

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 455**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2012 PCT/EP2012/066632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13030168**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2012 E 12750601 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2751280**

54 Título: **Método para predecir el riesgo de hipertensión asociado a la terapia antiangiogénesis**

30 Prioridad:

31.08.2011 EP 11179500

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

14.11.2016

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (33.3%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH;
VIB VZW (33.3%) y
LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW
(33.3%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 589 455 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para predecir el riesgo de hipertensión asociado a la terapia antiangiogénesis

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para predecir el riesgo de hipertensión en pacientes sometidos a terapia antiangiogénesis, incluyendo una terapia con bevacizumab.

10 Antecedentes de la invención

La angiogénesis contribuye a las enfermedades benignas y malignas, tales como el desarrollo del cáncer y, especialmente en el cáncer, resulta necesaria para el crecimiento, invasividad y metástasis tumorales. Para crecer, un tumor debe experimentar un cambio angiogénico. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) resulta necesario para inducir dicho cambio angiogénico. VEGF y los genes en la ruta de VEGF se consideran importantes mediadores en la progresión del cáncer. La familia génica de VEGF incluye el gen VEGF, también denominado VEGFA, los homólogos de VEGF, entre ellos el factor de crecimiento placentario (P1GF), VEGFB, VEGFC, VEGFD, los receptores de VEGF, entre ellos VEGFR-1 y VEGFR-2 (también denominados FLT1 y FLK1/KDR, respectivamente), los inductores de VEGF, entre ellos los factores HIF1 α , HIF2 α inducibles por hipoxia, y los sensores de oxígeno PHD1, PHD2 y PHD3.

La importancia de esta ruta en el crecimiento de las células cancerosas y la metástasis ha conducido al desarrollo de agentes antiangiogénesis para la utilización en la terapia del cáncer. Entre estas terapias se incluyen, entre otros, bevacizumab, pegaptanib, sunitinib, sorafenib y vatalanib. A pesar de la supervivencia significativamente prolongada que se obtiene con los inhibidores de la angiogénesis, tales como bevacizumab, los pacientes siguen sucumbiendo al cáncer. Además, no todos los pacientes responden a la terapia de inhibidores de la angiogénesis. El mecanismo subyacente a la falta de respuesta sigue siendo desconocido. Además, la terapia de inhibidores de la angiogénesis se asocia a efectos secundarios, tales como la perforación gastrointestinal, trombosis, sangrado, hipertensión y proteinuria.

Jain L. et al., Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 29:95, 2010, describe que el polimorfismo rs1870377 en VEGFR2 se correlaciona con el riesgo de desarrollar hipertensión inducida por las terapias de bevacizumab y sorafenib.

Gerger A. et al., Clinical Cancer Research 17(17):5783-92, 2011, describe que el alelo menor de EGF rs444903 A>G se asocia a una supervivencia global incrementada en pacientes con cáncer colorrectal metastásico tratado con bevacizumab de primera línea y quimioterapia basada en oxaliplatino.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, existe una necesidad de métodos para determinar qué pacientes responden particularmente bien a la terapia de inhibidores de la angiogénesis y/o qué pacientes son susceptibles a efectos secundarios asociados a los tratamientos antiangiogénesis.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a un método para determinar la susceptibilidad de un paciente a desarrollar hipertensión asociada a la terapia con un inhibidor de la angiogénesis, tal como el bevacizumab, mediante la determinación del genotipo en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID n° 4) en EGF, que se asocia a un riesgo reducido de hipertensión. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la angiogénesis, tal como el bevacizumab, para el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer y que presenta el genotipo en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID n° 4) asociado a un riesgo reducido de hipertensión. La exposición se refiere además a un método para reducir el riesgo de hipertensión asociado a una terapia antiangiogénesis, tal como el bevacizumab, en un paciente que sufre de cáncer mediante la detección del genotipo en rs2305949 (SEC ID n° 3) y/o rs4444903 (SEC ID n° 4) que se asocia a un riesgo reducido de hipertensión.

