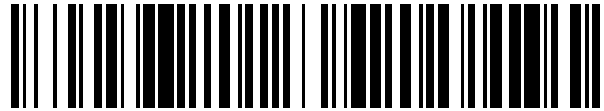


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 732**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2010 E 10754329 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2478114**

54 Título: **Procedimientos de diagnóstico para el cáncer de pulmón**

30 Prioridad:

17.09.2009 US 243361 P

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

05.03.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DE HAAS, SANNE LYSBET;
DELMAR, PAUL y
SCHERER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 530 732 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

Procedimientos de diagnóstico para el cáncer de pulmón

5 La presente invención, se refiere a procedimientos y a composiciones las cuales son de utilidad para la predicción de los resultados o consecuencias clínicas, para al gobierno y control de los pacientes tratados con una terapia anti-angiogénica.

10 El cáncer, es una de las mayores amenazas mortales para la salud. Sólo en los Estados Unidos de América, el cáncer, afecta a casi 1,3 millones de nuevos pacientes cada año, y ésta es la segunda causa que conduce a la muerte, después de la enfermedad cardiovascular, significando aproximadamente 1 de cada cuatro muertes. Los tumores sólidos, son responsables para la mayoría de estas muertes. A pesar del hecho consistente en que ha habido unos avances significativos en el tratamiento médico, en el tratamiento médico de ciertos cánceres, la tasa de supervivencia general de 5 años, para todos los cánceres, se ha mejorado únicamente en un porcentaje del 10 %
15 %, en los pasados 20 años. Los cánceres o tumores malignos, metastizan y crecen rápidamente, de una forma incontrolada, convirtiendo la detección y el tratamiento oportunos, en extremadamente difícil.

20 En dependencia del tipo de cáncer, los pacientes, de una forma típica, tienen varias opciones de tratamiento, disponibles para ellos, incluyendo a la quimioterapia, a la radiación, y a los fármacos basados en anticuerpos. Los procedimientos de diagnóstico los cuales son de utilidad para predecir los resultados o consecuencias clínicas, a partir de los diferentes regímenes de tratamiento, beneficiarían enormemente el gobierno y control clínico de estos pacientes. Diversos estudios, han explorado la correlación de la expresión genética con la identificación de tipos específicos de cánceres, tales como, por ejemplo, mediante ensayos específicos de mutación, análisis de microseries, qPCR, etc. Tales tipos de procedimientos, pueden ser de utilidad para la identificación y la clasificación
25 de un cáncer que se presenta en un paciente. Sin embargo, no obstante, se conoce mucho menos, en cuanto a lo referente al valor predictivo o de pronóstico de la expresión de genes, con un resultado o consecuencia clínica.

30 Así, de este modo, existe una necesidad en cuanto al hecho de poder disponer de procedimientos objetivos y reproducibles para predecir el resultado o consecuencias del tratamiento y, con ello, seleccionar el régimen de tratamiento óptimo para cada paciente.

35 Dowlati A et al., Clin Cancer Res (2008); 14 (5) : 1407 – 12, se refiere a un estudio correlativo de diferentes marcadores, a saber, los marcadores consistentes en los VEGF, bFGF, ICAM y E-selectina, en pacientes aquejados de cáncer de pulmón de células no pequeñas, tratados con bevacizumab, pero muestra una asociación con los niveles de bFGF y la respuesta al bevacizumab.

40 Herbst R S et al., Oncologist, Oncologista -, (2008); 13 (11) : 1166 – 76, describe que se llevó a cabo un estudio correlativo, en pacientes con NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas – [NSCLC, del inglés, non-small cell lung cancer] -), involucrados en un ensayo aleatorio de la fase II / III, de paclitaxel plus carboplatino, con o sin bevacizumab. Se examinaron los niveles de VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial – [VEGF, del inglés Vascular Endotelial growth Factor] -), del factor de crecimiento del fibroblasto básico (bFGF – [del inglés Basic fibroblast growth factor] -), y de la molécula de adhesión intercelular del tipo 1, soluble (ICAM – [del inglés, intercellular adhesion molecule-1] -). Sólo los niveles de ICAM de línea básica de referencia, parecían ser un factor de referencia, siendo un sólido y claro pronóstico para la supervivencia y la respuesta a la quimioterapia.
45

50 Los procedimientos de la presente invención, pueden utilizarse en una variedad de escenarios incluyendo, por ejemplo, en la ayuda en la selección de un paciente, durante el curso del desarrollo del fármaco, en la selección del curso óptimo del tratamiento, para un paciente, en la predicción de la probabilidad de un éxito, cuando se trata a un paciente individual con régimen de tratamiento particular, en la valoración de la progresión de una enfermedad, en la supervisión de la eficacia de un tratamiento, en la determinación de la prognosis para pacientes individuales y en la valoración de la predisposición de un individuo, para beneficiarse de una terapia particular, tal como, por ejemplo, una terapia anti-cáncer y / o una terapia anti-angiogénica.

55 La presente invención, se basa, en parte, en el descubrimiento de que, los niveles de expresión del bFGF (factor de crecimiento de fibroblasto básico), en pacientes que sufren de cáncer, se encuentran correlacionados con el incremento de los beneficios clínicos procedentes de una terapia anti-angiogénica. En concordancia con ello, un aspecto de la invención, proporciona procedimientos para la identificación de un paciente con cáncer, el cual puede beneficiarse de una terapia anti-angiogénica, procedimientos éstos, los cuales comprenden la determinación del nivel de expresión del bFGF, en una muestra obtenida de un paciente, en donde, un mayor nivel de la expresión del bFGF, en la muestra obtenida de un paciente, al compararse con el de una muestra de referencia, indica el hecho de que, el paciente en cuestión, puede beneficiarse de una terapia anti-angiogénica.
60

65 Otro aspecto de la presente invención, proporciona procedimientos de predicción de la capacidad de respuesta de un paciente con un cáncer, a la terapia anti-angiogénica, procedimientos éstos, los cuales comprenden la determinación del nivel de expresión del bFGF, en una muestra obtenida de un paciente, en donde, un mayor nivel

de la expresión del bFGF, en la muestra, al compararse con el de una muestra de referencia, indica el hecho de que, el paciente en cuestión, tiene, probablemente, una capacidad de respuesta, a la terapia anti-angiogénica.

5 En ciertas formas de presentación, la terapia anti-angiogénica, comprende el proceder a administrar un antagonista del VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) o un fragmento de éste. En ciertas formas de presentación, el antagonista del VEGF, es un anticuerpo anti-VEGF. En ciertas formas de presentación, el anticuerpo anti-VEGF, es un anticuerpo monoclonal. En ciertas formas de presentación, el anticuerpo anti-VEGF, es el bevacizumab. En ciertas formas de presentación, la terapia anti-angiogénica, comprende el proceder a administrar 5 mg / kg, 7,5 mg / kg, 10 mg / kg ó 15 mg / kg de bevacizumab. En ciertas formas de presentación, la terapia anti-angiogénica, comprende, de una forma adicional, la administración de por lo menos un agente quimioterapéutico al paciente. En ciertas formas de presentación, por lo menos no de los agentes quimioterapéuticos, es el cisplatino o la gemcitabina. En ciertas formas de presentación, la terapia anti-angiogénica, comprende, de una forma adicional, el administrar por lo menos dos agentes quimioterapéuticos al paciente. En ciertas formas de presentación, por lo menos dos agentes quimioterapéuticos, son el cisplatino la gemcitabina.

15 En una forma de presentación, el mayor nivel de expresión del bFGF (factor de crecimiento del fibroblasto básico), en una muestra obtenida de un paciente, al compararse la muestra de referencia, indica el hecho de que, el paciente, puede beneficiarse de una quimioterapia angiogénica, la cual comprende la administración de 7,5 mg / kg de bevacizumab. En otra forma de presentación, el mayor nivel de expresión del bFGF, en una muestra, al compararse con la muestra de referencia, indica el hecho de que, tiene, probablemente, una capacidad de respuesta, a la terapia anti-angiogénica, la cual comprende la administración de 7,5 mg / kg de bevacizumab.

20 En ciertas formas de presentación, los procedimientos de la presente revelación, comprenden, de una forma adicional, la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF, a un paciente. En ciertas formas de presentación, el anticuerpo anti-VEGF, es el bevacizumab. En ciertas formas de presentación, la cantidad efectiva de bevacizumab, la cual se administra al paciente, es la correspondiente a 7,5 mg / kg de bevacizumab. En ciertas formas de presentación, los procedimientos de la presente revelación, comprenden, de una forma adicional, la administración de una cantidad efectiva de por lo menos un agente quimioterapéutico, a un paciente. En ciertas formas de presentación, por lo menos uno de los agentes quimioterapéuticos, es el cisplatino o la gemcitabina. En ciertas formas de presentación, los procedimientos de la presente revelación, comprenden, de una forma adicional, la administración de una cantidad efectiva de por lo menos dos agentes quimioterapéuticos, a un paciente. En ciertas formas de presentación, por lo menos dos agentes quimioterapéuticos,, son el cisplatino y la gemcitabina.

25 La presente revelación, proporciona procedimientos para tratar a un paciente con un anticuerpo anti-VEGF, procedimientos éstos los cuales comprenden (1) la determinación del nivel de expresión del bFGF, en una muestra obtenida de un paciente, y (2) la administración de una cantidad efectiva de anticuerpo anti-VEGF, a un paciente, si existe un mayor nivel de expresión del bFGF, en la muestra, si se compara con una muestra de referencia.

30 En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión del bFGF que se está midiendo, es el nivel de expresión proteica. En ciertas forma de presentación, el nivel de expresión proteica, , se mide mediante el uso de un ensayo inmunológico. En ciertas formas de presentación, el ensayo inmunológico, es el ELISA. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión del bFGF, que se está midiendo, es el nivel de expresión de mRNA.

35 En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra, es mayor de aproximadamente 2 pg / ml. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra, es mayor de aproximadamente 4 pg / ml. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra, es mayor de aproximadamente 6 pg / ml. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra, es mayor de aproximadamente 6,9 pg / ml. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra de referencia, es igual a, o menor de aproximadamente 2 pg / ml. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra de referencia, es igual a, o menor de aproximadamente 4 pg / ml. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra de referencia, es igual a, o menor de aproximadamente 6 pg / ml. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra de referencia, es igual a, o menor de aproximadamente 6,9 pg / ml.

40 La presente revelación, proporciona, de una forma adicional, procedimientos para tratar un paciente afectado de cáncer, procedimientos éstos, los cuales comprenden el determinar el nivel de expresión proteica del bFGF, en una muestra obtenida de un paciente, y administrar una cantidad efectiva de anticuerpo anti-VEGF, al paciente, si el nivel de expresión genética del bFGF, es mayor de aproximadamente 2 pg / ml. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra, es mayor de aproximadamente 4 pg / ml. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra, es mayor de aproximadamente 6 pg / ml. En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión proteica del bFGF, en la muestra, es mayor de aproximadamente 6,9 pg / ml.

45 En ciertas formas de presentación, el anticuerpo anti-VEGF administrado al paciente, es un anticuerpo monoclonal.

5 En ciertas formas de presentación, el anti-cuerpo anti-VEGF administrado a un paciente, es un anticuerpo humanizado. En ciertas formas de presentación, el anticuerpo anti-VEGF, es el bevacizumab o un fragmento de éste. En ciertas formas de presentación, se administran, al paciente, 5 mg / kg, 7,5 mg / kg, 10 mg / kg ó 15 mg / kg de bevacizumab. En ciertas formas de presentación, la cantidad efectiva de bevacizumab, la cual se administra al paciente, es la correspondiente a 7,5 mg / kg de bevacizumab.

10 Los procedimientos de la presente revelación, comprenden, de una forma adicional, la administración, al paciente, de una cantidad efectiva de por lo menos un agente quimioterapéutico. En ciertas formas de presentación, el agente quimioterapéutico, es el cisplatino. En ciertas formas de presentación, el agente terapéutico, es la gemcitamina. En ciertas formas de presentación, el agente terapéutico, es el carboplatino. En ciertas formas de presentación, el agente terapéutico, es el paclitaxel. En ciertas formas de presentación, el agente terapéutico, es el pemetrexed. En ciertas formas de presentación, los procedimientos de la presente revelación, comprenden, de una forma adicional, la administración, al paciente, de cantidades efectivas de cisplatino y de gemcitabina. En ciertas formas de presentación, los procedimientos de la presente revelación, comprenden, de una forma adicional, la administración, al paciente, de cantidades efectivas de carboplatino y de paclitaxel.

20 En ciertas formas de presentación, el cáncer, es un cáncer de mama, un cáncer colon, un cáncer de ovario, un cáncer renal, o un glioblastoma. El cáncer es cáncer de pulmón, tratándose, en ciertas formas de presentación, de un cáncer de pulmón el cual no ha sido previamente tratado. En ciertas formas de presentación, el cáncer de pulmón, es un cáncer de pulmón de células no pequeñas. En ciertas formas de presentación, el cáncer de pulmón, es un cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cual no ha sido tratado previamente.

25 En ciertas formas de presentación, la muestra obtenida de un paciente, es un miembro seleccionado de entre el grupo consistente en: un tejido, células derivadas de la sangre, el plasma, el suero, y combinaciones de entre éstos. La muestra, es una muestra de sangre. En ciertas formas de presentación, la muestra procedente de un paciente, se obtiene antes o al inicio de la terapia anti-angiogénica.

30 En ciertas formas de presentación, el nivel de expresión del bFGF el cual se está midiendo, es el nivel proteico del bFGF en la sangre. En ciertas formas de presentación, la proteína del bFGF, es la forma madura de la proteína del bFGF.

35 La revelación, proporciona conjuntos de compuestos para la detección del nivel de expresión del bFGF, en una muestra obtenida de un paciente afectado de cáncer. Los conjuntos en cuestión, comprenden uno o más compuestos los cuales son capaces de detectar el nivel de expresión del bFGF, en donde, un mayor nivel de expresión del bFGF, determinado mediante la utilización del conjunto de uno o más compuestos, en una muestra obtenida de un paciente con cáncer, al compararse con el de una muestra de referencia, indica el hecho de que, el paciente, puede beneficiarse de una terapia anti-angiogénica. En ciertas formas de presentación, los compuestos, son proteínas. En ciertas formas de presentación, las proteínas, son anticuerpos. En ciertas formas de presentación, por lo menos uno de los anticuerpos, es capaz de unirse a la bFGF.

40 La revelación, proporciona equipos, a modo de "kits", para determinar si un paciente puede beneficiarse con la terapia anti-angiogénica. Estos equipos, a modo de kits, comprenden una serie compuesta por polinucleótidos, los cuales son capaces de hibridar, de una forma específica, al bFGF, en donde, el equipo a modo de kit, comprende, de una forma adicional, instrucciones para el uso de la citada serie, para predecir la sensibilidad o capacidad de respuesta de un paciente con cáncer, a la terapia anti-angiogénica, en donde, un mayor nivel de expresión del bFGF, al compararse con el de una muestra de referencia, indica el hecho de que, el paciente, puede beneficiarse de la terapia anti-angiogénica.

50 Cualquier forma de presentación que se describe aquí, en este documento de solicitud de patente, o cualquier combinación de éstas, se aplica a cualquier procedimiento y todos los procedimientos de la invención, los cuales se describen aquí, en este documento.

Se proporcionan las siguientes figuras:

55 La figura 1, muestra un diseño de ensayo AVAIL.

La figura 2, es una curva de Kaplan Meier, la cual muestra la probabilidad de supervivencia exenta de progresión, en grupos de tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón con un alto nivel de expresión proteica del bFGF.

60 La figura 3, es una curva de Kaplan Meier, la cual muestra la probabilidad de supervivencia exenta de progresión, en grupos de tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón con un bajo nivel de expresión proteica del bFGF.

La figura 4, es una curva de Kaplan Meier, la cual muestra la probabilidad de supervivencia global, en grupos de tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón con un alto nivel de expresión proteica del bFGF.

65

La figura 5, es una curva de Kaplan Meier, la cual muestra la probabilidad de supervivencia global, en grupos de tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón con un bajo nivel de expresión proteica del bFGF.

5 Las técnicas y los procedimientos los cuales se describen o a los cuales se les hace referencia, aquí, en este documento, se entienden bien y éstos se emplean de una forma usual, mediante la utilización de una metodología convencional, por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías extensamente utilizadas y que se encuentran descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. Edition, Clonación molecular: Un manual de laboratorio -, (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, -
10 Protocolos usuales en la biología molecular -, (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); Las series METHODS IN ENZYMOLOGY, - Procedimientos en enzimología -, (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH, - Un enfoque práctico -, (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE, - Anticuerpos, un manual de laborario, y cultivo de células animales -, (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis, - Síntesis de oligonucleótidos (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, - Procedimientos en biología molecular -, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook -, Biología celular, una libro de notas de laboratorio -, (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture -, Cultivo de células animales -, (R. I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture -, Introducción al cultivo de células y de tejidos -, (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures -, Cultivo de células y de tejidos: Procedimientos de laboratorio -, (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology -, Manual de inmunología experimental (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, - Vectores de transferencia genética para células de mamíferos (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, - La reacción en cadena de la polimerasa -, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology, - Cortos protocols en la biología molecular -, (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology, - Inmunobiología -, (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies, - Anticuerpos - (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach, - Anticuerpos: un enfoque práctico (D. Catty., ed., IRL Press, 1988 - 1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach, - Anticuerpos monoclonales, un enfoque práctico -, (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual, - Utilización de anticuerpos: Un manual de laboratorio -, (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies, - Los anticuerpos -, (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology, - Cáncer: Principios y práctica de oncología, (V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

35 A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y específicos utilizados aquí, en este documento de solicitud de patente, tienen el mismo significado que el usualmente entendido por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica, a la cual pertenece la presente invención. Las obras Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, - Diccionario de microbiología y biología molecular -, 2ª Edición J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure -, Reacciones de la química orgánica avanzada, Mecanismos y estructura -, 4ª Edición, John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992),
40 proporcionan, a la persona experta en el arte especializado de la técnica, un guía general, para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud de patente.

45 Para los propósitos de interpretación de esta especificación, se aplicarán las definiciones las cuales se facilitan abajo, a continuación y, en el caso en el que sea apropiado, los términos los cuales se utilizan en singular, incluirán así mismo, también, el plural, y viceversa.

50 El término "muestra", o "muestra de ensayo", tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a una composición la cual se obtiene o se deriva de un sujeto de interés, la cual contiene una entidad molecular y / o otra entidad molecular, la cual debe caracterizarse y / o identificarse, por ejemplo, a base de características físicas, bioquímicas, químicas y / o fisiológicas. En una forma de presentación, la definición, abarca a la sangre y a otras muestras de líquidos, de origen biológico y muestras de tejidos tales como las consistentes en un espécimen de biopsia o cultivos de tejidos o células derivados de éstos. La fuente de muestra de tejido, puede ser tejido sólido, tal como un órgano, una muestra de tejido, o una biopsia, o un aspirado, frescos, congelados y / o conservados; sangre o cualesquiera constituyentes de la sangre; fluidos corporales; y células procedentes de cualquier momento de la
55 gestación o desarrollo del sujeto o plasma.

60 En otra forma de presentación, la definición, incluye a muestras biológicas, la cual se han manipulado de cualquier forma, después de su obtención, tal como mediante un tratamiento con reactivos, una solubilización, o un enriquecimiento con ciertos componentes, tales como la proteínas o los polinucleótidos, o mediante la incorporación en una matriz semi-sólida o sólida, para propósitos de seccionamiento o división. Para los propósitos de este documento, mediante el término "sección", de una muestra de tejido, se pretende dar a entender una parte o fragmento o pedazo individual, de una muestra de tejido, tal como, por ejemplo, una "loncha" delgada de tejido o de células, cortadas de una muestra se tejido.

65 Las muestras, incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstas, a las células primarias o cultivadas o a

5 las líneas celulares, a los sobrenadantes celulares, a los lisados celulares, a los glóbulos blancos o plaquetas, al suero, al plasma, al fluido (humor) vítreo, al fluido linfático, al fluido sinovial, al fluido folicular, al fluido seminal, al fluido amniótico, a la leche, a la sangre entera, a la orina, al fluido cerebroespinal, a la saliva, al esputo, a las lágrimas, a la perspiración, al moco, a los lisados tumorales, y al medio de cultivo de tejido, así como a los extractos de tejidos tales como los consistentes el tejido homogeneizado, el tejido tumoral y los extractos celulares.

10 En una forma de presentación, la muestra, es una muestra clínica. En otra forma de presentación, la muestra, se utiliza en un ensayo de diagnóstico. La muestra es una muestra de sangre. En ciertas formas de presentación, la muestra es una muestra de sangre periférica. En ciertas formas de presentación, la muestra, es una muestra de sangre.

15 En ciertas formas de presentación, la muestra, se obtiene a partir de un tumor primario o metastásico. La biopsia de tejido, se utiliza, a menudo, para obtener un pedazo o fragmento representativo de un tejido tumoral. De una forma alternativa, las células tumorales, pueden obtenerse indirectamente, en forma de tejidos o de fluidos, los cuales se conoce o se piensa que contienen las células tumorales de interés. Así, por ejemplo, las muestras de lesiones de cáncer de pulmón, pueden obtenerse mediante resección, mediante broncoscopio, mediante aspiración con aguja fina, mediante cepillados bronquiales, o a partir del esputo, del fluido pleural o de la sangre.

20 En una forma de presentación, se obtiene una muestra de ensayo de un sujeto o paciente, previamente a la terapia anti-angiogénica. En otra forma de presentación, se obtiene una muestra de ensayo de un sujeto o paciente, previamente a la terapia con antagonistas de VEGF. En todavía otra forma de presentación, se obtiene una muestra de ensayo de un sujeto o paciente, previamente a la administración del anticuerpo anti-VEGF consistente en el bevacizumab. En cierta forma de presentación, se obtiene una muestra de ensayo, durante o después de la terapia anti-angiogénica, de la terapia con antagonista del VEGF, o de la terapia con anticuerpo anti-VEGF. En ciertas formas de presentación, la muestra de ensayo, se obtiene después de que el cáncer haya metastizado.

30 Una "muestra de referencia", tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a cualquier muestra, patrón estándar, o nivel, el cual se utiliza para los propósitos de comparación. Una muestra de referencia, incluye a todos los tipos de muestras biológicas, tal y como éstas se definen anteriormente, arriba, bajo el término de "muestra". En ciertas formas de presentación, una muestra de referencia, es una muestra de sangre. En ciertas formas de presentación, una muestra de referencia, es una muestra de sangre periférica. En ciertas formas de presentación, una muestra de referencia, es una muestra de suero. En ciertas formas de presentación, una muestra de referencia, es una muestra de plasma. Una muestra de referencia, puede ser, o bien ya sea una muestra seleccionada, o bien ya sea una colectiva.

40 En una forma de presentación, se obtiene una muestra de referencia, de una parte del cuerpo sana y / o no enferma, del cuerpo del mismo sujeto o paciente. En otra forma de presentación, se obtiene una muestra de referencia de un tejido y / o células, no tratados, del cuerpo del mismo sujeto o paciente.

45 En ciertas formas de presentación, se obtiene una muestra de referencia de uno o de más individuos con cáncer, los cuales no son el sujeto o paciente. En una forma de presentación, se obtiene una muestra de referencia, de una parte del cuerpo sana y / o no tratada, de un individuo el cual no es el sujeto o paciente.

En otra forma de presentación, se obtiene una muestra de referencia, de un tejido y / o células, no tratados, de una parte del cuerpo de un individuo el cual no es el sujeto o paciente.

50 En ciertas formas de presentación, una muestra de referencia, es representativa de múltiples muestras combinadas, procedentes de uno o más individuos sanos, los cuales no son el sujeto o paciente. En ciertas formas de presentación, una muestra de referencia, es representativa de múltiples muestras combinadas, procedentes de uno o más individuos con cáncer, los cuales no son el sujeto o paciente. En ciertas formas de presentación, una muestra de referencia, es la consistente en muestras colectivas de proteínas y / o RNA, procedentes de un o más individuos, los cuales no son el sujeto o paciente.

55 En ciertas formas de presentación, una muestra de referencia, es una muestra individual, o es la consistente en múltiples muestras combinadas, procedentes del mismo sujeto o paciente, las cuales se obtienen en uno o más puntos instantes de tiempo diferentes que cuando se obtiene la muestra de ensayo. Así, por ejemplo, se obtiene una muestra de referencia, en un instante o punto de tiempo anterior, del mismo sujeto o paciente, que cuando se obtiene la muestra de ensayo. Tal tipo de muestra de referencia, puede ser de utilidad, si la muestra de referencia se obtiene durante la diagnosis inicial del cáncer, y la muestra de ensayo, se obtiene más tarde, cuando el cáncer se convierte en metastásico. En ciertas formas de presentación, se obtiene una muestra de referencia, en punto o instante de tiempo posterior, del mismo sujeto o paciente, que cuando se obtiene la muestra de ensayo.

60 Un "individuo", "sujeto", o "paciente", es un vertebrado. En ciertas formas de presentación, el vertebrado, es un mamífero. Los mamíferos, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuento a éstos, a los animales de granja

(tales como las vacas) a los animales deportivos, a los animales de compañía o domésticos (tales como los gatos, los perros, y los caballos), a los primates, a los ratones y a las ratas. En ciertas formas de presentación, un mamífero, es un humano.

5 “Detección”, incluye cualesquiera medios de detección, incluyendo a la detección directa y a la detección indirecta.

La palabra “marcador”, cuando se utiliza aquí, en este documento, se refiere a un compuesto o a una composición, la cual se conjuga o se fusiona de una forma directa o de una forma indirecta, con un reactivo tal como consistente en una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo, y que facilita la detección del reactivo, al cual se encuentra conjugado o fusionado. El marcador, puede ser detectable en sí mismo (tales como por ejemplo, los marcadores radioisótopos o los marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, éste puede catalizar la modificación química de un compuesto o de una composición de sustrato, la cual es detectable.

15 Una “secuencia diana”, un “ácido nucleico diana”, o una “proteína diana”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, es un polinucleótido o una proteína de interés, cuya detección se desea. De una forma general, un “molde”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, es un polinucleótido el cual contiene la secuencia nucleótida diana. En algunas formas de presentación, los términos “secuencia diana”, “DNA molde”, “polinucleótido molde”, “ácido nucleico diana”, “polinucleótido diana”, y variaciones de éstos, se utilizan de una forma intercambiable.

20 El término “biomarcador”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere, de una forma general, a una molécula, incluyendo a un gen, a una proteína, a una estructura de hidrato de carbono, o a un glicolípido, cuya expresión, en tejido o célula de mamífero, o sobre éstos, puede detectarse mediante procedimientos estándar (o mediante procedimientos los cuales se dan a conocer aquí, en este documento), y es predictivo, diagnóstico y / o pronóstico, para la sensibilidad de un sujeto, a regímenes de tratamiento basados en la inhibición de la angiogénesis, tal como por ejemplo, un agente anti-angiogénesis, tal como un inhibidor específico del VEGF. En ciertas formas de presentación, la expresión de tal tipo de biomarcador, se determina para ser mayor que la que se observa para una muestra de referencia. En ciertas formas de presentación, el biomarcador es el bFGF. La expresión de los biomarcadores, puede determinarse, por ejemplo, mediante la utilización de un inmunoensayo multiplexado de alto rendimiento, tal como el que se encuentra comercialmente disponible en el mercado, procedente de la firma Rules Based Medicine, Inc., o de la firma Meso Scale Discovery. La expresión de los biomarcadores, puede también determinarse, mediante la utilización de por ejemplo, un ensayo de PCR o de FACS, un ensayo inmunohistoquímico, o un ensayo a base de un chip genético. Procedimientos adicionales para la medición de la expresión de los biomarcadores, se describen aquí, en este documento, en el apartado de Procedimientos de la invención.

35 Mediante los términos “correlacionar” o “correlación”, se pretende dar a entender el hecho de comparar, de cualquier forma, el rendimiento y / o los resultados de un primer análisis o protocolo, con el rendimiento y / o los resultados de un segundo análisis o protocolo. Así, por ejemplo, se pueden utilizar resultados de una primer análisis o protocolo, en la realización de un segundo protocolo y / o se pueden utilizar los resultados de un primer análisis o protocolo, para determinar el hecho de si debería llevarse a cabo un segundo análisis o protocolo. Con respecto a la forma de presentación del análisis o protocolo de expresión genética, se pueden utilizar los resultados del análisis o protocolo de expresión genética, para determinar el hecho de si debe llevarse a cabo un régimen terapéutico específico.

45 El nivel / cantidad de expresión, de un gen, producto genético, por ejemplo, biomarcador, puede determinarse en base a cualesquiera de los criterios conocidos en el arte especializado de la técnica, incluyendo, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, al mRNA, al cDNA, a la proteínas, a los fragmentos de proteínas y / o a la copia genética. Los niveles / cantidad de expresión, puede determinarse de una forma cualitativa y / o cuantitativa. En ciertas formas de presentación, las muestras, se encuentran normalizadas para ambas, las diferencias en la cantidad de RNA, o proteína sometida a test de ensayo, y la variabilidad de la calidad de la muestras de RNA o de proteínas utilizadas. Tal tipo de normalización, puede llevarse a cabo procediendo a medir y a incorporar la expresión de ciertos genes normalizados, incluyendo a los bien conocidos genes “housekeeping” o constitutivos, tales como el consistente en el GAPDH. De una forma alternativa, la normalización, puede basarse en la señal media o mediana de todos los genes ensayados, de un extenso subconjunto de éstos (enfoque de normalización global). En una base gen a gen, se procede a comparar la cantidad normalizada medida, en el mRNA o proteína del tumor de un paciente, con la cantidad encontrada en un conjunto de referencia. Los niveles de expresión normalizados para cada una de las mRNA o proteínas por tumor sometido a test de ensayo, por paciente, puede expresarse como un porcentaje del nivel de expresión medido en el conjunto de referencia. El nivel de expresión medido en una muestra particular de un paciente, a ser analizada, disminuirá en algunos percentiles, dentro de este rango, el cual puede determinarse mediante procedimientos los cuales son bien conocidos en el arte de la técnica especializada.

