012

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 372 236 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

Polimorfismos de vegf y terapia anti-angiogénesis

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere en general al tratamiento de enfermedades humanas y trastornos asociados con la terapia de anti-angiogénesis. Más específicamente, la invención se refiere a la terapia anti-angiogénesis de cáncer, ya sea sola o en combinación con otras terapias anti-cáncer.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer permanece como una de las amenazas más mortales para la salud humana, que afecta a más de un millón de nuevos pacientes cada año en los Estados Unidos. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de esas muertes. Aunque han existido avances significativos en el tratamiento médico de ciertos cánceres, los métodos actuales de tratamiento son relativamente no selectivos: la cirugía elimina el tejido enfermo; la radioterapia reduce los tumores sólidos; y la quimioterapia elimina las células que se dividen rápidamente. Estos tratamientos pueden dar como resultados numerosos efectos secundarios, en algunos casos, tan severos que limitan la dosis que puede administrarse y excluyen así el uso de fármacos potencialmente efectivos.

20 La angiogénesis es un evento celular importante en el cual las células endoteliales vasculares proliferan, se acortan y se reorganizan para formar nuevos vasos a partir de redes vasculares preexistentes. La angiogénesis es esencial para el crecimiento de la mayoría de los tumores primarios y su posterior metástasis. El factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), que también se denomina VEGF-A o factor de permeabilidad vascular (VPF), se ha descrito como un regulador esencial de la angiogénesis tanto normal como anormal. Ferrara y Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-15 25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543.

30 El anticuerpo anti-VEGF "Bevacizumab", también conocido como "BV", "rhuMab VEGF" o "Avastin®" es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta et al. (1997) *Cáncer Res.* 57:4593-4599, el cual se encuentra actualmente aprobado en los Estados Unidos para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico, cáncer pulmonar de células no pequeñas y cáncer de mama metastásico. Como otros tratamientos de cáncer, la terapia con Avastin® se asocia con ciertos efectos colaterales, incluyendo un mayor riesgo de hipertensión.

35 Los polimorfismos genéticos aparecen en una población cuando diferentes alelos en genes particulares dan como resultado diferentes fenotipos. Tales polimorfismos pueden jugar un papel al determinar la eficacia y seguridad de los fármacos terapéuticos. Por ejemplo, los polimorfismos específicos en VEGF han demostrado estar asociados con la incidencia de cáncer de mama. Schneider et al. (2008) *Breast Cancer Research and Treatment* 111:157-63.

40 Kim, J.K. (2003) *Korena Journal of Biological Sciences* 7(3) 261-264 investiga la distribución de frecuencia del polimorfismo C936T en la región 3' no traducida del gen de VEGF, que está asociado con los niveles de expresión de VEGF en plasma.

45 Zhu, X et al. (2007) *Current Hypertension Reviews* 3(2): 149-155 describe que la hipertensión ha surgido como uno de los efectos adversos más importantes de la terapia anti-VEGF. Los mecanismos que subyacen en la hipertensión asociada con anti-VEGF no se entienden. Se han propuesto varios potenciales mecanismos que incluyen la rarefacción vascular, disfunción endotelial, metabolismo alterado de óxido nítrico y neurohormonas aberrantes.

50 WO 2006/086544 y WO 2007/022101 también describen una conexión entre la administración de un antagonista del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) y la hipertensión.

La identificación de polimorfismos adicionales predictivos de la eficacia o seguridad de terapias particulares puede utilizarse para diseñar mejores terapias para aquellos pacientes que se beneficiarían mejor de ellas.

55 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en parte en la identificación de polimorfismos en VEGF que son predictivos de un mayor riesgo de hipertensión en pacientes que se someten a terapia anti-VEGF, incluyendo con Avastatin®.

60 En un aspecto, la invención proporciona un método para predecir si un paciente se encuentra con un mayor riesgo de hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF, que comprende cribar una muestra aislada del paciente para un polimorfismo genómico seleccionado a partir de VEGF (-1498C/T) y VEGF (-634G/C), en donde el paciente se encuentra con un mayor riesgo de hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF si el genotipo correspondiente comprende VEGF (-1498C) o VEGF (-634G). En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, bevacizumab.

En algunas realizaciones, el paciente se encuentra tratándose para el cáncer, por ejemplo, cáncer de mama. En algunas realizaciones, el paciente está siendo tratado con una composición anti-neoplásica.

- 5 También se describe un kit para predecir si un paciente se encuentra con un mayor riesgo de hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF que comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido específico para un polimorfismo en VEGF seleccionado del grupo que consiste de: VEGF (-1498C/T) y VEGF (-634G/C). En algunas realizaciones, los oligonucleótidos en el kit son útiles para la amplificación de la región de VEGF que comprende uno de estos polimorfismos.
- 10 También se describe un método para predecir si un paciente tiene una mayor probabilidad de beneficiarse del tratamiento con un antagonista de VEGF, que comprende cribar una muestra aislada del paciente para un polimorfismo genómico en VEGF (-2578C/A) o VEGF (-1154G/A), en donde el paciente tiene una mayor probabilidad de beneficiarse del tratamiento con un antagonista de VEGF si el genotipo correspondiente comprende VEGF (-2578AA) o VEGF (1154AA). En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, bevacizumab. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende además administrar una composición anti-neoplásica. En algunas realizaciones, el paciente se encuentra tratándose para el cáncer, por ejemplo, cáncer de mama.
- 15 También se describe un kit para predecir si un paciente tiene una mayor probabilidad de beneficiarse del tratamiento con un antagonista de VEGF que comprende un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido específico para un polimorfismo en VEGF seleccionado del grupo que consiste de: VEGF (-2578C/A) y VEGF (1154G/A). En algunas realizaciones, los oligonucleótidos en el kit son útiles para la amplificación de la región de VEGF que comprende uno de estos polimorfismos.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, las cuales se encuentran dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura, tales como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds., 1987 y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis et al., eds., 1994) .

35 A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente invención tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992), proveen al experto en la materia con una guía general para muchos de los términos utilizados en la 40 presente solicitud.

