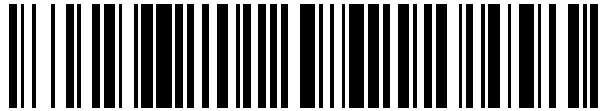


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 866**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2010 E 10842718 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2517014**

54 Título: **Marcador temprano de proteinuria en pacientes tratados con un tratamiento anti-VEGF**

30 Prioridad:

**21.12.2009 US 288514 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.03.2015**

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION  
AND RESEARCH (100.0%)  
200 First Street S.W.  
Rochester, MN 55905 , US**

72 Inventor/es:

**GAROVIC, VESNA D.**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 530 866 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

Marcador temprano de proteinuria en pacientes tratados con un tratamiento anti-VEGF

5 **Antecedentes**1. Campo técnico

10 Este documento se refiere a métodos y materiales implicados en determinar si un ser humano que recibe una terapia anti-VEGF tiene o no podocituria (por ejemplo, excreción urinaria de podocitos). Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales para detectar la presencia o ausencia de podocitos en una muestra de orina de un ser humano que recibe una terapia anti-VEGF para determinar si el ser humano ha desarrollado o corre el riesgo de desarrollar o no proteinuria o lesión renal.

15 2. Información de antecedentes

La angiogénesis tiene un papel crítico en el crecimiento, la invasión y la metástasis de tumores malignos. El uso de inhibidores de la angiogénesis como enfoque para el tratamiento del cáncer ha supuesto un progreso significativo en el campo de la terapia contra el cáncer. Los agentes que seleccionan como diana la ruta de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) están avanzando en el desarrollo clínico. Sin embargo, un efecto secundario en aproximadamente el 30% de los pacientes con cáncer que reciben terapia anti-VEGF es la proteinuria ( $\geq 300$  mg de proteína total en una muestra de orina de 24 horas). La proteinuria puede estar asociada a cambios patológicos renales característicos de endoteliosis glomerular, conduciendo a toxicidad renal. Un ejemplo de una terapia anti-VEGF es bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>), un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra VEGF.

**Sumario**

30 Este documento proporciona métodos y materiales relacionados con la determinación de si un ser humano que recibe una terapia anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab) ha desarrollado o corre el riesgo de desarrollar o no proteinuria. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales para detectar podocitos urinarios para determinar si un ser humano que recibe terapia anti-VEGF tiene o corre el riesgo de desarrollar o no proteinuria o lesión renal tal como se indica por la podocituria. La identificación de pacientes que tienen podocituria puede permitir que tales pacientes, que tienen o corren el riesgo de desarrollar toxicidad como resultado del uso clínico de fármacos, se traten con eficacia. Además, la identificación de pacientes que no tienen podocituria puede evitar la interrupción innecesaria de la terapia anti-VEGF. Tal como se describe en el presente documento, la presencia de podocitos urinarios puede usarse para identificar que seres humanos que reciben terapia anti-VEGF tienen proteinuria o corren el riesgo de desarrollar proteinuria tal como se indica por la podocituria.

40 En general, un aspecto de este documento presenta un método para evaluar a un ser humano que recibe una terapia anti-VEGF para detectar un riesgo de desarrollar proteinuria o lesión renal. El método comprende, o consiste esencialmente en, determinar si una muestra de orina de un ser humano que recibe terapia anti-VEGF contiene o no podocitos urinarios o evidencia de podocitos urinarios (por ejemplo, restos de podocitos), en el que la presencia de tales podocitos indica que el ser humano corre el riesgo de desarrollar proteinuria.

45 En otro aspecto, este documento presenta un método para evaluar a un ser humano que recibe una terapia anti-VEGF para detectar proteinuria. El método comprende, o consiste esencialmente en, determinar si una muestra de orina de un ser humano que recibe terapia anti-VEGF contiene o no podocitos urinarios o evidencia de podocitos urinarios (por ejemplo, restos de podocitos), en el que la presencia de tales podocitos indica que el ser humano tiene proteinuria.

50 En otra realización, este documento describe un método para evaluar a un ser humano que recibe una terapia anti-VEGF para detectar proteinuria, en el que la detección de proteinuria demuestra lesión renal.

55 La terapia anti-VEGF puede ser una terapia con bevacizumab, una terapia con sunitinib, una terapia con sorafenib u otras terapias conocidas o eficaces. La terapia puede ser una terapia con anticuerpo monoclonal o policlonal.

60 En otro aspecto, puede evaluarse a un ser humano que recibe una terapia anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en lugar de o además de una terapia anti-VEGF, para detectar proteinuria o el riesgo de desarrollar proteinuria o lesión renal tal como se describe en el presente documento con respecto a una terapia anti-VEGF.