60 El término “serie” o “microserie”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a un orden de disposición ordenado de elementos en serie, hibridizables, de una forma preferible, sondas de polinucleótidos (tal como, por ejemplo, oligonucleótidos), sobre un sustrato. El sustrato, puede ser un sustrato sólido, tal como el consistente en una platina de vidrio, o un sustrato semisólido, tal como el consistente en una membrana de nitrocelulosa. Las

secuencias nucleótidas, pueden ser DNA, RNA ó cualesquiera permutaciones de éstas.

“Amplificación”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a un procedimiento para producir múltiples copias de una secuencia deseada. “múltiples copias”, significa por lo menos 2 copias. Una “copia”, no significa necesariamente una perfecta complementariedad de secuencia o identidad a la secuencia molde. Así, por ejemplo, las copias, pueden incluir, a los análogos de nucleótidos, tales como los consistentes en la desoxinosina, modificaciones intencionadas de secuencias (tales como las consistentes en las modificaciones de secuencias introducidas mediante un cebador, el cual comprende una secuencia, la cual es hibridizable, pero no complementaria, al molde) y / o errores de secuencias, los cuales acontecen durante la amplificación.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico”, al y como se utilizan aquí, de una forma intercambiable, en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen al DNA y al RNA. Los nucleótidos, pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y / o sus análogos, o cualquier sustrato el cual pueda incorporarse en un polímero, mediante DNA ó RNA polimerasa. Un polinucleótido, puede comprender nucleótidos modificados, tales como los consistentes en los nucleótidos metilados y sus análogos. En el caso en el que se encuentre presente, la modificación a la estructura del nucleótido, puede impartirse antes o después del ensamblado del polímero. La secuencia de nucleótidos, pueden interrumpirse mediante componentes no nucleótidos. Un polinucleótido, puede modificarse adicionalmente, después de la polimerización, tal como mediante la conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones, incluyen, por ejemplo, a los “CAPS” (tampones de uniones híbridos), a la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural, por un análogo, a las modificaciones internucleótidas, tales como, por ejemplo, aquéllas con enlaces no cargados (tales como, por ejemplo, los fosfatos de metilo, los fosfotriésteres, los fosfoamidatos, los cabamatos, etc.), y con enlaces cargados (tales como, por ejemplo, los fosforotioatos, los fosforoditioatos, etc.), a aquéllas que contienen porciones colgantes, tales como, por ejemplo, las proteínas (tales como por ejemplo, las nucleasas, las toxinas, los anticuerpos, los péptidos señal, la ply-L-lisina, etc.) a aquéllas con intercaladores (tales como, por ejemplo, la acridina, el psoraleno, etc.) a aquéllas que contienen quelantes (tales como, por ejemplo, los metales, los metales radioactivos, el boro, los metales oxidantes, etc.), a aquéllas que contienen alquilantes, a aquéllas con enlaces modificados (tales como, por ejemplo, los ácidos alfa-anomérico-nucleicos, etc.), así como también a las formas no modificadas de (de los) polinucleótido(s). De una forma adicional, cualquiera de los grupos hidroxilo usualmente presentes en los azúcares, puede reemplazarse, por ejemplo, mediante grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos mediante grupos protectores estándar, o activados, para preparar enlaces adicionales a los nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse a soportes sólidos. El OH 5' terminal y 3' terminal, puede fosforilizarse o sustituirse por aminas, o por porciones de grupos orgánicos bloqueantes, con 1 a 20 átomos de carbono. Pueden también derivarse otros hidroxilos, para los grupos protectores estándar. Los polinucleótidos, pueden también formas análogas de ribosa o de desoxirribosa, los cuales, de una forma general, son conocidos en el arte especializado de la técnica., incluyendo, por ejemplo, a las 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro—ó 2'-azido-ribosa, a los análogos de los azúcares carboxílicos, a los azúcares α -anoméricos, a los azúcares epiméricos, tales como los consistentes en la arabinosa, las xilosas o lixosas, a los azúcares de piranosa, a los azúcares de furanosa, a las sedoheptulosas, a los análogos acrílicos, y a los análogos de nucleósidos abásicos, tales como la ribosida. Pueden reemplazarse uno más enlaces de fosfodiéster, mediante grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos, incluyen, aunque no de una forma limitada en cuanto a éstos., a la formas de presentación, en donde, el fosfato, se encuentra reemplazado por P(O)S("tioato"), P(S)S ("ditiato"), "(O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO ó CH₂ ("formacetal"), in los cuales, cada una de las R ó R', de una forma independiente la una con respecto a la otra, es H, ó alquilo (1-20), sustituido o insustituido, el cual contiene un enlace de éter(-O-), arilo, alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, o araldilo. No todos los polinucleótidos, son necesariamente idénticos. Las descripciones anteriormente mencionadas, arriba, se aplican a todos los polinucleótidos a los que se ha hecho referencia anteriormente, arriba, incluyen a los RNA y DNA.

“Oligonucleótido”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a polinucleótidos de cadena corta, de una forma general, de hebra individual, tratándose, de una forma general, de polinucleótido sintéticos, los cuales, generalmente, aunque no necesariamente, tienen una longitud de aproximadamente 200 nucleótidos. Los términos “oligonucleótido” o “polinucleótido”, no son necesariamente exclusivos. La descripción que se ha facilitado anteriormente, arriba, para los polinucleótidos, es igualmente y completamente aplicables a los oligonucleótidos.

Un “cebador” es, de una forma general, un polinucleótido de cadena corta, de hebra individual, de una forma general, con un grupo 3'-OH libre, el cual enlaza a una diana la cual se encuentra potencialmente presente en una muestra de interés, mediante la hibridación con una secuencia diana y, a continuación de ello, estimula la polimerización de polinucleótido complementario a la diana.

Un polipéptido de “secuencia nativa”, comprende un polipéptido, el cual tiene la misma secuencia de aminoácidos que la de un polipéptido derivado de la naturaleza. Así, de este modo, un polipéptido de secuencia nativa, puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de origen natural, procedente cualquier mamífero. Tal tipo de polipéptido de secuencia nativa, puede aislarse de la naturaleza, o éste puede producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de “secuencia nativa”, abarca, de una forma específica, a formas truncadas o secretadas de origen natural, del polipéptido (tal como, por ejemplo, una secuencia de dominio

extracelular a las formas variantes de origen natural (tales como, por ejemplo, formas empalmadas), y variantes alélicas del polipéptido, de origen natural.

5 Un polipéptido "aislado" o un anticuerpo "aislado", es uno que se ha identificado y separado y / recuperado de una componente, de su entorno medioambiental natural. Los componentes contaminantes de su entorno medioambiental natural, son materiales los cuales podrían interferir con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido en cuestión, y éstos pueden incluir a las enzimas, a las hormonas, y a otros solutos proteínicos o no proteínicos. En ciertas formas de presentación, el polipéptido, se purificará, (1) a un porcentaje mayor que el correspondiente a un 95 %, en peso, de polipéptido, según se determina mediante el procedimiento de Lowry, o a un porcentaje mayor que el correspondiente a un 99 %, en peso, (2) a un grado suficiente como para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminales o internos, mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad, mediante SDS-PAGE, bajo unas condiciones de de reducción o de no reducción, mediante la utilización de Coomassie blue, o silver stain (tinción de plata). El polipéptido aislado, incluye al polipéptido in situ, sin células recombinantes, puesto que, por lo menos un componente del entorno medioambiental natural del polipéptido, no se encontrará presente. De una forma usual, no obstante, el polipéptido, se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

20 Una "cadena de polipéptido", es un polipéptido, en donde, cada uno de los dominios de éste, se encuentra unido a otro dominio u otros dominios, mediante enlaces péptidos, de una forma contraria a las interacciones no covalentes o enlaces de disulfuro.

25 Una "variante" de polipéptido, significa un polipéptido biológicamente activo, el cual tiene un porcentaje de por lo menos aproximadamente un 80 %, de la identidad de la secuencia de aminoácidos, con el correspondiente polipéptido de secuencia nativa. Tales tipos de variantes, incluyen, por ejemplo, a los polipéptidos, en donde se añaden o se suprimen, uno o más aminoácidos (aminoácidos de origen natural y / o aminoácidos de origen no natural), al término N y / ó C, del polipéptido. De una forma usual, una variante, tendrá un porcentaje de por lo menos aproximadamente un 80 % de la identidad de la secuencia de aminoácidos, o por lo menos un porcentaje de aproximadamente un 90% de la identidad de la secuencia de aminoácidos, o por lo menos un porcentaje de aproximadamente un 95 % ó más de la identidad de la secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Las variantes, incluye, también, a fragmentos de polipéptidos (tales como, por ejemplo, subsecuencias, truncamientos, etc.), de una forma típica, biológicamente activos, de la secuencia nativa.

35 El término "variante de proteína", tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a una variante como la que se ha descrito anteriormente, arriba y / o a una proteína la cual incluye una o más mutaciones de aminoácidos, en la secuencia de la proteína nativa. De una forma opcional, las una o más mutaciones de aminoácidos, incluyen a la sustitución o sustituciones de aminoácidos. La proteína y las variantes de ésta, para su uso en la presente invención, puede prepararse mediante mutaciones en el DNA de la proteína. Tales tipos de variantes, incluyen, por ejemplo, a las supresiones de las inserciones en los residuos, o a las sustituciones de los residuos, en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Puede llevarse a cabo cualquier combinación o supresión, inserción y sustitución, para llegar al final de la construcción que tenga la actividad deseada. La mutaciones, las cuales se lleven a cabo en el DNA que codifica a la variante, no debe colocar a la secuencia, fuera del marco de lectura y, de una forma preferible, éstas no crearán regiones de complementariedad, las cuales pudieran producir una estructura de mRNA secundaria. Véase, a dicho efecto, la solicitud de patente europea EP 75 444 A.

45 El término "anticuerpo", tal y como se utiliza aquí, en este documento, se usa en su más amplio sentido, y éste cubre, de una forma específica, a los anticuerpos monoclonales (incluyendo a los anticuerpos monoclonales de longitud total, o intactos), alo anticuerpos monoclonales, a los anticuerpos multivalentes, a los anticuerpos multiespecíficos, (tales como, por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos), formado a base de por lo menos dos anticuerpos intactos, y a los fragmentos de anticuerpos (véase posteriormente, abajo, a continuación), siempre y cuando éstos exhiban la deseada actividad biológica.

55 A menos de que se indique de otro modo, la expresión "anticuerpo multivalente", se utiliza aquí, en la totalidad de esta especificación, para denotar un anticuerpo, el cual comprende tres o más sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente, se diseña, de una forma típica, para tener uno o más sitios de unión al antígeno, y ésta no es, de una forma general, un anticuerpo IgM ó IgA de secuencia nativa.

60 Los "Fragmentos de anticuerpos", comprenden únicamente una porción de un anticuerpo intacto, incluyendo, de una forma general, un sitio de unión al antígeno, del anticuerpo intacto, y reteniendo así, de este modo, la capacidad de unión al antígeno. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpos, a los cuales abarca la presente definición, incluyen: (i) al fragmento Fab, el cual tiene los dominios V_L, C_L, y C_{H1}; (ii) al fragmento Fab', el cual es un fragmento Fab, el cual tiene uno o más fragmentos de cisteína, en el término C del dominio C_{H1}; (iii) al fragmento Fd, el cual tiene los dominios V_H y C_{H1}; (iv) al fragmento Fd', el cual tiene los dominios V_H y C_{H1}, y uno o más residuos de cisteína, en el término C del dominio C_{H1}; (v) al fragmento Fv, el cual tiene los dominios V_L y V_H, de una rama individual de un anticuerpo; (vi) al fragmento dAb (véase, a dicho efecto, Ward et al., Nature 341, 544 - 546 (1989)), el cual consiste en un dominio V_H; (vii) a las regiones asiladas de CDR; (viii) a los fragmentos F(ab')₂, a un

fragmento bivalente, el cual incluye a dos fragmentos Fab', enlazados mediante un puente de disulfuro en la región bisagra; (ix) a la moléculas de anticuerpos de cadena individual (tal como, por ejemplo, una cadena Fv; scFv)(véase, a dicho efecto, Bird et al., Science 242: 423 - 426 (1988); y Huston et al., PNAS (USA) 85: 5879 - 5883 (1988)); (x) a los "diacuerpos" con dos sitios de unión al antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H), conectada a un dominio de cadena ligera (V_L), en la misma cadena del polipéptido (véase, a dicho efecto, la patente europea EP 404 097; la patente internacional WO 93 /11 161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993)); (xi) a los "anticuerpos lineales", los cuales comprenden un par de fragmentos Fd tandem (VH-CH1-VH-CH1), los cuales, conjuntamente con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno (véase, a dicho efecto, (Zapata et al. Protein Eng. 8(10): 1057 - 1062 (1995); y la patente estadounidense US No. 5.641.870).

El término "anticuerpo monoclonal", tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales de los cuales consta la población, son idénticos, excepto en cuanto a lo referente a las posibles mutaciones, tales como, por ejemplo, las mutaciones de origen natural, las cuales pueden encontrarse presentes en unas cantidades menores. Así, de este modo, el modificador "monoclonal", indica el carácter del anticuerpo, como no siendo a una mezcla de anticuerpos discretos. Los anticuerpos monoclonales, son altamente específicos, dirigiéndose contra un antígeno individual. En ciertas formas de presentación, un anticuerpo monoclonal, incluye, de una forma típica, un anticuerpo, el cual comprende una secuencia de polipéptido, la cual enlaza a una diana, en donde, la secuencia polipéptida de unión a la diana, se ha obtenido a partir de una pluralidad de secuencias polipéptidas. Así, por ejemplo, el proceso de selección, puede ser una selección de un clon único, procedente de una pluralidad de clones, tales como una reserva de clones de hibridoma, clones de fagos, o clones de DNA recombinante. Debería entenderse el hecho de que, una secuencia de unión a una dianas seleccionada, puede modificarse adicionalmente, tal como, por ejemplo, para mejorar la afinidad de la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en cultivo de células, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc. y que, un anticuerpo el cual comprenda la secuencia de unión a una diana, modificada, es así mismo, también, un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Como contraste a las preparaciones de anticuerpos monoclonales, las cuales, de una forma típica, incluyen a diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal, se dirige contra un determinante individual, en el antígeno. De una forma adicional a su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales, son ventajosas, debido al hecho de que, éstas, de una forma típica, no se encuentran contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal", indica el carácter del anticuerpo, de la forma que éste se obtiene, a partir de un población de anticuerpos, substancialmente homogénea, y no debe interpretarse como requiriendo la producción del anticuerpo, mediante cualquier tipo de procedimiento particular. Así, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales, utilizarse en concordancia con la presente invención, pueden realizarse mediante una gran variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, a procedimiento del hibridoma (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 - 97 (1975); Hongo et al., Hybridoma, - Hibridoma -, 14 (3): 253 - 260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, - Anticuerpos: Un manual de laboratorio (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª Edición, 1988); Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas -, Anticuerpos monoclonales e hibridomas de células T -, 563 - 681 (Elsevier, N.Y., 1981)), y procedimientos de de DNA recombinante (véase, a dicho efecto, por ejemplo, la patente estadounidense US nº 4.816.567), tecnologías de exhibición de fagos (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Clackson et al., Nature, 352: 624 - 628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 - 597 (1991); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338 (2): 299 - 310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340 (5): 1073 - 1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467 - 12472 (2004); y Lee et al., J. Immunol. Methods 284 (1 - 2): 119 - 132(2004), y tecnologías para la producción de anticuerpos humanos o anticuerpos semejantes a los humanos, los cuales tengan partes, o la totalidad, de locus de la inmunoglobulina humana, o genes, los cuales codifican a las secuencias de la inmunoglobulina humana (véase, a dicho efecto, por ejemplo, las patentes internacionales WO 1998 / 24 893; WO 1996 / 34 096; WO 1996 / 33 735; WO 1991 / 10 741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255 - 258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7: 33 (1993); las patentes estadounidenses US nº 5.545.807; US nº 5.545.806; US nº 5.569.825; US nº 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks et al., Bio/Technology 10: 779 - 783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856 - 859 (1994); Morrison, Nature 368: 812 - 813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845 - 851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65 - 93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales presentados aquí, en este documento, incluyen, de una forma específica, a los anticuerpos "quiméricos", en los cuales, una porción de un la cadena pesada y / o de la cadena ligera, es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias, en anticuerpos derivados de una especie particular, o que pertenece a una clase o subclase particular, mientras que, el resto de la(s) cadena(s), son idénticas u homólogas a las correspondientes secuencias, en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de tales tipos de anticuerpos, siempre y cuando, éstos, exhiban la deseada actividad biológica (véase, a dicho efecto, la patente estadounidense US nº 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 - 6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (tales como, por ejemplo, murinos), son anticuerpos murinos, los cuales contienen secuencias animales, derivados de la inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados, son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor), en cuyos residuos, procedentes de una región hipervariable del receptor, se encuentran reemplazados por residuos procedentes de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo del donante), tal como la consistente en un ratón, en una rata, en un conejo, o en un primate no humano, el cual tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) – [del inglés, framework region] -) de la inmunoglobulina humana, se encuentran reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Adicionalmente, además, los anticuerpos humanizados, pueden comprender residuos los cuales no se encuentran en el anticuerpo del receptor o en el anticuerpo del donante. Estas modificaciones, se realizan para refinar de una forma adicional el comportamiento o rendimiento del anticuerpo. De una forma general, el anticuerpo humanizado, comprenderá, de una forma substancial, la totalidad o por lo menos una y, de una forma típica, dos dominios variables, en los cuales la totalidad o substancialmente la totalidad de los bucles hipervariables, corresponden a aquéllos de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad o substancialmente la totalidad de los Frs (regiones de marco), son aquéllas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, comprenderá también, de una forma opcional, por lo menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc – [del inglés, constant region] -), de una forma típica, aquélla de una inmunoglobulina humana. Para mayores detalles, véase Jones et al., Nature 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323 - 329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593 - 596 (1992). Véase, a dicho efecto, también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105 - 115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035 - 1038 (1995); Hurler y Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428 - 433 (1994); y las patentes estadounidenses US nº 6.982.321 y US nº 7.087.409. Véase también, a dicho efecto, de una forma adicional, van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368 - 74 (2001). Los anticuerpos humanos, pueden también prepararse mediante la administración del antígeno a un animal transgénico, el cual se haya modificado, para producir tales tipos de anticuerpos, como respuesta al reto antigénico, pero, cuyos locus endógenos, se hayan discapacitado, tal como, por ejemplo, xeno-ratones inmunizados (véase, a dicho efecto, por ejemplo, las patentes estadounidenses US nº 6.075.181 y US nº 6.150.584, en cuanto a lo referente a la tecnología de XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557 - 3562 (2006) en cuanto a lo referente a los anticuerpos generados vía la tecnología de los híbrdomas de las células B humanas.

Un "anticuerpo humano", es un anticuerpo, el cual posee una secuencia de aminoácidos, la cual se corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano y / o que se ha realizado mediante la utilización de una cualquiera de las técnicas para la realización de anticuerpos humanos, de la forma que se da a conocer aquí, en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano, excluye, de una forma específica, a un anticuerpo humanizado, el cual comprenda residuos de unión al antígeno, no humanos. Los anticuerpos humanos, pueden producirse mediante la utilización de varias técnicas, las cuales son bien conocidas en el arte especializado de la técnica. En una forma de presentación, el anticuerpo humano, se selecciona de entre la biblioteca de fagos, en donde, dicha librería de fagos, expresa los anticuerpos humanos (véase, a dicho efecto, Vaughan et al. Nature Biotechnology 14: 309 - 314 (1996); Sheets et al. PNAS (USA) 95: 6157 - 6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)). Los anticuerpos humanos, pueden también realizarse procediendo a introducir loci (locus) de inmunoglobulina, en animales transgénicos, tales como, por ejemplo, ratones, en los cuales, los genes de la inmunoglobulina endógena, se han inactivado parcialmente o completamente. En el reto, se observa la producción del anticuerpo, el cual se parece, de una forma muy aproximada, al que se ve en los humanos, en todos sus aspectos, incluyendo la reorganización, el ensamblado y el repertorio del anticuerpo. Este enfoque, se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses US nº 5.545.807; US nº 5.545.806; US nº 5.569.825; US nº 5.625.126; US nº 5.633.425; US nº 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10: 779 - 783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856 - 859 (1994); Morrison, Nature 368: 812 - 13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845 - 51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65 -9 3 (1995). De una forma alternativa, el anticuerpo humano, puede prepararse vía la inmortalización de linfocitos B humanos, los cuales produzcan un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales tipos de linfocitos B, pueden recuperarse a partir de un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana, o éstos pueden haberse inmunizado in vitro). Véase, a dicho efecto, por ejemplo, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, - Anticuerpos monoclonales y terapia contra el cáncer -, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147 (1):86 - 95 (1991); y la patente estadounidense US nº 5.750.373.

El término "variable", se refiere al hecho consistente en que, ciertas porciones de los dominios variables, difieren, de una forma extensiva, en la secuencia, entre los anticuerpos, y se utilizan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular, para su antígeno particular. No obstante, la variabilidad, no se encuentra distribuida de una forma homogénea, a través de los dominios variables de los anticuerpos. Ésta se concentra en tres segmentos, a los cuales se les denomina regiones hipervariables, en ambos dominios, los dominios variables de cadenas ligeras y los dominios variables de cadenas pesadas. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables, se denominan regiones marco (FRs). Los dominios variables de las cadenas nativas pesada y ligera, comprende, cada una de ellas, cuatro FRs, las cuales adoptan, en gran medida, un configuración de hoja beta, conectada por tres regiones hipervariables, las cuales forman bucles, los cuales conectan con la estructura de hojas beta, y en algunos casos forman parte de dicha estructura de hojas beta. Las regiones hipervariables, en cada cadena, se encuentran sostenidas, conjuntamente, en una íntima proximidad con las FRs, y con las regiones hipervariables de la otra

cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno, de los anticuerpos (véase, a dicho efecto, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, - *Secuencias de proteínas, de interés inmunológico* -, 5ª Edición -, Public Health Service, National Institutes of Health, - Servicio de la salud pública, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes, no se encuentran involucrados, de una forma directa, en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero éstos exhiben varias funciones efectoras, tales como las consistentes en la participación de un anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

El término “región hipervariable”, HVR” ó “HV”, cuando se utiliza aquí, en este documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo, los cuales son responsables para la unión al antígeno. Así, por ejemplo, el término región hipervariable (HVR ó HV - [del inglés, hypervariable region] -), se refiere a las regiones de un dominio variable de un anticuerpo, las cuales son hipervariables, en cuanto a lo referente a la secuencia y / o que forman bucles estructuralmente definidos. De una forma general, los anticuerpos, comprenden seis HVRs; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3, exhiben la mayor parte de la diversidad de los seis HVRs, y H3, de una forma particular, se cree que juega un rol interpretativo único en cuanto a conferir una fina especificidad a los anticuerpos. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, Xu et al., *Immunity* 13: 37 - 45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology*, - *Procedimientos en la Biología Molecular* -, 248 : 1 - 25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos camélidos de origen natural, consistentes en una cadena pesada, sólo son funcionales y estables, en ausencia de una cadena ligera. Véase a dicho efecto, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363: 446 - 448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3: 733 - 736 (1996).

Aquí, en este documento, se encuentran en uso y se abarcan un gran número de delineaciones HVR. Las Regiones de determinación de complementariedad de Rabat (CDRs, - [del inglés, Kabat Complementarity Determining Regions, se basan en la variabilidad de secuencia, y son las más usualmente utilizadas, (véase, a dicho efecto, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, - *Secuencias de proteínas de interés inmunológico*, 5ª Edición, Public Health Service, National Institutes of Health, - Servicio de la Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud -, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, se refiere, en cambio, a la localización de los bucles estructurales (véase, a dicho efecto, Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196: 901 - 917 (1987)). Los HVRs AbM, representan un compromiso entre los HVRs de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se utilizan mediante el sistema de software informático de modelación de anticuerpos AbM moleculares de Oxford (Oxford Molecular's AbM antibody modeling software). Los HVRs de “contacto”, se basan en el análisis de las estructuras de cristales complejas, disponibles. Los residuos de cada una de estas HVRs, se anotan abajo, a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Denominación de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Denominación de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Los HVRs, pueden comprender “HVRs” extendidas, de la siguiente forma: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 ó 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, ó 95-102 (H3) en la VH. Los residuos de dominios variables, se numeran en concordancia con Kabat et al., (mencionados anteriormente, arriba) para cada una de estas definiciones.

Residuos de la “región marco” o residuos “FR”, son aquéllos residuos de los dominios variables, distintos que los correspondientes a los residuos de la región hipervariable, tal y como se definen aquí, en este documento.

El término (numeración de residuos de un dominio variable, como en Kabat”, o “numeración de la posición de aminoácidos, como en Kabat”, y variaciones de éstos términos, se refieren al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligeras, de la recopilación de anticuerpos en Kabat et al. mencionado anteriormente, arriba. Mediante la utilización de este sistema de numeración, la secuencia lineal de aminoácidos, efectiva, puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales, correspondientes a un recorte de una FR ó HVR, del dominio variable, o a una inserción de una variable, del dominio variable en cuestión. Así, por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada, puede incluir una inserción de aminoácidos individual (residuo 52a, en concordancia con Kabat), después del residuo 52 de H2, y residuos insertados (tales como, por ejemplo, los residuos 82a, 82b, y 82C, etc., en concordancia con Kabat), después de residuo 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de los residuos, puede determinarse para un anticuerpo dado, mediante el alineamiento en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo, con una secuencia numerada según Kabat, del tipo “estándar”.

Durante la totalidad de la presente especificación, se utiliza, de una forma general, el sistema de numeración de Kabat, cuando se hace referencia a un residuo, en el dominio variable (aproximadamente, residuos 1 - 107, de la

cadena ligera, y residuos 1 – 113, de la cadena pesada)(véase, a dicho efecto, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest., - Secuencias de interés inmunológico -, 5ª Edición, Public Health Service, National Institutes of Health, - Servicio de la Salud Pública, Institutos nacionales de la Salud -, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" ó "Índice EU", se utiliza, de una forma general, cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU, reportado por Kabat et al., Sequences of Immunological Interest., - Secuencias de proteínas de interés inmunológico -, 5ª Edición, Public Health Service, National Institutes of Health, - Servicio de la Salud Pública, Institutos nacionales de la Salud -, Bethesda, Md. (1991)). A menos de que se indique de otra forma, aquí, en este documento, la referencias a los números de residuos en el dominio constante de anticuerpos, significa una numeración de residuos por el sistema de numeración EU (para mayores detalles, véase, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense US nº 2998 / 0 181 888, en la cual se reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense nº 60 / 640.323).

En dependencia de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas), pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases mayores de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y algunas de entre éstas, pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), tales como, por ejemplo, IgG1 (incluyendo a los alotipos no A y A), IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada, los cuales corresponden a la diferentes clases de inmunoglobulinas, de denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras y las configuraciones tridimensionales de las subunidades, de diferentes clases de inmunoglobulinas, se conocen bien, en el arte especializado de la técnica, y éstas se describen, de una forma general, en por ejemplo, Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, - Inmunología celular y molecular -, 4ª Edición (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo, puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por una asociación covalente o no covalente del anticuerpo, con una o más proteínas o péptidos adicionales distintos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) procedentes de cualquier tipo de especie de vertebrados, pueden asignarse a uno o más tipos, claramente distintos, denominados kappa (κ) y lamda (λ), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

El término "región Fc", se utiliza aquí, en este documento, para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, la cual puede generarse mediante la digestión de papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc, puede ser una región Fc de secuencia nativa, o una variante de la región Fc, de secuencia nativa. Si bien es verdad que, la delimitación de la región Fc, se define, de una forma usual, como una cadena pesada de inmunoglobulina, puede variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana, se define, como extendiéndose a partir de un residuo de aminoácidos, en aproximadamente la posición Cys226, ó a partir de aproximadamente la posición Pro230, al término carboxilo de la región Fc. La lisina C-terminal (residuo 447, en concordancia con el sistema de numeración EU), o de la región Fc, puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo. o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica a una cadena pesada del anticuerpo. Correspondientemente en concordancia, una composición de anticuerpos intactos, puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos k477 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin residuos k447 eliminados, y poblaciones de anticuerpos que tengan una estructura mezclada de anticuerpos con el residuo 447 eliminado o no eliminado. La región Fc de una inmunoglobulina, comprende, de una forma general, dos dominios constantes, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} , y de una forma opcional, comprende un dominio C_{H4} .