DEFINICIONES

Como se utiliza en la presente invención, las formas singulares "un" "una" y "el/la" incluyen el plural a menos que el 45 contexto lo indique claramente de otro modo. Por ejemplo "una" célula también incluirá "células".

El término "comprende" pretende significar que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, pero no excluye otros.

50 Los términos "VEGF" y "VEGF-A" se utilizan indistintamente para referirse al factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos y los factores de crecimiento celular endotelial vascular relacionados de 121, 189 y 206 aminoácidos, como se describe por Leung et al., Science, 246:1306 (1989) y Houck et al., Mol. Endocrin., - 5:1806 (1991), junto con formas alélicas naturales y procesadas de las mismas. El término "VEGF" también se utiliza para referirse a formas truncadas del polipéptido que comprende los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de tales formas de VEGF puede identificarse en la presente solicitud, por ejemplo, mediante "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" o "VEGF₁₆₅". Las posiciones de aminoácidos para un VEGF nativo "truncado" se numeran como se indica en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición 17 de aminoácido (metionina) en el VEGF nativo truncado es también la posición 17 (metionina) en el VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene una afinidad de unión para los receptores KDR y Flt-1 comparables con el VEGF nativo.

65 Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. Preferentemente, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede utilizarse como un agente terapéutico para dirigirse e interferir con enfermedades o condiciones en donde se la actividad de VEGF está implicada. Un anticuerpo anti-VEGF habitualmente no se unirá a otros homólogos de VEGF, tales como VEGF-B o VEGF-C, u otros factores de crecimiento, tales como P1GF, PDGF o bFGF. Un anticuerpo anti-VEGF preferido es un anticuerpo monoclonal que

se une al mismo epítopo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A 4.6.1 producido mediante el hibridoma ATCC HB 10709. Más preferentemente, el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta et al. (1997) Cáncer Res 57:4593-4599, incluyendo, pero sin limitarse, al anticuerpo conocido como bevacizumab (BV; Avastin®).

5 Un "antagonista de VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF incluyendo sus uniones con uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen los anticuerpos VEGF y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, las moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a VEGF evitando así su unión a uno o más receptores, 10 anticuerpos anti-receptor de VEGF y antagonistas del receptor VEGF, tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina quinasas de VEGFR.

15 El término "anticuerpo" se utiliza en el más amplio sentido e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada.

20 El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se presentan de manera natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un antígeno único. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse 25 que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden fabricarse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o puede fabricarse mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la Patente de Estado Unidos No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden también aislarse de 30 bibliotecas de anticuerpos de fago utilizando las técnicas descritas por ejemplo en Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991) o Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991) .

35 Un "trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo las condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en la presente invención incluyen tumores benignos y malignos; leucemias y tumores linfoideos; trastornos neuronales, neurogliales, astrocitales, hipotalámicos y otros glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocoélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

40 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un fármaco efectiva para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, disminuir hasta cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos; inhibir (es decir, disminuir hasta cierto grado y preferentemente detener) la metástasis de tumor; inhibir, hasta cierto grado, el crecimiento del tumor; y/o aliviar hasta cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Siempre 45 que el fármaco pueda evitar el crecimiento y/o eliminación de las células cancerígenas existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia de cáncer, la eficacia *in vivo* puede por ejemplo, medirse evaluando la supervivencia global (OS), supervivencia de libre progresión (PFS), tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

50 "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como al profiláctico o medidas preventivas. Las personas con necesidad de tratamiento incluyen las que ya tienen el trastorno, así como aquellas en que debe evitarse el trastorno.

55 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracterizan habitualmente por el crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, y el carcinoma escamoso de pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de célula B (incluyendo linfoma no de Hodgkin de grado bajo/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblastico de alto grado; NHL de célula pequeña no dividida de alto grado; NHL de enfermedad con gran masa tumoral; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA;

y Macroglobulinemia de Waldenstrom; leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfobástica aguda (ALL); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo post-transplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales) y síndrome de Meigs.

- 5 El término "composición anti-neoplásica" se refiere a una composición útil para tratar el cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo capaz de inhibir o prevenir el crecimiento o funcionamiento tumoral y/o causar la destrucción de células tumorales. Los agentes terapéuticos adecuados en una composición anti-neoplásica para tratar el cáncer incluyen, pero no se limitan a, agentes quimioterapéuticos, isótopos radioactivos, toxinas, citoquinas, tales como interferones y citoquinas que reconocen los agentes antagónicos, receptores de citoquinas o antígenos asociados con células tumorales. Preferentemente, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer.

- 10 15 Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico del polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente en la forma o disposición en que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico ya que ésta existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el polipéptido, donde por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales.

- 20 25 30 El término "polimorfismo" se refiere a una ubicación en la secuencia de un gen que varía dentro de una población. Un polimorfismo se encuentra comprendido de diferentes "alelos". La ubicación de dicho polimorfismo se identifica por su posición en el gen y las diferentes bases que se encuentran allí. Por ejemplo, VEGF -1498C/T indica que existe variación entre C y T en la posición -1498 en el gen de VEGF. Las dos posibles variantes C y T son dos alelos diferentes. Debido a que el genotipo se encuentra comprendido de dos alelos separados, cualquiera de las diversas posibles variantes puede observarse en cualquiera de las individuales (por ejemplo, para este ejemplo CC, CT o TT).

- 35 40 El término "genotipo" se refiere a los alelos específicos de un cierto gen en una muestra celular o de tejido. En el ejemplo anterior CC, CT o TT son genotipos posibles en el polimorfismo de VEGF -1498C/T.

- 45 50 El término "muestra" incluye una muestra de célula o tejido tomada de un paciente. Por ejemplo, una muestra puede incluir una muestra de tumor, una muestra de tejido normal que corresponde al tipo de tumor, una muestra de tejido tomada del área que rodea el tumor o las células sanguíneas.

- 55 60 La identificación del genotipo particular en una muestra puede llevarse a cabo por cualquiera de un número de métodos muy conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, la identificación del polimorfismo puede efectuarse mediante la clonación del alelo y su secuenciación utilizando técnicas muy conocidas en el sector. Alternativamente, las secuencias genéticas pueden amplificarse a partir del ADN genómico, por ejemplo, utilizando PCR, y secuenciar el producto. Se describen a continuación diversos métodos no limitantes para analizar un ADN del paciente para mutaciones en un locus genético determinado.