65 En algunos casos, pueden detectarse podocitos en, por ejemplo, una muestra de orina usando un anticuerpo contra una proteína expresada por podocitos, tal como podocina. En algunos casos, el anticuerpo puede ser un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de podocalixina, un polipéptido de nefrina o un polipéptido de sinaptopodina. Pueden detectarse podocitos, o sus fragmentos, usando cualquier método apropiado incluyendo, sin limitación, técnicas de

tinción celular, técnicas de inmunocitoquímica y citometría de flujo usando, por ejemplo, anticuerpos anti-podocina.

En otro aspecto, este documento presenta un método para evaluar a un ser humano que ha recibido una terapia anti-VEGF para detectar un riesgo de desarrollar proteinuria. El método comprende, o consiste esencialmente en, determinar si una muestra de orina de un ser humano que recibe terapia anti-VEGF contiene o no uno o más podocitos urinarios o evidencia de uno o más podocitos urinarios, en el que la presencia de uno o más podocitos urinarios indica que el ser humano corre el riesgo de desarrollar proteinuria. La terapia anti-VEGF puede seleccionarse del grupo que consiste en una terapia con bevacizumab, una terapia con sunitinib y una terapia con sorafenib. La etapa de determinación puede comprender usar un anticuerpo para detectar podocitos. La etapa de determinación puede comprender usar citometría de flujo para detectar podocitos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-podocina. El método puede comprender detectar la presencia de uno o más podocitos urinarios. El método puede comprender clasificar al mamífero como que corre el riesgo de desarrollar proteinuria basándose al menos en parte en la presencia de uno o más podocitos urinarios. El método puede comprender detectar la ausencia del uno o más podocitos urinarios. El método puede comprender clasificar al mamífero como que no corre el riesgo de desarrollar proteinuria basándose al menos en parte en la ausencia del uno o más podocitos urinarios. El ser humano puede ser un ser humano no embarazado. El método puede comprender determinar si la muestra de orina contiene o no un nivel de podocitos urinarios superior a aproximadamente tres o más podocitos urinarios (por ejemplo, superior a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más podocitos urinarios) por campo de microscopio de alta potencia (400X).

En otro aspecto, este documento presenta un método para evaluar a un ser humano que ha recibido una terapia anti-VEGF o anti-EGFR para detectar proteinuria o un riesgo de desarrollar proteinuria. El método comprende, o consiste esencialmente en, determinar si una muestra de orina de un ser humano que recibe terapia anti-VEGF o una terapia anti-EGFR contiene o no uno o más podocitos urinarios o evidencia de uno o más podocitos urinarios, clasificar al ser humano como que tiene o como que corre el riesgo de desarrollar proteinuria si el uno o más podocitos urinarios o la evidencia están presentes en la muestra de orina y clasificar al ser humano como que no tiene o como que no corre el riesgo de desarrollar proteinuria si el uno o más podocitos urinarios y la evidencia no están presentes en la muestra de orina. El ser humano puede ser un ser humano que recibió la terapia anti-VEGF. La terapia anti-VEGF puede seleccionarse del grupo que consiste en una terapia con bevacizumab, una terapia con sunitinib y una terapia con sorafenib. La etapa de determinación puede comprender usar un anticuerpo para detectar podocitos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-podocina. La etapa de determinación puede comprender usar citometría de flujo para detectar podocitos. El método puede comprender detectar la presencia de uno o más podocitos urinarios. El método puede comprender detectar la ausencia del uno o más podocitos urinarios. El ser humano puede ser un ser humano no embarazado. El método puede comprender determinar si la muestra de orina contiene o no un nivel de podocitos urinarios superior a aproximadamente tres o más podocitos urinarios (por ejemplo, superior a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más podocitos urinarios) por campo de microscopio de alta potencia (400X).

En otro aspecto, este documento presenta un método para identificar que un ser humano que ha recibido una terapia anti-VEGF o anti-EGFR tiene proteinuria o corre el riesgo de desarrollar proteinuria. El método comprende, o consiste esencialmente en, detectar la presencia de uno o más podocitos en una muestra de orina de un ser humano que recibió terapia anti-VEGF o una terapia anti-EGFR, y clasificar al ser humano como que tiene o como que corre el riesgo de desarrollar proteinuria basándose al menos en parte en la presencia. El ser humano puede ser un ser humano que recibió la terapia anti-VEGF. La terapia anti-VEGF puede seleccionarse del grupo que consiste en una terapia con bevacizumab, una terapia con sunitinib y una terapia con sorafenib. La etapa de detección puede comprender usar un anticuerpo para detectar el uno o más podocitos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-podocina. La etapa de detección puede comprender usar citometría de flujo para detectar el uno o más podocitos. El ser humano puede ser un ser humano no embarazado. La presencia de uno o más podocitos en la muestra de orina puede detectarse detectando la presencia de restos de uno o más podocitos urinarios. El método puede comprender determinar si la muestra de orina contiene o no un nivel de podocitos urinarios superior a aproximadamente tres o más podocitos urinarios (por ejemplo, superior a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más podocitos urinarios) por campo de microscopio de alta potencia (400X).