A menos de que se indique de otro modo, aquí, en este documento, la numeración de los residuos, en una cadena pesada de inmunoglobulina, es la numeración correspondiente al índice EU, tal y como se da a conocer y se establece en Kabat et al., mencionados anteriormente, arriba. El "índice como en Kabat", se refiere a la numeración de residuos, del anticuerpo IgG1 humano, EU.

Mediante "cadena de la región Fc", aquí, en este documento, se pretende dar a entender una de las dos cadenas polipeptidas de la región Fc.

El "dominio C_{H2} " de la región Fc de la IgG humana (al cual se le hace también referencia como dominio "Cg2"), se extiende, de una forma usual, desde el residuo de aminoácidos a aproximadamente la posición 231, al residuo de aminoácidos a aproximadamente la posición 340. El dominio C_{H2} , es único, debido al hecho de que, éste no se encuentra íntimamente emparejado con otro dominio. En lugar de ello, dos cadenas de hidratos de carbono unidas en N, se encuentran interpuestas entre los dominios C_{H2} , de una molécula de IgG nativa, intacta. Se ha especulado con el hecho de que, el hidrato de carbono, puede proporcionar un sustituto para el emparejado dominio – dominio, y ayudar a estabilizar el dominio C_{H2} . Burton, *Molec. Immunol.* 22: 161 - 206 (1985). El dominio C_{H2} el cual se menciona aquí, en este documento, puede ser un domino C_{H2} de secuencia nativa, o una variante del dominio C_{H2} de secuencia nativa.

El domino " C_{H3} ", comprende la extensión de los residuos C-terminal al a un dominio C_{H2} , en una región Fc (a saber, un residuo de aminoácidos, en aproximadamente la posición 341, a un residuo de aminoácidos en aproximadamente la posición 447, de una IgG). La región C_{H3} , aquí referenciada, puede ser un dominio C_{H3} de secuencia nativa, o una variante de un dominio C_{H3} de secuencia negativa (tal como, por ejemplo, un dominio C_{H3} , con una

“protuberancia” introducida en una secuencia de éste, y una correspondiente “cavidad” introducida en otra cadena de éste; véase, a dicho efecto, la patente estadounidense US nº 5.821.333). Tales tipos de variantes de dominios de C_H3, pueden utilizarse para realizar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos), tal y como se describen aquí, en este documento.

“Región bisagra”, se define, de una forma general, como la extensión, desde aproximadamente Glu216, ó aproximadamente Cys226, hasta aproximadamente Pro230 de la IgG1 humana (véase, a dicho efecto, Burton, Molec. Immunol. 22: 161 - 206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos IgG, pueden alinearse con la secuencia IgG1, procediendo a emplazar el primer residuo y el último residuo de la cisteína, que forman los enlaces S – S intercadena pesada, en las mismas posiciones. Las regiones bisagra aquí referenciadas, pueden ser una región bisagra de secuencia nativa, o una variante de la región bisagra de la secuencia nativa. Las dos cadenas de polipéptidos de una variante de la región bisagra, de una forma general, retiene por lo menos un residuo de cisteína, por cadena de polipéptido, de tal forma que, dos cadenas de polipéptido de la variante de la región bisagra, puedan formar un enlace de disulfuro entre las dos cadenas. La región bisagra preferida, aquí, en este documento, es una región bisagra, humana, de secuencia nativa, tal como, por ejemplo, una región bisagra, de IgG1, humana, de secuencia nativa.

Una “región Fc funcional”, posee por lo menos una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. Las “funciones efectoras” ejemplares, incluyen a la C1q de unión a: la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); al receptor de unión a: la citotoxicidad mediatizada por células dependientes del anticuerpo (ADCC); la fagocitosis; la infra-regulación de los receptores de la superficie celular (tales como, por ejemplo, el receptor de células B; BCR), etc. Tales tipos de funciones efectoras, requieren, de una forma general, el que la región Fc, se combine con un dominio de unión (tal como, por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo), y puede valorarse, mediante la utilización de varios ensayos conocidos en el arte de la técnica especializada, para evaluar tales tipos de funciones efectoras de anticuerpos.

Una “región Fc de secuencia nativa”, comprende una secuencia de aminoácidos, idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc, encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa, incluyen a la región Fc de la IgG1 humana, de secuencia nativa (alotipos no A y alotipos A); a la región IgG2, humana, de secuencia nativa; a la región IgG3, humana, de secuencia nativa; a la región IgG4, humana, de secuencia nativa; así como, también, a las variantes de éstas, de origen natural.

Una “variante de la región Fc”, comprende una secuencia de aminoácidos, la cual difiere de la de una región Fc de secuencia nativa, en virtud de por lo menos una modificación de aminoácidos. En ciertas formas de presentación, la variante de la región Fc, tiene por lo menos una sustitución de aminoácidos, en comparación con una región Fc de secuencia nativa, o con una región Fc de un polipéptido progenitor, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y, de una forma preferible, de aproximadamente una sustitución de aminoácidos a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos, en una región Fc de secuencia nativa, o en la región Fc de un polipéptido progenitor, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y, de una forma preferible, de aproximadamente una sustitución de aminoácidos a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos, en una región Fc de secuencia nativa, o en la región Fc del polipéptido progenitor. La variante de la región Fc, posee, de una forma típica, por ejemplo, por lo menos un porcentaje de aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, con un región Fc de secuencia nativa, y / o con una región Fc de un polipéptido progenitor, o de por lo menos un porcentaje del 90 % de identidad de secuencia, con ésta, o de por lo menos un porcentaje de aproximadamente un 95 % de identidad de la secuencia, o más, con ésta.

“Funciones efectoras” del anticuerpo, se refiere a aquéllas actividades biológicas atribuibles a la región Fc, (una región Fc de secuencia nativa o una variante de una región secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y puede variar, con el isótopo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de los anticuerpos, incluyen a: la unión a la C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC – [del inglés, complement dependent cytotoxicity] -); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediatizada por células y dependiente del anticuerpo (ADCC – [del inglés, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity] -); fagocitosis; infra-regulación de los receptores de la superficie celular (tales como, por ejemplo, el receptor de las células B); y la activación de las células B.

“Citotoxicidad mediatizada por células y dependiente del anticuerpo” o “ADCC”, se refiere a una forma de citotoxicidad, en la cual, la Ig secretada, enlazada a los receptores Fc (FcRs), presentes ciertas células citotóxicas (tales como, por ejemplo, las células naturales asesinas (NK – [del inglés Natural Killer cells] -), la neutrófilos, y los macrófagos), posibilitan el que estas células efectoras citotóxicas, se unan, de una forma específica, a una célula diana que porta el antígeno, y subsiguiente, maten a la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediatizar en la citotoxicidad, la células NK, expresan únicamente el FcγRIII, mientras que, el los monolitos, expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR, en las células hematopoyéticas, se encuentra recopilada en la Tabla 3, localizada en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457 - 92 (1991). Con objeto de valorar la actividad DDCC de la molécula de interés, puede llevarse a cabo un ensayo de ADCC, tal como el que se describe en las patentes estadounidenses US nº 5.500.362 ó US nº 5.821.337. Las células efectoras de utilidad, para tales tipos de ensayos, incluyen a las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC – del

inglés, Peripheral blood mononuclear cells] y a las células asesinas (NK). De una forma alternativa, o de una forma adicional, la actividad ADCC de una molécula de interés, puede valorarse in vivo, tale como, por ejemplo, en un modelo animal, tal y como el que se da a conocer en Clynes et al. PNAS (USA) 95: 652 - 656 (1998).

5 Las “células efectoras humanas”, son leucocitos, los cuales expresan una o más FcRs, y realizan funciones efectoras. En ciertas formas de presentación, las células, expresan por lo menos el FcγRIII y realizan funciones efectoras. En ciertas formas de presentación, las células, expresan por lo menos el FcγRIII y realizan funciones efectoras. En ciertas formas de presentación, las células, expresan por lo menos el FcγRIII y realizan funciones efectoras. Los ejemplos de leucocitos humanos los cuales mediatizan la ADCC, incluyen a las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), a las células asesinas naturales (NK), a los monolitos, a las células C citotóxicas, y a los neutrófilos; prefiriéndose, de una forma general, las PBMCs y las células NK. Las células efectoras, pueden aislarse de su fuente nativa, tal como, por ejemplo, de la sangre o de las PBMCs, de la forma que se describe aquí, en este documento.

15 “Receptor Fc” o “FcR”, describe un receptor el cual se une o enlaza a la región Fc de un anticuerpo. En algunas formas de presentación, un FcR, es un FcR humano. En algunas forma de presentación, un FcR, es un Frc el cual se une o enlaza a un anticuerpo IgG (un receptor gamma), e incluyen a los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo a las variables alélicas, y de una forma alternativa, a las formas unidas o empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII, incluyen a los receptores FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), los cuales tienen unas secuencias de aminoácidos similares, y secuencias que difieren, de una forma primaria, en los dominios citoplásmicos de éstas. El receptor activador FcγRIIA, contiene una formación inmunorreceptora de activación a base de tirosina (ITAM – [del inglés, immunoreceptor tyrosine-based activation motif-]), en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB, contiene una formación inmunorreceptora de inhibición a base de tirosina (ITIM – [del inglés, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-]), en su dominio citoplásmico (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Dacron. Annu. Rev. Immunol. 15: 203 - 234 (1997)). Los FcRs, se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457 - 92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25- 34 (1994); y en Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330 - 41 (1995). Otros FcRs, incluyendo a aquéllos que se identificarán en el futuro, se abarcan, aquí, en este documento, mediante el término “RcR”.

30 El término “receptor Fc”, o “FcR”, incluye así mismo, también, al receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable para la transferencia de las IgGs maternas, al feto (véase, a dicho efecto, Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), y para la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Los procedimientos para mediar la unión al FcRn, son conocidos, en el arte de la técnica especializada (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Ghetie y Ward., Immunol. Today 18(12): 592 - 598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7): 637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); la patente internacional WO 2004 / 92 219 (Hinton et al.).

40 La unión a un FcRn humano, in vivo, y la vida media en suero, de los polipéptidos de unión de la alta afinidad al FcRn humano, puede valorarse, por ejemplo, en los ratones transgénicos o las líneas de células humanas transfectadas, las cuales expresan el FcRn humano, o en primates, a los cuales se les administra una variante de la región Fc. La patente internacional WO 2000 / 42 072 (concedida a Presta) describe variantes de anticuerpos, con una unión o enlace mejorada o disminuida a la FcRs. Véase también, a dicho efecto, por ejemplo, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591 - 6604 (2001).

45 La “citotoxicidad dependiente del complemento” ó “CDC”, se refiere a la lisis de una célula diana, en presencia de un complemento. La activación de una trayectoria de complemento clásica, se inicia mediante la unión del primer componente de sistema de complemento (C1q), a anticuerpos (de la subclase apropiada), los cuales se encuentran unidos a su antígeno cognado. Con objeto de valorar la activación del complemento, puede procederse a llevar a cabo un ensayo de CDC, tal como, por ejemplo, el que se describe en Gazzano – Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996). La variantes de polipéptidos con las secuencias de aminoácidos modificadas de la región Fc (polipéptidos con una variante de la región Fc), y una capacidad de unión al C1q, aumentada o disminuida, se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense US nº 6.194.551 B1 y en la patente internacional 1999 / 51642. Véase, también, por ejemplo, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178 - 4184 (2000).

55 Un anticuerpo de “afinidad madura”, es un anticuerpo con una o más modificaciones en uno o más CDRs de éste, lo cual tiene como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con anticuerpo progenitor, el cual no posee dicha(s) alteración o alteraciones. En una forma de presentación, un anticuerpo de afinidad madura, tiene una afinidad correspondiente a valores nanomolares, o incluso a valores picomolares, para el antígeno diana. Los antígeno de afinidad madura, se producen mediante procedimientos, los cuales son conocidos en el arte de la técnica especializada. Marks et al. Bio / Technology 10: 779 – 783 (1992), describen la maduración de la afinidad, mediante el entremezclado de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de la CDR y / o residuos de la estructura, se describe por parte de: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809 - 3813 (1994); Schier et al. Gene 169: 147 – 155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155: 1994 - 2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7): 3310 - 9 (1995); y Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226: 889 - 896 (1992).

65 Un “sitio funcional de unión al antígeno”, de un anticuerpo, es un sitio de unión al antígeno, el cual es capaz unirse o

enlazar a un antígeno diana. La afinidad de unión al antígeno, de un sitio de unión al antígeno, no es, de una forma necesaria, tan fuerte como la del antígeno progenitor, del cual se deriva el sitio de unión al antígeno, pero, la capacidad de unirse a al antígeno, debe ser susceptible de poderse medir, mediante la utilización de uno de más procedimientos conocidos, para evaluar la unión de un anticuerpo a un antígeno. De una forma adicional, la afinidad de unión al antígeno, de cada uno de los sitios de unión al antígeno, de un anticuerpo monovalente, aquí referenciado, no necesita ser el mismo, de una forma cuantitativa. Para los anticuerpos multiméricos aquí representados, el número de sitios funcionales de unión de antígeno, puede evaluarse mediante la utilización de un análisis de ultracentrifugación. En concordancia con este procedimiento de análisis, se combinan diferentes factores de relación del antígeno diana, con respecto al anticuerpo multimérico, y se procede a calcular el peso medio molecular de los complejos, asumiendo diferentes números de sitios funcionales de unión. Estos valores teóricos, se comparan con los valores experimentales efectivos obtenidos, con objeto de evaluar el número de sitios funcionales de unión.

Una anticuerpo que tiene una "característica biológica", de un anticuerpo designado, es un anticuerpo, el cual posee una o más características biológica de dicho anticuerpo, las cuales lo distinguen con respecto a otros anticuerpos, los cuales se unen al mismo antígeno.

Con objeto de filtrar los anticuerpos los cuales se unen a un epítipo, o a un antígeno, unidos por una anticuerpo de interés, se procede a llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado, de rutina, tal como el que se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual, - Anticuerpos, Un manual de laboratorio -*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

El término "antagonista", cuando se utiliza aquí, en este documento, se refiere a una molécula capaz de neutralizar, de bloquear, de inhibir, de derogar, o de interferir con, las actividades de una proteína de la invención, incluyendo su enlace o unión a uno o más receptores, en el caso de un ligando o el enlace o unión a uno o más ligandos, en el caso de un receptor. Los antagonistas, incluyen a los anticuerpos y a los fragmentos de éstos de unión al antígeno, a la proteínas, a los péptidos, a las glicoproteínas, a los glicolípidos, a los polisacáridos, a los oligosacáridos, a los ácidos nucleicos, a las moléculas bioorgánicas, a los péptidomiméticos, a los agentes farmacológicos, a sus metabolitos, a las secuencias de control transcripcionales y de translación, y por el estilo. Los antagonistas, incluyen así mismo, también, a los inhibidores de moléculas finas, de una proteína de la invención, y a las proteínas de fusión, a las moléculas receptoras y derivados, los cuales se unen, de una forma específica, a la proteína, secuestrando, con ello, su unión a su diana, a las variantes de los antagonistas de la proteína, a las moléculas antisentido, dirigidas a una proteína de la invención, a los aptámeros de RNA, y a las ribozimas, contra una proteína de la invención.

Un anticuerpo "bloqueante", de un "antagonista", es un anticuerpo, el cual inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que éste se une. Ciertos tipos de anticuerpos bloqueantes (o de bloqueo) o anticuerpos antagonistas bloqueantes (o de bloqueo), inhiben, de una forma substancial o de una forma completa, la actividad biológica del antígeno.

Los términos "VEGF" y "VEGF-A", se utilizan aquí, en este documento, de una forma intercambiable, para hacer referencia al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares, de 165 aminoácidos, y a los factores de 121-, 145-, 183-, 189-, y 206 aminoácidos, tal y como se describe por parte de Leung et al. *Science*, 246:1306 (1989), Houck et al. *Mol. Endocrin.*, 5: 1806 (1991), y Robinson & Stringer, *Journal of Cell Science*, 144(5): 853 - 865 (2001), conjuntamente con las formas alélicas de origen natural, y la formas procesadas de éstas. El VEGF-A, forma parte de una familia de genes, la cual incluye a los VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, y P1GF. El VEGF-A, se une, de una forma primaria a los receptores de tirosina quinasas de alta afinidad, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR), siendo, éste último, el transmisor mayor de las señales mitogénicas celulares del endotelio vascular del VEGF-A. El término "VEGF" ó "VEGFA", se refiere, también a los VEGFs de especies no humanas, tales como las correspondientes a los ratones, las ratas o los primates. Algunas veces, el VEGF de una especie específica, se indica en términos tales como hVEGF, para la VEGF humana, ó mVEGF para la VEGF murina. El término "VEGF", se utiliza, también, para referirse a formas truncadas do fragmentos del polipéptido, las cuales comprenden los aminoácidos 8 a 109 ó 1 a 109, del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares, de 165 aminoácidos. Las posiciones de aminoácidos, para un VEGF nativo "truncado", se numeran de la forma que se indica en la secuencia de de VEGF nativa. Así, por ejemplo, la posición de aminoácidos 17 (metionina), en el VEGF nativo, truncado, es también la posición 1 (metionina), en el VEGF nativo. El VEGF nativo, truncado, tiene una afinidad de unión, para los receptores KDR y Flt-1, comparable a del VEGF nativo.

Un "antagonista de VEGF", se refiere a una molécula (peptídica o no peptídica) capaz de neutralizar, de bloquear, de inhibir, de derogar, de reducir o de interferir con, las actividades del VEGF, incluyendo su unión a uno o más receptores del VEGF. Los antagonistas del VEGF, incluyen a los anticuerpos anti-VEGF, y los fragmentos de unión al antígeno, de éstos, a las moléculas receptoras y a sus derivados, las cuales se unen, de una de una forma específica al VEGF, secuestrando, con ello, su unión o enlace a uno o más receptores (tales como, por ejemplo, proteínas receptoras de VEGF, solubles, ó fragmentos de éstas, de unión al VEGF, o proteínas receptoras de VEGF quimérico), los anticuerpos anti-receptores de VEGF, y la antagonistas de anti-receptores de VEGF, tales como los

inhibidores de molécula pequeña de las tirosina quinasas de VEGFR, y las proteínas de fusión, tal como, por ejemplo, las consistentes en la VEGF-Trap (Regeneron), VEGF₁₂₁-gelonina (Peregine). Los antagonistas del VEGF, incluyen, también, a las variantes de antagonistas del VEGF, a las moléculas antisentido, dirigidas al VEGF, a los aptámeros de RNA, y las ribozimas, contra los VEGF o los receptores de VEGF. Los antagonistas del VEGF los cuales son de utilidad en los procedimientos de la presente invención, incluyen, de una forma adicional, a los compuestos peptídicos o no peptídicos, los cuales se unen o enlazan, de una forma específica, al VEGF, tales como los anticuerpos anti-VEGF, y a los fragmentos de éstos, de unión al antígeno, los polipéptidos, o fragmentos de éstos, los cuales se unen, de una forma específica, al VEGF; los oligómeros de nucleobase complementarios a por lo menos un fragmento de una molécula de ácido nucleico, que codifica a un polipéptido de VEGF; ribozimas que tienen como diana el VEGF; los pepticuerpos para el VEGF; y los aptámeros de VEGF. En una forma de presentación, el antagonista del VEGF, reduce o inhibe, mediante un porcentaje de por lo menos un 10%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, ó más el nivel de expresión o la actividad biológica del VEGF. En otra forma de presentación, el VEGF, inhibido por el antagonista del VEGF, es el VEGF (8 - 109), el VEGF (1 - 109), ó el VEGF₁₆₅.

El término "anticuerpo anti-VEGF", o un "anticuerpo que se une a al VEGF", se refiere a un anticuerpo, el cual es capaz de unirse a la VEGF, con una suficiente afinidad y especificidad que, el anticuerpo, sea de utilidad como un agente de diagnóstico y / o terapéutico, en la objetivización de VEGF, como diana. Así, por ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF de la presente invención, puede utilizarse como un agente terapéutico, en la objetivización de enfermedades o condiciones, como diana, e interferir con éstas, en donde, se encuentra involucrada la actividad del VEGF. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, las patentes US nº 6.582.959, y US nº 6.703.020; las patentes internacionales WO 98 / 45 332; WO 96 / 30 046; WO 94 / 10 202, y WO 2005 / 044 853; la patente europea EP 0 666 868 B1; y las solicitudes de patente estadounidense US - A 2003 0 206 899, US - A 200 30 190 317, US - A 2003 0 203 409, US - A 2005 0 112 126, US - A 2005 0 186 208, y US - A 2005 0 112 126; Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288: 149 - 164 (2004); y la patente internacional WO 2005 012 359. El anticuerpo seleccionado, tendrá, normalmente, una afinidad de unión, lo suficientemente fuerte, al VEGF. Así, por ejemplo, el anticuerpo, puede unirse a la hVEGF, con un valor de K_d, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 100 nM - 1 pM. Las afinidades del anticuerpo, pueden determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo a base de resonancia plasmónica de superficie (tales como los consistentes en el ensayo de BIAcore, de la forma que se describe en el documento de prioridad PCT de la solicitud de publicación de patente internacional No. WO 2005 / 012 359); el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y los ensayos de competición (tales como, por ejemplo, el RIA's). El anticuerpo, puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, como, por ejemplo, con objeto de evaluar su efectividad como un agente terapéutico. Tales tipos de ensayos, son conocidos, en el arte especializado de la técnica, y dependen del antígeno objetivizado como diana, y del uso que se pretende para el anticuerpo. Los ejemplos, incluyen al ensayo de inhibición de HUVEC (HUVEC - del inglés, Human Umbilical Vein Endothelial Cells - [células endoteliales de la vena del cordón umbilical, humano] -); ensayos de inhibición del crecimiento de las células tumorales (según se describe en la patente internacional WO 89 / 06 692, por ejemplo); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) y de citotoxicidad mediatizada por complementos (CDC)(véase, a dicho efecto, la patente estadounidense US nº 5.500.362); y los ensayos de actividad agonista o de hematopoyesis (véase, a dicho efecto, la patente internacional WO 95 / 27 062). Un anticuerpo anti-VEGF, no se unirá, de una forma usual a otros homólogos de VEGF, tales como los consistentes en los VEGF-B, VEGF-C, VEGFD, ó VEGF-E, ni tampoco a otros factores de crecimiento, tales como los consistentes en los P1GF, PDGF ó bFGF. En una forma de presentación, los anticuerpos anti-VEGF, incluyen a los anticuerpos monoclonales, los cuales se unen al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1, producido por el hibridoma ATCC HB 10709; Un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado, recombinante (véase, a dicho efecto, Presta et al. (1997) Cancer Res. 57: 4593 - 4599), incluyendo, pero no de una forma limitativa en cuenta a éste, al anticuerpo conocidos como "bevacizumab (BV)", también conocidos como "rumba VEGF" o como "AVASTIN™." El producto AVASTIN™, se encuentra, en el momento presente, comercialmente disponible en el Mercado. El Bevacizumab, comprende regiones marco de la IgG1 humana, mutadas y regiones de determinación de la complementariedad, de unión al antígeno, procedentes del anticuerpo murino A.4.6.1, que bloquea la unión del VEGF humano, a sus receptores. Aproximadamente un porcentaje del 93 % de la secuencia de aminoácidos del bevacizumab, incluyendo a la mayor parte de las regiones marco, se deriva de la IgG1 humana, y aproximadamente un porcentaje del 7 % de la secuencia, se deriva del A461. El bevacizumab, tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 daltons, y ésta se encuentra glicosilada. El bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados, se describen, de una forma adicional, en la patente estadounidense US nº 6.884.879, registrada en fecha 26 de Febrero del 2005. Anticuerpos anti-VEGF adicionales, incluyen a las series de anticuerpos G6 ó B20 (tales como, por ejemplo, las series de anticuerpos consistentes en las G6-23, G6-31, B20-4.1), tal y como se describe en el documento de prioridad PCT de la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 2005 / 012 359. Para anticuerpos adicionales preferidos, véanse las patentes estadounidenses US nº 7.060.269, US nº 6.582.959, US nº 6.703.020; US nº 6.054.297; las patentes internacionales WO 98 / 45 332; WO 96 / 30 046; WO 94 / 10 202; la patente europea EP 0 666 868 B1; y las solicitudes de patente estadounidenses US nº 2006 009 360, US nº 2005 018 6208, US nº 2003 0 206 899, US nº 2003 0 190 317, US nº 2003 0 203 409, y US nº 2005 0 112 126; y Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288: 149 - 164 (2004).

El término "polipéptido de la serie B20), tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a un polipéptido,

que incluye a un anticuerpo que se une a la VEGF. Los polipéptidos de la serie B20, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los anticuerpos derivados de una secuencia de un anticuerpo B20, ó de un anticuerpo derivado del B20, el cual se describe en la publicación de patente estadounidense US nº 2006 0 280 747, en la publicación de patente estadounidense US nº 2007 0 141 065 y / o en la publicación de patente estadounidense US nº 2007 0 020 267. En una forma de presentación, el polipéptido de las serie B20, es el B20-4.1, según se describe en la en la publicación de patente estadounidense US nº 2006 0 280 747, en la publicación de patente estadounidense US nº 2007 0 141 065, y / o en la publicación de patente estadounidense US nº 2007 0 020 267. En otra forma de presentación, el polipéptido de la serie B20, es el B20-4.1.1, el cual se describe en el documento de prioridad PCT de la publicación de patente internacional WO 2009 / 073 160.

El término "polipéptido de la serie G6", tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a un polipéptido, el cual incluye a un anticuerpo que se une a la VEGF. Los polipéptidos de la serie G6, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los anticuerpos derivados de una secuencia de un anticuerpo G6, ó de un anticuerpo derivado del G6, el cual se describe en la publicación de patente estadounidense US nº 2006 0 280 747, en la publicación de patente estadounidense US nº 2007 0 141 065 y / o en la publicación de patente estadounidense US nº 2007 0 020 267. Los polipéptidos de la serie G6, de la forma que éstos se describen en la publicación de patente estadounidense US nº 2006 0 280 747, en la publicación de patente estadounidense US nº 2007 0 141 065, y / o en la publicación de patente estadounidense US nº 2007 0 020 267, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuento a éstas, a los G6-8, G6-23 y G6-31.

El término "bFGF", también conocido como "FGF2", "FGF- β " ó "factor de crecimiento de fibroblastos, básico", es un miembro de la familia de los factores de crecimiento de los fibroblastos, codificado por un gen localizado en la rama corta del cromosoma 4. El término bFGF, tal y como se utiliza aquí, en este documento, incluye a un polipéptido de bFGF, y variantes del bFGF. El factor de crecimiento de fibroblastos, básico (bFGF), es un polipéptido de unión a la heparina, soluble. El bFGF, se une también, a un receptor denominado FGFR-1 (Flg). El bFGF, tiene un efecto mitogénico, en las células endoteliales, y es un potente inductor de la angiogénesis. La producción de paracrina del bFGF, en las células tumorales, según se ha reportado, se encuentra asociado con un cambio angiogénico del desarrollo tumoral (véase, a dicho efecto, Kandel, J., et al., Cell, 1991. 66(6): páginas 1095 - 104). Más allá de su efecto independiente en las células endoteliales, el bFGF, actúa, también, de una forma sinérgica con el VEGF, en cuanto a lo referente inducir la angiogénesis (véase, a dicho efecto, Asahara, T., et al., Circulation, 1995. 92(9 Supl.): páginas 11365 - 71).

El bFGF de secuencia nativa, comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la del bFGF derivado de la naturaleza, independientemente de su modo de preparación. Así, de este modo, el bFGF de secuencia nativa, pueden tener una secuencia de aminoácidos de un bFGF humano, de origen natural, de un bFGF murino, de origen natural, o de un bFGF de cualesquiera otras especies de mamíferos, de origen natural. Las secuencias del bFGF humanos, se dan también a conocer (SEQ ID NOs: 1 a 5). Tal tipo de bFGF de secuencia nativa, puede aislarse de la naturaleza, o puede producirse por medios recombinantes y / o sintéticos. El término bFGF de secuencia nativa, abarca, de una forma específica, a las formas prepro, pro y maduras, de origen natural y a las formas truncadas del bFGF, de origen natural, a las formas variables de origen natural (por ejemplo, las formas unidas o empalmadas de una forma alternativa), y la variantes alélicas de origen natural.

Las variantes del bFGF, son polipéptidos de bFGF biológicamente activos, los cuales tienen una secuencia de aminoácidos, la cual difiere de la secuencia de un polipéptido de bFGF de secuencia nativa, en virtud de una inserción, de una supresión, de una modificación, y / o de una sustitución de uno o más residuos de aminoácidos, en la secuencia nativa. Las variantes del bFGF, tienen, de una forma general, un porcentaje de menos de un 100% de identidad de secuencia, con un bFGF de secuencia nativa. De una forma habitual, no obstante, una variante de bFGF biológicamente activa, tendrá una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de por lo menos un porcentaje de aproximadamente un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, o aproximadamente un 99%. Las variantes del bFGF, incluyen a los fragmentos péptidos de por lo menos 5 aminoácidos, los cuales retienen una actividad biológica del correspondiente polipéptido de bFGF de secuencia nativa. La variantes del bFGF, incluyen así mismo, también, a polipéptidos de bFGF, en donde, se añaden uno o más residuos de aminoácidos, al término N-terminal ó C-terminal, o dentro de la secuencia de bFGF nativa. Las variantes del bFGF, incluyen así mismo, también, a polipéptidos de bFGF, en donde, un número determinado número de residuos de aminoácidos, se encuentran suprimidos y, de una forma opcional, sustituidos, por uno o más residuos de aminoácidos.