- 65 70 75 80 85 90 Puede utilizarse la tecnología de microensayos de ADN, por ejemplo, dispositivos de chip de ADN y microensayos de alta densidad para aplicaciones de cribado de alto rendimiento y microensayos de menor densidad. Los métodos para la fabricación de microensayos se conocen en la técnica e incluyen diversas tecnologías y procesos de deposición o de marcación por inyección de tinta y microinyección, procesos de síntesis de oligonucleótidos *in situ* o fotolitográficos en chip y procesos electrónicos dirigidos por sonda de ADN. Las aplicaciones de hibridación de microensayos de ADN se han aplicado exitosamente en las áreas del análisis de la expresión genética y genotipo para las mutaciones puntuales, polimorfismos de nucleótido único (SNPs) y repeticiones cortas en serie (STRs). Los métodos adicionales incluyen microensayos de ARN de interferencia y combinaciones de microensayos y otros métodos, tales como microdissección de captura con láser (LCM), hibridación genómica comparativa (CGH) e inmunoprecipitación de cromatina (ChiP). Ver, por ejemplo, He et al. (2007) *Adv. Exp. Biol.* 593:117-133 y Heller (2002) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4 : 129-153. Otros métodos incluyen PCR, xMAP, ensayo invasor, espectrometría de masa, y pirosecuenciación (Wang et al. (2007) 593:105-106).

- Otro método de detección es la hibridación específica de alelo utilizando sondas que solapan el sitio polimórfico y tienen aproximadamente 5, o alternativamente 10, o alternativamente 20, o alternativamente 25, o alternativamente 30 nucleótidos alrededor de la región polimórfica. Por ejemplo, varias sondas capaces de hibridarse específicamente a la variante alélica se unen a un soporte de fase sólida, por ejemplo, un "chip". Los oligonucleótidos pueden unirse a un soporte sólido mediante una variedad de procesos, incluyendo litografía. El análisis de detección por mutación utilizando estos chips comprende oligonucleótidos, también llamados "ensayos de sonda de ADN" descritos en por ejemplo, en Cronin et al. (1996) *Human Mutation (Mutación Humana)* 7:244.

- 95 En otros métodos de detección, es necesario amplificar primero al menos una parte del gen antes de identificar la

variante alélica. La amplificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante PCR y/o LCR u otros métodos muy conocidos en la técnica.

En algunos casos la presencia del alelo específico en ADN proveniente de un sujeto puede demostrarse mediante el análisis de enzima de restricción. Por ejemplo, el polimorfismo de nucleótido específico puede dar como resultado una secuencia de nucleótidos que comprende un sitio de restricción que se encuentra ausente de la secuencia de nucleótidos de otra variante alélica.

En una realización adicional, puede utilizarse la protección de agentes de división (tales como nucleasa, hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina) para detectar bases mal acopladas en heteroduplos de ARN/ARN ADN/ADN o ARN/ADN (ver, por ejemplo, Myers et al. (1985) *Science* 230: 1242). En general, la técnica de "división por desacoplamiento" se inicia al proporcionar heteroduplos formados al hibridar un ácido nucleico de control, que está opcionalmente marcado, por ejemplo, ARN o ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos de la variante alélica del gen con un ácido nucleico muestra, por ejemplo, ARN o ADN, obtenido de una muestra de tejido. Los duplos bicatenarios se tratan con un agente que divide las regiones monocatenarias del duplo tal como los duplos formados en base a desacoplamientos de pares de bases entre las cadenas de control y de muestra. Por ejemplo, los duplos de ARN/ADN pueden tratarse con híbridos de RNasa y los híbridos de ADN/ADN con nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones desacopladas. Alternativamente, cualquiera de los duplos de ADN/ADN o ARN/ADN puede tratarse con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina a fin de digerir las regiones desacopladas. Después de la digestión de las regiones desapareadas, el material resultante se separa a continuación por tamaño sobre geles de poliacrilamida de desnaturización para determinar si los ácidos nucleicos de control y de muestra tienen una secuencia de nucleótidos idéntica o en la cual los nucleótidos son diferentes. Ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 6,445,249, Cotton et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397; Saleeba et al. (1992) *Meth. Enzymol.* 217:286-295.

Las alteraciones en la movilidad electroforética también pueden utilizarse para identificar la variante alélica particular. Por ejemplo, puede utilizarse el polimorfismo de conformación de monocadena (SSCP) para detectar las diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutante y tipo salvaje (Orita et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766; Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144 y Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9 : 73 - 79) . Los fragmentos de ADN monocatenarios de los ácidos nucleicos de muestra y de control se desnaturizan y se dejan renaturalizar. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos monocatenarios varía de acuerdo con la secuencia, la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un solo cambio de base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede mejorarse al utilizar ARN (en lugar de ADN), en el cual la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En otra realización preferida, el método en cuestión utiliza el análisis de heteroduplo para separar moléculas de heteroduplos bicatenarios sobre la base de cambios en la movilidad electroforética (Keen et al. (1991) *Trends Genet.* 7:5) .

La identidad de la variante alélica también puede obtenerse al analizar el movimiento de un ácido nucleico que comprende la región polimórfica en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturización, el cual se analiza utilizando electroforesis de gel de gradiente de desnaturización (DGGE) (Myers et al. (1985) *Nature* 313:495). Cuando se utiliza DGGE como el método de análisis, el ADN se modificará para asegurar que no se desnaturice completamente, por ejemplo al agregar una abrazadera GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alta fusión mediante PCR. En una realización adicional, se utiliza un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente de agente de desnaturización para identificar las diferencias en la movilidad del ADN de control y de muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265:1275).