Una realización de la exposición proporciona métodos para determinar la susceptibilidad de un paciente al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia que comprende un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab. Los métodos comprenden: (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer, el genotipo en el polimorfismo rs42305949 (SEC ID n° 3), (b) identificar un paciente como menos susceptible a desarrollar hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, en el que la presencia del genotipo CC en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID n° 3) indica que dicho paciente es más susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de CT o TT en el polimorfismo rs42305949 (SEC ID n° 3), o la presencia del genotipo CT o TT en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID n° 3) indica que dicho paciente es menos susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de CC en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID n° 3). En algunas realizaciones,

- 5 los métodos son métodos in vitro. En algunas realizaciones, la terapia comprende además un agente quimioterapéutico o un régimen de quimioterapia. En algunas realizaciones, el inhibidor de angiogénesis se administra con uno o más agentes seleccionados de entre el grupo que consiste de taxanos, interferón α , 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, gemcitabina-erlotinib y agentes quimioterapéuticos basados en el platino. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer pancreático, cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer mamario o cáncer pulmonar. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. En algunas realizaciones, el genotipo se determina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la administración de la terapia en el paciente.
- 10 Otra realización de la exposición proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la angiogénesis tal como se define en la presente memoria, destinadas al tratamiento de un paciente que necesita del mismo, en el que dicho paciente se ha determinado que es menos susceptible a desarrollar hipertensión asociada a una terapia que comprende el inhibidor de la angiogénesis según el método descrito en la presente memoria.
- 15 Una realización adicional de la exposición proporciona kits para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria. Los kits comprenden oligonucleótidos capaces de determinar el genotipo en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID n° 3).
- 20 Todavía otra realización de la exposición proporciona métodos para reducir el riesgo de desarrollar hipertensión asociada a una terapia que comprende un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab. Los métodos comprenden: (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer, el genotipo en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID n° 3), (b) identificar un paciente como menos susceptible a desarrollar hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, en el que la presencia del genotipo CT o TT en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID n° 3)
- 25 indica que dicho paciente es menos susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de CC en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID n° 3), y (c) administrar dicho inhibidor de la angiogénesis en un paciente con el genotipo CT o TT en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID n° 3), identificado como menos susceptible a desarrollar hipertensión según (b). En algunas realizaciones, la terapia comprende además un agente quimioterapéutico o un régimen de quimioterapia. En algunas realizaciones, el inhibidor de angiogénesis se administra con uno o más agentes seleccionados de entre el grupo que consiste de taxanos, interferón α , 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, gemcitabina-erlotinib y agentes quimioterapéuticos basados en el platino. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer pancreático, cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer mamario o cáncer pulmonar. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. En algunas realizaciones, el genotipo se determina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.
- 30
- 35 Todavía otra realización de la exposición proporciona métodos de tratamiento de un paciente. Los métodos comprenden administrar en el paciente una terapia que comprende un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, en el que el genotipo del paciente en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID n° 3) se ha determinado que es CT o TT.
- 40
- 45 Una realización adicional de la invención proporciona métodos para determinar la susceptibilidad de un paciente a desarrollar hipertensión asociada a una terapia que comprende un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab. Los métodos comprenden: (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer el genotipo en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID n° 4), y (b) identificar un paciente como más o menos susceptible a desarrollar hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, basándose en dicho genotipo, en el que la presencia del genotipo GA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID n° 4) indica que dicho paciente es más susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID n° 4), o la presencia del genotipo GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID n° 4) indica que dicho paciente es menos susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID n° 4). En algunas realizaciones, los métodos son métodos in vitro. En algunas realizaciones, la terapia comprende además un agente quimioterapéutico o un régimen de quimioterapia. En algunas realizaciones, el inhibidor de angiogénesis se administra con uno o más agentes seleccionados de entre el grupo que consiste de taxanos, interferón α , 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, gemcitabina-erlotinib y agentes quimioterapéuticos basados en el platino. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer pancreático, cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer mamario o cáncer pulmonar. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. En algunas realizaciones, el genotipo se determina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la administración de la terapia en el paciente.
- 50
- 55
- 60 Una realización adicional de la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la angiogénesis tal como se define en la presente memoria, destinadas al tratamiento de un paciente que necesita del mismo, en el que dicho paciente se ha determinado que es menos susceptible a desarrollar hipertensión asociada a una terapia con el inhibidor de la angiogénesis según el método descrito en la presente memoria.
- 65