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puedan usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para poner en práctica la invención, se describen métodos y materiales adecuados a continuación.

En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerán. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos y a partir de las reivindicaciones.

**Descripción de los dibujos**

La figura 1 contiene una fotografía de células urinarias sembradas sobre un portaobjetos recubierto de colágeno, cultivadas durante 24 horas y teñidas para inmunorreactividad con podocina.

## 5 Descripción detallada

Este documento proporciona métodos y materiales para determinar si un ser humano que recibió o que está recibiendo una terapia anti-VEGF ha desarrollado o corre el riesgo de desarrollar o no proteinuria tal como se indica por la podocituria. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales para determinar si un ser humano (por ejemplo, una paciente con cáncer no embarazada) tratada con una terapia anti-VEGF tiene o no un nivel elevado de podocitos urinarios, indicando de ese modo que el ser humano ha desarrollado o corre el riesgo de desarrollar proteinuria. Tal como se da a conocer en el presente documento, la detección de uno o más podocitos o evidencia de podocitos (por ejemplo, restos de podocitos) en la orina de un ser humano es indicativa de que el ser humano desarrolló o corre el riesgo de desarrollar proteinuria. La presencia de proteinuria puede indicar que el ser humano está experimentando o corre el riesgo de desarrollar lesión renal. La proteinuria grave puede ser indicativa de síndrome nefrótico.

Los métodos y materiales proporcionados en el presente documento pueden usarse para evaluar cualquier tipo de ser humano que recibió o que está recibiendo una terapia anti-VEGF, una terapia anti-EGFR o una combinación de una terapia anti-VEGF y una terapia anti-EGFR. Por ejemplo, los métodos y materiales proporcionados en el presente documento pueden usarse para evaluar seres humanos masculinos o femeninos para detectar proteinuria o un riesgo de desarrollar proteinuria. En algunos casos, los métodos y materiales proporcionados en el presente documento pueden usarse para evaluar a seres humanos no embarazados que recibieron o están recibiendo una terapia anti-VEGF, una terapia anti-EGFR o una combinación de una terapia anti-VEGF y una terapia anti-EGFR para detectar proteinuria o un riesgo de desarrollar proteinuria. Los ejemplos de terapias anti-VEGF incluyen, sin limitación, terapias con bevacizumab, terapias con sunitinib y terapias con sorafenib. Los ejemplos de terapias anti-EGFR incluyen, sin limitación, terapias con cetuximab, terapias con panitumumab, terapias con trastuzumab, terapias con lapatinib, terapias con erlotinib y terapias con gefitinib.

Puede usarse cualquier método apropiado para determinar el nivel de podocitos en la orina de un ser humano. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de tinción celular que incluyen el uso de anticuerpos que se unen a podocitos o polipéptidos expresados por podocitos. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen, sin limitación, anticuerpos que tienen la capacidad de unirse a un polipéptido de podocina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 7657615; n.º de registro NP\_055440.81), un polipéptido de podocalixina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 66277202, n.º de registro NP\_001018121.1; n.º de GI de GenBank 33598950, n.º de registro NP\_005388.2; n.º de GenBank 7271815, n.º de registro AAB61574.1 y n.º de GI de GenBank 7657465, n.º de registro NP\_056535.1), un polipéptido de nefrina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 10441644; n.º de registro AAG17141.1), un polipéptido de sinaptopodina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 33323347; n.º de registro AAQ07403.1), un polipéptido de Neph1 (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 14572521; n.º de registro AAK00529.1.), un polipéptido de GLEPP1 (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 885926; n.º de registro AAA82892.1), un polipéptido de WT1 (por ejemplo, n.º de GI de GenBank AAH46461.2; n.º de registro 110611793), un polipéptido de CD2AP (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 11321634; n.º de registro NP\_036252.1), un polipéptido de actina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 4501881; n.º de registro NP\_001091.1), un polipéptido de actinina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 3157976; n.º de registro AAC17470.81), un polipéptido de cadherina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 2281027; n.º de registro BAA21569.1), un polipéptido de catenina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 4503131; n.º de registro NP\_001895.1), un polipéptido de integrina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 47078292; n.º de registro NP\_000203.2), un polipéptido de vinculina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 340237; n.º de registro AAA61283.1), un polipéptido de talina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 6682361; n.º de registro AAF23322.1), un polipéptido de paxilina (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 704348; n.º de registro AAC50104.1) o un polipéptido de ZO-1 (por ejemplo, n.º de GI de GenBank 116875767; n.º de registro NP\_003248.3). En algunos casos, pueden usarse técnicas de citometría de flujo para determinar el nivel de podocitos presentes en una muestra de orina de ser humano. Los podocitos detectados en una muestra de orina pueden ser podocitos viables, podocitos no viables o una combinación de los mismos. En algunos casos, los podocitos no viables pueden ser restos de podocitos identificables.