Ejemplos de técnicas para detectar las diferencias de al menos un nucleótido entre 2 ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva o extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, pueden prepararse sondas de oligonucleótidos en las cuales el nucleótido polimórfico conocido se coloca centralmente (sondas específicas de alelos) y, a continuación, se hibrida al ADN diana bajo condiciones que permiten la hibridación sólo si se encuentra un acoplamiento perfecto (Saiki et al. (1986) *Nature* 324:163); Saiki et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230). Dichas técnicas de hibridación de oligonucleótidos específicas de alelo pueden utilizarse para la detección de los cambios de nucleótido en la región polimórfica del gen. Por ejemplo, los oligonucleótidos que tienen la secuencia de nucleótidos de la variante alélica específica se unen a una membrana de hibridación y esta membrana se hibrida entonces con el ácido nucleico de muestra marcado. El análisis de la señal de hibridación revelará a continuación la identidad de los nucleótidos del ácido nucleico de muestra.

Alternativamente, la tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación de PCR selectiva puede utilizarse junto con la presente invención. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la variante alélica de interés en el centro de la molécula (de manera que la amplificación dependa de la hibridación diferencial) (Gibbs et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2437-2448) o en el extremo terminal 3' de un cebador donde, bajo condiciones apropiadas, se puede evitar el desacoplamiento, o reducir la extensión de la polimerasa (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238 y Newton et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17 : 2503) . Esta técnica también se llama "SONDA" por Probe Oligo Base. Extension. Además, puede ser deseable introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para crear la detección en base a la división

(Gasparini et al. (1992) Mol. Cell. Probes 6:1) .

- En otra realización, la identificación de la variante alélica se lleva a cabo utilizando un ensayo de unión de oligonucleótidos (OLA), como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estado Unidos No. 4,998,617 y en Laridegren, U. et al. Science 241: 1077-1080 (1988). El protocolo OLA utiliza dos oligonucleótidos que se diseñan para ser capaces de hibridarse a secuencias de contacto de una sola cadena de una diana. Uno de los oligonucleótidos se une a un marcador de separación, por ejemplo, biotinilado y el otro está marcado de manera detectable. Si la secuencia complementaria exacta se encuentra en una molécula diana, los oligonucleótidos se hibridarán de tal manera que sus extremos terminales contactan y crean un sustrato de unión. La unión permite entonces que el oligonucleótido marcado se recupere utilizando avidina, u otro ligando de biotina. Nickerson, D. A. et al., ha descrito un ensayo de detección de ácido nucleico que combina las características de PCR y OLA (Nickerson, D. A. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8923-8927). En este método, se utiliza PCR para lograr la amplificación exponencial del ADN diana que se detecta a continuación utilizando OLA.
- La presente invención proporciona métodos para detectar un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en VEGF. Debido a que los polimorfismos de nucleótido único están flanqueados por regiones de secuencia invariante, su análisis requiere no más que la determinación de la identidad del nucleótido de variante único y es innecesario determinar una secuencia génica completa para cada paciente. Se han desarrollado diversos métodos para facilitar el análisis de los SNPs.
- El polimorfismo de base única puede detectarse utilizando un nucleótido especializado resistente a la exonucleasa, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estado Unidos No. 4,656,127. De acuerdo con el método, se permite que un cebador complementario a la secuencia alélica inmediatamente a 3' con respecto al sitio polimórfico se hibride a una molécula diana obtenida de un animal o humano particular. Si el sitio polimórfico en la molécula diana contiene un nucleótido que es complementario al presente derivado particular de nucleótido resistente a la exonucleasa, entonces ese derivado se incorporará en el extremo del cebador hibridado. Dicha incorporación hace que el cebador sea resistente a la exonucleasa y permite de este modo su detección. Dado que se conoce la identidad del derivado de la muestra resistente a la exonucleasa, el descubrimiento de que el cebador se ha vuelto resistente a las exonucleasas revela que el nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana era complementario al del derivado de nucleótido utilizado en la reacción. Este método tiene la ventaja de que no requiere la determinación de grandes cantidades de datos de secuencia ajenas.
- Puede también utilizarse un método basado en solución para determinar la identidad del nucleótido del sitio polimórfico (WO 91/02087). Al igual que antes, se emplea un cebador que es complementario a las secuencias alélicas inmediatamente a 3' con respecto al sitio polimórfico. El método determina la identidad del nucleótido de ese sitio utilizando derivados de didesoxinucleótido marcados, los cuales, si son complementarios al nucleótido del sitio polimórfico, se incorporarán en el extremo terminal del cebador.
- En WO 92/15712 se describe un método alternativo. Este método utiliza mezclas de terminadores marcados y un cebador que es complementario a la secuencia 3' con respecto a un sitio polimórfico. El terminador marcado que se incorpora se determina así mediante, y complementariamente al, nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana a evaluarse. El método es normalmente un ensayo de fase heterogénea, en el cual el cebador o la molécula diana se inmovilizan a una fase sólida.
- Se han descrito muchos otros procedimientos de incorporación de nucleótido guiados por el cebador para analizar sitios polimórficos en ADN (Komher, J. S. et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17:7779-7784; Sokolov, B. P. (1990) Nucl. Acids Res. 18:3671; Syvanen, A-C., et al. (1990) Genomics 8:684-692; Kuppuswamy, M. N. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1143-1147; Prezant, T. R. et al. (1992) Hum. Mutat. 1:159-164; Uguzzoli, L. et al. (1992) GATA 9: 107-112; Nyren, P. et al. (1993) Anal. Biochem. 208:171-175). Estos métodos todos dependen de la incorporación de desoxinucleótidos marcados para diferenciar entre las bases en un sitio polimórfico.
- Además, se entenderá que cualquiera de los métodos anteriores para detectar alteraciones en un gen o producto génico o variantes polimórficas puede utilizarse para monitorizar la evolución del tratamiento o terapia.
- Los métodos descritos en la presente invención pueden llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico preenvasados, tales como los descritos a continuación, que comprenden al menos una sonda o ácido nucleico cebador, que puede utilizarse de manera conveniente, por ejemplo, para determinar si un sujeto se encuentra con riesgo de desarrollar hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF.
- El ácido nucleico muestra para utilizarse en los métodos de diagnóstico y pronóstico descritos anteriormente, puede obtenerse de cualquier tipo de célula o tejido de un sujeto. Por ejemplo, un fluido corporal del sujeto (por ejemplo, sangre) puede obtenerse mediante técnicas conocidas. De manera alternativa, las pruebas de ácido nucleico pueden llevarse a cabo sobre muestras secas (por ejemplo, cabello o piel).
- La invención descrita en el presente documento se refiere a métodos y composiciones para determinar e identificar el alelo presente en el locus de VEGF. Esta información es útil para predecir el nivel de riesgo de desarrollar

hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF. Pueden utilizarse sondas para determinar directamente el genotipo de la muestra o pueden utilizarse simultánea o posteriormente a la amplificación. El término "sondas" incluye ácidos nucleicos mono o bicatenarios que se presentan de manera natural o recombinante o ácidos nucleicos sintetizados químicamente. Pueden marcarse mediante traducción "nick", reacción de relleno de Klenow, PCR u otros métodos conocidos en la técnica. Las sondas, su preparación y/o marcaje se describen en Sambrook et al. (1989) supra. Una sonda puede ser un polinucleótido de cualquier longitud adecuada para la hibridación selectiva a un ácido nucleico que contiene una región polimórfica de la presente invención. La longitud de la sonda utilizada dependerá, en parte, de la naturaleza del ensayo utilizado y las condiciones de hibridación empleadas.

- 5 Las sondas marcadas también pueden utilizarse junto con la amplificación de un polimorfismo. (Holland et al. (191) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7276-7280). La Patente de Estados Unidos No. 5,210,015 describe estrategias basadas en fluorescencia para proporcionar mediciones a tiempo real de los productos de amplificación durante PCR. Dichas estrategias han empleado colorantes de intercalación (tal como bromuro de etidio) para indicar la cantidad de ADN bicatenario presente o han empleado sondas que contienen pares inhibidores de fluorescencia (también referidos como estrategia "Taq-Man"), donde la sonda se divide durante la amplificación para liberar una molécula fluorescente cuya concentración es proporcional a la cantidad de ADN bicatenario presente. Durante la amplificación, la sonda se digiere por la actividad de nucleasa de una polimerasa cuando se hibrida a la secuencia diana para provocar que la molécula fluorescente se separe de la molécula inhibidora, haciendo así que aparezca la fluorescencia proveniente de la molécula informadora. La estrategia Taq-Man utiliza una sonda que contiene un par de molécula informadora-molécula inhibidora que se híbrida específicamente a una región de un polinucleótido diana que contiene el polimorfismo.

10 Las sondas pueden fijarse a superficies para utilizarse como "chips genéticos". Dichos chips genéticos pueden utilizarse para detectar variaciones genéticas mediante un número de técnicas conocidas por un experto en la materia. En una técnica, los oligonucleótidos se disponen sobre un chip genético para determinar la secuencia de ADN mediante secuenciación por el procedimiento de hibridación, tal como el resumido en las Patentes de Estados Unidos Nos. 6,025,136 y 6,018,041. Las sondas también pueden utilizarse para la detección fluorescente de una secuencia genética. Dichas técnicas también se han descrito, por ejemplo, en las Patentes de Estado Unidos Nos. 5,968,740 y 5,858,659. Una sonda también puede fijarse a una superficie de electrodo para la detección electroquímica de las secuencias de ácido nucleico tal como se describe en la Patente de Estado Unidos No. 5,952,172 y por Kelley, S.O. et al. (1999) *Nucl. Acids Res.* 27:4830-4837.

15 Adicionalmente, los ácidos nucleicos aislados utilizados como sondas o cebadores pueden modificarse para hacerse más estables. Las moléculas de ácido nucleico de ejemplo que se modifican incluyen análogos de fosforamidato, fosfotioato y metilfosfonato de ADN (ver también las Patentes de Estado Unidos Nos. 5,176,996; 5,264,564 y 5,256,775).

20 Como se establece en el presente documento, la presente invención también proporciona métodos de diagnóstico para determinar el tipo de variante alélica de una región polimórfica presente en VEGF. En algunas realizaciones, los métodos utilizan sondas o cebadores que comprenden secuencias de nucleótidos que son complementarias a la región polimórfica de VEGF. Por consiguiente, también se describen kits para llevar a cabo estos métodos.

25 En algunas realizaciones, se describen kits para determinar si un sujeto se encuentra con riesgo de desarrollar hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF. En algunas realizaciones, los kits son para determinar si un sujeto tiene una probabilidad mayor de beneficiarse de una terapia anti-VEGF. Dichos kits contienen una o más de las composiciones descritas anteriormente y las instrucciones de uso. Sólo como un ejemplo, los kits son para determinar si un paciente se encuentra con riesgo de desarrollar hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF que contiene un primer y un segundo oligonucleótido específicos para una región polimórfica de VEGF, por ejemplo, VEGF (-2578C/A), VEGF (-1498C/T), VEGF (-1154G/A) o VEGF (-634G/C). Como otro ejemplo, los kits son para determinar si un sujeto tiene una probabilidad mayor de beneficiarse de una terapia anti-VEGF que contiene un primer y un segundo oligonucleótido específicos para una región polimórfica de VEGF, por ejemplo, VEGF (-2578C/A) o VEGF (-1154G/A). Los oligonucleótidos "específicos para" un locus genético se unen a la región polimórfica del locus o se unen adyacentes a la región polimórfica del locus. Para los oligonucleótidos que se utilizan como cebadores para amplificación, los cebadores se encuentran adyacentes si están suficientemente cercanos para utilizarse para producir un polinucleótido que comprende la región polimórfica. En una realización, los oligonucleótidos se encuentran adyacentes si se unen dentro de aproximadamente 1-2 kb, por ejemplo, menos de 1 kb desde el polimorfismo. Los oligonucleótidos específicos son capaces de hibridarse a una secuencia, y bajo condiciones adecuadas no se unirán a una secuencia que difiere por un solo nucleótido.

30 El kit puede comprender al menos una sonda o cebador que es capaz de hibridarse específicamente a la región polimórfica del VEGF e instrucciones para su uso. Los kits comprenden normalmente al menos uno de los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Los kits para amplificar al menos una parte de VEGF comprenden generalmente dos cebadores, al menos uno de los cuales es capaz de hibridarse a la secuencia de variante alélica. Dichos kits son adecuados para la detección del genotipo mediante por ejemplo, detección de fluorescencia, mediante detección electroquímica o mediante otra detección.