En la presente memoria se describen además kits para llevar a cabo los métodos indicados en la presente memoria. Los kits comprenden oligonucleótidos capaces de determinar el genotipo en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4).

5 Se describen además en la presente memoria métodos para reducir el riesgo de desarrollar hipertensión asociada a una terapia que comprende un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab. Los métodos comprenden: (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer, el genotipo en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4), (b) identificar un paciente como menos susceptible a desarrollar hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, en el que la presencia del genotipo GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) indica que dicho paciente es menos susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4), y (c) administrar dicho inhibidor de la angiogénesis en un paciente con el genotipo GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4), identificado como menos susceptible a desarrollar hipertensión según (b). En algunas realizaciones, la terapia comprende además un agente quimioterapéutico o un régimen de quimioterapia. En algunas realizaciones, el inhibidor de angiogénesis se administra con uno o más agentes seleccionados de entre el grupo que consiste de taxanos, interferón α , 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, gemcitabina-erlotinib y agentes quimioterapéuticos basados en el platino. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer pancreático, cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer mamario o cáncer pulmonar. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. En algunas realizaciones, el genotipo se determina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

En la presente memoria se describen además métodos de tratamiento de pacientes. Los métodos comprenden administrar en el paciente una terapia que comprende un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, en el que el genotipo del paciente en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) se ha determinado que es GG o AA.

Breve descripción de los dibujos

- 30 Figura 1: Distribuciones de variables de datos clínicos. Gráfico de Kaplan-Meier de la supervivencia sin progresión (PFS)
- Figura 2: Distribuciones de variables de datos clínicos. Gráfico de Kaplan-Meier de supervivencia global (OS).
- Figura 3: Distribuciones de variables de datos clínicos. Gráfico de columnas de mejor respuesta global (BOR). Las tasas de BOR fueron de 49% en los sujetos tratados con BEV y de 46% en los sujetos tratados con PBO.
- 35 Figura 4: Distribuciones de variables de datos clínicos. Gráfico de columnas de la hipertensión no relacionada con el fármaco de estudio. Las tasas de hipertensión fueron de 18% en los sujetos tratados con BEV y de 7% en los sujetos tratados con PBO.
- Figura 5: Resultados del análisis de asociación para VEGFA y PFS en el análisis de panel de eficacia de Leuven.
- Figura 6: Diagrama de Forest para rs699946 (SEC ID nº1) en VEGFA sometido a ensayo para la asociación con PFS.
- 40 Figura 7: Diagrama de Forest para la asociación de rs12505758 (SEC ID nº 2) con OS en sujetos blancos tratados con BEV.
- Figura 8: Gráficos de Kaplan-Meier para la asociación entre rs12505758 (SEC ID nº 2) y OS.
- Figura 9: Frecuencias de hipertensión en correlación a rs2305949 (SEC ID nº 3) (KDR).
- Figura 10: Diagrama de Forest para rs2305949 (SEC ID nº 3) en KDR, para la hipertensión en sujetos blancos tratados con BEV.
- 45 Figura 11: Frecuencias de hipertensión en correlación a rs4444903 (SEC ID nº 4) (EGF).
- Figura 12: Diagrama de Forest para rs4444903 (SEC ID nº 4) en EGF e hipertensión en *PGx-SP-BEV-White*.
- Figura 13: Diagrama de Forest para la asociación de rs11133360 (SEC ID nº 5) con PFS en sujetos blancos tratados con BEV.
- 50 Figura 14: Secuencias de los SNP genotipados en el metaanálisis y asociados al resultado con bevacizumab. SEC ID nº 1 corresponde a rs699946, en el que la posición 51 es A o G. SEC ID nº 2 corresponde a rs12505758, en el que la posición 51 es C o T. SEC ID nº 3 corresponde a rs2305949, en el que la posición 51 es C o T. SEC ID nº 4 corresponde a rs4444903, en el que la posición 51 es A o G. SEC ID nº 5 corresponde a rs11133360, en el que la posición 51 es C o T.