Un anticuerpo puede ser, sin limitación, un anticuerpo policlonal, monoclonal, humano, humanizado, quimérico o de cadena sencilla o un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión, tal como un fragmento Fab, un fragmento F(ab'), un fragmento Fd, un fragmento producido por una biblioteca de expresión de Fab, un fragmento que comprende un dominio VL o VH o un fragmento de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Un anticuerpo puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgM, IgD, IgA o IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG4 o IgA2) o subclase. Además, un anticuerpo puede ser de cualquier animal incluyendo, sin limitación, aves y mamíferos. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser un anticuerpo de ser humano, conejo, oveja o cabra. Un anticuerpo puede producirse de manera natural, ser recombinante o sintético. Los anticuerpos pueden generarse y purificarse usando cualquier método apropiado. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando tecnologías de hibridoma, recombinantes o de presentación en fago o una combinación de tales tecnologías. En algunos casos, pueden producirse fragmentos de anticuerpos de manera sintética o recombinante a partir de un gen que codifica

para una secuencia de anticuerpo parcial. Cualquier anticuerpo que puede usarse para detectar podocitos (por ejemplo, anticuerpos anti-podocina, anticuerpos anti-podocalixina, anticuerpos anti-nefrina o anticuerpos anti-sinaptopodina) puede tener una afinidad de unión por su antígeno de al menos  $10^4 \text{ mol}^{-1}$  (por ejemplo, al menos  $10^1$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  o  $10^{12} \text{ mol}^{-1}$ ). Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo anti-podocina que se une a polipéptidos de podocina a una afinidad de al menos  $10^4 \text{ mol}^{-1}$  (por ejemplo, al menos  $10^1$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  o  $10^{12} \text{ mol}^{-1}$ ) tal como se describe en el presente documento.

El término “nivel elevado” tal como se usa en el presente documento con respecto al nivel de podocitos urinarios es cualquier nivel que está por encima de una mediana del nivel promedio de podocitos presentes en la orina de una población al azar de seres humanos no embarazados que se sabe que no tienen proteinuria (por ejemplo, una población al azar de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 500 o más seres humanos no embarazados que se sabe que no tienen proteinuria). Por ejemplo, la población al azar de seres humanos no embarazados puede ser una población de seres humanos no embarazados que reciben una terapia anti-VEGF o una población de seres humanos no embarazados que no reciben una terapia anti-VEGF, siempre que los seres humanos no tengan proteinuria. En algunos casos, la población al azar de seres humanos no embarazados puede ser una población de seres humanos no embarazados que reciben una terapia anti-EGFR o una población de seres humanos no embarazados que no reciben una terapia anti-EGFR, siempre que los seres humanos no tengan proteinuria. En algunos casos, un nivel elevado de podocitos urinarios puede ser un nivel detectable de podocitos (por ejemplo, células positivas para podocina) en una muestra de orina. La presencia o ausencia de un nivel detectable de podocitos de este tipo (por ejemplo, células positivas para podocina) puede determinarse usando un anticuerpo anti-podocina.

Una vez que se determina el nivel de podocitos urinarios de un ser humano, entonces puede evaluarse el nivel para determinar si el nivel es un nivel elevado. La presencia de un nivel elevado de podocitos urinarios puede indicar que el ser humano tiene proteinuria o corre el riesgo de desarrollar proteinuria. Pueden realizarse pruebas clínicas adicionales para confirmar que un ser humano que tiene un nivel elevado de podocitos urinarios tiene proteinuria. Por ejemplo, puede realizarse una prueba de determinación de proteína total en una recogida de orina de 24 horas, una prueba para el análisis de proteínas con tira reactiva de orina y/o una prueba de razón proteína-creatinina en una muestra de orina al azar para confirmar que un ser humano que tiene un nivel elevado de podocitos urinarios tiene proteinuria. Si se confirma la presencia de proteinuria mediante una prueba clínica adicional (por ejemplo, una prueba de determinación de proteína total en una recogida de orina de 24 horas) para un ser humano que tiene un nivel elevado de podocitos urinarios, entonces ese ser humano puede clasificarse como que tiene proteinuria. Si no se confirma la presencia de proteinuria mediante una prueba clínica adicional (por ejemplo, una prueba de determinación de proteína total en una recogida de orina de 24 horas) para un ser humano que tiene un nivel elevado de podocitos urinarios, entonces ese ser humano puede clasificarse como que corre el riesgo de desarrollar proteinuria.