El término "antagonista de bFGF", cuando se utiliza aquí, en este documento, se refiere a una molécula, la cual se une a la bFGF, e inhibe o, de una forma substancial, reduce, una actividad biológica del bFGF. Los ejemplos no limitativos de los antagonistas de bFGF, incluye a los anticuerpos, a las proteínas, a los péptidos, a las glicoproteínas, a los glicopéptidos, a los glicolípidos, a los polisacáridos, a los oligosacáridos, a los ácidos nucleicos, a las moléculas bioorgánicas, a los peptidomiméticos, a los agentes farmacológicos, y a sus metabolitos, a las secuencias de control transcripcional y de traducción, y por el estilo. En una forma de presentación de la invención, el antagonista del bFGF, es un anticuerpo, de una forma especial, una anticuerpo anti-bFGF, el cual se une o enlaza al bFGF humano.

El término “actividad biológica” y “biológicamente activo”, con respecto a un polipéptido, se refiere a la capacidad de una molécula, para unirse, de una forma específica, a las respuestas celulares, y para regularlas, tal como, por ejemplo, la proliferación, la migración, etc. Las respuestas celulares, incluyen así mismo, también, a aquéllas mediatizadas mediante un receptor, incluyendo, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstas, a la migración y / o a la proliferación. En este contexto, el término “modular”, incluye a ambos, la promoción y la inhibición.

“Actividad biológica del VEGF”, incluye a la unión a cualquier receptor del VEGF, o cualquier actividad de señalización del VEGF, tal como la regulación de ambas, la angiogénesis normal o anormal, y la vasculogénesis (véase, a dicho efecto, Ferrara y Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18: 4-25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77: 527-543); la estimulación de la vasculogénesis y la angiogénesis embrionica (véase, a dicho efecto, Carmeliet et al. (1996) *Nature* 380: 435-439; Ferrara et al. (1996) *Nature* 380: 439-442); y la modulación de la proliferación cíclica de los vasos sanguíneos en el tracto reproductor femenino, y para el crecimiento óseo y la formación de los cartílagos (véase, a dicho efecto, Ferrara et al. (1998) *Nature Med.* 4: 336-340; Gerber et al. (1999) *Nature Med.* 5: 623-628). Adicionalmente a ser un factor angiogénico en la angiogénesis y la vasculogénesis, el VEGF, como factor pleiotrópico, exhiben múltiples efectos biológicos en otros procesos fisiológicos, tales como los consistentes en la supervivencia de las células endoteliales, la permeabilidad y la vasodilatación de los vasos, la quimiotaxis de monocitos y el influjo del calcio (véase, a dicho efecto, Ferrara y Davis-Smyth (1997), citados anteriormente, arriba, y Cebe-Suarez et al. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 601-615 (2006)). Adicionalmente, además, estudios recientemente realizados, han reportado los efectos mitogénicos del VEGF, en algunos pocos tipos de células no endoteliales, tales como las consistentes en las células epiteliales pigmentarias de la retina, en las células del conducto pancreático, y en las células de Schwann. Véase, a dicho efecto, Guerrin et al. (1995) *J. Cell Physiol.* 164: 385-394; Oberg-Welsh et al. (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* 126: 125-132; Sondell et al. (1999) *J. Neurosci.* 19: 5731-5740.

El factor o agente angiogénico, es un factor de crecimiento, el cual estimula el desarrollo de los vasos sanguíneos, por ejemplo, estimula la angiogénesis, el crecimiento de las células endoteliales, la estabilidad de los vasos sanguíneos, y / o la vasculogénesis, etc. Así, por ejemplo, los factores angiogénicos, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a, por ejemplo, el VEGF y a los miembros de la familia de los VEGF, a la familia de los PDGF, a la familia de los factores de crecimiento del fibroblasto (FGFs), a la familia de los ligandos de TIE (angiopoyetinas), a las efrinas, al ANGPTL3, al ANGPTL4, etc. Éste incluiría, también, a los factores los cuales aceleran la curación de las heridas, tales como la hormona del crecimiento, el factor de crecimiento semejante a la insulina del tipo I (JGF-I), el VIGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el CTGF, y los miembros de su familia, y el TGF- α y el TGF- β . Véase, a dicho efecto, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1, la cual presenta un listado de los factores angiogénicos); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003).

Un “agente anti-angiogénico” o “inhibidor de la angiogénesis”, se refiere a una sustancia de reducido peso molecular, a un polinucleótido, a un polipéptido, a una proteína aislada, a una proteína recombinante, a un anticuerpo o a conjugados o proteínas de fusión de éstos, los cuales inhiben la angiogénesis, la vasculogénesis, o la permeabilidad vascular no deseable, bien ya sea de una forma directa, o bien ya sea de una forma indirecta. Así, por ejemplo, un agente anti-angiogénico, es un anticuerpo u otro antagonista a un agente angiogénico, de la forma que éstos se han definido anteriormente, arriba, tal como, por ejemplo, los anticuerpos al VEGF, los anticuerpos a los receptores del VEGF, las moléculas pequeñas que bloquean a la señalización del receptor del VEGF (tales como, por ejemplo, las PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706). Los agentes anti-angiogénicos, incluyen a los inhibidores de angiogénesis, nativos, tales como, por ejemplo, la angiotatina, la endostatina, etc. Véase, a dicho efecto, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.* 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003) (por ejemplo, la Tabla 3, la cual recopila un listado de la terapia anti-angiogénica en el melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (tal como, por ejemplo, la Tabla 2, en la cual se encuentra recopilado un listado de los factores anti-angiogénicos); y, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003) (tal como, por ejemplo, la Tabla 1, en la cual se encuentra recopilado un listado de los agentes anti-angiogénicos utilizados en ensayos clínicos).

El término “terapia anti-angiogénica”, se refiere a una terapia de utilidad para inhibir la angiogénesis, la cual comprende la administración, de por lo menos un agente anti-angiogénico, de la forma que se ha definido anteriormente, arriba. En ciertas formas de presentación, la terapia anti-angiogénica, comprende la administración de los antagonistas del VEGF, a un sujeto. En una forma de presentación, la terapia anti-angiogénica, comprende la administración de una antagonista del VEGF, de la forma que se ha definido anteriormente, arriba. En una forma de presentación, el antagonista del VEGF, es un anticuerpo anti-VEGF. En otra forma de presentación, el anticuerpo anti-VEGF, es el bevacizumab. En ciertas formas de presentación, la terapia anti-angiogénica, comprende la administración de 7,5 g/kg de bevacizumab.

El término “agente inmunosupresor”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a las sustancias las cuales actúan para suprimir o para enmascarar el sistema inmunitario de un mamífero, el cual se esté tratando, aquí. Esto incluiría a sustancias las cuales suprimen la producción de citocinas, infra-regulan o suprimen la expresión

auto-antígeno, o enmascaran los antígenos MHC. Los ejemplos de tales tipos de agentes, incluyen a las pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-sustituidas, (véase, a dicho efecto, la patente estadounidense US nº 4.665.077); a los fármacos antiinflamatorios (NSAIDs); al ganciclovir, al tacrolimus, a los glucocorticoides, tales como el cortisol y la aldosterona, a los agentes anti-inflamatorios, tales como el inhibidor de la ciclooxigenasa, el inhibidor de la 5-lipooxigenasa, o el antagonista del receptor del leucotrieno; a los antagonistas de la purina, tal como la azatioprina o el micofenolato de mofetilo (MMF); a los agentes alquilantes, tales como la ciclofosfamida; la bromocriptina; el danazol; la dapsona; el glutaraldehído (el cual enmascara a los antígenos MHC de la forma descrita en la patente estadounidense US nº 4.120.649); los anticuerpos anti-idiotípicos para los antígenos MHC y los fragmentos de; la ciclosporina A; los esteroides tales como los corticosteroides o los glucocorticosteroides o los análogos de glucocorticoides, tales como, por ejemplo, la prednisona, la metilprednisolona, y la dexametasona; los inhibidores de la dihidrofolato reductasa, tal como el metotrexato (oral o subcutáneo); la hidroxicloeroquina; la sulfasalazina; la leflunomida; la citocina o los receptores de citocina, incluyendo a los anticuerpos anti-interferon-alfa, -beta, ó -gamma, a los anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral alfa (infiximab ó adalimumab), los anti-TNF-alfa immunoahesina (etanercept), los anticuerpos del anti-factor de necrosis tumoral beta, los anticuerpos anti-interleucina 2 y los anticuerpos del receptor anti-IL-2; los anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo a los anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; los anticuerpos anti-L3T4; los heterólogos de la globulina anti-linfocitos; los anticuerpos de pan-T, de una forma preferible, los anticuerpos anti-CD3 ó anti-CD4/CD4a; los péptidos solubles que contienen un dominio de unión a la LFA-3 (véase, a dicho efecto, la patente internacional WO 1990 / 08 187, publicada en fecha 26 de Julio de 1990); la estreptocinasa; el TGF-beta; la estreptodornasa; los RNA o DNA del huésped; el FK506; el RS-61443; la desoxispergualina; la rapamicina; El receptor de células T (véase, a dicho efecto, Cohen et al., patente estadounidense US nº 5.114.721); los fragmentos del receptor de las células T (véase, a dicho efecto, Offner et al., Science, 251: 430-432 (1991); la patente internacional WO 1990 / 11 294; laneway, Nature, 341: 482 (1989); y la patente internacional WO 1991 / 01 133); y los anticuerpos del receptor de células T (EP 340.109) tal como el T10B9.

Los ejemplos de "fármacos anti-inflamatorios no esferoidales", ó "NSIDs", son el ácido acetilsalicílico, el ibuprofeno, el naxopreno, la indometacina, el sulindac, la tolmetina, incluyendo a las sales y los derivados de éstos.

El término "agente citotóxico", tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a una sustancia la cual inhibe o previene la función de la célula y / o causa la destrucción de las células. El término, pretende incluir a los isótopos radioactivos (tales como por ejemplo, los isótopos ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P y los isótopos radioactivos de Lu), a los agentes quimioterapéuticos, y las toxinas, tales como las toxinas de moléculas pequeñas, o las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, de origen fúngico, de origen de plantas, o de origen animal, incluyendo a los fragmentos y / o variantes de éstos.

Un "agente de inhibición del crecimiento" o ("agente inhibitorio del crecimiento"), cuando se utiliza aquí, en este documento, se refiere a un compuesto o a una composición, los cuales inhiben el crecimiento de una célula, in vitro y / o in vivo. Así, de este modo, el agente de inhibición del crecimiento, puede ser uno, el cual reduzca, de una forma significativa, el porcentaje de células en la fase S. Los ejemplos de agentes de inhibición del crecimiento, incluyen a los agentes los cuales bloquean la progresión del ciclo celular (en una fase distinta a la fase S), tales como los agentes los cuales inducen a la detención de la fase G1 HI, o la detención de la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M, incluyen a las vincas (vincristina y vinblastina), al TAXOL™, y a los inhibidores de topo II, tales como los consistentes en la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, la etoposida y la bleomicina. Aquéllos agentes los cuales detienen la fase G1, tienen también una influencia extendida a la fase S, tales como, por ejemplo, los agentes alquilantes del DNA, tales como el tamoxifeno, la prednisona, la decarbazina, la mecloretina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo, el ara-C. Una información adicional, puede encontrarse Molecular Basis of Cancer, - Base molecular del cáncer -, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", - Regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos -, por Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente, en la página 13.

Un "agente quimioterapéutico", es un compuesto químico, el cual es de utilidad en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos, incluyen a los agentes alquilantes, tales como la tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN™; los sulfonatos de alquilo, tal como el busulfano, el improsulfano y el piposulfano; las aziridinas, tales como la benzodopa, la carboquona, meturedopa, y la uredopa; las etileniminas y las metilamelaminas, incluyendo a la alretamina, la trietilenemelamina, la trietilenfosforamida, la trietilentioposforamida y la trimetilolomelamina; las acetogeninas (especialmente, la bullatacina y la bullatacinona); el delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL™); la beta-lapachona; el lapachol; colchicinas; el ácido betulínico; una camptotecina (incluyen al análogo sintético topotecán (HYCAMTIN™), el CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR™), la acetilcamptotecina, la escopolectina, y la 9-aminocamptotecina); la briostatina; callistatina; el CC-1065 (incluyendo a los análogos sintéticos adozelesín, carzelesín, y bizelesín); la podofillotoxina; el ácido podofillínico; la teniposida; las criptoficinas (de una forma particular, la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo a los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongiostatina; las mostazas de nitrógeno, tales como las consistentes en el clorambucilo, la clonafazina, la colofosfamida, la estramustina, ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato - óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembicina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitrosureas, tales como las consistentes en la carmustina,

la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina, y la ranimnustina; los antibióticos, tales como, por ejemplo, los antibióticos de enedina (tales como, por ejemplo, la calicheamicina, de una forma especial, la calicheamicina gama II y la calicheamicina omega II (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); la dinemicina, incluyendo a la dinemicina A; una esperamicina; así como, también, el cromóforo neocarzinostatina y los cromóforos de antibióticos relacionados, de cromoproteína enedina), las aclacinomisinas, la actinomocina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomocina, la carabicina, la carminomicina, la carzinofilina, las cromomicinas, dactinomocina, la daunorubicina, la detorubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (incluyendo al ADRIAMYCIN™, la morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, 2-la pirrolino-doxorrubicina, la inyección liposomal doxorubicina HCl (DOXIL™) y la desoxidoxorrubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarrubicina, la marcellomicina, las mitomicinas tales como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, la olivomicina, la peplomicina, la potfomicina, la puomicina, la quelamicina, rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la zinostatina, la zorubicina; el pemetrexed (ALIMTA™); la gemcitabina (GEMZAR™); los anti-metabolitos, tales como el metotrexato, la gemcitabina (GEMZAR™), el tegafur (UFTORAL™), la capecitabina (XELODA™), una potilona, y el 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico, tales como la denopterin, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de la purina, tales como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina, la tioguanina; los análogos de la pirimidina, tales como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didexoxiuridina, la doxifluridina, la encitabina, la floxuridina; los andrógenos tales como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitioestanol, la mepitioestana, la testolactona; los antiadrenales, tales como la aminoglutetimida, el mitotano, el trilostano; el reforzante de ácido fólico, tal como el ácido frolínico; La aceglatona; el glicósido de aldofofamidato; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucilo; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfornitina; el acetato de elliptinico; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidoxiurea; el lentinan; la lonidainina; los maitansinoides, tales como los consistentes en la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la pentostatina; el fenamet; la pirarubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidrazida; la procarbazona; el complejo de polisacáridos PSK™ (de la firma JHS Natural Products, Eugene, OR); el razoxano; el rizoxin; el sizofirano; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaziquona; la 2,2',2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente, la toxina T-2, el verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE™, FILDESIN™), la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromano; la gacitosina; el arabinósido ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, tales como, por ejemplo, el paclitaxel (TAXOL™), la formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñadas con albúmina (ABRAXANE™), y el docetaxel (TAXOTERE™); el clorambucilo; la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los análogos del platino, tales como el cisplatino y el carboplatino; la vinblastina (VELBAN™); el platino etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN™); el oxaliplatino; el leucovovin; la vinorelbina (NAVELBINE™); la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides, tales como el ácido retinoico; la sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualesquiera de los anteriormente mencionados, arriba. Así como las combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como las consistentes en CHOP, una abreviación de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviación para un régimen de tratamiento con un oxaliplatino (ELOXATIN™), combinado con 5-FU y leucovovina.

En esta definición, se incluye, también, a los agentes anti-hormonales, los cuales actúan para regular, reducir, bloquear, o inhibir los efectos de las hormonas las cuales estimulan el crecimiento del cáncer, y las cuales se encuentran a menudo, en forma de un tratamiento corporal, sistémico o completo. Éstos pueden ser hormonas en sí mismas. Los ejemplos, incluyen a los anti-estrógenos y a moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, al tamoxifeno (incluyendo al tomoxifeno NOLVADEX™), al raloxifeno (EVISTA™), al droloxifeno, al 4-hidroxitamoxifeno, al trioxifeno, al keoxifeno, al LY117018, a la onapristona, y al toremifeno (FARESTON™); a las anti-progesteronas; a los infra-reguladores de los receptores de estrógenos (ERDs); a los agentes los cuales funcionan para suprimir o clausurar los ovarios, tales como, por ejemplo, los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), tales como los consistentes en el acetato de leuprolida (LUPRON™ y ELIGARD™), el acetato de goserelina, el acetato de busarelina y la triptorelina; a los anti-andrógenos, tales como los consistentes en la flutamida, la nilutamida y la bicalutamida; y a los inhibidores de la aromatasa, los cuales inhiben a la enzima aromatasa, la cual regula la producción de estrógenos, en las glándulas adrenales o suprarrenales, tales como, por ejemplo, los 4(5)-imidazoles, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol (MEGASE™), el exemestano (AROMASIN™), el formestano, el fadrozol, el vorozol (RIVISOR™), el letrozol (FEMARA™), y el anastrozol (ARIMIDEX™). De una forma adicional, tal tipo de definición de los agentes terapéuticos, incluye a los bisfosfanatos, tales como el clodronato (tal como, por ejemplo, el BONEFOS™ o el OSTAC™), el etidronato (DIDROCAL™), el NE-58095, el ácido zoledrónico / zoledronato (ZOMETA™), el alendronato (FOSAMAX™), el pamidronato (ARELIA™), el tiludronato (SKELID™), o el risedronato (ACTONEL™); así como también la troxacitabina (un análogo del nucleósido de 1,3-dioxolano citosina); los oligonucleótidos antisentido, de una forma particular, aquéllos los cuales inhiben la expresión de genes, en trayectorias de señalización, implicados, en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, las proteínas PKC-alpha, Raf, H-Ras, y el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); las vacunas, tales como la vacuna THERATOPE™ y las vacunas de terapia genérica, tales como, por ejemplo, las consistentes en la vacuna ALLOVECTIN™, la vacuna LEUVECTIN™, y la VAXID™; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (tal como, por ejemplo, el LURTOTECAN™); la rnrH (tal como, por ejemplo, el ABARELIX™); el ditosilato de lapatinib (un inhibidor dual de

moléculas pequeñas de la tirosina quinasa ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016); los inhibidores de COX-2, tales como el celecoxib (CELEBREX™; 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)-benceno-sulfonamida; y las sales, ácidos o derivados, farmacéuticamente aceptables, de cualesquiera de los agentes anteriormente mencionados, arriba.

5 El término “citocina” es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular, las cuales actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de tales tipos de citocinas, son los consistentes en las linfocinas, las monocinas, y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen, entre las citocinas la hormona del crecimiento, tal como la hormona del crecimiento, humana, la hormona N-metionil del crecimiento, humana, y la hormona del crecimiento, bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorrelinaxina; las hormonas glicoprotéicas, tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante de las tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático, el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentar; el factor de necrosis tumoral alfa y beta; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado a gonadotropina del ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular (tal como, por ejemplo, el VEGF, el VEGF-B, el VEGF-C, el VEGF-D, el VEGF-E); el factor de crecimiento derivado de la placenta (P1GF); los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF, tal como, por ejemplo, el PDGFA, el PDGFB, el PDGFC, el PDGFD); la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores del crecimiento nervioso, tales como el NGF-alfa; el factor de crecimiento de las plaquetas; los factores de crecimiento transformantes (TGFs), tales como el TGF-alfa y el TGF-beta; el factor-I y -II de crecimiento similar a la insulina; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductores; los interferones tales como los consistentes en el interferón-alfa, -beta y -gamma, los factores estimulantes de la formación de colonias (CSFs), tales como los consistentes en CSF de macrófagos (M-CSF); el CSF de macrófagos y granulocitos (GM-CSF); y el CSF de granulocitos (G-CSF); las interleucinas (ILs) tales como las consistentes en las IL-1, IL-1-alfa, IL-1-beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20-IL-30; un factor de necrosis tumoral, tal como el consistente en el TNF-alfa o el TNF-beta; y otros factores polipeptídicos, incluyendo al LIF y el ligando del equipo a modo de “Kit” (KL). Tal como se utiliza aquí, en este documento, el término citocina, incluye a las proteínas de fuentes naturales o procedentes del cultivo de células recombinantes y los equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

30 Un “desorden” o “trastorno”, es cualquier tipo de condición, la cual se beneficiaría de un tratamiento. Éste término, incluye a los trastornos o desórdenes, o enfermedades, crónicos y agudos, incluyen a aquéllas condiciones patológicas, las cuales predisponen al mamífero, al trastorno o desorden en cuestión. Los ejemplos no limitativos de los trastornos o desórdenes a ser tratados, aquí, incluyen a cualquier forma de tumor, tumores benignos y malignos; a los tumores vascularizados; a la hipertrofia; a las leucemias y malignidades linfoides; a los desórdenes o trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, y a otros trastornos o desórdenes glandulares, macrófagos, epiteliales, estromales y blastoélicos; y a los trastornos o desórdenes inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, a los trastornos o desórdenes vasculares, los cuales resultan de una vascularización inapropiada, aberrante, excesiva y / o patológica, y / o permeabilidad vascular inapropiada, aberrante, excesiva y / o patológica.

40 Tal y como se utiliza aquí, en este documento, el término “tratamiento” (y variaciones de éste, tales como las consistentes en “tratar” o “proceder a tratar”), se refiere a una intervención clínica, en un intento de modificar el curso natural de un individuo o de una células que se están tratando, y que puede llevarse a cabo, tanto para la profilaxis de la patología clínica, como durante el curso de dicha patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento, incluyen a la prevención de la aparición o de la recidiva de la enfermedad, al alivio de los síntomas, a la disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas, a la prevención de la metástasis, a la disminución de la tasas de progresión de la enfermedad, a la mejora o la paliación del estado de la enfermedad, y a la remisión o la mejora de la prognosis. En algunas formas de presentación, los procedimientos y las composiciones de la presente invención, se utilizan para retardar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o desorden, o para enlentecer la progresión de enfermedad o trastorno o desorden.

50 El término “cantidad efectiva”, o “cantidad terapéuticamente efectiva”, se refiere a una cantidad de un fármaco, el cual sea efectivo para tratar una enfermedad o trastorno o desorden en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad efectiva del fármaco, puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (a saber, enlentecer, en alguna extensión y, de una forma típica, parar), la infiltración de las células cancerosas, al interior de los órganos periféricos; inhibir (a saber, enlentecer, en alguna extensión y, de una forma típica, parar), la metástasis tumoral; inhibir, en alguna extensión, el crecimiento tumoral; capacitar el tratamiento del tumor independiente del VEGF, y / o liberar, en alguna extensión, uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En cuanto a lo referente a que, el fármaco, pueda prevenir el crecimiento y / o eliminar (matar) las células existentes, éste puede ser citostático o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia in vivo, puede medirse, por ejemplo, procediendo a valorar la duración de la supervivencia, el tiempo de la progresión de la enfermedad (TTP) las tasas de respuestas (RR), la duración de las respuestas, y / o la calidad de vida.

65 Una “cantidad profilácticamente efectiva”, se refiere a una cantidad efectiva, a unas dosis y en unos períodos de tiempo necesarios, como para lograr el resultado profiláctico deseado. De una forma típica, pero no necesaria, puesto que, una dosis profiláctica, se utiliza, en los sujetos, previamente a un estado temprano de la enfermedad, o

en el estado temprano de ésta, la cantidad profilácticamente efectiva, será inferior a la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los términos “cáncer” y “canceroso” (o “cancerosa”), se refiere a una condición fisiológica, o para describir ésta, en los mamíferos, la cual se caracteriza, de una forma típica, mediante un crecimiento celular irregular (no regulado). Los ejemplos de cáncer, incluyen, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, al carcinoma, al linfoma, al blastoma, al sarcoma, y la leucemia o malignidades linfoides. Los ejemplos más particulares de tales tipos de cánceres, incluyen al cáncer de riñón o renal, al cáncer de mama, al cáncer de colon, al cáncer rectal, al cáncer colorrectal, al cáncer de pulmón, incluyendo a cáncer de pulmón de células pequeñas, al cáncer de pulmón de células no pequeñas, al adenocarcinoma de pulmón y al carcinoma escamoso o epidermoide de pulmón (tal como, por ejemplo, el cáncer de células escamosas o epidermoides epiteliales), el cáncer cervical, el cáncer de ovarios, el cáncer de próstata, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el cáncer del peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gástrico o de estómago, incluyendo al cáncer gastrointestinal, los tumores estromales gastrointestinales (GIST), el cáncer pancreático, el cáncer de cabeza y cuello, el glioblastoma, el retinoblastoma, los astrocitomas, los tecotas, los arrenoblastomas, el hepatoma, las malignidades hematológicas, incluyendo al linfoma no Hodgkin (NHL), el mieloma múltiple y las malignidades hematológicas agudas, el carcinoma endometrial o uretino, la endometriosis, los fibrosarcomas, el coriocarcinoma, el carcinoma de las glándulas salivares, el cáncer de vulva, el cáncer de tiroides, los carcinomas esofágicos, el carcinoma hepático, el carcinoma anal, el carcinoma de pene, el carcinoma nasofaríngeo, los carcinomas laríngeos, el sarcoma de Kaposi, el melanoma, los carcinomas de piel, el Schwannoma o neurilemmoma, el oligodendroglioma, los neuroblastomas, el rhabdomyosarcoma, el sarcoma osteogénico, el los leiomiomas, los carcinomas del tracto urinario, los carcinomas de tiroides, el tumor de Wilm, así el linfoma de células B (incluyendo al linfoma no Hodgkin de grado bajo (crecimiento lento) / foliular (NHL); el NHL linfocítico pequeño (SL); el NHL de grado intermedio / foliular; el NHL de grado difuso; el NHL linfoblástico de grado alto; NHL de células pequeñas no segmentadas, de grado alto; enfermedad de NHL, no voluminosa; linfoma de células del manto; el linfoma relacionado con el SIDA; y la Macroglobulinemia de Waldenstrom; la leucemia linfocítica crónica (CLL); la leucemia linfoblástica aguda (ALL); la leucemia de las células pilosas; la leucemia mieloblástica crónica; y el trastorno o desorden linfoproliferativo post-transplante (PTLD), así como la proliferación vascular anormal, asociada con la facomatosis, el edema (tal como el que se encuentra asociado con los tumores cerebrales), y el síndrome de Meig.

“Tumor”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular, neoplásica, tanto como si es benigno como si es benignos, y a todas la células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Los ejemplos de trastornos neoplásicos a ser tratados, incluyen, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a aquéllos los cuales se describen aquí, en este documento, bajo los términos “cáncer” y “canceroso” (o “cancerosas”)(en su forma singular o plural).

El término “terapia anticancerosa” (o “anticáncer”, o “terapia del cáncer”, se refiere a una terapia, la cual es de utilidad en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos anticancerosos, incluyen, si bien no de una forma limitativa en cuanto a éstos, por ejemplo, a los agentes quimioterapéuticos, a los agentes inhibidores del crecimiento, a los agentes citotóxicos, a los agentes los cuales se utilizan en la terapia de radiación, a los agentes anti-angiogénicos, a los agentes apoptóticos, a los agentes antitubulina, y a otros agentes para tratar el cáncer, tales como los consistentes en los anticuerpos anti-HER-2, los anticuerpos anti-CD20, y el antagonista del receptor del factor del crecimiento epidermal (tal como, por ejemplo, un inhibidor de a tirosina quinasa), el inhibidor de HER1 / EGFR(tal como, por ejemplo, el erlotinib (TARCEVA™), los inhibidores del factor del crecimiento derivados de las plaquetas (tal como, por ejemplo, el GLEEVEC™ (Mesilato de Imatinib)), un inhibidor de COX-2 (tal como, por ejemplo, el celecoxib), el ERBITUX™ (cetuximab, Imclone), los interferones, las citocinas, los antagonistas (tales como, por ejemplo, los anticuerpos neutralizantes) los cuales se unen a una o varias dianas consistentes en los ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o el receptor o receptores del VEGF, el TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos orgánicos, etc. Las combinaciones de éstos, se encuentran también incluidas en la presente invención.

El término “diagnosis”, se utiliza aquí, en este documento, para referirse a un a la identificación de un estado molecular o patológicos, enfermedad o condición, tal como la identificación del cáncer, o para referirse a la identificación de un paciente con cáncer, el cual pueda beneficiarse de un régimen de tratamiento particular.

El término “prognosis”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a la probabilidad del beneficio clínico procedente de una terapia anticáncer.

“El término “predicción”, se utiliza aquí, en este documento, para referirse a la probabilidad de que, un paciente, pueda responder, de una forma favorable, a un terapia anticancerosa particular. Los procedimientos predictivos de la presente invención, pueden utilizarse clínicamente, para tomar decisiones, procediendo a elegir las modalidades de tratamiento las cuales sean las más apropiadas, para cualquier paciente. Los procedimientos predictivos de la presente invención, son herramientas valiosas para la predicción de si, un paciente, tiene la posibilidad de

responder, de una forma favorable, a un régimen de tratamiento, tal como el consistente en un régimen terapéutico, incluyendo, por ejemplo, la administración de un determinado agente terapéutico o combinación de éstos, una intervención quirúrgica, un tratamiento esteréico, etc.