Descripción detallada de las realizaciones

1. Definiciones

60 El término "administrar" se refiere a la administración de una composición farmacéutica, tal como un inhibidor de la angiogénesis, en el paciente. Por ejemplo, pueden administrarse 2,5 mg/kg de peso corporal a 15 mg/kg de peso corporal de bevacizumab (Avastin[®]) cada semana, cada 2 semanas o cada 3 semanas, dependiendo del tipo de cáncer que se somete a tratamiento. Entre las dosis particulares se incluyen 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg y 15 mg/kg. Son dosis todavía más particulares 5 mg/kg cada 2 semanas, 10 mg/kg cada 2 semanas y 15 mg/kg cada 3 semanas.

65

La expresión "inhibidor de la angiogénesis" en el contexto de la presente invención se refiere a la totalidad de los agentes que alteran la angiogénesis (es decir, el proceso de formación de vasos sanguíneos) e incluye agentes que inhiben la angiogénesis, incluyendo, aunque sin limitación, la angiogénesis tumoral. En este contexto, la inhibición puede referirse al bloqueo de la formación de vasos sanguíneos y a la detención o entrecimiento del crecimiento de vasos sanguíneos. Entre los ejemplos de inhibidores de la angiogénesis se incluyen el bevacizumab (también conocido como Avastin®), el pegaptanib, el sunitinib, el sorafenib y el vatalanib. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado recombinante que se une e inhibe la actividad biológica del VEGFA humano en un sistema de ensayo in vitro e in vivo. El término "bevacizumab" comprende la totalidad de los anticuerpos anti-VEGF correspondientes que satisfacen los requisitos necesarios para obtener una autorización comercial como producto idéntico o biosimilar en un país o territorio seleccionado de entre el grupo de países que consiste de USA, Europa y Japón. En el contexto de la presente invención, un inhibidor de la angiogénesis incluye un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, más específicamente un anticuerpo que se une al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab. Un anticuerpo se une "esencialmente al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia en el caso de que los dos anticuerpos reconozcan epítipos idénticos o estéricamente solapantes. Los métodos más ampliamente utilizados y rápidos para determinar si dos epítipos se unen a epítipos idénticos o estéricamente solapantes son los ensayos de competición, que pueden configurarse en varios formatos diferentes, utilizando un antígeno marcado o un anticuerpo marcado. Habitualmente, el antígeno se inmoviliza en una placa de 96 pocillos, y se mide la capacidad de los anticuerpos no marcados para bloquear la unión de anticuerpos marcados utilizando marcajes radioactivos o enzimáticos.

El término "cáncer" se refiere a la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente como proliferación celular no regulada. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Entre los ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluyen el cáncer de células escamosas, el cáncer pulmonar (incluyendo el cáncer pulmonar de células pequeñas, el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar y el carcinoma pulmonar escamoso), el cáncer de peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gástrico o de estómago (incluyendo el cáncer gastrointestinal), el cáncer pancreático (incluyendo el cáncer pancreático metastásico), el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer ovárico, el cáncer hepático, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer mamario (incluyendo el cáncer mamario negativo para HER-2 localmente avanzado, recurrente o metastásico), el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de las glándulas salivares, el cáncer de riñón o renal, el cáncer hepático, el cáncer hepático, el cáncer de vulva, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como el linfoma de células B (incluyendo el linfoma no de Hodgkin de grado bajo/folicular (NHL), el NHL linfocítico pequeño (SL), el NHL de grado intermedio/folicular, el NHL difuso de grado intermedio, el NHL inmunoblástico de grado elevado, el NHL linfoblástico de grado elevado, el NHL de células pequeñas no hendidas de grado elevado, el NHL de afectación masiva, el linfoma de células del manto, el linfoma relacionado con el SIDA y la macroglobulinemia de Waldenström), la leucemia linfocítica crónica (CLL), la leucemia linfoblástica aguda (ALL), la leucemia de células pilosas, la leucemia mieloblástica crónica y el trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD), así como la proliferación vascular anormal asociada a las facomatosis, edema (tal como el asociado a los tumores cerebrales) y el síndrome de Meigs.