En algunos casos, el nivel de podocitos urinarios presentes en un ser humano puede evaluarse usando un valor de corte tal como 0,85 podocitos urinarios presentes por mg de creatinina. Por ejemplo, una vez que se determina el nivel de podocitos urinarios de un ser humano, puede compararse el nivel con un valor de corte (por ejemplo, 0,85 podocitos urinarios/mg de creatinina). La presencia de un nivel de podocitos urinarios superior o igual al valor de corte puede indicar que el ser humano tiene proteinuria o un riesgo de desarrollar proteinuria. Pueden realizarse pruebas clínicas adicionales para confirmar que un ser humano que tiene un nivel de podocitos urinarios superior o igual al valor de corte tiene proteinuria. Por ejemplo, puede realizarse una prueba de determinación de proteína total en una recogida de orina de 24 horas, una prueba para el análisis de proteínas con tira reactiva de orina y/o una prueba de razón proteína-creatinina en una muestra de orina al azar para confirmar que un ser humano que tiene un nivel de podocitos urinarios superior o igual al valor de corte tiene proteinuria. Si se confirma la presencia de proteinuria mediante una prueba clínica adicional (por ejemplo, una prueba de determinación de proteína total en una recogida de orina de 24 horas) para un ser humano que tiene un nivel de podocitos urinarios superior o igual al valor de corte, entonces ese ser humano puede clasificarse como que tiene proteinuria. Si no se confirma la presencia de proteinuria mediante una prueba clínica adicional (por ejemplo, una prueba de determinación de proteína total en una recogida de orina de 24 horas) para un ser humano que tiene un nivel de podocitos urinarios superior o igual al valor de corte, entonces ese ser humano puede clasificarse como que corre el riesgo de desarrollar proteinuria.

En algunos casos, un ser humano tratado con una terapia anti-VEGF, una terapia anti-EGFR o ambas puede clasificarse como que tiene proteinuria o un riesgo de desarrollar proteinuria si se determina que el nivel de podocitos en una muestra de orina del ser humano tratado con la terapia (por ejemplo, la terapia anti-VEGF, la terapia anti-EGFR o ambas) es superior al nivel de podocitos en una muestra de orina obtenida a partir de ese ser humano en un punto de tiempo más temprano (por ejemplo, en un momento anterior a cualquier tratamiento con una terapia anti-VEGF o una terapia anti-EGFR). Pueden realizarse pruebas clínicas adicionales para confirmar que un ser humano que experimenta tal aumento de podocitos urinarios a lo largo del tiempo tiene proteinuria. Por ejemplo, puede realizarse una prueba de determinación de proteína total en una recogida de orina de 24 horas, una prueba para el análisis de proteínas con tira reactiva de orina y/o una prueba de razón proteína-creatinina en una muestra de orina al azar para confirmar que un ser humano que experimenta un aumento de podocitos urinarios a lo largo del tiempo tiene proteinuria. Si se confirma la presencia de proteinuria mediante una prueba clínica adicional (por ejemplo, una prueba de determinación de proteína total en una recogida de orina de 24 horas) para un ser humano

que experimenta un aumento de podocitos urinarios a lo largo del tiempo, entonces ese ser humano puede clasificarse como que tiene proteinuria. Si no se confirma la presencia de proteinuria mediante una prueba clínica adicional (por ejemplo, una prueba de determinación de proteína total en una recogida de orina de 24 horas) para un ser humano que experimenta un aumento de podocitos urinarios a lo largo del tiempo, entonces ese ser humano puede clasificarse como que corre el riesgo de desarrollar proteinuria.

En algunos casos, la detección de uno o más podocitos en una muestra de orina puede ser indicativa de podocituria. Por ejemplo, una paciente no embarazada que recibe una terapia anti-VEGF o una terapia anti-EGFR (o ambas) puede clasificarse como que tiene proteinuria o un riesgo de desarrollar proteinuria basándose al menos en parte en la detección de uno o más podocitos en una muestra de orina. Pueden realizarse pruebas clínicas adicionales para confirmar que un ser humano que tiene uno o más podocitos urinarios detectables tiene proteinuria. Por ejemplo, puede realizarse una prueba de determinación de proteína total en una recogida de orina de 24 horas, una prueba para el análisis de proteínas con tira reactiva de orina y/o una prueba de razón proteína-creatina en una muestra de orina al azar para confirmar que un ser humano que tiene uno o más podocitos urinarios detectables tiene proteinuria. Si se confirma la presencia de proteinuria mediante una prueba clínica adicional (por ejemplo, una determinación de proteína total en una prueba de recogida de orina de 24 horas) para un ser humano que tiene uno o más podocitos urinarios detectables, entonces ese ser humano puede clasificarse como que tiene proteinuria. Si no se confirma la presencia de proteinuria mediante una prueba clínica adicional (por ejemplo, a determinación de proteína total en a prueba de recogida de orina de 24 horas) para un ser humano que tiene uno o más podocitos urinarios detectables, entonces ese ser humano puede clasificarse como que corre el riesgo de desarrollar proteinuria.