5 La capacidad de respuesta o reacción de un paciente, puede valorarse, mediante la utilización de cualquier parámetro final, el cual indique un beneficio para el paciente, incluyendo, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a (1) la inhibición, en alguna extensión, de la progresión de la enfermedad, incluyendo un enlentecimiento y una completa paralización de ésta; (2) la reducción del sitio de la lesión; (3) la inhibición (tal como, por ejemplo, la reducción o la paralización completa de ésta), o una infiltración de las células enfermas al interior de los órganos y / o tejidos periféricos; (4) la inhibición (tal como, por ejemplo, la reducción, el enlentecimiento o la paralización completa de ésta) o una propagación de la enfermedad; (5) la liberación, en alguna extensión, de uno o de más síntomas asociados con el desorden o trastorno; (6) el incremento en el transcurso de tiempo de la presentación exenta de enfermedad, a continuación del tratamiento; y / ó (8) la disminución de la mortalidad en un determinado punto de tiempo continuación del tratamiento.

15 El beneficio clínico, puede medirse procediendo a valorar varios parámetros finales, tales como, por ejemplo, la inhibición, en alguna extensión, de la progresión de la enfermedad, incluyendo al enlentecimiento y a la paralización completa de la enfermedad; la reducción en el número de episodios y / o síntomas de la enfermedad; la reducción del tamaño de la lesión; la inhibición (tal como, por ejemplo, la reducción, el enlentecimiento o la paralización completa) de la infiltración de las células de la enfermedad, al interior de otros órganos y / o tejidos periféricos; la inhibición (tal como, por ejemplo, la reducción, el enlentecimiento o la paralización completa) de la extensión o propagación de la enfermedad; la disminución de la respuesta autoinmune, la cual puede resultar, pero no tiene que resultar, en la progresión o la ablación de la lesión de la enfermedad; liberar, en alguna extensión, de uno o más de los síntomas asociados con el desorden o trastorno; el incremento del transcurso de tiempo de la presentación, exenta de enfermedad, a continuación del tratamiento, tal como , por ejemplo, la supervivencia, exenta de progresión de la enfermedad; el incremento de la supervivencia total; una tasa de supervivencia más alta; y / o una mortalidad disminuida, en un determinado punto de tiempo, a continuación del tratamiento.

20 El término “beneficio”, se utiliza aquí, en este documento, en su sentido más amplio, y éste se refiere a cualquier efecto, no deseable y, de una forma específica, éste incluye al beneficio clínico, de la forma que éste se define aquí, en este documento.

25 El término “formulación farmacéutica”, se refiere a una preparación, la cual es en una forma tal, como para permitir el hecho de que, la actividad biológica de un ingrediente activo, sea efectiva, y la no contenga componentes adicionales, los cuales sean tóxicos, de una forma inaceptable, para un sujeto, al cual pudiere administrarse la formulación. Tales tipos de formulaciones, pueden ser estériles.

Una formulación “estéril”, es aséptica, o exenta de cualesquiera microorganismos vivos, y de sus esporas.

30 La administración “en combinación con” uno o más terapéuticos adicionales, incluye a la administración simultánea (al mismo tiempo – [concurrente] -) y consecutiva, o secuencial, en cualquier orden.

35 El término “de una forma concurrente”, (o de una forma simultánea), se utiliza aquí, en este documento, para hacer referencia a la administración de uno o de más agentes terapéuticos, en donde, por lo menos una parte de la administración, se solapa en el tiempo. Correspondientemente en concordancia, la administración simultánea o concurrente, incluye a un régimen de administración, cuando la administración de uno o más agentes, continúa, después de la administración discontinua de uno o más agentes adicionales distintos.

40 Administración “crónica”, se refiere a la administración del agente o de los agentes, de una forma continua, de uno modo opuesto al de una forma aguda, de tal forma que se mantenga el efecto (actividad) inicial terapéutico, durante un extendido transcurso de tiempo.

45 La administración “intermitente”, es el tratamiento el cual no se realiza de una forma consecutiva o sucesiva, sin interrupción, sino que, éste, es cíclico, por naturaleza.

50 “Portadores” o “soportes”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, incluye a los portadores o soportes, a los excipientes, o a los estabilizadores, los cuales no son tóxicos para la célula o para un mamífero, los cuales se estén exponiendo a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el portador o soporte fisiológicamente aceptable, de una solución tamponada, acuosa de un determinado valor pH. Los ejemplos de portadores o soportes fisiológicamente aceptables, incluyen a los tampones tales como los tampones fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; a los antioxidantes, los cuales incluyen al ácido ascórbico; a los polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 residuos); a las proteínas, tales como la albúmina del suero, la gelatina, o las inmunoglobulinas; a los polímeros hidrofílicos, tales como la polivinilpirrolidona; a los aminoácidos, tales como los consistentes en la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina, o la lisina; a los monosacáridos, los disacáridos, y otros hidratos de carbono, incluyendo a la glucosa, la manosa o las dextrinas; a los agentes quelantes, tales como

el EDTA; a los alcoholes de azúcares, tales como el manitos o el sorbitos; a los contra-iones formadores de sales, tales como el sodio; y / o a los tensioactivos no iónicos, tales como el TWEEN™, el polietilenglicol (PEG), y el PLURONICS™.

5 Un liposoma, es una pequeña vesícula, compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y / o tensioactivos, el cual es de utilidad para suministrar un fármaco (tal como el consistente en un anticuerpo anti-VEGFG, a un mamífero. Los componentes del liposoma se encuentran distribuidos, de una forma usual, en una formación del tipo bicapa, similar a la distribución de las membranas biológicas.

10 Los agentes anti-angiogénicos, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los siguientes agentes: los inhibidores del VEGF, tales como un antagonista específico del VEGF, un inhibidor del EGF, los inhibidores de EGFR, el ERBITUX™ (cetuximab, ImClone Systems, Inc., Branchburg, N.J.), el VECTIBIX™ (panitumumab, Amgen, Thousand Oaks, CA), los inhibidores del TIE2, los inhibidores del IGF1R, los inhibidores de la COX-II (ciclooxigenasa II), los inhibidores de la MMP-2 (metaloproteínasa de matriz, 2) y los inhibidores de la MMP-9 (metaloproteínasa de matriz, 9), el CP-547.632 (de la firma Pfizer Inc., NY, USA), el Axitinib (de la firma Pfizer Inc.; AG-013736), el ZD-6474 (de la firma AstraZeneca), el AEE788 (de la firma Novartis), el AZD-2171), la trampa del VEGF (de las firmas Regeneron / Aventis), el Vatalanib (también conocido como PTK-787, ZK-222584: de la firma Novartis & Schering AG), el Macugen (pegaptanib octasódico, el NX-1838, el EYE-001, de la firma Pfizer Inc. / Golead / Eyetech), el IM862 (de la firma Cytran Inc. de Kirkland, Wash., USA); y el angiozoma, un ribozoma sintético de Ribozima (de la firma Boulder, Colo.) y Chiron (Emeryville, Calif.) y combinaciones de entre éstos. Otros inhibidores de la angiogénesis, incluyen a la tromboespondina 1, la tromboespondina 2, el colágeno IV y el colágeno XVIII. Los inhibidores del VEGF, se dan a conocer en las patentes estadounidenses US nº 6.534.524 y US nº 6.235.764.

25 Un antagonista específico del VEGF, se refiere a una molécula capaz de unirse al VEGF, reduciendo los niveles de expresión del VEGF, o neutralizando, bloqueando, inhibiendo, anulando, reduciendo, o interfiriendo con las actividades biológicas del VEGF, incluyendo a la VEGF de unión a uno o más receptores de VEGF, y la angiogénesis mediada por VEGF, y la supervivencia o proliferación de las células endoteliales. Como antagonistas específicos del VEGF, de utilidad en los procedimientos de la presente invención, se incluyen los polipéptidos los cuales se unen, de una forma específica, al VEGF y a los anticuerpos anti-VEGF, y los fragmentos de éstos, de unión al antígeno, las moléculas receptoras y derivados, los cuales se unen, de una forma específica, al VEGF, secuestrando su unión a uno o más receptores, proteínas de fusión (tales como, por ejemplo, la trampa de VEGF (de la firma Regeneron), y la VEGF₁₂₁-gelonina (de la firma Peregrine). Los antagonistas específicos del VEGF, incluyen a las variantes de los polipéptidos de VEGF, a los oligómeros nucleobase antisentido dirigidos al VEGF, a las moléculas pequeñas de RNA dirigidas al VEGF, a los aptámeros de RNA, a los pepticuerpos, y a las ribozimas contra el VEGF.

Los dos receptores del VEGF mejor caracterizados, son el VEGFR1 (también conocidos como Flt-1) y el VEGFR2 (también conocido como KDR y FLK-1, para el homólogo murino). La especificidad de cada receptor, para cada familia de VEGF, varía, pero, el VEGF-A, se une a ambos, el Flt-1 y el KDR. El receptor Flt-1 de longitud total, incluye un dominio extracelular, el cual tiene siete dominios de Ig, un dominio de transmembrana, y un dominio extracelular, con actividad tirosina quinasa. El dominio extracelular, se encuentra involucrado en la unión del VEGF, y el dominio intracelular, se encuentra involucrado en la transducción de señal.

45 Las moléculas receptoras del VEGF, o los fragmentos de éstas, las cuales se unen de una forma específica al VEGF, pueden utilizarse como inhibidores del VEGF, los cuales se unen y secuestran a la proteína de VEGF, previniendo, con ello, el que ésta señalice. En ciertas formas de presentación, la molécula receptora del VEGF, o el fragmento de ésta de unión al VEGF, es una forma soluble, tal como la consistente en el sFlt-1. Una forma soluble del receptor, ejerce a un efecto inhibitorio sobre la actividad biológica de la proteína de VEGF, mediante la unión al VEGF, previniendo así, de este modo, el que ésta se una a sus receptores naturales, presentes en la superficie de las células diana. Se encuentran también incluidas las proteínas de fusión receptoras del VEGF, cuyos ejemplos, se describen posteriormente, abajo, a continuación.

55 Una proteína quimérica, receptora del VEGF, es una molécula receptora, la cual tiene secuencias de aminoácidos derivadas de por lo menos dos proteínas diferentes, siendo, por lo menos una de ellas, una proteína receptora del VEGF (tal como, por ejemplo, el receptor flt-1 ó el receptor KDR), la cual es capaz de unirse a la actividad biológica del VEGF, y de inhibirla. En ciertas formas de presentación, las proteínas quiméricas receptoras del VEGF de la presente invención, consisten en secuencias de aminoácidos derivadas de únicamente dos diferentes moléculas receptoras del VEGF; sin embargo, no obstante, las secuencias de aminoácidos, las cuales comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o la totalidad de los siete dominios semejante de Ig, procedentes de la región extracelular de unión a ligandos, del receptor flt-1 y / ó KDR, puede enlazarse a las secuencias de aminoácidos de otras proteínas son relacionadas, tales como, por ejemplo, las secuencias de inmunoglobulinas. Otras secuencias de aminoácidos a las cuales se combinan los dominios semejantes de Ig, resultarán fácilmente evidentes, para aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Los ejemplos de proteínas quiméricas receptoras del VEGF, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstas, a las Flt-1/Fc, KDR/Fc, ó Flt-1/KDR/Fc del tipo

soluble, (también conocidas como VEGF Trap – [Trampa de VEGF] -). (Véase, a dicho efecto, por ejemplo, el documento de prioridad PCT de la solicitud de publicación del documento internacional de patente nº WO 97/ 44 453).

5 Una proteína soluble, receptora del VEGF, o las proteínas quiméricas receptoras del VEGF, incluyen a las proteínas receptoras del VEGF, las cuales no se encuentran fijadas a las superficies de las células, vía un dominio transmembrana. Como tales, la formas solubles del receptor del VEGF, incluyendo a las proteínas quiméricas receptoras, al mismo tiempo que ser capaces de unirse a un VEGF, y desactivarlo, no comprenden un dominio transmembrana y, así, de una forma general, estos no llegan a asociarse con la membrana celular, o células, en la
10 cuales se expresan las moléculas.

Inhibidores del VEGF adicionales, se encuentran descritos, por ejemplo, en por ejemplo, en la patente internacional WO 99 / 24 440, en el documento de prioridad de la solicitud de publicación del documento internacional de patente PCT / IB 99 /00 797, en las patentes internacionales WO 95 / 21613 y WO 99/61422, en las patentes
15 estadounidenses US nº 6.534.524, y US nº 5.834.504, en la patente internacional WO 98 /50 356, en las patentes estadounidenses US nº 5.883.113, US nº 5.886.020, US nº 5.792.783, y US nº 6.653.308, y en las patentes internacionales WO 99 /10 349, WO 97 / 32 856, WO 97 / 22 596, WO 98 / 54 093, WO 98 /02 438, WO 99 / 16 755, y WO 98 / 02 437.

20 En total, se ha reportado un porcentaje del 53 - 74% de los pacientes con NSCLC, los cuales tienen el bFGF expresado, en los especímenes del tejido tumoral (véase, a dicho efecto, Takanami, I., et al., Jpn J Clin Oncol, 1996. 26(5): páginas 293-7; Volm, M., et al., Eur J Cancer, 1997. 33(4): páginas 691-3; Shou, Y., et al., Br J Cancer, 2001. 85(11): páginas 706-12) y bFGF expression was associated with higher T and N (in the TNM classification), - la expresión del bFGF, se encontraba asociada con un mayor nivel de y N y T (en la clasificación TNM) y una etapa
25 tumoral superior; y una escasa supervivencia - (Takanami, I., et al., Jpn J Clin Oncol, 1996. 26(5): páginas 293-7). Se ha reportado también el hecho de que, la expresión del bFGF, se encuentra asociado con una reducida diferenciación, una invasión de los vasos, y una metástasis de los nódulos linfáticos, en los pacientes con NSCLC (Volm, M., et al., Anticancer Res, 1999. 19(1B): páginas 651-5; Ito, H., et al., Oncol Rep, 2002. 9(1): páginas 119-23).

30 Los estudios en los cuales se ha examinado el rol interpretativo del bFGF circulante, en pacientes afectados de NSCLC, han mostrado unos estudios variables, de una asociación favorable entre los niveles incrementados de bFGF y la supervivencia (véase, a dicho efecto, Brattstrom, D., et al., Anticancer Res, 1998. 18(2A): páginas 1123-7), ausencia de correlación con la supervivencia (véase a dicho efecto, Ueno, K., et al., Lung Cancer, 2001. 31(2-3):
35 páginas 213-9) y una asociación negativa entre los niveles elevados y la supervivencia (Brattstrom, D., et al., Lung Cancer, 2002. 37(1): páginas 57-63; Brattstrom, D., et al., Lung Cancer, 2004. 43(1): páginas 55-62; Joensuu, H., et al., Cancer Res, 2002. 62(18): páginas 5210-7).

40 Se ha sugerido el hecho de que el bFGF circulante, se encuentra asociado con el escape de los tumores, de la terapia anti-VEGF, puesto que, la sobre-regulación de loa trayectorias de señalización pro-angiogénicas alternativas, (tales como el bFGF) pueden encontrarse involucradas en la resistencia a la terapia anti-VEGF (véase, a dicho efecto, Jain, R.K., et al., Nat Rev Clin Oncol, 2009. 6(6): páginas 327-38; Dempke, W.C. y V. Heinemann, Eur J Cancer, 2009. 45(7): páginas 1117-28).

45 La presente invención, se basa, parcialmente, en la identificación de que, el nivel de expresión del bFGF, es de utilidad en la predicción y / o el gobierno y control del progreso de la terapia anti-angiogénica, la cual comprende un anticuerpo anti-VEGF consistente en el bevacizumab. De una forma particular, la presente invención, se basa, parcialmente, en la identificación del nivel de la proteína bFGF, en la sangre, es de utilidad en la predicción de la
50 capacidad de respuesta de un paciente, a una terapia con anticuerpo anti-VEGF. Así, de este modo, los procedimientos dados a conocer en los procedimientos y los ensayos, proporcionan medios convenientes, eficientes, y potencialmente efectivos en cuanto a su coste, para obtener datos e información de utilidad en la valoración apropiada o terapias efectivas para tratar a los pacientes con cáncer. Así, por ejemplo, una muestra procedente de un paciente con cáncer, podría examinarse mediante varios ensayos in vitro, para determinar el hecho de si, el nivel de expresión del bFGF, en una muestra, es mayor que el nivel de expresión del bFGF, en una muestra de
55 referencia. En el caso en el que se detecte un mayor nivel de expresión, el paciente, se beneficiaría, probablemente, de una terapia anticáncer que comprendiera un anticuerpo anti-VEGF. En ciertas formas de presentación, si se detecta un nivel de expresión más alto del bFGF, el paciente, se beneficiará, probablemente, de una terapia anti-angiogénica, la cual comprenda una terapia anti-VEGF. En ciertas formas de presentación, si se detecta un mayor nivel de expresión del bFGF, el paciente, se beneficiará, probablemente, de una terapia anti-angiogénica la cal
60 comprenda la administración de 7,5 mg / kg de anticuerpo anti-VEGF consistente en el bevacizumab.

Los niveles / cantidad de expresión de un biomarcador, pueden determinarse en base a cualquier criterio apropiado, el cual sea conocido en el arte especializado de la técnica, incluyendo, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, al mRNA; el cDNA, las proteínas, los fragmentos de proteínas y (o el número de copias genéticas.

65

Así, por ejemplo, el nivel de expresión del bFGF, en una muestra, puede analizarse mediante un gran número de metodologías, muchas de las cuales son conocidas en el arte de la técnica especializada, y entendidas por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica, incluyendo, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstas, al análisis inmunohistoquímico y / o de transferencia Western, al análisis de inmunoprecipitación, a los ensayos de unión molecular, al ensayo ELISA, al ensayo ELIFA, a la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), y por el estilo, a los ensayos cuantitativos basados en la sangre (tales como por ejemplo, el ensayo ELISA en suero)(para examinar, por ejemplo, los niveles de la expresión proteínica), a los ensayos bioquímicos de la actividad enzimática, a la hibridación in situ, al análisis de transferencia Northern y / o análisis de PCR de los mRNAs, así como cualesquiera de entre la amplia variedad de ensayos, los cuales pueden realizarse mediante el análisis genético y / o series de tejidos. Los protocolos típicos para evaluar el estatus de los genes y de los productos genéticos, se encuentran, por ejemplo, en Ausubel et al. eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, - Protocolos usuales en Biología Molecular -, Unidades 2 (Análisis de transferencia Northern), 4 (Análisis de transferencia Southern), 15 (Análisis de inmunotransferencia) y 18 (Análisis por PCR). Pueden también utilizarse los inmunoensayos multiplexados, tales como aquéllos comercialmente disponibles en el mercado, procedentes de las entidades Rules Based Medicine o Meso Scale Discovery (MSD).

Una muestra la cual comprenda el bFGF, puede obtenerse mediante procedimientos los cuales son bien conocidos en el arte de la técnica especializada, y los cuales sean apropiados para el tipo particular y localización del cáncer de interés. Véase, a dicho efecto, el apartado de Definiciones. Así, por ejemplo, las muestras de lesiones cancerosas, pueden obtenerse mediante resección, broncoscopia, aspiración mediante aguja fina, el cepillado bronquial, o a partir del esputo, del fluido pleural, o de la sangre. Los genes o productos genéticos, tales como, por ejemplo, el gen bFGF, la proteína bFGF, ó el mRNA del bFGF, pueden detectarse a partir del cáncer o tejido tumoral, o a partir de otras muestras corporales, tales como las consistentes en la orina, el esputo, el suero o el plasma. Las mismas técnicas las cuales se han discutido anteriormente, arriba, para la detección de los genes diana, o productos genéticos, en muestras cancerosas, pueden aplicarse a otras muestras corporales. Las células cancerosas, pueden desprenderse de las lesiones cancerosas, y aparecer en tales tipos de muestras corporales. Mediante la exploración de rastreo de tales muestras, puede lograrse una simple diagnosis temprana, para estos cánceres. Adicionalmente, además, el progreso de la terapia, puede gobernarse y controlarse, de una forma más sencilla, procediendo a someter a tests de ensayo, tales tipos de muestras, para genes diana o productos genéticos.

Los medios para el enriquecimiento de una preparación de tejido para las células cancerosas, son conocidos, en el arte de la técnica especializada. Así por ejemplo, el tejido, puede aislarse en parafina o en secciones criostáticas. Las células cancerosas, pueden también separarse de las células normales, mediante citometría de flujo o mediante microdissección de captura por láser. Éstas técnicas, así como también otras técnicas para separar las células cancerosas de las células normales, se conocen bien, en el arte especializado de la técnica. Si el tejido canceroso se encuentra altamente contaminado con células normales, la detección del gen "signatura" de una determinada patología, o el perfil de la expresión proteínica, puede ser más dificultosa, si bien, no obstante, las técnicas para minimizar la contaminación y / o los resultados de falsos negativos / positivos, son bien conocidas, procediéndose a describir algunas de ellas, en este documento, posteriormente, abajo, a continuación. Así, por ejemplo, puede también procederse a valorar una muestra, para la presencia de un biomarcador, el cual se conozca que se encuentre asociado con una célula cancerosa de interés, pero no con una correspondiente célula normal, o viceversa.

En ciertas formas de presentación, se procede a examinar la expresión de proteínas, en una muestra, mediante la utilización de inmunohistoquímica ("IHC"), y protocolos de tinción. La tinción inmunohistoquímica de las secciones de tejidos, ha mostrado ser un procedimiento fidedigno para la valoración o la detección de la presencia de proteínas, en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica, utilizan un anticuerpo para explorar y visualizar los antígenos celulares, "in situ", de una forma general, mediante procedimientos cromogénicos o fluorescentes.

La muestra de tejido, puede fijarse (por ejemplo, conservarse), mediante metodologías convencionales (véase, a dicho efecto, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," 3rd edition; - Manual de procedimientos de tinción histológica del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas -, 3ª Edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology, - Procedimientos avanzados de laboratorio en histología y patología del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas -, (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Una persona experta en el arte especializado de la técnica, apreciará el hecho de que, la elección de un fijador, de determina mediante los propósitos para los cuales debe tintarse histológicamente la muestra, o de otro modo, analizarse. La persona experta en el arte especializado de la técnica, apreciará así mismo, también, el hecho de que, la fijación, dependerá el tamaño de la muestra y del fijador utilizado. A título de ejemplo, para fijar una muestra, puede utilizarse formalina tamponada neutra, una solución de Bouin, ó formaldehído.

De una forma general, en primer lugar, se procede a fijar la muestra y, a continuación, ésta se deshidrata, mediante una serie ascendente de alcoholes, se infiltra y se embebe con parafina, u otro medio seccionante, de tal forma que pueda seccionarse la muestra de tejido. De una forma alternativa, puede procederse a seccionar el tejido y fijar las

secciones obtenidas. A título de ejemplo, la muestra de tejido, puede embeberse y procesarse en parafina, mediante una metodología del tipo convencional (véase, a dicho efecto, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," – Manual de procedimientos de tinción histológica del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas -, mencionado anteriormente, arriba). Los ejemplos de parafina los cuales se pueden utilizar, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los tipos "Parablast", "Brolid" y "Tissuemay". Una vez que se haya embebido la muestra de tejido, puede procederse a seccionar la muestra, mediante un instrumento de corte del tipo microtomo, o por el estilo (véase, a dicho efecto, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," – Manual de procedimientos de tinción histológica del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas -, mencionado anteriormente, arriba). A título de ejemplo, para este procedimiento, las secciones, pueden tener un tamaño correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los aproximadamente 100 micrómetros hasta los aproximadamente cinco micrómetros, en cuanto a lo referente a su espesor. Una vez seccionada la muestra, las secciones, pueden unirse a una platina o portaobjetos, mediante diversos procedimientos estándar. Los ejemplos de portaobjetos adhesivos, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, al silano, la gelatina, la poli-L-lisina, y por el estilo. A título de ejemplo, las secciones embebidas en parafina, pueden unirse a platinas o portaobjetos cargados positivamente, y / o platinas o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

En el caso en el que se haya procedido a utilizar parafina, como el material de embebido, entonces, las secciones de tejido, se desparafinan y se rehidratan con agua. Las secciones de tejido, pueden desparafinarse mediante diversas metodologías estándar convencionales. Así, por ejemplo, se pueden utilizar xilenos y series gradualmente descendentes de alcoholes (véase, a dicho efecto, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," – Manual de procedimientos de tinción histológica del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas -, mencionado anteriormente, arriba). De una forma alternativa, puede procederse a utilizar agentes desparafinantes, no orgánicos, de los tipos comercialmente disponibles en el mercado, tales como el Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

En ciertas formas de presentación, a continuación de la preparación de las muestras, puede procederse a analizar una sección de tejido, mediante la utilización de IHC (inmunohistoquímica). La IHC, puede realizarse en combinación con técnicas adicionales, tales como las consistentes en la tinción morfológica y / o hibridación in situ mediante fluorescencia. Se encuentran disponibles dos tipos generales de IHC; los ensayos directos y los ensayos indirectos. En concordancia con el primer tipo de ensayo, el enlace o unión del anticuerpo al antígeno diana, se determina de una forma directa. Este ensayo directo, utiliza un reactivo marcado, tal como un "tag" fluorescente, o un anticuerpo primario marcado con enzimas, el cual puede visualizarse sin ninguna interacción individual del anticuerpo. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado, se une al antígeno y, a continuación, un segundo anticuerpo marcado, se une al anticuerpo primario. Cuando el segundo anticuerpo se conjuga a un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico, para proporcionar la visualización del antígeno. Acontece entonces una amplificación de la señal, debido al hecho de que, varios anticuerpos secundarios, pueden reaccionar con diferentes epítopes, en el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y / o secundario utilizado para la inmunohistoquímica, se marcará, de una forma típica, con una porción susceptible de poderse detectar. Se encuentran disponibles numerosos marcadores, los cuales pueden agruparse, de una forma general, en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I . El anticuerpo, puede marcarse con un radioisótopo, mediante la utilización de las técnicas las cuales se encuentran descritas, por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, - Protocolos Actuales en Inmunología -, Volúmenes 1 y 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991), y la radioactividad, puede medirse mediante el recuento de centelleo.

(b) Partículas de oro coloidal

(c) Marcadores fluorescentes, incluyendo, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los quelatos de tierras raras (quelatos de europio), Texas Red (rojo tejano), rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umberliferona, ficocriterina, ficocianina, o fluoróforos comercialmente disponibles en el mercado, tales como los consistentes en el SPECTRUM ORANGE 7 y el SPECTRUM GREEN 7, y / o derivados de cualesquiera de entre uno o más de los anteriormente citados arriba. Los niveles fluorescentes, pueden conjugarse al anticuerpo, mediante la utilización de, por ejemplo, las técnicas dadas a conocer en *Current Protocols in Immunology*, - Protocolos actuales en Inmunología (citado anteriormente, arriba). La fluorescencia, puede cuantificarse mediante la utilización de un fluorímetro.

(d) Marcadores de sustratos de enzimas, encontrándose, varios de estos marcadores de sustratos de enzimas, comercialmente disponibles en mercado y, la patente estadounidense US nº 4.275.149, proporciona una revisión de algunos de éstos. La encima, cataliza, de una forma general, una modificación química del sustrato cromogénico, la cual puede medirse mediante la utilización de varias técnicas. Así, por ejemplo, la enzima, puede catalizar un cambio de color, en un sustrato, la cual puede medirse espectrofotométricamente. De una forma alternativa, la enzima, puede modificar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un

cambio en la luminiscencia, se describen anteriormente, arriba. El substrato quimioluminiscente, se excite electrónicamente, mediante una reacción química, y puede entonces emitir luz, la cual puede medirse (mediante la utilización de una quimioluminiscencia, por ejemplo), o donar energía a un receptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos, incluyen a las luciferasas (tales como, por ejemplo, la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana; patente estadounidense US nº 4.737.456), a la luciferina, a las 2,3-dihidroftalazinodionas, al malato deshidrogenasa, a la ureasa, a la peroxidasa, tal como la peroxidasa del rábano picante (HRPO – [del inglés, horseradish peroxidase] -), a la fosfatasa alcalina, a la β -galactosidasa, a la glucoamilasa, a la lisozima, a las sacárido-oxidasas (tales como, por ejemplo, la glucosa-oxidasa, la galactosa-oxidasa, y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa), a las oxidasas heterocíclicas (tales como la uricasa y la xantina-oxidasa), a la lactoperoxidasa, a la microperoxidasa, y por el estilo. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos, se describen en O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, - Preparación de Conjugados de anticuerpos de enzimas -, en Methods in Enzym. (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981).

15 Los ejemplos de combinaciones de substrato – enzima, incluyen, por ejemplo:

(i) La peroxidasa del rábano picante (HRPO), con hidrógeno-peroxidasa, en donde, la hidrógeno-peroxidasa, oxida a un precursor de tinte (tal como, por ejemplo, la ortofenilendiamina (PDP), o el clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB));

(ii) La fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo, como substrato cromogénico, y

(iii) La β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un substrato cromogénico (tal como, por ejemplo, la p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) ó un substrato fluorogénico (tal como, por ejemplo, la 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa).