Los oligonucleótidos, tanto si se utilizan como sondas o cebadores, contenidos en un kit pueden marcarse de forma detectable. Las marcadores pueden detectarse ya sea directamente, por ejemplo, para marcadores fluorescentes, o indirectamente. La detección indirecta puede incluir cualquier método de detección conocido por un experto en la materia, incluyendo interacciones de biotina-avidina, unión de anticuerpo y similar. Los oligonucleótidos marcados

5 fluorescentemente también pueden contener una molécula inhibidora. Los oligonucleótidos pueden unirse a una superficie. En algunas realizaciones, la superficie es sílice o vidrio. En algunas realizaciones, la superficie es un electrodo metálico.

10 Aún otros kits comprenden al menos un reactivo necesario para llevar a cabo el ensayo. Por ejemplo, el kit puede comprender una enzima. De manera alternativa, el kit puede comprender un amortiguador o cualquier otro reactivo necesario.

15 Los kits pueden incluir todos o algunos de los controles positivos, controles negativos, reactivos, cebadores, marcadores de secuenciación, sondas y anticuerpos descritos en el presente documento para determinar el genotipo del sujeto en la región polimórfica del VEGF.

El siguiente ejemplo pretende únicamente ilustrar la práctica de la presente invención y no se proporciona a modo de limitación.

20 EJEMPLO

Ejemplo 1. Polimorfismos genéticos en VEGF y su asociación con el resultado

25 E2100 era una prueba Intergrupal Fase III que demostró una mejora en la supervivencia sin progresión (PFS) y la tasa de respuesta (RR) al agregar bevacizumab a paclitaxel para mujeres con cáncer de mama metastásico no tratado previamente. Existió significativamente más hipertensión y se observó proteinuria en las mujeres que recibieron bevacizumab.

Muestras

30 Se llevó a cabo una prueba retrospectiva de datos a partir de la prueba E2 100 de Avastin para cáncer de mama. Los grupos de datos incluían 673 pacientes elegibles con 623 casos de progresión de la enfermedad y 483 muertes. De estos, se estableció el genotipo de bloques tumorales introducidos en parafina de 363 casos elegibles (un seguimiento promedio de 43 meses). Además, 377 casos elegibles estuvieron disponibles para VEGF IHC y 341 estuvieron disponibles para VEGFR-2 IHC. Todas las muestras se analizaron "a ciegas" sin la identificación del paciente o información clínica resultante.

Polimorfismos

40 Los polimorfismos se analizaron tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) analizados

Gen	Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP)	Ubicación	Caucásico: Frecuencia de alelo ¹ raro	Afromericano: Frecuencia de alelo ¹ raro
VEGF	-2578 C/A	Promotor	A= 49%	A=24 %
	-1498 C/T	Promotor	C= 49%	C=33%
	-1154 G/A	Promotor	A= 33%	A=10%
	-634 G/C	5' UTR	C= 32%	C=35%
	936 C/T	3' UTR	T= 15%	T=13%
VEGFR-2	889 G/A (V2971)	Exón 7	A= 9 %	A=20%
	1416 A/T (44728)	Exón 11	T= 25 %	T=10%

45 Estos polimorfismos se seleccionaron debido a que estos genes son conocidos por modular la angiogénesis: 1) están implicados en el mecanismo de la angiogénesis; 2) tenían un polimorfismo genético establecido; 3) la frecuencia del polimorfismo era lo suficientemente alta que su impacto sobre la respuesta del fármaco a un nivel de población sería significativo; y/o 4) el polimorfismo podía alterar la función del gen de una manera biológicamente relevante.

50 Establecimiento del Genotipo de SNPs

Se extrajo el ADN de secciones de tejido de 20 micrómetros embebidos en parafina, utilizando el kit DneasyB Tissue

(Qiagen, Valencia, CA). Se estableció el genotipo de los SNPs con PCR a tiempo real basado en Taqman®. Los detalles para cada SNP se han descrito previamente en Schneider, et al. (2007) "Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer" Breast Cancer Res. Treat. En general, los genotipos se determinaron de manera satisfactoria en el 88,2% de los casos. Esto varió en base al SNP analizado y varió desde 82% hasta 92% de tasa de éxito. Para todos los SNPs combinados, 50% se valoraron de manera exacta del grupo de control y 50% del grupo de la combinación.

Valoración de la Expresión de la Proteína

- 10 La expresión de la proteína para VEGF y VEGFR-2 se valoró mediante IHC a partir del bloque tumoral proporcionado. Para la valoración de VEGF, se desparafinaron los portaobjetos, se rehidrataron y se colocaron en una vaporera para legumbres con tampón de citrato a un pH de 6,0 durante 30 minutos. Después de enfriar los portaobjetos hasta temperatura ambiente, se lavaron en dos cambios de agua destilada seguido por dos cambios de solución salina tamponada con fosfato (PBST) con Tween™ 20 al 0,05% (Fisher Scientific, Pittsburg FA). Los portaobjetos se colocaron a continuación en un Dako Autostainer (Dako Cytomation, Carpenteria CA). Los portaobjetos se incubaron con una solución de bloqueo de peroxidasa (Dako, S2001) durante 10 minutos seguido por tres cambios de PBST durante un mínimo de 10 minutos en total. Los portaobjetos se incubaron a continuación secuencialmente con el anticuerpo anti-VEGF (VG1, Lab Vision, Fremont CA) diluido 1:100 durante 60 minutos, Dako Envision + (Dako, K4001) durante 60 minutos y DAB Substrate-Chromogen System (Dako, K3466), con tres cambios de PBST entre cada etapa. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina de Harris (Fisher), se deshidrataron, se purificaron y se le colocó un cubreobjetos. Se calculó una valoración de VEGF-inv estimando el porcentaje de células tumorales invasivas con tinción de VEGF citoplásmico del portaobjetos completo.
- 15 Para IHC de VEGFR-2, las secciones de tumor de mama embebidas en parafina fijadas con formalina, en primer lugar se desparafinaron y se rehidrataron. A continuación, se efectuó la recuperación de antígeno a 98°C durante 20 minutos en ("Target Retrieval Solution") Solución de Recuperación de Objetivo de pH 9,0 (S2367, Dako, Carpenteria, CA). A continuación se aplicó el Dual Endogenous Enzyme Bloc ("Bloque de Enzimas Endógenas Diales" (K4065, EnVisionTM+Dual Link System-HRP, Dako) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se administró el anticuerpo monoclonal de conejo anti-VEGFR-2 clon 55B11 (#2479, Cell Signaling Tech., Danvers, MA) a 1:20 durante 2 horas
- 20 a temperatura ambiente. Se realizó el desarrollo de la señal con DAB mediante el protocolo para el kit EnVision+ con modificaciones mínimas. Se completó el contrateñido con Hematoxilina QS (H-3404, Vector, Burlingame, CA) seguido por la deshidratación y la colocación del cubreobjetos. Las secciones de placenta o hígado humanos se utilizaron como controles positivos. La omisión del anticuerpo primario y la sustitución con IgG de conejo (X0936, Dako) sirvieron como controles negativos. Se realizó la valoración con el método de valoración H, calculado
- 25 mediante: $\Sigma(u\alpha)$, donde u era la intensidad de tinción (0-3+), y α era el porcentaje (0-100) de células tumorales teñidas con cada intensidad (ref).