Un ser humano tratado con una terapia anti-VEGF, una terapia anti-EGFR o ambas puede monitorizarse usando los métodos y materiales proporcionados en el presente documento. Pueden aparecer podocitos en la orina de un paciente antes que se detecte la proteinuria, proporcionando así un factor pronóstico temprano de un acontecimiento adverso próximo. Esta indicación temprana puede permitir que el personal sanitario altere el plan de tratamiento anti-VEGF o anti-EGFR de un paciente o inicie el tratamiento para la proteinuria. Por ejemplo, el nivel de podocitos en una muestra de orina puede evaluarse para determinar si la proteinuria persiste o no en respuesta a la disminución de la dosis de terapia anti-VEGF o terapia anti-EGFR.

Este documento también proporciona métodos y materiales para ayudar a los profesionales médicos o de investigación en la determinación de si un ser humano tratado con una terapia anti-VEGF, una terapia anti-EGFR o ambas tiene o está desarrollando o no proteinuria. Profesionales médicos pueden ser, por ejemplo, médicos, enfermeras, técnicos de laboratorio médico y farmacéuticos. Profesionales de la investigación pueden ser, por ejemplo, investigadores principales, técnicos de investigación, becarios postdoctorales y estudiantes licenciados. Puede ayudarse a un profesional mediante (1) la determinación del nivel de podocitos urinarios en una muestra de orina y (2) la comunicación de la información sobre el nivel a ese profesional. En algunos casos, puede ayudarse a un profesional mediante (1) la evaluación de la presencia de podocitos urinarios en una muestra de orina y (2) la comunicación de la información sobre la presencia de podocitos urinarios a ese profesional.

Puede usarse cualquier método apropiado para comunicar la información a otra persona (por ejemplo, un profesional). Por ejemplo, puede facilitarse la información directa o indirectamente a un profesional. Además, puede usarse cualquier tipo de comunicación para comunicar la información. Pueden usarse por ejemplo, correo, correo electrónico, teléfono e interacciones cara a cara. También puede comunicarse la información a un profesional haciendo que esa información esté disponible electrónicamente para el profesional. Por ejemplo, la información puede comunicarse a un profesional poniendo la información en una base de datos informática de tal manera que el profesional pueda acceder a la información. Además, la información puede comunicarse a un hospital, una clínica o una instalación de investigación que sirve como agente para el profesional.

Este documento también proporciona métodos y materiales para tratar seres humanos con una terapia anti-VEGF tal como bevacizumab, una terapia anti-EGFR o ambas en condiciones que reducen la probabilidad de inducir proteinuria. Por ejemplo, a un ser humano que necesita una terapia anti-VEGF (por ejemplo, un paciente con cáncer humano que necesita tratamiento con bevacizumab) puede administrársele una dosis convencional de bevacizumab (por ejemplo, de 5-15 mg/kg/día) durante un número limitado de ciclos de dosificación administrados una vez cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas. Puede obtenerse una muestra de orina al menos una vez en el plazo de los 3 primeros días de tratamiento y evaluarse para detectar podocitos urinarios tal como se describe en el presente documento. Si se detectan podocitos urinarios o un nivel elevado de podocitos urinarios, entonces la dosis de la terapia anti-VEGF puede reducirse en al menos el 30 por ciento (por ejemplo, el 30, el 40, el 50, el 75, el 80, el 90 o el 100 por ciento) durante un periodo de tiempo. Alternativamente, la terapia anti-VEGF puede saltarse durante uno o dos ciclos de dosificación durante un periodo de tiempo de manera que la medicación se reciba cada cuatro semanas o cada seis semanas. Tras este periodo de tiempo, puede obtenerse una muestra de orina y evaluarse para detectar podocitos urinarios tal como se describe en el presente documento. Si no se detectan podocitos urinarios o no se detecta un nivel elevado de podocitos urinarios, entonces puede aumentarse la dosis de la terapia anti-VEGF (por ejemplo, aumentarse hasta la dosis original o hasta algo menos que la dosis original). Si se detectan podocitos urinarios o se detecta un nivel elevado de podocitos urinarios, entonces puede reducirse adicionalmente la dosis o la frecuencia de la terapia anti-VEGF durante un periodo de tiempo adicional (por ejemplo, ciclos de una vez

cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o más). La evaluación de la orina para detectar podocitos urinarios o niveles de podocitos urinarios y el ajuste de la dosificación de la terapia anti-VEGF pueden repetirse múltiples veces hasta que se alcance una dosis de terapia anti-VEGF que no induce proteinuria tal como se determina por la presencia o el nivel de podocitos urinarios detectados.

5 Se observa que aunque los métodos y materiales descritos se entiende que son para pacientes que reciben terapia anti-VEGF, terapia anti-EGFR o ambas, también pueden evaluarse pacientes que reciben otras terapias, tales como terapia con fármacos antiinflamatorios no esteroideos, bisfosfonato, trastuzumab, capecitabina, paclitaxel o antraciclina para determinar si tienen proteinuria o si corren el riesgo de desarrollar proteinuria tal como se indica por la podocituria.