Para aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, se encuentran comercialmente disponibles, en el mercado, numerosas otras combinaciones adicionales de enzimas – substratos. Para una revisión general de éstas, véanse las patentes estadounidenses US nº 4.275.149 y US nº 4.318.980. Algunas veces, el marcador, se encuentra indirectamente conjugado con el anticuerpo. Las personas expertas en el arte especializado de la técnica, estarán informadas sobre las varias técnicas existentes para realizar o conseguir tales tipos de combinaciones. Así, por ejemplo, el anticuerpo, puede conjugarse con biotina y, cualesquiera de las cuatro amplias categorías de marcadores anteriormente mencionados, arriba, pueden conjugarse con avidina, o viceversa. La avidina, se une selectivamente a la biotina y, así, de este modo, el marcador, puede conjugarse con el anticuerpo, de esta forma indirecta. De una forma alternativa, para realizar una conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo, se conjuga con un pequeño hapteno, y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente, arriba, se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno. Así, de este modo, puede lograrse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

Aparte de los procedimientos para la preparación de las muestras, los cuales se ha discutido anteriormente, arriba, puede ser deseable un tratamiento adicional de la sección del tejido, previamente a la IHC (inmunohistoquímica), durante la IHC, o después de ésta. Así, por ejemplo, pueden llevarse a cabo procedimientos de recuperación de epítomos, tales como el consistente en el calentamiento de la muestra de tejido en tampón citrato (Véase, a dicho efecto, por ejemplo, Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

A continuación de una etapa opcional de bloqueo, la sección de tejido, se expone al anticuerpo primario, durante un transcurso de tiempo suficiente, y bajo una condiciones apropiadas, de tal forma que, al anticuerpo primario, se una al antígeno proteico diana, en la muestra de tejido. Las condiciones apropiadas para conseguir esto, puede determinarse mediante una experimentación de rutina. La extensión de la unión del anticuerpo, a la muestra, se determina mediante la utilización de uno cualquiera de los marcadores detectables discutidos anteriormente, arriba, en este documento. En ciertas formas de presentación, el marcador, es un marcador enzimático (tal como, por ejemplo, la HRPO – [peroxidasa del rábano picante]-), la cual cataliza una modificación química del substrato cromogénico, tal como el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina. En una forma de presentación, el marcador enzimático, se conjuga al anticuerpo, el cual se une, de una forma específica, al anticuerpo primario (así, por ejemplo, el anticuerpo primario, es un anticuerpo policlonal del conejo, y el anticuerpo secundario, es un anticuerpo anti-conejo generado en cabras).

Los especímenes de esta forma preparados, pueden montarse y depositarse en pletinas delizantes cubiertas. Se procede, a continuación, a efectuar la evaluación de las pletinas, mediante, por ejemplo, la utilización de un microscopio, y puede entonces emplearse un criterio de la intensidad de tinción, del tipo que se utiliza, de una forma rutinaria, en el arte especializado de la técnica. El criterio de la intensidad de tinción, pueden evaluarse del siguiente modo:

Patrón de tinción	Puntuación
No se observa ninguna tinción en las células	0
Se detecta una tinción débil / escasamente perceptible, en un porcentaje de más del 10 % de las células	1+
Se observa una tinción débil a moderada, en un porcentaje de más del 10 % de las células	2+
Se observa una tinción moderada a fuerte, en un porcentaje de más del 10 % de las células	3+

5 En procedimientos alternativos, puede ponerse en contacto con un anticuerpo específico, para el citado biomarcador, tal como, por ejemplo, el bFGF, bajo unas condiciones suficientes como para que se forme un complejo anticuerpo – biomarcador, y a continuación, detectar el citado complejo. La presencia del biomarcador, puede detectarse un gran número de veces, tal como mediante procedimientos de transferencia Western o ELISA, para ensayar una gran variedad de tejidos y de muestras, incluyendo el plasma o el suero. Se encuentran comercialmente disponibles, en el mercado, una amplia variedad de técnicas de inmunoensayos, los cuales utilizan tal tipo de formato de ensayo, véanse, por ejemplo, a dicho efecto, las patentes estadounidenses US nº 4.016.043, US nº 4.424.279 y US nº 4.018.653. Éstos incluyen a ambos tipos de ensayos, los ensayos de sitio individual, y los ensayos de dos sitios o del tipo “sándwich”, de los tipos no competitivos, así como los tradicionales ensayos de unión competitivos. Estos ensayos, incluyen así mismo, también, la unión directa de un anticuerpo marcado, a un biomarcador diana.

15 Los ensayos sándwich, se encuentran entre los ensayos de mayor utilidad y más usualmente utilizados. Existe una gran número de variaciones de técnicas de ensayos sándwich, y se pretende el hecho de que, todas ellas, se encuentren abarcadas por la presente invención. En resumen, en un típico ensayo avanzado, se inmoviliza a un anticuerpo no marcado, sobre un substrato sólido, y la muestra a ensayar, se pone en contacto con la molécula unida. Después de un apropiado transcurso de tiempo de incubación, durante un período de tiempo suficiente como para permitir la formación de un complejo anticuerpo – antígeno, se añade un segundo anticuerpo específico al antígeno, marcado con una molécula reportadora, capaz de producir una señal detectable, y éste se incubaba, permitiendo que acontezca un transcurso de tiempo suficiente para la formación de otro complejo de anticuerpo – antígeno – anticuerpo marcado. Se procede a eliminar, mediante lavado, cualquier tipo de material que no haya reaccionado, y se determina la presencia del antígeno, mediante la observación de la señal producida por la molécula reportera. Los resultados, pueden ser, bien ya sea cualitativos, mediante simple observación de la señal visible, o bien ya sea cuantitativos, mediante la comparación con una muestra de control, la cual contenga unas cantidades conocidas de biomarcador.

30 Las variaciones del ensayo avanzado, incluyen a un ensayo simultáneo, en el cual, ambos, la muestra y el anticuerpo marcado, se añaden simultáneamente al anticuerpo unido o enlazado. Estas técnicas, se conocen bien, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, incluyendo cualesquiera variaciones menores, tal y como éstas resultarán fácilmente evidentes. En un ensayo sándwich avanzado, típico, un procede a unir un primer anticuerpo, el cual tiene especificidad para el biomarcador, a una superficie sólida, bien ya sea de una forma covalente, o bien ya sea de una forma pasiva. La superficie sólida, de una forma típica, es de vidrio o de polímero, siendo, los polímeros más usualmente utilizados, la celulosa, la poliacrilamida, el nylon, el poliestireno, el poli(cloruro de vinilideno), o el polipropileno. Los soportes sólidos, pueden ser en forma de tubos, en forma de perlas, en forma de microplacas, o de cualquier otra superficie apropiada para llevar a cabo el inmunoensayo. Los procesos de unión, son bien conocidos en el arte de la técnica especializada, y éstos, consisten, de una forma general, en la unión o enlace covalente por reticulación, o la absorción física, procediéndose a lavar el complejo, en la preparación para la muestra de ensayo. Se procede, a continuación, a añadir un alícuoto de la muestra, al complejo de la fase sólida, y se incubaba, durante un transcurso de tiempo suficiente (tal como, por ejemplo, un transcurso de tiempo de 2 – 40 minutos, o durante el transcurso de toda la noche, en el caso en el que ello sea conveniente), y bajo unas condiciones apropiadas (tales como, por ejemplo, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes situados entre la temperatura ambiente los 40 °C, tal como la consistente en un valor situado entre los 25 °C y los 32 °C, inclusive), para permitir el enlace o unión de cualesquiera subunidades presentes en el anticuerpo. A continuación del período de incubación, se procede a lavar la fase sólida de la subunidad del anticuerpo, y ésta se seca y se incubaba, con un segundo anticuerpo específico para una porción del biomarcador. EL segundo biomarcador, se una molécula reportadora, la cual se utiliza para indicar el enlace o unión del segundo anticuerpo, a la segunda marcadora.

50 Un procedimiento alternativo, involucra la inmovilización de biomarcadores diana en la muestra y, a continuación, la exposición de la diana inmovilizada a un anticuerpo específico, el cual puede encontrarse marcado, o no marcado, con una molécula reportadora. En dependencia de la cantidad de diana y de la fuerza de la señal de la molécula diana, es posible el poder detectar la diana enlazada, mediante el marcaje directo con un anticuerpo. De una forma alterativa, se procede a exponer, al complejo diana - primer anticuerpo, un segundo anticuerpo marcado, el cual es específico al primer anticuerpo, para formar un complejo terciario diana – primer anticuerpo - segundo anticuerpo. El

complejo, se detecta mediante la señal emitida por la molécula reportadora. Por “molécula reportadora”, tal y como ésta expresión se utiliza en la presente especificación, se pretende dar a entender una molécula, la cual, debido a su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable, la cual permite la detección un anticuerpo unido al antígeno. Las moléculas reportadoras mayormente utilizadas, en este tipo de ensayo son, o enzimas, o fluoróforos, o moléculas que contienen radionúclidos (a saber, los radioisótopos), y las moléculas quimioluminiscentes.

En el caso un inmunoensayo enzimático, se procede a conjugar una enzima al segundo anticuerpo, de una forma general, por mediación de glutaraldehído o periodato. Tal y como será fácilmente reconocible, no obstante, existe una gran variedad de de diferentes técnicas de conjugación, las cuales se encuentran fácilmente disponibles, para las personas expertas en el arte de la técnica especializada. Las enzimas usualmente utilizadas, incluyen a la peroxidasa del rábano picante, a la glucosa-oxidasa, a la galactosidasa, y a la fosfatasa alcalina, entre otras. Los substratos a ser utilizados, con las enzimas específicas, se eligen, de una forma general, para la producción, en la hidrólisis, mediante la correspondiente enzima, de un cambio de color detectable. Los ejemplos de enzimas apropiadas, incluyen a la fosfatasa alcalina y a la peroxidasa alcalina. Es también posible el emplear substratos cromogénicos, los cuales proporcionan un producto fluorescente, en lugar de los substratos cromogénicos anotados anteriormente, arriba. En la totalidad de los casos, se añade el anticuerpo marcado con la enzima, al primer complejo de anticuerpo – antígeno – anticuerpo, se deja que éste se una y, a continuación, se procede a eliminar, mediante lavado, el exceso de reactivo. Se procede, a continuación, a añadir el substrato apropiado, al complejo de anticuerpo – antígeno – anticuerpo. El substrato, reaccionará con la enzima ligada al segundo anticuerpo, proporcionando una señal visual cualitativa, la cual puede adicionalmente cuantificarse, de una forma usual, por espectrofotometría, para proporcionar una indicación de la cantidad de biomarcador el cual se encuentra presente en la muestra. De una forma alternativa, pueden acoplarse químicamente compuestos fluorescentes, tales como los consistentes en la fluoresceína y la rodamina, a los anticuerpos, sin modificar su capacidad de enlace o unión. Cuando se activa mediante la iluminación con luz de una determinada longitud de onda particular, entonces, el anticuerpo marcado con fluorocromo, absorbe la energía lumínica, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz, a un color característico, el cual es susceptible de poderse detectar, de una forma visual, en la molécula. Tal y como sucede en la EIA (valoración del impacto medioambiental -[EIA, del inglés, Environmental Impact Assessment]-), el anticuerpo marcado con fluorescente, se deja que se una al primer complejo anticuerpo – marcador molecular. Después de haber procedido a lavar el reactivo no enlazado, se procede a exponer el primer complejo terciario remanente, a la luz, de la apropiada longitud de onda, indicando entonces, la fluorescencia observada, la presencia del marcador molecular de interés. La fluorescencia y las técnicas de EIA (valoración del impacto medioambiental), se encuentran ambas bien establecidas en el arte especializado de la técnica. No obstante, pueden también emplearse otras moléculas reportadoras, tales como las moléculas radioisótopas, las moléculas quimioluminiscentes, o las moléculas bioluminiscentes.

Se contempla el hecho de que, las técnicas descritas anteriormente, arriba, puedan emplearse para detectar el nivel de expresión proteica del BFGF

Los procedimientos de la presente invención, incluyen, de una forma adicional, a los protocolos los cuales examinan el nivel de expresión del mRNA del bFGF, en una muestra. Los procedimientos para la evaluación de los mRNAs, en células, son bien conocidos, y éstos incluyen, por ejemplo, a los ensayos de hibridación, mediante la utilización de sondas de DNA complementarias (tal como la hibridación in situ, mediante la utilización ribosondas marcadas, específicas para uno o más genes, la transferencia Northern, y las técnicas relacionadas), y varios ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como la RT-PCR, mediante la utilización de cebadores complementarios, específicos para uno o más genes, y procedimientos de detección mediante amplificación de otro tipo, tales como los consistentes en, por ejemplo, DNA ramificado, SISBA, TMA, y por el estilo.

En ciertas formas de presentación, puede procederse a ensayar, de una forma conveniente, muestras de tejido o de células, para mRNAs, mediante la utilización de transferencia de Northern, de análisis del tipo “dot blot” (transferencia por puntos”, o mediante análisis por PCR. Así, por ejemplo, los ensayos de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa -[RT-PCR, del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction] -), tales como los consistentes en los ensayos cuantitativos por PCR, se conocen bien, en el arte especializado de la técnica. En una forma ilustrativa de presentación de la presente invención, un procedimiento para detectar un mRNA diana, en una muestra biológica, comprende la producción de cDNA, a partir de una muestra, por transcripción inversa, mediante la utilización de por lo menos un cebador; la amplificación del cDNA de esta forma producido, mediante la utilización de polinucleótido diana, como cebadores de sentido y antisentido, para amplificar los cDNAs contenidos; y la detección de la presencia del cDNA diana amplificado, mediante la utilización de sondas de polinucleótidos. De una forma adicional, tales tipos de procedimientos, pueden incluir una o más etapas, las cuales permiten el determinar los niveles de mRNA diana, en una muestra biológica (tal como, por ejemplo, procediendo a examinar, de una forma simultánea, los niveles de una secuencia de mRNA de control, comparativa, de un gen “housekeeping” o constitutivos, tal como el consistente en un miembro de la familia de las actinas. De una forma opcional, puede observarse la secuencia del cDNA diana amplificado.

Los procedimientos opcionales de la presente invención, incluyen protocolos los cuales examinan o detectan

mRNAs, tales como las mRNAs diana, en una muestra de tejido o de células, mediante tecnologías de microseries. Mediante la utilización de microseries de ácido nucleico, se transcriben inversamente las muestras de ensayo y de control de mRNA, procedentes de las muestras de tejido de ensayo y de control, y se procede a su marcaje, para generar sondas de cDNA. Se procede, a continuación, a hibridar las sondas, a una serie de ácidos nucleicos inmovilizados sobre un soporte sólido. La serie, se configura de tal forma que se conozcan la secuencia y la posición de cada miembro de la serie. La hibridación de una sonda marcada con un miembro particular de la serie, indica el hecho de que, la muestra a partir de la cual se ha derivado la sonda, expresa dicho gen. El análisis de expresión genética diferencial del tejido enfermo, puede proporcionar una información valiosa. La tecnología de microseries, utiliza las técnicas de hibridación del ácido nucleico y la tecnología de computación, para evaluar el perfil de expresión del mRNA de miles de genes, en el ámbito de un experimento individual (véase, a dicho efecto, por ejemplo, la patente internacional WO 01 / 75 166, publicada en fecha 11 de Octubre del 2001; las patentes estadounidenses US nº 5.700.637; US nº 5.445.934; y US nº 5.807.522; Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. et al., Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999), para una discusión de la fabricación de microseries). Las microseries de DNA (DNA microarrays), son series en miniatura, las cuales contienen fragmentos de genes, los cuales, o bien se han sintetizado directamente, o bien se han salpicado, como motas, sobre vidrios, u otros sustratos. En una sola serie individual, se encuentran usualmente representados miles de genes. Un experimento típico de microseries, involucra a la siguientes etapas: 1) la preparación de la diana de RMA, marcada de forma fluorescente, aislada de la muestra; 2) la hibridación de la diana marcada, a la microserie; 3) el lavado, la tinción y la exploración de rastreo de la serie; 4) el análisis de la imagen sometida a exploración de rastreo; y 5) la generación de los perfiles de expresión genética. De una forma usual, en la actualidad, se están utilizando dos tipos principales de microseries de DNA: series de oligonucleótidos (usualmente, de 25 a 70 meros) series de expresión de genes, los cuales contienen productos de PCR preparados a partir de cDNA. En la formación de una serie, los oligonucleótidos, pueden bien ya sea prefabricarse y salpicarse a modo de motas a la superficie, o sintetizarse directamente sobre la superficie (in situ).

El sistema "Affymetrix GeneChip®", es un sistema de microseries, el cual se encuentra comercialmente disponible en el mercado, y cual comprende series fabricadas mediante la síntesis directa de oligonucleótidos, sobre una superficie de vidrio. Series de sondas / genes: Oligómeros, usualmente, de 25 meros, se sintetizan directamente sobre una oblea o disco de vidrio, mediante una combinación de fotolitografía a base de semiconductores, y tecnologías de síntesis química de fase sólida. Cada serie, contiene hasta un número de 400.000 oligos diferentes, y cada oligo, se encuentra presente en millones de copias. Puesto que, las sondas de oligonucleótidos se sintetizan en localizaciones conocidas, en la serie, los modelos patrón de la hibridación y las intensidad de de señal, pueden interpretarse en términos de identidad genética, y niveles de expresión relativos, mediante el sistema de software informático del tipo "Affymetrix Microarray Suite software". Cada gen, se encuentra representado en la serie, mediante una serie de diferentes sondas oligonucleótidas. Cada par de sondas, consiste en un oligonucleótido de adaptación o emparejamiento perfecto, y un oligonucleótido de disparidad o divergencia. La sonda de emparejamiento perfecto, tiene una secuencia exactamente complementaria al gen particular, y así, de este modo, mide la expresión del gen. La sonda de disparidad, difiere de la sonda de emparejamiento perfecto, mediante una sustitución de base individual, perturbando la unión de la transcripto genético diana. Esto ayuda a determinar el trasfondo y la hibridación no específica, la cual contribuye a la señal medida para el oligo de de emparejamiento perfecto. El sistema de software informático "Microarray Suite software" substraee las intensidades de hibridación de las sondas de disparidad, de aquéllas de las sondas de emparejamiento perfecto, para determinar el valor de la intensidad absoluta o específica, de cada conjunto de sondas. Las sondas, se eligen en base a su información actual, de procedencia del banco de genes "Genbank", y de otros de depósito o bancos de nucleótidos. Se supone que, las secuencias reconocen las regiones únicas del extremo 3' del gen. Para llevar a cabo la hibridación, de hasta 64 series, a la vez, se utiliza un horno de hibridación del tipo "GeneChip Hybridization Oven (usualmente denominado "rotisserie" oven). La estación de fluidos, realiza el lavado y la tinción de las series de sondas. Ésta se trata de una estación completamente automatizada, y contiene cuatro módulos, soportando, cada módulo, una serie de sondas. Cada módulo, se controla de una forma independiente, mediante un sistema de software informático del tipo "Microarray Suite software", mediante la utilización de protocolos para fluidos preprogramados. El "scanner" o dispositivo de exploración de rastreo, se trata de un dispositivo de exploración de rastreo por fluorescencia, de láser confocal, el cual mide la intensidad de la fluorescencia emitida por el cRNA marcado, unido a las series de sondas. La estación de trabajo de la computadora con el sistema de software informático del tipo "Microarray Suite software" controla la estación de fluidos y el dispositivo de exploración de rastreo (scanner). El sistema de software informático del tipo "Microarray Suite software", puede controlar un número de hasta diez estaciones de fluidos, mediante la utilización de una hibridación preprogramada, protocolos de lavado de tinción, para la serie de sondas. El sistema de software informático, adquiere también, y convierte, los datos de la intensidad de la hibridación, en un llamamiento de presencia / ausencia, para cada gen, mediante la utilización de algoritmos apropiados. Finalmente, el software informático, detecta cambios en la expresión genética, entre los experimentos mediante análisis de comparación y conforma los resultados de salida en archivos txt, los cuales pueden utilizarse con otros programas de software informático, para datos de análisis adicionales.

La expresión de un biomarcador, en una muestra de tejido o de células, puede también examinarse, vía ensayos funcionales o ensayos basados en actividad. Así, por ejemplo, si el biomarcador es una enzima, se pueden entonces realizar ensayos los cuales son conocidos en el arte especializado de la técnica, para determinar o para detectar la

presencia de una actividad enzimática dada, en la muestra de tejido o celular.

Los equipos de ensayo a modo de "kits" de la revelación, tienen un gran número de formas de presentación. En ciertas formas de presentación, un equipo de ensayo a modo de "kit", comprende un recipiente contenedor, un marcador sobre el citado recipiente contenedor, y una composición contenida en el interior del citado recipiente contenedor, en donde, la composición, incluye uno o más anticuerpos primarios, los cuales se unen al bFGF, indicando, el marcador en el recipiente contenedor, el hecho de que, la composición, puede utilizarse para evaluar la presencia de la proteína bFGF, en por lo menos un tipo de célula de mamífero, e instrucciones para la utilización de anticuerpos, para la evaluación de la presencia de la proteína bFGF, en por lo menos un tipo de célula de mamífero. El equipo a modo de "kit", puede comprender, de una forma adicional, un juego de instrucciones y materiales para preparar una muestra de tejido, y aplicar el anticuerpo y la sonda, a la misma sección de la muestra de tejido. El equipo a modo de "kit", incluye ambos, un anticuerpo primario y secundario, en donde, el anticuerpo secundario, se conjuga a un marcador, tal como, por ejemplo, un marcador enzimático.

Otra forma de presentación, es la consistente en un equipo a modo de "kit", la cual comprende un recipiente contenedor, un marcador, en el citado recipiente contenedor, y una composición, contenida en el interior del citado recipiente contenedor; en donde, la composición, incluye uno o más polinucleótidos, los cuales hibridan a la secuencia polinucleótida del bFGF, bajo unas condiciones astringentes, el marcador en el citado recipiente contenedor, indica el hecho de que, la composición, puede utilizarse para evaluar la presencia y / o los niveles de expresión del bFGF, en por lo menos una célula de mamífero, e instrucciones para la utilización del polinucleótido, para evaluar la presencia y / o los niveles de expresión de los RNAs o DNAs de bFGF, en por lo menos una célula de mamífero.

Otros componentes opcionales, en el equipo a modo de "kit", incluyen uno o más tampones (tales como, por ejemplo, un tampón de bloque, un tampón de lavado, un tampón de substratos, etc.), otros reactivos tales como los consistentes en un substrato (tal como, por ejemplo, cromóforo), el cual se encuentra químicamente modificado mediante un marcador enzimático, una solución de recuperación de epítomos, muestras de control (controles positivos y / o negativos), platina(s) de control, etc.

La presente revelación, contempla un procedimiento para tratar un desorden o trastorno angiogénico (tal como, por ejemplo, un trastorno o desorden caracterizado por una angiogénesis anormal, o un vascular anormal), en un paciente, procedimiento éste, el cual comprende las etapas de determinar el hecho de que, la muestra obtenida del paciente, tiene un alto nivel de expresión del bFGF, al compararse con una muestra de referencia, y administrar, al paciente, una cantidad efectiva de un agente antiangiogénico, mediante el cual, se trata se trata el trastorno o desorden proliferativo crónico. En ciertas formas de presentación, la terapia antiangiogénica, comprende la administración de una antagonista del VEGF. En cierta forma de presentación, el antagonista del VEGF, es un anticuerpo anti-VEGF. En ciertas formas de presentación, el anticuerpo anti-VEGF, es el bevacizumab. En ciertas formas de presentación, los procedimientos, comprenden la administración de unas cantidades correspondientes a una tasa de 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg ó 15 mg/kg de bevacizumab, al paciente el cual tiene un nivel más alto de expresión del bFGF.

Los ejemplos de trastornos o desórdenes angiogénicos a ser tratados aquí, incluyen, aunque no de una de una forma limitativa en cuanto a éstos, al cáncer, de una forma especial, a los tumores sólidos vascularizados, y a los tumores metastáticos (incluyendo al cáncer de colon, al cáncer de pulmón, al cáncer de mama, al cáncer de ovario, al cáncer renal y al glioblastoma), a las enfermedades causadas por neovascularización ocular, especialmente, la ceguera diabética, las retinopatías, la retinopatía diabética primaria, o la degeneración macular relacionada con la edad, la neovascularización coroidea (CNV), el edema macular diabético, la miopía patológica, la enfermedad de von Hippel-Lindau, la histoplasmosis del ojo, la oclusión de la vena retinal central (CRVO – [del inglés, Central Retinal Vein Occlusion] -), la neovascularización corneal, la neovascularización retiniana, y la rubosis; a la psoriasis, a la artritis psoriática, a la hemangioblastoma, tal como la hemangioma; a las enfermedades inflamatorias renales, tales como la glomerulonefritis, especialmente, la glomerulonefritis mesangioproliferativa, el síndrome urémico hemolítico, la neuropatía diabética o la nefroesclerosis hipertensiva; a varias enfermedades inflamatorias, tales como la artritis, especialmente, la artritis reumatoidea, la enfermedad inflamatoria del intestino, la psoriasis, la sarcoidosis, la arteriosclerosis arterial, y las enfermedades las cuales acontecen después de los trasplantes, la endometriosis o el asma crónico y otros condiciones o trastornos; a los estados de enfermedad incluyendo, por el ejemplo, al edema asociado con los tumores, tales como, por ejemplo, los tumores cerebrales, la ascitis asociada con malignidades; al síndrome de Meig; a la inflamación pulmonar; al síndrome nefrótico; a la efusión pericárdica, a la efusión pleural; a la permeabilidad asociada con enfermedades cardiovasculares, tal como la consistente en la condición o trastorno post-infarto de miocardio, y las apoplejías, y por el estilo.

Los ejemplos de cáncer a ser tratados aquí, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, al carcinoma, el linfoma, el blastoma, el sarcoma y la leucemia. De una forma más particular, los ejemplos de dichos tipos de cáncer, incluyen a los cánceres consistentes en el cáncer de células escamosas, el cáncer de pulmón (incluyendo al cáncer de pulmón de células pequeñas, al cáncer de pulmón de células no pequeñas, al adenocarcinoma de pulmón y al carcinoma escamoso o epidermoide de pulmón), el cáncer del peritoneo, el cáncer

hepatoviliar, el cáncer gástrico o de estómago (incluyendo al cáncer gastrointestinal), el cáncer pancreático, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovarios, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el cáncer endometrial o uterino, el carcinoma de las glándulas salivales, el cáncer de riñón o renal, el cáncer de hígado, el cáncer de próstata, el cáncer de vulva, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, y varios tipos de cáncer de cabeza y de cuello, así como, también, el linfoma de células B (incluyendo, al linfoma no Hodgkin (NHL) de bajo grado / folicular; NHL linfocítico pequeño ((SL)NHL); al NHL de grado intermedio / folicular; al NHL difuso de grado intermedio; al NHL inmunoblástico de alto; al NHL linfoblástico de grado alto; al NHL de células pequeñas no segmentadas, de grado alto; al NHL de enfermedad voluminosa, al linfoma de células manto; al linfoma relacionado con el SIDA; y a la macroglobulinemia de Waldenstrom), la leucemia linfocítica crónica (CLL); la leucemia linfoblástica aguda (ALL); la leucemia de células pilosas; la leucemia mieloblástica crónica; y el desorden o trastorno linfoproliferativo post-transplante (PTLD); así como, también, la proliferación vascular anormal, asociada con la facomatosis, el edema (tal como el edema asociado con los tumores cerebrales), y el síndrome de Meig. De una forma más particular, los cánceres los cuales son susceptibles de poderse tratar mediante los anticuerpos de la presente invención, incluyen al cáncer de mama, al cáncer colorrectal, al cáncer de recto, al cáncer de pulmón de células no pequeñas, al linfoma no Hodgkin (NHL), al cáncer de células renales, al cáncer de próstata, al cáncer de hígado, al cáncer pancreático, al sarcoma de tejido blando, al sarcoma de Kaposi, al carcinoma carcinoide, al cáncer de cabeza y de cuello, al melanoma, al cáncer de ovarios, al mesotelioma, y al mieloma múltiple.

Se contempla el hecho de que, cuando se utiliza para tratar varias enfermedades, tales como los tumores, el antagonista del VEGF, puede combinarse con uno más agentes terapéuticos adicionales distintos, para la misma enfermedad o para enfermedades similares. Así, por ejemplo, cuando se utiliza para tratar el cáncer, los antagonistas del VEGF, pueden utilizarse en combinación con terapias anticancerosas convencionales, tales como las consistentes en la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia o combinaciones de éstas.

En ciertas formas de presentación, los antagonistas del VEGF (tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF), y uno o más agentes terapéuticos, pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en una cantidad y durante un transcurso de tiempo suficiente, como para tratar los tumores. En ciertas formas de presentación, el antagonista del VEGF, puede administrarse subsiguientemente a otros agentes anticancerosos. En ciertas formas de presentación, el antagonista del VEGF, se administra simultáneamente con una terapia para el cáncer, tal como, por ejemplo, la quimioterapia. De una forma alternativa o de una forma opcional, la terapia a base de antagonistas, se alterna con otra terapia para el cáncer, la cual puede llevarse a cabo en cualquier orden.

En ciertos aspectos, otros agentes terapéuticos de utilidad para la combinación con la terapia para el cáncer, con el antagonista del VEGF, incluyen a otros agentes antiangiogénicos. Se han identificado muchos agentes antiangiogénicos, y éstos son conocidos, en el arte especializado de la técnica, incluyendo a aquéllos los cuales se han listado por parte de Carmeliet y Jain (2000) Nature 407 (6801): 249-57, y aquéllos los cuales se describen aquí, en este documento, en las secciones de Definiciones, y de Inhibidores angiogénicos.