Estadísticas

- 40 Se estimaron las distribuciones de casos con el tiempo utilizando el análisis Kaplan-Meier. Se evaluó la asociación del genotipo con el resultado tiempo - caso (PFS & OS) utilizando el método de riesgos proporcionales de Cox. Un nivel significativo = 0,017 correspondía a una tasa general de error tipo 1 de 0,05 para cada polimorfismo, en base a la corrección Bonferroni para comparaciones múltiples. Dado un 1,7% de tasa de falsos positivos para cada comparación, la probabilidad de que al menos tuviera lugar un falso positivo entre las 21 comparaciones fue de aproximadamente 0,3, asumiendo que todas las comparaciones fueron independientes. Se evaluaron la asociación del genotipo con RR (definido como la respuesta completa/respuesta parcial frente a enfermedad estable/enfermedad progresiva) y la toxicidad (hipertensión de grado 3/4) utilizando el test exacto de Fisher con un nivel significativo de p=0,05. La asociación del genotipo con la expresión se estudió utilizando el test de Kruskal-Wallis. Para RR y la toxicidad, dado un 5% de tasa de falsos positivos para cada comparación, la probabilidad de que tuviera lugar al menos un positivo falso entre las 7 comparaciones fue de aproximadamente 0,3, asumiendo que todas las comparaciones fueron independientes. Las asociaciones de la expresión con el resultado tiempo - caso (PFS & OS) y RR se evaluaron utilizando el método de riesgos proporcionales de Cox y el test de Wilcoxon para suma de rangos respectivamente. Todos los valores p fueron por dos colas.

Relación del Genotipo con la Eficacia

- 55 Todo los genotipos candidatos (Tabla 1) se compararon con la eficacia tanto en el grupo de control (solo paclitaxel) como el grupo de combinación (paclitaxel y bevacizumab) tal como se valoraron en E2100. Los parámetros de eficacia incluyeron PFS (punto final primario de E2100), OS y RR. El genotipo VEGF-2578 AA y los genotipos VEGF-1154 AA predijeron un OS favorable (Tabla 2) para pacientes en el grupo de combinación.

Tabla 2. Relación del genotipo VEGF sobre la supervivencia global (OS)

SNP	Comparación del genotipo (OS promedio en meses y frecuencia)	Tasa de riesgo	Intervalo de Confianza	Valor p
VEGF-2578	CA (24,4; 42,6%) vs AA (37,0; 20,8%)	1,78	(98,3% = 0,96,3,32)	0,026
	CC (22,2; 37,6%) vs AA (37,0; 21%)	1,70	(98,3% = 0,91,3,17)	0,043
	CC (22,2; 37,6%) vs CA (24,4; 42,6%)	0,99	(98,3% = 0,62,1,58)	0,95
AA vs CA+CC		0,58	(95% = 0,36,0,93)	0,023
VEGF-1154	GG (22,3; 56,9%) vs GA (29,8; 38,8%)	1,60	(98,3% = 0,98,2,60)	0,022
	GG (22,3; 56,95%) vs AA (46,5; 9,4%)	2,69	(98,3% = 1,10,6,59)	0,008
	GA (29,8; 38,8%) vs AA (46,5; 9,4%)	1,68	(98,3% = 0,66,4,30)	0,19
AA vs GA vs GG		0,62	(95% = 0,46,0,83)	0,001

- 5 Estos genotipos no predijeron una OS mejorada para pacientes en el grupo de control y no predijeron una PFS o RR superior para ningún grupo. Debido a la mejora significativa para aquellos con el genotipo VEGF-2578 AA, se analizó AA en comparación con los genotipos combinados CA y CC para OS y esta comparación demostró una proporción de riesgo de 0,58 (95% C.I.: 0,36, 0,93; p=0,023) a favor del genotipo AA. La comparación de PFS correspondiente reveló una proporción de riesgo de 0,91 (95% C.I. 0,62, 1,35; p=0,65) a favor del genotipo VEGF-2578 AA. Debido a un efecto de gen-dosis claro en el SNP de VEGF-1154, se evaluó un efecto de gen-dosis y éste demostró una proporción de riesgo de 0,62 (95% C.I.: 0,46; 0,83; p=0,001) a favor del genotipo VEGF-1154AA. Este mismo análisis de gen-dosis para PFS reveló una proporción de riesgo de 0,79 (95% C.I.: 0,62, 1,02; p=0,07) a favor del genotipo VEGF-1154AA (Tabla 3).
- 10

15 Tabla 3. Relación del genotipo VEGF en la supervivencia sin progresión (PFS)

SNP	Comparación del Genotipo (PFS promedio en meses)	Tasa de riesgo	Intervalo de Confianza	valor p
VEGF-1154	AA (14,1) vs GA (13,5) vs GG (10,7)	0,79	(95% = 0,62,1,02)	0,07

La supervivencia global promedio para el grupo de control fue de 25,2 meses y 26,7 meses para el grupo de combinación. La supervivencia global para los genotipos VEGF-2578 AA y VEGF-1154 AA en el grupo de combinación fue significativamente mayor a 37,0 meses y 46,5 meses, respectivamente.