10 La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1 - Un caso de podocituria en una paciente que recibe terapia anti-VEGF con sunitinib

#### 20 ESTUDIO DE CASO

Una mujer de 67 años de edad presentaba una masa de 7,2 X 6,1 cm que implicaba la parte central e inferior del riñón derecho. La función renal era normal con una creatinina de 1,0 y sin proteinuria. Posteriormente se sometió a nefrectomía radical derecha y linfadenectomía retroperitoneal. La patología confirmó carcinoma de células renales de grado 2, T2, N0, M1, de tipo células claras. Se inició la terapia con sunitinib, con buena respuesta.

25 A los cuatro meses de terapia, la función renal empeoró con una creatinina pico de 1,5 y 467 mg de proteína en 24 horas. Se inició el bloqueo del receptor de angiotensina con Diovan. Los efectos secundarios adicionales incluyeron hipertensión, síndrome de pies y manos e hipotiroidismo inducido por fármacos.

30 Tras siete meses de terapia, su creatinina mejoró hasta 1,3 pero seguía siendo proteinúrica, con una proteína pronosticada de 931 mg en 24 horas. En ese momento, se realizó un ensayo de podocituria tal como se describe a continuación y se confirmó la presencia de podocitos urinarios (figura 1).

#### 35 DETECCIÓN DE PODOCITOS

Se centrifugó una muestra de orina al azar (de 25-50 ml cada una) durante 8 minutos a 700 g a temperatura ambiente. Se enjuagaron los sedimentos dos veces con disolución de fibroblastos diploides humanos (FDH). A continuación, se resuspendieron los sedimentos en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y medio F-12 con suero bovino fetal al 10% que se complementó con antibióticos para la prevención de la contaminación bacteriana. Se sembró una alícuota de un mililitro sobre un portaobjetos de cultivo tisular recubierto con colágeno, a lo que le siguió la incubación durante la noche a 37°C en un 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se retiraron los medios, seguido por dos lavados con solución salina tamponada con fosfato. Se fijó el portaobjetos con 1 ml de metanol enfriado con hielo durante 10 minutos a -20°C. Se incubó el portaobjetos con anticuerpos frente a podocina (dilución, 1:200). Tras lavar con solución salina tamponada con fosfato, se añadió un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína a una dilución de 1:40 durante 30 minutos. Se contratiñó el sedimento con tinción nuclear de Hoechst para facilitar la diferenciación de células completas de fragmentos de células. Se montaron cubreobjetos con Vectashield (Vector Labs, Burlington, Calif.) y se observaron los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia (Leica, Alemania). Se consideró que las células nucleadas con tinción positiva eran podocitos. Un patólogo renal, que era ciego para el diagnóstico clínico y los hallazgos de laboratorio, evaluó cada muestra para determinar el número de células que estaban presentes y el porcentaje de células que se tiñeron para podocina.

Se cambió el régimen de sunitinib para la paciente presentada y se disminuyó la dosis. Su función renal, según las mediciones de creatinina, mejoró. Sigue siendo proteinúrica, pero su función renal permanece estable.

55 Una prueba es positiva para proteinuria si el número de podocitos expresado como una razón con respecto al contenido en creatinina de la respectiva muestra de orina es superior a 0,85 podocitos/mg de creatinina.

60 Los resultados proporcionados en el presente documento indicaron que un nivel elevado de podocitos urinarios es un marcador de proteinuria en seres humanos que están tratándose con una terapia anti-VEGF. En los controles, dos pacientes en terapia anti-VEGF sin proteinuria, no se observó podocituria.

### Ejemplo 2 - Podocituria en pacientes tratados con terapia de bloqueo de VEGF para el cáncer

65 Se realizó lo siguiente para determinar si está presente podocituria en pacientes que, mientras se someten a una terapia anti-VEGF, desarrollan proteinuria (tabla 1). Además, se comparó la excreción de podocitos urinarios entre pacientes en terapia anti-VEGF con proteinuria que oscila entre 101 y 9720 mg/d (tabla 1).

Tabla 1.

Tipo de cáncer	Edad/sexo	Anti-VEGF	GFR	Proteinuria	Células/HPF
Colangio	68/F	B	66	420 mg/d	0
De células renales	60/M	S/nib	39	101 mg/d	1
Colorrectal	55/F	B	137	Tira reactiva 1+	1
De colon	66/F	B + S/nib	77	330 mg/d	0
GBM	59/F	B + S/nib	78	152 mg/d	1
De células renales	73/M	B	63	2144 mg/d	>3
De células renales	67/F	Sunitib	43	2112 mg/d	>3
SBC	68/M	B	59	6361 mg/d	>3
GBM	70/M	S/nib	70	9720 mg/d	>9

GBM: glioblastoma multiforme; SBC: carcinoide del intestino delgado; B: bevacizumab; S/nib: sorafenib; HPF: campo de alta potencia X400.

5

Estos resultados demuestran un mayor grado de podocituria en pacientes que se someten a terapia anti-VEGF con proteinuria en exceso de 2 g/d en comparación con los tratados con los mismos agentes y con proteinuria < 0,85 g/d.