En ciertas formas de presentación, el antagonista del VEGF, puede utilizarse en combinación con un antagonista del bFGF. En cierta forma de presentación, el antagonista del VEGF, es un anticuerpo anti-VEGF. En ciertas formas de presentación, el antagonista del bFGF, es un anticuerpo anti-bFGF. En cierta forma de presentación, el anticuerpo anti-VEGF consistente en el bevacizumab, puede utilizarse en combinación con un anticuerpo antagonista del bFGF. En cierta forma de presentación, el bevacizumab, puede utilizarse en combinación con un anticuerpo anti-bFGF. En ciertas formas de presentación, el anticuerpo anti-VEGF y el anticuerpo anti-bFGF, pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, en una cantidad y durante un transcurso de tiempo, los cuales sean suficientes para tratar los tumores.

Los agentes correspondientes a la revelación (divulgación) (tales como, por ejemplo, los antagonistas del VEGF, el antagonista del bFGF, el agente terapéutico, o el agente anticanceroso), se administran a un paciente humano, en concordancia con procedimientos los cuales se conocen bien, tales como los consistentes en una administración intravenosa, como un bolo o, mediante la infusión continua, durante un determinado transcurso de tiempo, mediante las rutas de administración consistentes en la ruta intermuscular, la ruta intraperitoneal, la ruta intracerebroespinal, la ruta subcutánea, la ruta intraarticular, la ruta intrasinovial, la ruta intratecal, la ruta oral, la ruta tópica, o la ruta de inhalación, y / o la administración subcutánea.

Cuando el procedimiento de la revelación, contempla la administración de un anticuerpo, a un paciente, en dependencia del tipo y de la gravedad de la enfermedad, entonces, una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg (tal como, por ejemplo, de 0,1 – 20 mg/kg), de anticuerpo, será una dosificación inicial candidata, para la administración al paciente, bien ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o bien ya sea mediante una infusión continua. Una dosificación diaria típica, podría ser la correspondiente a una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los aproximadamente 1 µg/kg, hasta los aproximadamente 100 mg/kg ó más, en dependencia de los factores anteriormente mencionados, arriba. Para administraciones repetidas durante un transcurso de tiempo de varios días, o más, en dependencia de la

condición o trastorno a tratar, el tratamiento, se sostiene, hasta que acontezca la deseada supresión de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, no obstante, pueden ser de utilidad otros regímenes de dosificación. En ciertas formas de presentación, el anticuerpo, se administra cada dos o tres semanas, a una dosis correspondiente una tasa comprendida dentro de unos márgenes que van desde los aproximadamente 5 mg/kg hasta los aproximadamente 15 mg/kg. En un aspecto, el anticuerpo, se administra cada dos o tres semanas, a una dosis correspondiente una tasa de 5 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg, ó de aproximadamente 15 mg/kg. Tal tipo de régimen de dosificación, puede utilizarse en combinación con un régimen de quimioterapia. En algunos aspectos, el régimen de quimioterapia, involucra la administración tradicional de un régimen intermitente de altas dosis. En ciertas formas de presentación, los agentes quimioterapéuticos, se administran mediante dosis las cuales son más pequeñas y más frecuentes, sin pausas programadas (“quimioterapia metronómica”). El progreso de la terapia, se controla y gobierna fácilmente, mediante la utilización de técnicas y ensayos convencionales.

Las cantidades efectivas de los agentes terapéuticos, tales como, por ejemplo, los consistentes en un antagonista del bFGF, administrado en combinación con un antagonista del VEGF, serán a discreción del médico especialista. Las dosificaciones apropiadas para el antagonista del VEGF, son aquéllas las cuales se utilizan en el momento presente, y éstas puede reducirse, debido a la acción combinada (sinergia), del antagonista del VEGF y el antagonista diferente, tal como, por ejemplo, el antagonista del bFGF.

La composición del anticuerpo, se formulará, se dosificará y se administrará, de una forma coherente con la buena práctica médica. Los factores para la consideración, en este contexto, incluyen al desorden o trastorno que se esté tratando, al mamífero particular el cual se esté tratando, a la condición o trastorno clínico del paciente individual, a la causa del trastorno o desorden, al sitio de suministro del agente, al procedimiento o método de administración, a la programación de la administración, y a otros factores los cuales son conocidos por parte de los facultativos médicos especialistas practicantes. La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva”, del anticuerpo a administrar, se controlará y gobernará, mediante tales tipos de consideraciones, y ésta es cantidad mínima necesaria, para prevenir, mejorar, o tratar la enfermedad o trastorno o desorden. No es necesario el formular el anticuerpo con uno o con más agentes del tipo usualmente utilizado en la actualidad, para prevenir o tratar el desorden o trastorno en cuestión, si bien, y de una forma opcional, sí se puede formular el anticuerpo en cuestión, con tales tipos de agentes usualmente utilizados en la actualidad. La cantidad efectiva de tales tipos de agentes adicionales distintos, depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de desorden o trastorno o de tratamiento, y de otros factores, los cuales se han discutido anteriormente, arriba. Éstos se utilizan, de una forma general, en las mismas dosificaciones y mediante las mismas rutas de administración, cuyo uso se ha descrito anteriormente, arriba, a razón de un porcentaje correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente un 1 % hasta aproximadamente un 99 %, con respecto a las dosificaciones cuyo empleo se ha descrito anteriormente, arriba. De una forma general, el alivio o mitigación o el tratamiento de una enfermedad, o desorden o trastorno, involucra la atenuación o reducción de uno o de más síntomas o problemas médicos, asociados con la enfermedad o trastorno. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco, puede cumplir con una o con combinación de las siguientes funciones: reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (tal como, por ejemplo, reducir en cierta extensión y / o parar) la infiltración de células cancerosas, al interior de los órganos periféricos; inhibir la metástasis tumoral; inhibir, en alguna extensión y hasta cierto punto, el tamaño del tumor; y / o aliviar o mitigar, en alguna extensión y hasta cierto punto, uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En cuanto a lo referente al fármaco, éste puede prevenir o evitar el crecimiento y / la exterminación de las células cancerosas existentes, y éste puede ser citostático y / o citotóxico. En algunas formas de presentación, una composición de la presente revelación, puede utilizarse para prevenir o evitar el inicio o la recidiva de la enfermedad, o trastorno o desorden, en un sujeto o mamífero.

En ciertos aspectos, la revelación, proporciona un procedimiento para identificar a un paciente con cáncer, el cual pueda beneficiarse de una terapia antiangiogénica, la cual comprende la determinación de los niveles de expresión del bFGF, en una muestra obtenida de un paciente, y a continuación, tratar al paciente, mediante la administración de cantidades efectivas de un antagonista del VEGF, y uno o más agentes terapéuticos, al paciente. Puede utilizarse una gran variedad de agentes terapéuticos en los procedimientos de tratamiento combinados de la invención. Una lista ejemplar y no limitativa de los agentes terapéuticos contemplados, es la que se proporciona aquí, en este documento, en la sección en la cual se facilitan las definiciones de los términos los cuales se utilizan en esta especificación.

En ciertas formas de presentación, los procedimientos de la presente revelación, comprenden la administración, a un paciente, de una antagonista del VEGF, y una cantidad efectiva de por lo menos un agente quimioterapéutico. En ciertas formas de presentación, el agente quimioterapéutico, es el cisplatino. En ciertas formas de presentación, el agente quimioterapéutico, es la gemcitabina. En ciertas formas de presentación, el agente quimioterapéutico, es el carboplatino. En ciertas formas de presentación, el agente quimioterapéutico, es el paclitaxel. En ciertas formas de presentación, se administran, al paciente, cantidades efectivas de antagonista del VEGF, de cisplatino y de gemcitabina. En ciertas forma de presentación, se administran, al paciente, cantidades efectivas de antagonista del VEGF, de carboplatino y de paclitaxel.

Tal y como se entenderá, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, las dosis

apropiadas de agentes terapéuticos, serán, generalmente, aproximadamente aquéllas utilizadas empleadas en las terapias químicas, en donde, los agentes quimioterapéuticos, se administran bien ya sea solos, o bien ya sea en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Acontece no obstante una variación de la dosificación a administrar, en dependencia de la condición o trastorno la cual se esté tratando. El médico especialista que administre el tratamiento, estará capacitado para determinar las dosis individuales para los sujetos individuales.

EJEMPLOS

Protocolo de Ensayo AVAiL

La adición del bevacizumab a la quimioterapia a base de platino, en ensayos de fase III, estudio E4599 y ensayo AVAIL (Avastin en el pulmón), mejoraba los resultados, en pacientes afectados de NSCLC avanzado. En el estudio E4599, era un objetivo del estudio, el determinar el pronóstico y valor predictivo de varios biomarcadores. Este análisis de varios biomarcadores, mostraba el hecho de que, los niveles de la molécula de adhesión intramuscular 1 (ICAM 1), pueden ser predictivos de la respuesta a la terapia y el pronóstico de supervivencia, mientras que, los pacientes con unos niveles altos del factor de crecimiento endotelial vascular de base o referencia, pueden tener una tasa de respuesta superior al bevacizumab. En el ensayo consistente en el estudio AVAiL, se procedió a llevar a cabo un análisis de biomarcadores similar.

El estudio AVAiL ("AVASTIN™ in Lung" BO177704– [Avastin en el pulmón, BO177704]-), es un estudio de fase III, aleatorio, doble ciego, controlado, el cual incluye a más de 1.000 pacientes, con un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), previamente no tratado, avanzado, con una histología distinta que la célula escamosa (figura 1). El objetivo primario del estudio, era el de demostrar la superioridad en la supervivencia exenta de progresión (PFS – [del inglés, progression free survival] -), de los pacientes, de ambos, las secciones con el tratamiento con contenido en AVASTIN™, versus, las secciones del régimen de control. Los aspectos secundarios del estudio, incluían la supervivencia total (OS – [del inglés, overall survival]-), la tasa de respuesta, y la duración de la respuesta, la calidad de vida y una comparación de seguridad de las dos dosis de AVASTIN™, versus niveles estándar de cuidado. Se estudiaron dos dosis de AVASTIN™ (7,5 mg/kg y 15 mg/kg). El estudio AVAiL, confirmó el beneficio clínico, en términos de PFS (supervivencia exenta de progresión), incrementada de una forma significativa (unas tasas de PFS, las cuales eran de un 20% a un 30% mayores que las correspondientes a aquellos pacientes los cuales recibieron únicamente la quimioterapia), ya encontrada en el ensayo (E45999) de los pacientes con NSCLC (véase, a dicho efecto, Reck M, et al. J Clin Oncol 2009; 27(8):1227-1234; Sandler A.B. et al.; N Engl. J. Med. 2006; 355: 2542-2550). Se observó un efecto similar del tratamiento, en ambos niveles de dosificación con AVASTIN™, a razón de una tasas de dosificación de 7,5 y 15 mg/kg.

El protocolo del ensayo, se aprobó por parte del consejo directivo institucional de revisión, en cada lugar, y éste se realizó en concordancia con la Declaración de Helsinki, en concordancia también con las instrucciones de las Buenas Prácticas Clínicas actuales de la Administración Estadounidense para los Alimentos y los Fármacos (current US Food and Drug Administration Good Clinical Practices), y también en concordancia con los requerimientos éticos locales y los requerimientos legales. La decisión para llevar a cabo los análisis retrospectivos de los biomarcadores, para todos los pacientes elegidos de una forma aleatoria, para el ensayo AVAiL, se tomó después de haberse completado la selección para el estudio.

Se procedió a tomar el perfil demográfico completo del conjunto de los pacientes, y se recopiló y se registró el historial clínico médico de cada paciente. Todos los pacientes, experimentaron un examen físico, incluyendo el peso, los signos vitales superiores, y el examen cardiopulmonar, el estatus evolutivo según el ECOG (Grupo Oncológico Cooperativo Occidental – [ECOG, el inglés Eastern Cooperative Oncology Group] -). El ECG (ecocardiograma) de 12 derivaciones). El estatus tumoral de cada paciente, se valoró de la forma que se ha descrito previamente, arriba (véase, a dicho efecto, Reck M. et al., J. Clin. Oncol. 2009; 27(9): 1227-1234). En resumen, el estatus tumoral, se valoró cada tres ciclos (aproximadamente, cada 9 meses), durante el tratamiento de ensayo. Si los pacientes renunciaban al tratamiento de ensayo, por razones distintas de enfermedad progresiva, los valores de seguimiento de los tumores, se repetían cada dos meses, hasta la progresión de la enfermedad. Las respuestas tumorales, se valoraron, por parte del investigador, en concordancia con las instrucciones según los "Response Evaluation Criteria in Solid Tumors" (Criterios de evaluación de la respuesta, en los tumores sólidos) (véase, a dicho efecto, Therasse P. et al., J. Clin. Oncol. 2009; 27(9):1227-1234). Un consejo directivo independiente denominado "independent Data and Safety Monitoring Board" (Consejo directivo independiente de gobierno y control de los datos y de la seguridad), era el responsable para llevar a cabo la revisión de los datos de seguridad no entremezclados. Los casos adversos (AE – [del inglés, Adverse events], se clasificaron mediante la utilización de la versión 3.0 del sistema de clasificación consistente en el "National Cancer Institute Common Toxicity Criteria for Adverse Events (version 3.0)" (Criterios usuales de toxicidad del Instituto Nacional del Cáncer para eventos adversos – versión 3.0), y éstos se codificaron, en concordancia con el diccionario médico para las actividades regulatorias. Se obtuvieron así mismo, también, los datos de laboratorios, y éstos se suministraron al "Data and Safety Monitoring Board" (Consejo directivo de gobierno y control de datos y de la seguridad).

Las características de referencia de base de la población de biomarcadores, para pacientes los cuales reciben una

dosis baja de bevacizumab (7,5 mg/kg) se encuentran recopiladas en la Tabla 1, la cual se facilita abajo, a continuación. Las características demográficas de referencia de base, de referencia, para los pacientes incluidos en el análisis de biomarcadores el cual se muestra en la Tabla 1, eran un reflejo de la población de estudio, en su conjunto.

	Placebo + cis/gem N = 112	Bv7,5 + cis/gem N = 131
5	<u>Tabla 1</u>	
10	<hr/>	
	Sexo	
15	MUJER 40 (36%)	48 (37%)
	HOMBRE MALE 72 (64%) 83 (63%)	
	n 112	131
	<hr/>	
20	Estatus de fumador	
	NUNCA FUE FUMADOR 26 (23%)	33 (25%)
	FUE FUMADOR EN EL PASADO 58 (52%)	57 (44%)
	FUMADOR EN LA ACTUALIDAD 28 (25%)	41 (31%)
25	n 112	131
	<hr/>	
	Categoría de edad en años	
30	<65 76 (68%)	97 (74%)
	>=65 36 (32%) 34 (26%)	
	n 112	131
	<hr/>	
35	Estado de la enfermedad	
	III B (NO RECURRENTE) 14 (13%)	20 (15%)
	IV (NO RECURRENTE) 90 (80%)	98 (75%)
	RECURRENTE 8 (7%)	13 (10%)
40	n 112	131
	<hr/>	
	Categoría regional	
45	CENTROAMÉRICA SUDAMÉRICA 1 (<1%)	-
	ÉSTE ASIÁTICO 3 (3%)	11 (8%)
	EUROPE DEL ESTE 28 (25%)	31 (24%)
	EUROPA OCCIDENTAL/ AUSTRALIA/ CANADÁ 80 (71%)	89 (68%)
	n 112	131
	<hr/>	
50	Raza	
	Asiática 5 (4%)	13 (10%)
	Blanca 107 (96%)	117 (89%)
55	Otras - 1 (<1%)	
	n 112	131
	<hr/>	
60	ECOG (referencia de base)	
	0 45 (40%)	52 (40%)
	1 67 (60%)	79 (60%)
	n 112	131

Continuación tabla

5	Clasificación celular		
10	ADENOCARCINOMA	96 (86%)	116 (89%)
	CARCINOMA DE CÉLULAS GRANDES	13 (12%)	8 (6%)
	ADENOCARCINOMA PREDOMINANTEMENTE MIXTO	-	1 (<1%)
	OTROS	3 (3%)	6 (5%)
	n	112	131
15	LDH de referencia de base		
	<= ULN	62 (58%)	82 (67%)
	> ULN	45 (42%)	40 (33%)
20	n	107	122
25	Plaquetas de referencia de base		
	<=300 10 ⁹ /L	49 (44%)	69 (53%)
	>300 10 ⁹ /L	63 (56%)	61 (47%)
	n	112	130

Ejemplo 2: Recolección y análisis de las muestras

30 Se procedió a recolectar muestras, de los pacientes afectados de NSCLC no escamoso en la fase IIIB ó en la fase IV ó recurrente. Todas las muestras, se obtuvieron de pacientes, los cuales, a continuación, se trataron con cisplatino 90 mg/m² y gemcitabina, 1.250 mg/m², durante hasta seis ciclos, más una baja dosis de bevacizumab (7,5 mg/kg), un alta dosis de bevacizumab (15 mg/kg) ó placebo, cada 3 semanas, hasta la progresión de la enfermedad.

35 Se procedió a extraer 3 ml de sangre, en un tubo del tipo vacutainer, de citrato sódico. Éstos se mezclaron, de una forma inmediata, mediante la inversión del tubo, de 10 a 15 veces, y se centrifugaron a aproximadamente 3000 g, en un centrífuga refrigerada, a una temperatura de 4°C. En algunos casos, las muestras, se almacenaron a una temperatura de -20°C durante un transcurso de tiempo de hasta un mes, y a continuación, se transfirieron, a una temperatura de -70°C.

40 Se procedió a descongelar la totalidad de las muestras, y éstas se distribuyeron en alícuotos de 40 µl, en placas de microtubos, de 384 pozos, del tipo REMP (marca comercial), en lotes de 72. Los tubos, se sellaron con un septum de aluminio, y éstos se almacenaron en congeladores, ajustados para mantener una temperatura de -70°C, hasta su análisis. Se encontraban disponibles un total de 366 muestras, para el análisis de las concentraciones de bFGF.

45 Se adquirió, en el mercado, un inmunoensayo del tipo sándwich, para medir el bFGF, de procedencia de la firma R&D Systems (Minneapolis, MN). Los equipos a modo de kit, se utilizaron en concordancia con las recomendaciones del fabricante. En resumen, se procedió a preparar patrones estándar básicos, con un diluyente calibrador del tipo "Calibrator Diluent", a una solución stock de 64 pg/ml. Las series de dilución estándar en el Calibrator Diluent, incluían 32, 16, 8, 4, 2, 1 y 0 pg/ml de bFGF.

50 Los patrones estándar, los controles, o las muestras prediluidas en tampón de ensayo, se añadieron a cada pozo, de un una microplaca de poliestireno, recubierta con anticuerpo monoclonal contra el bFGF, de la forma estipulada en el equipo a modo de kit. Después de un transcurso de tiempo de incubación de 3 horas, a la temperatura ambiente, las placas se lavaron, y se procedió a añadir anticuerpo de detección conjugado, y se incubaron, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. A continuación de haber procedido a otro lavado, se procedió a añadir 50 µl de solución del substrato y, cada pozo, se incubó durante un transcurso de tiempo de 45 minutos, a la temperatura ambiente. Subsiguientemente, se procedió a añadir solución amplificadora (50 µl/pozo), se dejó que se revelara el color y, la reacción, se paró, mediante ácido sulfúrico 2N (50 µl/pozo). En un transcurso de tiempo de 30 minutos, se procedió a leer las placas, a una longitud de onda de 400 nm, mediante la utilización de un espectrofotómetro de placas del tipo "Microplate Spectrophotometer" (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se procedió a corregir los valores de la absorbancia, a una longitud de onda de 490 nm, para la absorbancia a una longitud de

onda de 650 nm. La reducción de los datos, estaba basada en un ajuste de la curva logística de 4 parámetros, mediante la utilización del paquete de programas de software informático instrumentales. El nivel proteico del bFGF, se midió en pg/ml, dentro de unos márgenes de 2-64 pg/ml, debido a los límites funcionales del ensayo.

5 En el caso en donde, los niveles proteicos de los niveles del bFGF, se encontraran fuera de los márgenes de detención, los resultados, se reportaron entonces como BLQ (Por debajo del límite de cuantificación – [BQL, del inglés Below Limit of Quantification] -) o como ALQ (Por encima del límite de cuantificación – [ALQ, del inglés, Above the upper Limit of Quantification] -). Puesto que, el volumen de las muestras, se encontraba limitado para las mediciones del bFGF, únicamente se llevaron a cabo mediciones individuales. Si el volumen de la muestras, no era
10 suficiente para las mediciones, incluso para un una medición repetida individual, se reportaba entonces como QNS (Cantidad no suficiente - [QNS, del inglés, quantity not sufficient). En el caso en el que fuera posible una medición individual, se reportaba entonces la medición individual.

15 En base a las tres muestras de control en ejecución, las cuales se incluyeron en cada placa de ensayo, el rendimiento productivo del ensayo del bFGF, durante el análisis de las muestras, fue satisfactorio, durante la totalidad de la conducción del estudio. El número de muestras que consiguieron unos resultados válidos, unos resultados por debajo o unos resultados por encima del rango de cuantificación, o unos resultados o válidos, se encuentran recopilados en la Tabla 2, la cual se facilita abajo, a continuación.

20 Tabla 2

Molécula de ensayo	Resultado dentro del rango (n)	ALQ	BLQ *	NOA	QNS
bFGF	249	22	52	6	43

25 Ejemplo 3: Análisis estadístico de los datos del nivel de proteína bFGF

30 Para los análisis estadísticos, se procedió a dividir en dos categorías los niveles de expresión de la proteína bFGF: nivel alto y nivel bajo. La definición de nivel alto o de nivel bajo, se proporciona aquí, en este documento.

35 El punto final de la supervivencia global (OS – [del inglés, Overall survival] -), se define como el tiempo transcurrido desde la entrada en el estudio, hasta la muerte o la supresión. El punto final de la supervivencia exenta de progresión (PFS – [del inglés, progression free survival] -), se define como el tiempo transcurrido desde la entrada en el estudio, hasta la progresión de la enfermedad o la muerte.

40 El modelo de regresión de riesgo proporcional de Cox, es el que se utilizó para evaluar el efecto de las variables de predictoras en el PFS y el OS. El factor de riesgo para el OS, se definió como el factor correspondiente al cociente resultante de dividir el riesgo de muerte, en el grupo tratado, por el riesgo de muerte en el grupo de placebo. Un factor de riesgo correspondiente a un valor por debajo de 1, indica el hecho de que, el riesgo de muerte, es inferior, en el grupo tratado que en el grupo de placebo, y así, por lo tanto, indicando el hecho de que la OS media, es más prolongada en los pacientes tratados, que en los pacientes de placebo. El factor o cociente para la PFS, se definió como el factor correspondiente al cociente resultante de dividir el riesgo de muerte o progresión, en el grupo tratado, por el riesgo de muerte en el grupo de placebo. Un factor de riesgo correspondiente a un valor por debajo de 1, indica el hecho de que, el riesgo de progresión o muerte, es inferior, en el grupo tratado que en el grupo de placebo, y así, por lo tanto, indicando el hecho de que la PFS media, es más prolongada en los pacientes tratados, que en los
45 pacientes de placebo.

50 “Efecto del tratamiento” o “Efecto del tratamiento realizado”, se definió como el efecto en la OS ó en la PFS, la cual se observó, cuando se procedía a administrar, 7,5 m/kg de bevacizumib a los pacientes, en comparación con los pacientes de placebo. El efecto del tratamiento, se valora mediante la utilización del factor de riesgo. Un tratamiento positivo, se definió como queriendo significar que, la OS ó la PFS, se incrementó, en el grupo tratado, en comparación con el grupo de placebo. Así, por lo tanto, un efecto positivo del tratamiento, corresponde a un factor o cociente de riesgo inferior a un valor de 1.

55 Se utilizó el procedimiento de Kaplan Meier, para generar una representación gráfica de la probabilidad de supervivencia, en el grupo de tratamiento, en el subgrupo de pacientes con un nivel alto de la proteína bFGF, y en el subgrupo de pacientes con un nivel bajo de la proteína bFGF (Figuras 2 a 5).

60 En la primera serie de análisis, se evaluó el efecto de tratamiento de los pacientes con un alto nivel de proteína bFGF. El valor medio del nivel de bFGF de las muestras, era el correspondiente a un valor de 6,9 pg/ml. Así, por lo tanto, en el primer ejemplo, si el nivel de proteína en el bFGF, en una muestra obtenida de un paciente, era mayor de un valor de 6,9 pg/ml, entonces, la muestra, se designaba como teniendo un alto nivel de proteína bFGF. De una forma adicional, se utilizó un valor de corte de 2 pg/ml, para caracterizar de una forma adicional el efecto del biomarcador, puesto que, el valor, correspondía al límite inferior de la detección en el ensayo. Así, por lo tanto, en la
65

segunda muestra, si el nivel de proteína bFGF en una muestra obtenida de un paciente, era mayor de 2 pg/ml, entonces, la muestra, se designaba como teniendo un alto nivel de proteína bFGF.

5 Para la OS, la hipótesis nula, confirmó el hecho de que no existe ninguna diferencia en la OS, entre el grupo de tratamiento con placebo y grupo de tratamiento con 7,5 mg/kg de bevacizumab. La hipótesis alternativa, confirmó el hecho de que existe una diferencia en la OS, entre los dos grupos de tratamiento. Se utilizó un test de ensayo de rango logarítmico, para calcular el valor p correspondiente a esta hipótesis. Un valor p por debajo de 0,05, se considera como siendo estadísticamente significativo.

10 Para la PFS, la hipótesis nula, confirmó el hecho de que no existe ninguna diferencia en la PFS, entre el grupo de tratamiento con placebo y grupo de tratamiento con 7,5 mg/kg de bevacizumab. La hipótesis alternativa, confirmó el hecho de que existe una diferencia en la PFS, entre los dos grupos de tratamiento. Se utilizó un test de ensayo de rango logarítmico, para calcular el valor p correspondiente a esta hipótesis. Un valor p por debajo de 0,05, se considera como siendo estadísticamente significativo.

15 En la segunda serie de análisis, se evaluó el efecto de tratamiento de los pacientes con un bajo nivel de proteína bFGF. En el primer ejemplo, si el nivel de proteína bFGF en una muestra obtenida de un paciente, era igual o inferior a un valor de 6,9 pg/ml, entonces, la muestra, se designó como teniendo un bajo nivel de proteína bFGF. En el segundo ejemplo, si el nivel de proteína bFGF en una muestra obtenida de un paciente, era igual o inferior a 2 pg/ml, entonces, la muestra, se designó como teniendo un bajo nivel de proteína bFGF.

20 La hipótesis nula, confirmó el hecho de que no existe ninguna diferencia en la OS, entre los dos grupo de tratamiento. La hipótesis alternativa, confirmó el hecho de que existe una diferencia en la OS, entre los grupos de tratamiento. Se utilizó un test de ensayo de rango logarítmico, para calcular el valor p correspondiente a esta hipótesis. Un valor p por debajo de 0,05, se considera como siendo estadísticamente significativo.

25 Para la PFS, la hipótesis nula, confirmó el hecho de que no existe ninguna diferencia en la Supervivencia Exenta de Progresión, entre los dos grupo de tratamiento. La hipótesis alternativa, confirmó el hecho de que existe una diferencia en la PFS, entre los grupos de tratamiento. Se utilizó un test de ensayo de rango logarítmico, para calcular el valor p correspondiente a esta hipótesis. Un valor p por debajo de 0,05, se considera como siendo estadísticamente significativo.

30 La tercera serie de análisis, se realizó con objeto de evaluar el hecho de si, el efecto del tratamiento, difería, según el nivel de proteína bFGF. Se utilizó, para ello, un modelo con el grupo de tratamiento, el nivel de bFGF, y el tratamiento mediante la interacción del bFGF, como predictor o indicador.

35 Para la OS, la hipótesis alternativa para este test de ensayo de interacción, confirmó el hecho de que no existe ninguna diferencia en el efecto del tratamiento en la OS, en concordancia con el nivel de bFGF. La hipótesis alternativa, confirmó el hecho de que el efecto del tratamiento, difería en concordancia con el nivel de bFGF. Se procedió a llevar a cabo un test de ensayo del factor de riesgo, para calcular el valor p correspondiente a esta hipótesis. Un valor p por debajo de 0,05, se considera como siendo estadísticamente significativo. Un valor p por debajo de 0,1, se considera como siendo un valor limítrofe dudosamente significativo.

40 Para la PFS, la hipótesis alternativa para este test de ensayo de interacción, confirmó el hecho de que no existe ninguna diferencia en el efecto del tratamiento en la PFS, en concordancia con el nivel de bFGF. La hipótesis alternativa, confirmó el hecho de que el efecto del tratamiento, difería en concordancia con el nivel de bFGF. Un valor p por debajo de 0,05, se considera como siendo estadísticamente significativo. Un valor p por debajo de 0,1, se considera como siendo un valor limítrofe dudosamente significativo.