- 20 También se combinaron todos los genotipos para VEGF-2578 y VEGF-1154 y se evaluaron para una asociación con la supervivencia global. Hubo 9 posibles combinaciones de las cuales cuatro grupos tenían 3 o menos casos y por lo tanto se excluyeron del análisis. Los 5 grupos restantes se analizaron en relación a la supervivencia (Tabla 4). Cuando se compararon los genotipos VEGF-2578/1154 AA/AA con el resto, hubo una mejora estadísticamente significativa en la supervivencia global (p=0,041).
- 25

Tabla 4. Comparación de los genotipos de VEGF combinados con la supervivencia global

Genotipos VEGF -2578/-1154	Supervivencia global promedio en meses	% de casos	Comparación con otros genotipos combinados
AA/AA	49,7	7,6	p= 0,041
AA/GA	30,2	11,4	p= 0,44
CA/GA	27,1	20,9	p= 0,40
CA/GG	22,5	21,5	p= 0,038
CC/GG	21,7	32,9	p= 0,30
Otros	----	5,7	

Relación del Genotipo con la Toxicidad (Hipertensión de grado 3/4)

Se compararon todos los genotipos candidatos (Tabla 1) con la hipertensión de grado 3/4 con toxicidad significativa más habitual (por Criterios de Toxicidad Habitual). Sobre el 15% de todos los pacientes que recibieron bevacizumab en la prueba de base, experimentaron la hipertensión de grado 3/4. Se observó que los alelos específicos en VEGF-1498C/T y -634G/C se asociaban con la hipertensión de grado 3/4 en el grupo experimental. Los genotipos VEGF -634CC y VEGF -1498TT se correlacionaban fuertemente con la hipertensión de grado 3/4 menor (8% y 0%, respectivamente) cuando se compararon con los genotipos alternos (Tabla 5). Hubo una hipertensión numéricamente menor en el genotipo VEGF-2578 CC (12%) cuando se comparó con los genotipos CA (21%) y AA (22%) pero ésta no alcanzó una significancia estadística (p=0,32). Cuando se compararon el VEGF-2578CC frente a los genotipos alternos combinados (CA/AA) había una tendencia para la asociación (p=0,16). De forma similar, el genotipo VEGF-1154 GG presentaba menos hipertensión (14%) en comparación con los genotipos alternos combinados de GA (22%) y GG (27%), pero ésta no alcanzó una significancia estadística (p=0,15).

Tabla 5. Relación del genotipo de VEGF con la hipertensión de grado 3/4

Polimorfismo de nucleótido único	% de hipertensión de grado 3/4 y (número absoluto/porcentaje) por el genotipo	valor p
VEGF-634	CC=0% (n=27; 15,3%) vs GC=22% (n=82; 46,3%) vs GG=19% (n=68; 38,4%)	0,013
VEGF-1498	CC vs GC+GG	0,005
	TT=8% (n=60; 33,9%) vs CT=22% (n=82; 46,3%) vs CC=23% (n=35; 19,8%)	0,056
	TT vs CC+CT	0,022

Relación del Genotipo con la Expresión (IHC)

Se compararon todos los genotipos candidatos (Tabla 1) con la expresión de tumor primario (valorada mediante IHC) para VEGF y VEGFR-2. El grado de expresión de VEGF se evaluó mediante la valoración de VEGF_inv que variaba de 0 a 100 (en base al porcentaje de células invasivas con tinción de VEGF citoplásmico). El grado de la expresión de VEGFR-2 se evaluó mediante la valoración H que podía variar de 0 (no se detectó la expresión) hasta 300 (100% de las células presentaban una expresión máxima 3+). Se compararon los genotipos con la expresión VEGF para el cohorte completo y no se determinaron asociaciones estadísticamente significativas. Para el genotipo VEGF-2578 hubo una tendencia para la asociación entre el genotipo y la valoración VEGF inv. La valoración promedio para el genotipo AA fue menor (AA=48 (desviación estándar = 40)) cuando se comparó con los genotipos alternos (CA=54 (desviación estándar=37) y CC=61 (desviación estándar=37)), pero ésta no alcanzó una significancia estadística (p=0,08). El genotipo VEGF-1154 AA también presentó una expresión promedio inferior (AA=42 (desviación estándar=40)) que los genotipos alternos (GA=53 (desviación estándar=38) y GG=58 (desviación estándar=37)) pero ésta tampoco alcanzó una significancia estadística (p=0,13). No hubo genotipos correlacionados con la expresión de VEGFR-2.

Relación de la Expresión de VEGF y VEGFR-2 con el resultado clínico

La expresión del tumor primario (valorada por IHC) se comparó con el resultado en E2100 (RR, PFS y OS). No hubo asociación estadísticamente significativa entre la expresión de VEGF o de VEGFR-2 con el resultado. Esto fue cierto cuando se evaluó el grupo de control, el grupo de combinación o el cohorte completo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para predecir si un paciente se encuentra con un mayor riesgo de hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF, que comprende cribar una muestra aislada de dicho paciente para un polimorfismo genómico en VEGF (-1498C/T), donde el paciente se encuentra con un mayor riesgo de hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF si el genotipo correspondiente comprende VEGF (-1498C).
- 10 2. Método para predecir si un paciente se encuentra con un mayor riesgo de hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF, que comprende cribar una muestra aislada de dicho paciente para un polimorfismo genómico en VEGF (-634G/C), donde el paciente se encuentra con un mayor riesgo de hipertensión asociada con el tratamiento con un antagonista de VEGF si el genotipo correspondiente comprende VEGF (-634G).
- 15 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
- 25 5. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho paciente está tratándose para el cáncer con un antagonista de VEGF.
- 30 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho paciente está tratándose además con una composición anti-neoplásica.
7. Método según la reivindicación 5, en el que dicho cáncer es cáncer de mama.
8. Método según la reivindicación 5, en el que dicho antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.
9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
10. Método según la reivindicación 8, en el que dicho paciente está tratándose además con una composición anti-neoplásica.