**REIVINDICACIONES**

1. Método para evaluar a un ser humano que ha recibido una terapia anti-VEGF para detectar un riesgo de desarrollar proteinuria, comprendiendo dicho método: determinar si una muestra de orina de un ser humano que recibe terapia anti-VEGF contiene o no uno o más podocitos urinarios o evidencia de uno o más podocitos urinarios; en el que la presencia de dicho uno o más podocitos urinarios o dicha evidencia indica que dicho ser humano corre el riesgo de desarrollar proteinuria.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la terapia anti-VEGF se selecciona del grupo que consiste en una terapia con bevacizumab, una terapia con sunitinib y una terapia con sorafenib.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de determinación comprende usar un anticuerpo para detectar podocitos, o en el que dicha etapa de determinación comprende usar citometría de flujo para detectar podocitos o en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-podocina.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho método comprende detectar la presencia de dicho uno o más podocitos urinarios, en particular en el que dicho método comprende clasificar dicho mamífero como que corre el riesgo de desarrollar proteinuria basándose al menos en parte en dicha presencia de dicho uno o más podocitos urinarios.
5. Método según la reivindicación 1, en el que dicho método comprende detectar la ausencia de dicho uno o más podocitos urinarios, en particular en el que dicho método comprende clasificar dicho mamífero como que no corre el riesgo de desarrollar proteinuria basándose al menos en parte en dicha ausencia de dicho uno o más podocitos urinarios.
6. Método según la reivindicación 1, en el que dicho ser humano es un ser humano no embarazado, o en el que dicho método comprende determinar si dicha muestra de orina contiene o no tres o más podocitos urinarios por campo de alta potencia.
7. Método para evaluar a un ser humano que ha recibido una terapia anti-VEGF o anti-EGFR para detectar proteinuria o un riesgo de desarrollar proteinuria, comprendiendo dicho método:  
 determinar si una muestra de orina de un ser humano que recibe terapia anti-VEGF o una terapia anti-EGFR contiene o no uno o más podocitos urinarios o evidencia de uno o más podocitos urinarios,  
 clasificar dicho ser humano como que tiene o como que corre el riesgo de desarrollar proteinuria si dicho uno o más podocitos urinarios o dicha evidencia están presentes en dicha muestra de orina, y  
 clasificar dicho ser humano como que no tiene o como que no corre el riesgo de desarrollar proteinuria si dicho uno o más podocitos urinarios y dicha evidencia no están presentes en dicha muestra de orina.
8. Método según la reivindicación 7, en el que dicho ser humano recibió dicha terapia anti-VEGF, en particular en el que dicha terapia anti-VEGF se selecciona del grupo que consiste en una terapia con bevacizumab, una terapia con sunitinib y una terapia con sorafenib.
9. Método según la reivindicación 7, en el que dicha etapa de determinación comprende usar un anticuerpo para detectar podocitos, en particular en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-podocina.
10. Método según la reivindicación 7, en el que dicha etapa de determinación comprende usar citometría de flujo para detectar podocitos, o en el que dicho método comprende detectar la presencia de dicho uno o más podocitos urinarios, o en el que dicho método comprende detectar la ausencia de dicho uno o más podocitos urinarios, o en el que dicho ser humano es un ser humano no embarazado, o en el que dicho método comprende determinar si dicha muestra de orina contiene o no tres o más podocitos urinarios por campo de alta potencia.
11. Método para identificar que un ser humano que ha recibido una terapia anti-VEGF o anti-EGFR tiene proteinuria o un riesgo de desarrollar proteinuria, comprendiendo dicho método:  
 detectar la presencia de uno o más podocitos en una muestra de orina de un ser humano que recibió terapia anti-VEGF o una terapia anti-EGFR, y  
 clasificar dicho ser humano como que tiene o como que corre el riesgo de desarrollar proteinuria basándose al menos en parte en dicha presencia.
12. Método según la reivindicación 11, en el que dicho ser humano recibió dicha terapia anti-VEGF, en particular en el que dicha terapia anti-VEGF se selecciona del grupo que consiste en una terapia con bevacizumab, una terapia con sunitinib y una terapia con sorafenib.

13. Método según la reivindicación 11, en el que dicha etapa de detección comprende usar un anticuerpo para detectar dicho uno o más podocitos, en particular en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-podocina.
- 5 14. Método según la reivindicación 11, en el que dicha etapa de detección comprende usar citometría de flujo para detectar dicho uno o más podocitos, o en el que dicho ser humano es un ser humano no embarazado.
- 10 15. Método según la reivindicación 11, en el que la presencia de dicho uno o más podocitos en dicha muestra de orina se detecta detectando la presencia de restos de uno o más podocitos urinarios, o en el que dicho método comprende determinar si dicha muestra de orina contiene o no tres o más podocitos urinarios por campo de alta potencia.



**Figura 1**