La expresión "agente quimioterapéutico" o "régimen de quimioterapia" incluye cualquier agente activo que puede proporcionar un efecto terapéutico anticáncer y que puede ser un agente químico o un agente biológico, en particular, que sea capaz de interferir con las células de cáncer o tumorales. Son agentes activos particulares aquellos que actúan como agentes antineoplásicos (quimotóxicos o quimostáticos) que inhiben o previenen el desarrollo, maduración o proliferación de las células malignas. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas (por ejemplo mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán y clorambucilo), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y semustina (metil-CCNU)), etileniminas/metilmelaminas (por ejemplo trietilenmelamina (TEM), trietileno, tiofosforamida (tiotepa), hexametilmelamina (HMM, altretamina)), alquilsulfonatos (por ejemplo el busulfán) y triazinas (por ejemplo dacarbazina (DTIC)); antimetabolitos, tales como análogos del ácido fólico (por ejemplo metotrexato y trimetrexato), análogos de pirimidina (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina, fluorodesoxiuridina, gemcitabina, citosina arabinósido (AraC, citarabina), 5-azacitidina, 2,2'-difluorodesoxicidina) y análogos de purina (por ejemplo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fosfato de fludarabina y 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA)); fármacos antimetabólicos desarrollados a partir de productos naturales (por ejemplo, paclitaxel, alcaloides vinca (por ejemplo, vinblastina (VLB), vincristina y vinorelbina), docetaxel, estramustina y fosfato de estramustina), epipodofilotoxinas (por ejemplo etopósido y tenipósido), antibióticos (por ejemplo actinomicina D, daunomicina (rubidomicina), daunorubicin, doxorubicina, epirubicina, mitoxantrona, idarubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C, actinomicina C, actinomicina, enzimas (por ejemplo L-asparaginasa) y modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo interferón- α , IL-2, G-CSF, GM-CSF); agentes misceláneos, incluyendo complejos de coordinación con el platino (por ejemplo cisplatino, carboplatino y oxaliplatino), antracenedionas (por ejemplo mitoxantrona), urea sustituida (es decir, hidroxurea), derivados de metilhidrazina (por ejemplo N-metilhidrazina (MIH), procarbazona), supresores adrenocorticales (por ejemplo mitotano (o,p'-DDD), aminoglutetimida); hormonas y antagonistas, incluyendo antagonistas adrenocorticoesteroides (por ejemplo prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida), progestinas (por ejemplo caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol), estrógenos (por ejemplo

5 dietilestilbestrol, etinil-estradiol y equivalentes de los mismos); antiestrógenos (por ejemplo tamoxifeno), andrógenos (por ejemplo propionato de testosterona, fluoximesterona y equivalentes de los mismos), antiandrógenos (por ejemplo flutamida, análogos de hormonas liberadoras de gonadotropinas, leuprolido), antiandrógenos no esteroideos (por ejemplo flutamida), inhibidores del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, erlotinib, lapatinib y gefitinib) anticuerpos (por ejemplo, trastuzumab), irinotecán y otros agentes, tales como leucovorina. Para el tratamiento del cáncer pancreático metastásico, entre los agentes quimioterapéuticos para la administración bevacizumab se incluyen la gemcitabina y el erlotinib y combinaciones de los mismos (ver también los ejemplos proporcionados en la presente memoria). Para el tratamiento del cáncer de células renales, entre los agentes quimioterapéuticos para la administración con bevacizumab se incluyen el interferón α (ver también los ejemplos proporcionados en la presente memoria).