45 Se procedió a llevar a cabo una cuarta serie de análisis, con objeto de comprobar la solidez de los resultados encontrados, con los otros tres análisis descritos anteriormente, arriba. En esta serie de análisis, los valores para los niveles de proteína bFGF, no se dicotomizaron, sin que, éstos, se trataron como variable continua, después de una transformación logarítmica. De una forma adicional, se incluyeron otras variables de pronóstico de referencia de base, en el modelo, con objeto de comprobar el hecho de si, el efecto del bFGF, no se confundía mediante otros factores. El modelo, tenía un grupo de tratamiento, un nivel de bFGF, un tratamiento mediante la interacción del bFGF, y otras covariables de referencia de base, como predictores o indicadores. Los otros indicadores o predictores de referencia de base, eran: el género (hombre versus mujer); fumador en el pasado versus todos los demás; la edad (< 65 versus >= 65); la etapa de la enfermedad (IV versus todas las demás); Europa Occidental / Australia / Canadá / versus todas las demás; la raza (blanca versus todas las demás): ECOG en la exploración de rastreo; adenocarcinoma versus todos los demás.

50 Para la supervivencia global, la hipótesis nula, confirmó el hecho de que, el efecto del tratamiento en la OS, no variaba de una forma lineal, mediante la variación de los niveles de expresión de la proteína bFGF. La hipótesis alternativa, confirmó el hecho de que el efecto del tratamiento, variaba, mediante la variación de los niveles de expresión de la proteína bFGF. Se procedió a llevar a cabo un test de ensayo del factor de riesgo, para calcular el

valor p correspondiente a esta hipótesis. Un valor p por debajo de 0,05, se considera como siendo estadísticamente significativo.

5 Para la PFS, la hipótesis nula, confirmó el hecho de que, el efecto del tratamiento en la PFS, no variaba de una forma lineal, mediante la variación de los niveles de expresión de la proteína bFGF. La hipótesis alternativa, confirmó el hecho de que el efecto del tratamiento, variaba, mediante la variación de los niveles de expresión de la proteína bFGF. Se procedió a llevar a cabo un test de ensayo del factor de riesgo, para calcular el valor p correspondiente a esta hipótesis. Un valor p por debajo de 0,05, se considera como siendo estadísticamente significativo.

10 La tabla 3, la cual se facilita abajo, a continuación, muestra los resultados de la serie de análisis 1 y 2, mediante los cuales se evalúa el efecto del tratamiento, en subgrupos de pacientes con un bajo nivel de expresión proteica del bFGF, definido como valores $\leq 6,9$ pg/ml, y un alto nivel de expresión proteica del bFGF, definido como valores $> 6,9$ pg/ml.

15 Los resultados que se encuentran recopilados en la Tabla 3, muestran un fuerte efecto del tratamiento, en la PFS y en la OS, en pacientes con alto nivel de expresión proteica del bFGF ($> 6,9$ pg/ml). El factor de riesgo, que se estima bien por debajo de 1, y el valor p, por debajo de 0,05, indica el hecho de que, el tratamiento, prolonga de una forma significativa el transcurso de tiempo hasta la muerte, y el transcurso de tiempo hasta la progresión, en pacientes con un nivel de proteína bFGF $> 6,9$ pg/ml.

20

Tabla 3

Análisis 1 y 2	Bevacizumab 7,5 mg/kg versus placebo			
	Supervivencia exenta de progression		Supervivencia global	
	HR [95% CI]*	Valor p	HR [95% CI]	Valor p
Bajo nivel de proteína bFGF ($\leq 6,9$ pg/ml)	0,74 [0,50; 1,09]	0,12	1,13 [0,72; 1,76]	0,5979
Alto nivel de proteína bFGF ($> 6,9$ pg/ml)	0,47 [0,31; 0,71]	0,0002	0,52 [0,33; 0,81]	0,0036

*HR[95%CI]: Factor de riesgo con un 95% de intervalo de confianza

25 La tabla 4, la cual se facilita abajo, a continuación, muestra los resultados de las series de análisis 1 y 2, en los cuales se evalúa el efecto del tratamiento en la PFS y la OS, en subgrupos de pacientes, con un bajo nivel de expresión proteica del bFGF, definido como nos valores de ≤ 2 pg/ml y un alto nivel de expresión proteica del bFGF, definido como valores > 2 pg/ml.

30 Los resultados que se encuentran recopilados en la Tabla 4, muestran un fuerte efecto del tratamiento, en la PFS y en la OS, en pacientes con alto nivel de expresión proteica del bFGF (> 2 pg/ml). El factor de riesgo, que se estima bien por debajo de 1, y el valor p, por debajo de 0,05, indica el hecho de que, el tratamiento, prolonga de una forma significativa el transcurso de tiempo hasta la muerte, y el transcurso de tiempo hasta la progresión, en pacientes con un nivel de proteína bFGF > 2 pg/ml.

35

Tabla 4

Análisis 1 y 2	Bevacizumab 7,5 mg/kg versus placebo			
	Supervivencia exenta de progression		Supervivencia global	
	HR [95% CI]*	Valor p	HR [95% CI]	Valor p
Bajo nivel de proteína bFGF (≤ 2 pg/ml)	0,73 [0,37 - 1,47]	0,38	1,29 [0,56 - 3,0]	0,553
Alto nivel de proteína bFGF (> 2 pg/ml)	0,56 [0,41 - 0,77]	0,0003	0,71 [0,51 - 1]	0,0506

*HR[95%CI]: Factor de riesgo con un 95% de intervalo de confianza

40 La tabla 5, la cual se facilita abajo, a continuación, muestra el resultado de la tercera serie de análisis. Ésta reporta sobre los valores p, para el test de ensayo de interacción entre el efecto del tratamiento y el nivel de expresión de la proteína bFGF. Estos resultados, proporcionan una evidencia adicional en cuanto al hecho de que, el efecto del

tratamiento, es significativamente más importante en el subgrupo de pacientes con un alto nivel de expresión proteica del bFGF.

Tabla 5

5

Análisis 3	Bevacizumab 7,5 mg/kg versus placebo, a razón de ($\leq 6,9$ pg/ml) versus ($> 6,9$ pg/ml bFGF)
Valor p	
Supervivencia exenta de progresión	0,0807
Supervivencia global	0,0126

La tabla 6, la cual se facilita abajo, a continuación, muestra el resultado de las cuatro series de análisis. Ésta expone el valor p, para el tratamiento, en términos de interacción, en un modelo en el cual se utilizan los valores de la expresión de la proteína bFGF, como variables continuas transformadas en logarítmicas, y otras características de referencia de base, de los pacientes. Estos resultados, proporcionan una evidencia adicional en cuanto al hecho de que, el efecto del tratamiento, se encuentra significativamente asociado con el nivel de expresión de la proteína bFGF, en donde se observó un mayor efecto del tratamiento, en los pacientes los cuales tenían unos mayores niveles de expresión de la proteína bFGF.

10

15

Tabla 6

Análisis 4	[Beverizumab 7,5 mg/kg versus placebo], a razón de ($\leq 6,9$ pg/ml) versus ($> 6,9$ pg/ml bFGF)
Valor p	
Supervivencia exenta de progresión	0,0339
Supervivencia global	0,0446

En resumen, se aplicaron diversos modelos estadísticos, con objeto de valorar el efecto del tratamiento en la PFS y en la OS, en relación con el nivel de bFGF. Los análisis, se llevaron a cabo, en primer lugar, con un alto nivel proteico de bFGF, definido como todos los niveles de expresión de la proteína bFGF, con unos valores > 2 pg/ml. A continuación, y con objeto de incrementar la potencia estadística para detectar una diferencia entre altos niveles de expresión y bajos niveles de expresión de la proteína bFGF, en términos de efecto del tratamiento, se procedió, así mismo, a llevar a cabo análisis con bFGF de alto nivel de expresión proteica, definido como todos los valores $> 6,9$ pg/ml. Todos los análisis, indicaron, de una forma consistente, el hecho de que se encontraba presente un significativo incremento en la PFS y en la OS, en los pacientes con bFGF de alto nivel de expresión proteica (Figuras 2, 3, 4 y 5).

20

25

Mientras que, la presente invención, se ha descrito con referencia a lo que se considera como siendo las formas específicas de presentación, deberá no obstante entenderse el hecho de que, la presente invención, no se encuentra limitada a dichas formas de presentación.

30

En la totalidad de la presente invención, incluyendo las reivindicaciones, el término "comprendiendo" (o "que comprende" o que "comprenden"), se utiliza como una frase de transición, de finales abiertos, la cual no excluye elementos adicionales no mencionados o etapas de procedimiento no mencionadas.

35

Listado de secuencias

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

40

<120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA SU USO EN EL DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON CÁNCER

<130> 26419

45

<141> 2009-09-17

<160> 5

50

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

ES 2 530 732 T3

<213> Homo sapiens

<400> 1

5 Met Val Gly Val Gly Gly Gly Asp Val Glu Asp Val Thr Pro Arg
1 5 10 15

Pro Gly Gly Cys Gln Ile Ser Gly Arg Gly Ala Arg Gly Cys Asn
20 25 30

10 Gly Ile Pro Gly Ala Ala Ala Trp Glu Ala Ala Leu Pro Arg Arg
35 40 45

Arg Pro Arg Arg His Pro Ser Val Asn Pro Arg Ser Arg Ala Ala
50 55 60

15 Gly Ser Pro Arg Thr Arg Gly Arg Arg Thr Glu Glu Arg Pro Ser
65 70 75

20 Gly Ser Arg Leu Gly Asp Arg Gly Arg Gly Arg Ala Leu Pro Gly
80 85 90

Gly Arg Leu Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Ala Pro Glu Arg Val
95 100 105

25 Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Thr Ala Ala Pro Arg Ala Ala
110 115 120

Pro Ala Ala Arg Gly Ser Arg Pro Gly Pro Ala Gly Thr Met Ala
125 130 135

30 Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly
140 145 150

35 Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu
155 160 165

Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly
170 175 180

40 Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu
185 190 195

Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val
200 205 210

45 Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu
215 220 225

Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu
230 235 240

50 Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser
245 250 255

55 Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser
260 265 270

Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser
275 280 285

60 Ala Lys Ser

<210> 2

<211> 210

65 <212> PRT

ES 2 530 732 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

5 Met Gly Asp Arg Gly Arg Gly Arg Ala Leu Pro Gly Gly Arg Leu
1 5 10 15

Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Ala Pro Glu Arg Val Gly Gly Arg
20 25 30

10 Gly Arg Gly Arg Gly Thr Ala Ala Pro Arg Ala Ala Pro Ala Ala
35 40 45

Arg Gly Ser Arg Pro Gly Pro Ala Gly Thr Met Ala Ala Gly Ser
50 55 60

15 Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala
65 70 75

Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys
80 85 90

20 Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp
95 100 105

Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln
110 115 120

25 Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn
125 130 135

30 Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys
140 145 150

Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn
155 160 165

35 Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val
170 175 180

40 Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly
185 190 195

Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
200 205 210

45 <210> 3
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <400> 3

Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly
1 5 10 15

His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe
20 25 30

55 Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu
35 40 45

Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg
50 55 60

60 Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala
65 70 75

Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp
80 85 90

65

ES 2 530 732 T3

5 Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr
 95 100 105

 Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg
 110 115 120

10 Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys
 125 130 135

 Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
 140 145

15

<210> 4
<211> 135
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 4

25 Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys
 1 5 10 15

 Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp
 20 25 30

30 Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln
 35 40 45

 Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn
 50 55 60

35 Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys
 65 70 75

40 Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn
 80 85 90

45 Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val
 95 100 105

 Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly
 110 115 120

 Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
 125 130 135

50 <210> 5
<211> 867
<212> DNA
<213> Homo sapiens

55 <400> 5

ctggtgggtg tgggggggtgg agatgtagaa gatgtgacgc cgcggccccg 50
cgggtgccag attagcggac gcggtgcccg cggttgcaac gggatccccg 100
gcgctgcagc ttgggaggcg gctctcccga ggcggcgtcc gcggagacac 150
ccatccgtga accccaggtc ccgggcccgc ggctcgccgc gcaccagggg 200
ccggcggaca gaagagcggc cgagcggctc gaggctgggg gaccgcgggc 250
gcgcccgccg gctgccgggc gggaggctgg ggggcccggg ccggggccgt 300

65

ES 2 530 732 T3

5 gccccggagc gggtcggagg ccggggcccg ggccggggga cggcggctcc 350
ccgcgcggct ccagcggctc ggggatcccc gccgggcccc gcagggacca 400
10 tggcagccgg gagcatcacc acgctgcccg ccttgcccga ggatggeggc 450
agcgggcct tcccggcccg ccaactcaag gacccaagc ggctgtactg 500
caaaaacggg ggcttcttcc tggcatcca ccccgacggc cgagttgacg 550
15 gggccggga gaagagcgc cctcacatca agctacaact tcaagcagaa 600
gagagaggag ttgtgtctat caaaggagtg tgtgctaacc gttacctggc 650
tatgaaggaa gatggaagat tactggcttc taaatgtgtt acggatgagt 700
20 gtttctttt tgaacgattg gaatctaata actacaatac ttaccggcca 750
aggaaataca ccagttggta tgtggcactg aaacgaactg ggcagtataa 800
acttggatcc aaaacaggac ctgggcagaa agctatactt tttcttccaa 850
25 tgtctgctaa gagctga 867

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento para identificar a un paciente con cáncer de pulmón, el cual pueda beneficiarse de una terapia antiangiogénica, la cual comprende un anticuerpo anti-VEGF, y por lo menos un agente quimioterapéutico, comprendiendo, dicho procedimiento, la determinación del nivel de expresión del bFGF, en una muestra de sangre obtenida del paciente, en donde, un nivel de expresión más alto del bFGF, en la muestra obtenida del paciente, al compararse con una muestra de referencia, indica el hecho de que, el paciente, puede beneficiarse de la terapia anti-angiogénica.
- 10 2.- Un procedimiento para predecir la respuesta de un paciente con cáncer de pulmón, a una terapia antiangiogénica, la cual comprende un anticuerpo anti-VEGF, y por lo menos un agente quimioterapéutico, comprendiendo, dicho procedimiento, la determinación del nivel de expresión del bFGF, en una muestra de sangre obtenida del paciente, en donde, un nivel de expresión más alto del bFGF, en la muestra, al compararse con una muestra de referencia, indica el hecho de que, el paciente, es susceptible de tener una capacidad de respuesta a la
- 15 3.- El procedimiento de la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en donde, el anticuerpo anti-VEGF, es el bevacizumab.
- 20 4.- El procedimiento de la reivindicación 3, en donde, el agente quimioterapéutico, es el cisplatino o la gemcitabina.
- 5.- El procedimiento de la reivindicación 3, en donde, la terapia antiangiogénica, comprende por lo menos dos agentes quimioterapéuticos.
- 25 6.- El procedimiento de la reivindicación 5, en donde, por lo menos dos agentes quimioterapéuticos, son el cisplatino y la gemcitabina.
- 7.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde, la terapia antiangiogénica, comprende 7,5 mg/kg de bevacizumab.
- 30 8.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, el nivel de expresión del bFGF, es un nivel de expresión protéica.
- 9.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, el nivel de expresión del bFGF, en la muestra, es mayor de 2 pg/ml.
- 35 10.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, el nivel de expresión del bFGF, en la muestra, es mayor de 6,9 pg/ml.
- 40 11.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde, el cáncer, se trata de un cáncer de pulmón, el cual no se ha tratado previamente.
- 12.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde, el cáncer, es un cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 45 13.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, la muestra obtenida del paciente, es una muestra de plasma.
- 50 14.- Uso de una proteína o de un oligonucleótido, o de una serie de polinucleótidos, en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, la proteína, o el oligonucleótido, o la serie de polinucleótidos, se usa para determinar el nivel de expresión del Bfgf

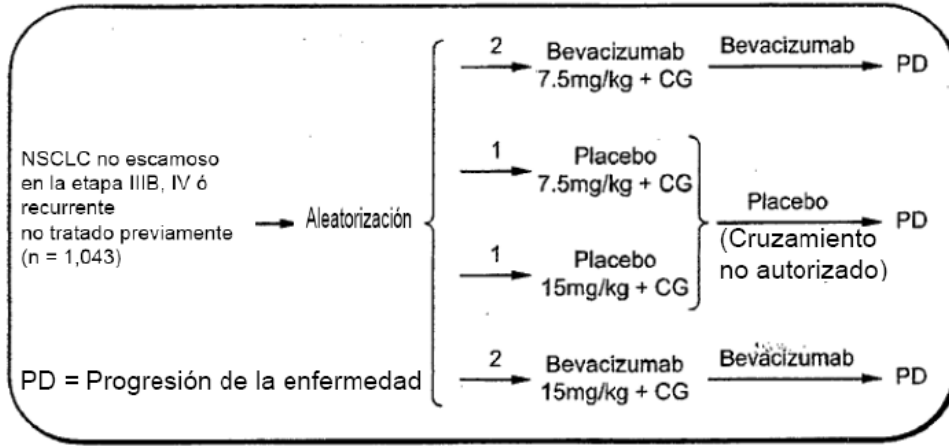


FIG. 1

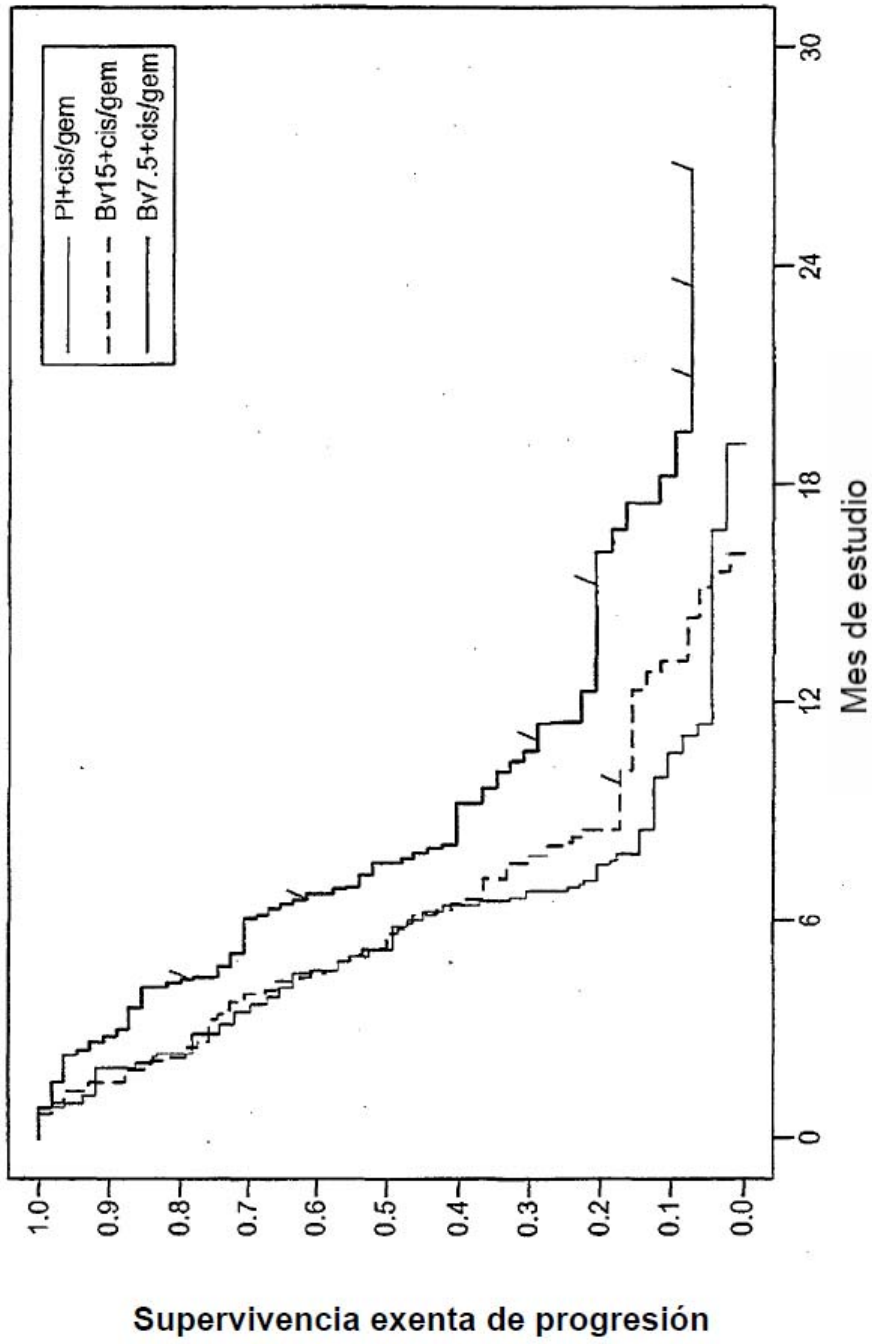


FIG. 2

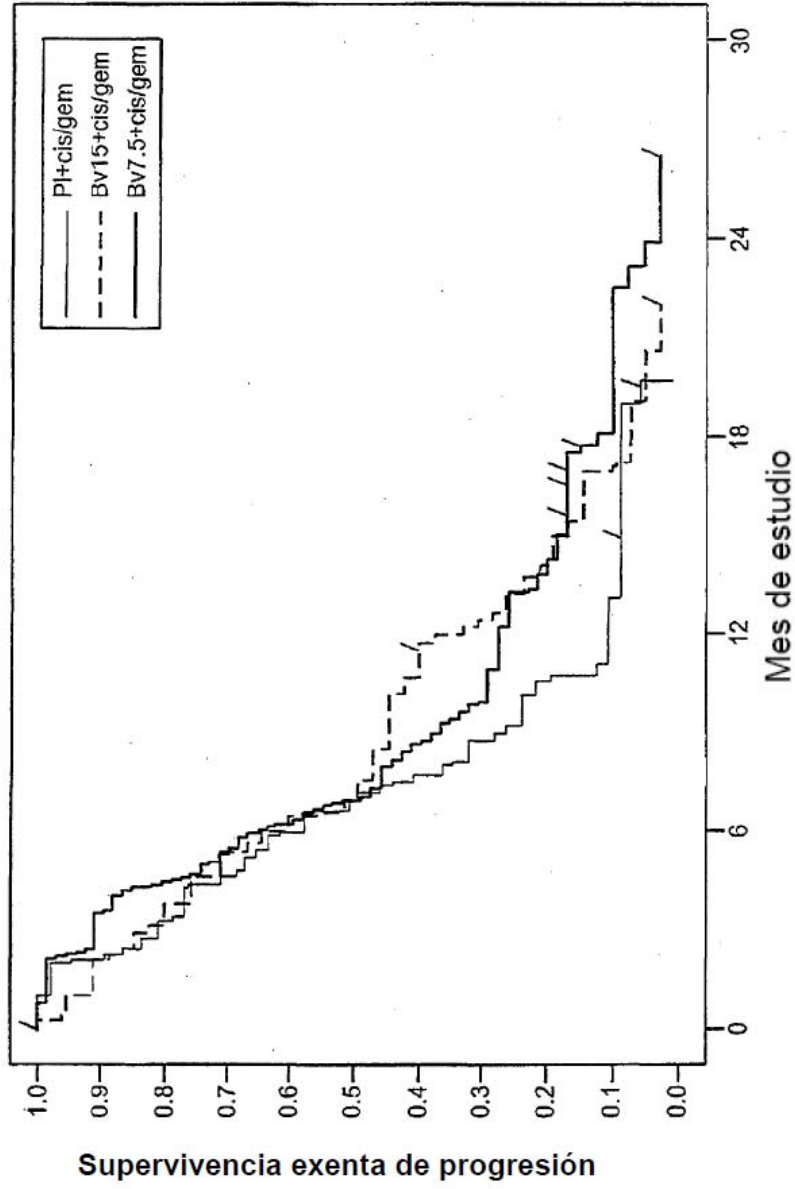


FIG. 3

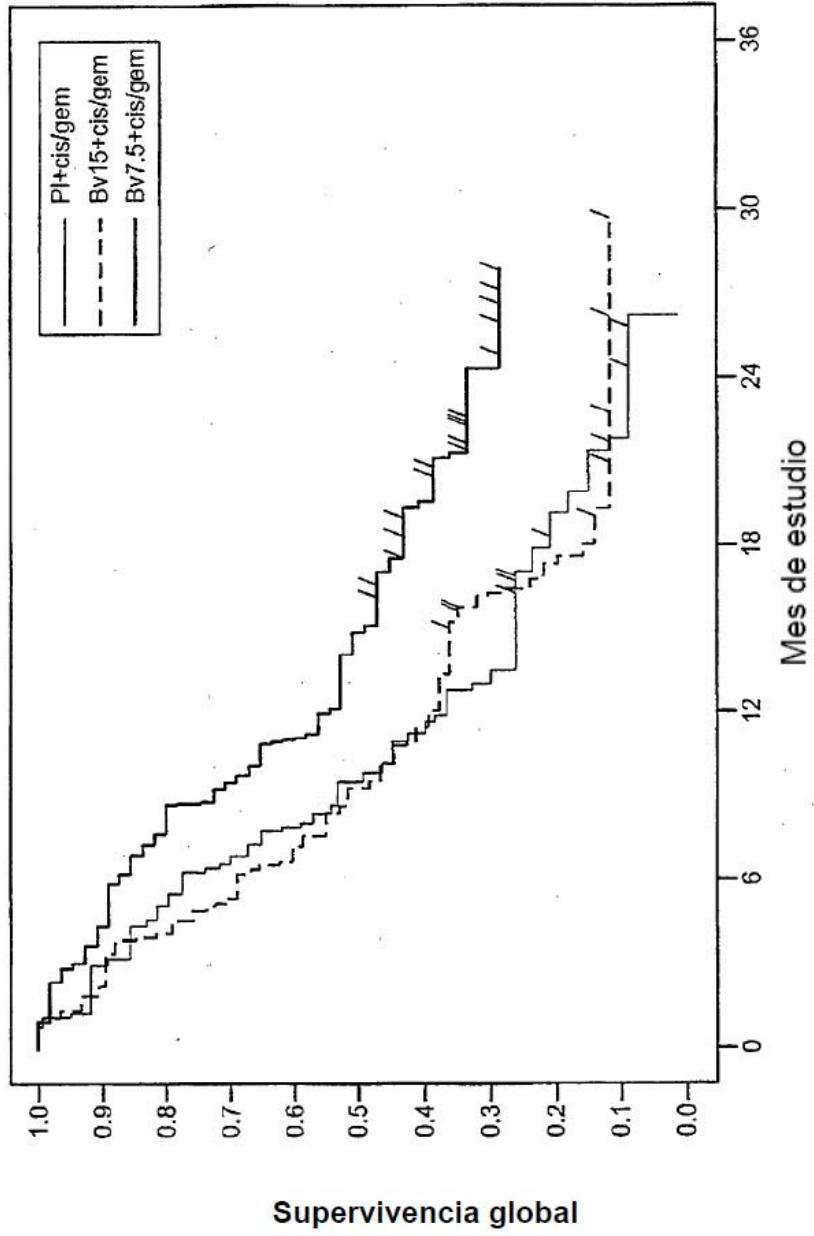


FIG. 4

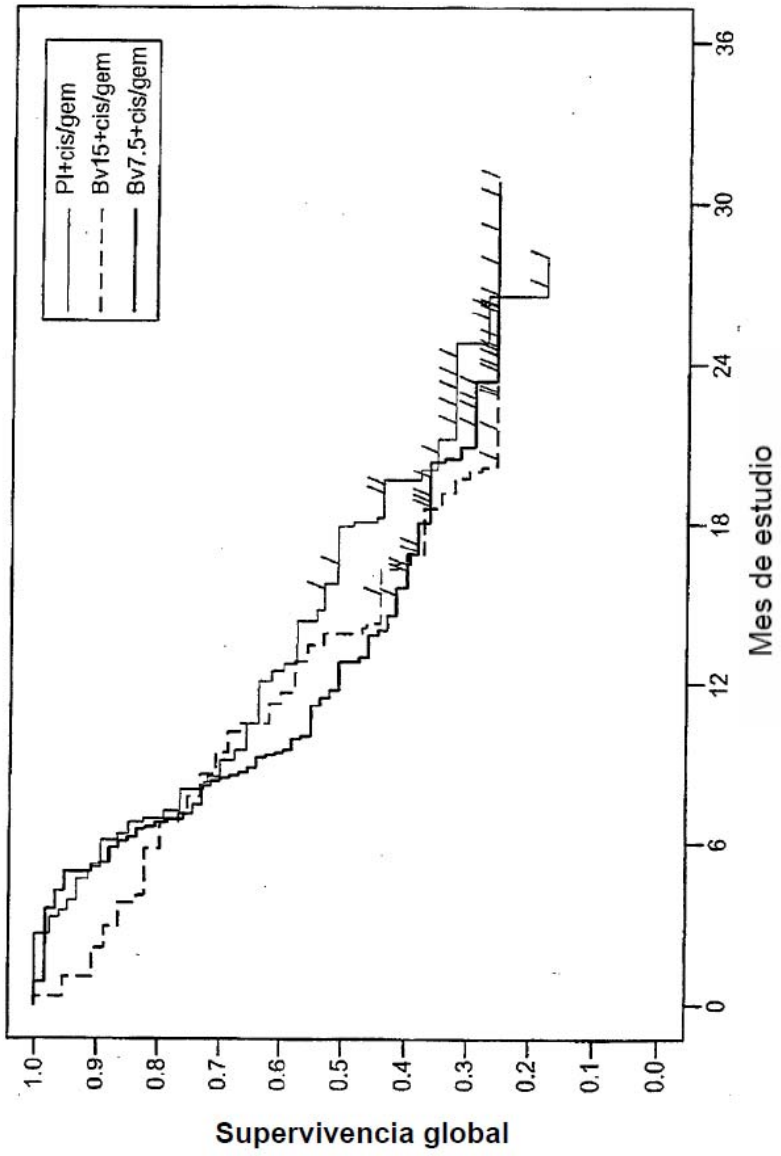


FIG. 5