El término "alelo" se refiere a una variante de secuencia de nucleótidos de un gen de interés.

15 El término "genotipo" se refiere a una descripción de los alelos de un gen contenido en un individuo o en una muestra. En el contexto de la presente invención, no se realiza ninguna distinción entre el genotipo de un individuo y el genotipo de una muestra originada a partir del individuo. Aunque típicamente un genotipo se determina a partir de muestras de células diploides, puede determinarse un genotipo a partir de una muestra de células haploides, tal como un espermatozoide.

20 Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" se utilizan intercambiamente y se refieren a una molécula que comprende dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferentemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependerán de la función o uso último del oligonucleótido. Un oligonucleótido puede derivarse sintéticamente o mediante clonación. Las quimeras de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos también pueden encontrarse comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

25 El término "polimorfismo" se refiere a la aparición de dos o más secuencias alternativas genéticamente determinadas de un gen en una población. Típicamente, la primera forma alélica identificada se designa arbitrariamente la forma de referencia y otras formas alélicas se designan alelos alternativos o variantes. La forma alélica que se observa más frecuentemente en una población seleccionada en ocasiones se denomina forma de tipo salvaje.

30 La expresión "polimorfismo de un solo nucleótido" o "SNP" es un sitio de un nucleótido que varía entre alelos. Los polimorfismos de un solo nucleótido pueden encontrarse en cualquier región del gen. En algunos casos, el polimorfismo puede resultar en un cambio de la secuencia de la proteína. El cambio de la secuencia de la proteína puede afectar a la función de la misma o no.

35 El término "hipertensión" se refiere a una presión sanguínea elevada. La expresión "hipertensión asociada a una terapia" puede medirse en diferentes grados según los criterios terminológicos comunes del National Cancer Institute para los sucesos adversos (CTCAE v2-3). Tal como apreciará el experto en la materia, un paciente es más susceptible de desarrollar hipertensión en el caso de que el paciente pertenezca a un subgrupo de pacientes que presenta una probabilidad estadísticamente significativa de desarrollar hipertensión en comparación con otro subgrupo de pacientes. De manera similar, un paciente es menos susceptible de desarrollar hipertensión en el caso de que el paciente pertenezca a un subgrupo de pacientes que presenta una probabilidad estadísticamente significativa de no desarrollar hipertensión en comparación con otro subgrupo de pacientes.

45 El término "paciente" se refiere a cualquier animal individual, más concretamente un mamífero (incluyendo animales no humanos tales como, por ejemplo, perros, gatos, caballos, conejos, animales de zoológico, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos) para el que se desea un tratamiento. Todavía más específicamente, el paciente en la presente memoria es un ser humano. En el contexto de la presente invención, el paciente puede ser un sujeto humano.

50 El término "sujeto" en la presente memoria es cualquier sujeto humano, incluyendo un paciente, elegible para el tratamiento, que está experimentando o ha experimentado uno o más signos, síntomas u otros indicadores de un trastorno angiogénico. Se pretende que se incluyan como sujeto cualesquier sujetos participantes en ensayos de investigación clínica que no muestren ningún signo clínico de enfermedad, o sujetos participantes en estudios epidemiológicos, o sujetos utilizados anteriormente como controles. El sujeto puede haber sido tratado anteriormente con un agente anticáncer, o no haber sido tratado de esta manera. El sujeto puede no haber estado expuesto a uno o más agentes adicionales utilizados al iniciar el tratamiento en la presente memoria, es decir, el sujeto puede no haber sido tratado anteriormente con, por ejemplo, un agente antineoplásico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico "en la línea base" (es decir, en un punto prefijado del tiempo que es anterior a la administración de una primera dosis de un anticáncer en el método de tratamiento en la presente memoria, tal como el día de cribado del sujeto anterior al inicio del tratamiento). Dichos sujetos "no expuestos" se consideran generalmente candidatos para el tratamiento con dicho agente o agentes adicionales.

65 La expresión "un paciente que sufre de" se refiere a un paciente que manifiesta signos clínicos con respecto a una enfermedad maligna determinada, tal como cáncer, una enfermedad que implica angiogénesis fisiológica y patológica y/o enfermedad tumoral.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "terapia" o "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula bajo tratamiento, y puede llevarse a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, prevenir la aparición o recurrencia de una enfermedad, el alivio de síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la reducción de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de una enfermedad y la remisión o la mejora del pronóstico.

La expresión "supervivencia global" se refiere al periodo de tiempo durante y después del tratamiento, de supervivencia del paciente.

La expresión "supervivencia sin progresión" se refiere al periodo de tiempo durante y después del tratamiento durante el que, según la evaluación del médico responsable del tratamiento o del investigador, la enfermedad del paciente no empeora, es decir, no progresa.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación estéril que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica del medicamento resulte efectiva, y que no contiene componentes adicionales que resulten inaceptablemente tóxicos para un sujeto en el que se administre la formulación.

2. Realizaciones detalladas

En la presente invención, las variaciones de los genes KDR y EGF se identificaron inesperadamente como marcadores/predictores de la susceptibilidad a desarrollar hipertensión asociada al tratamiento con un inhibidor de la angiogénesis. Los términos "marcador" y "predictor" pueden utilizarse intercambiamente y se refieren a alelos variantes específicos de los genes. La variación o marcador también puede denominarse polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

Siguiendo los métodos de la presente invención, se llevó a cabo un metaanálisis de los SNP utilizando las muestras derivadas de cinco ensayos de Fase II y Fase III con bevacizumab, es decir, NO16966 (cáncer colorrectal primario avanzado, ver Saltz et al., J. Clin. Oncol. 26:2013-2019, 2008, y Hurwitz et al., N. Engl. J. Med. 350:2335-2342, 2004), AVITA (cáncer pancreático, ver Van Cutsem, J. Clin. Oncol. 27:2231-2237, 2009), AVAIL (cáncer pulmonar de células no pequeñas, ver Reck et al., J. Clin. Oncol. 27:1227, 2009), AVOREn (cáncer renal, ver Escudier et al., J. Clin. Oncol. 28:2144, 2010) y AVADO (cáncer de mama, ver Miles, J. Clin. Oncol. 28:3239, 2010).

Tal como se muestra en los ejemplos, se asociaron diez SNP con hipertensión inducida por bevacizumab ($p < 0,05$), pero ninguno de ellos sobrepasó el umbral para los ensayos múltiples ($p < 0,0003$). Los dos SNP que mostraban la asociación más fuerte ($p < 0,01$) fueron: rs2305949 (SEC ID nº 3) en KDR (proporción de probabilidades alélicas=0,93, IC al 95% 0,88-0,98, $p=0,0067$) y rs4444903 (SEC ID nº 4) en EGF (proporción de probabilidades alélicas=1,06, IC al 95% 1,02-1,11, $p=0,0052$). Para rs2305949 (SEC ID nº 3) (KDR), los portadores de CC (de tipo salvaje) mostraban una frecuencia más alta de desarrollo de hipertensión al ser tratados con BEV, mientras que los pacientes tratados con placebo mostraron un resultado más bien opuesto, con una frecuencia de hipertensión más alta en los pacientes portadores de TT. Para rs4444903 (SEC ID nº 4) (EGF), los portadores del heterocigoto GA mostraron la frecuencia de hipertensión más alta, un efecto que no se observó en los pacientes tratados con placebo, ya que no se observaron diferencias entre los diferentes genotipos. Resulta interesante que rs2305949 (SEC ID nº 3) y rs4444903 (SEC ID nº 4) se encontraban estrechamente asociados a cambios de aminoácidos en las posiciones 273 y 708 de KDR y EGF, sugiriendo que estos cambios podrían afectar funcionalmente a ambos genes y contribuir de esta manera a la hipertensión.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente exposición proporciona un método in vitro para determinar la susceptibilidad de un paciente al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia que comprende un inhibidor de la angiogénesis, que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, comprendiendo dicho método:

1. (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer el genotipo en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3), e
2. (b) identificar un paciente como más o menos susceptible al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, basándose en dicho genotipo, en el que la presencia del genotipo CC en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3) indica que dicho paciente es más susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de CT o TT en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3) o en el que la presencia de genotipo CT o TT en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3) indica que dicho paciente es menos susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de CC en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3). En una realización, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer renal, cáncer ovárico, cáncer mamario, cáncer pancreático, cáncer gástrico y cáncer pulmonar, más específicamente cáncer colorrectal,

cáncer renal, cáncer mamario, cáncer pancreático y cáncer pulmonar, todavía más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal y cáncer pulmonar.

La presente exposición proporciona además una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que bevacizumab, para el tratamiento de un paciente que lo necesita, en el que dicho paciente se ha determinado que es menos susceptible al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia con el inhibidor de la angiogénesis mediante un método in vitro que comprende:

1. (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer el genotipo en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3), e
2. (b) identificar un paciente como más o menos susceptible al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, basándose en dicho genotipo, en el que la presencia del genotipo CC en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3) indica que dicho paciente es más susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de CT o TT en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3) o en el que la presencia de genotipo CT o TT en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3) indica que dicho paciente es menos susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de CC en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3). En una realización, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer renal, cáncer ovárico, cáncer mamario, cáncer pancreático, cáncer gástrico y cáncer pulmonar, más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer mamario, cáncer pancreático y cáncer pulmonar, todavía más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal y cáncer pulmonar.

La presente exposición proporciona además un método para reducir el riesgo de desarrollar hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, comprendiendo dicho método:

1. (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer el genotipo en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3),
2. (b) identificar un paciente como menos susceptible a desarrollar hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, en el que la presente del genotipo CT o TT en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3) indica que dicho paciente es menos susceptible al desarrollo de hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de CC en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3), y
3. (c) administrar dicho inhibidor de la angiogénesis en un paciente con el genotipo CT o TT en el polimorfismo rs2305949 (SEC ID nº 3) identificado como menos susceptible al desarrollo de hipertensión según (b). En una realización, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer renal, cáncer ovárico, cáncer mamario, cáncer pancreático, cáncer gástrico y cáncer pulmonar, más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer mamario, cáncer pancreático y cáncer pulmonar, todavía más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal y cáncer pulmonar.

La presente invención proporciona además un método in vitro para determinar la susceptibilidad de un paciente al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia que comprende un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, comprendiendo dicho método:

1. (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer el genotipo en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4), e
2. (b) identificar un paciente como más o menos susceptible al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o con un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, basándose en dicho genotipo, en el que la presencia del genotipo AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) indica que dicho paciente es más susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) o en el que la presencia de genotipo GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) indica que dicho paciente es menos susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4). En una realización, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer renal, cáncer ovárico, cáncer mamario, cáncer pancreático, cáncer gástrico y cáncer pulmonar, más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer mamario, cáncer pancreático y cáncer pulmonar, todavía más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal y cáncer mamario.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que bevacizumab, para el tratamiento de un paciente que lo necesita, en el que dicho paciente se ha determinado que es menos susceptible al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia con el inhibidor de la angiogénesis mediante un

método in vitro que comprende:

1. (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer el genotipo en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4), e
- 5 2. (b) identificar un paciente como más o menos susceptible al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o con un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, basándose en dicho genotipo, en el que la presencia del genotipo AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) indica que dicho paciente es más susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) o en el que la presencia de genotipo GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) indica que dicho paciente es menos susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4). En una realización, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer renal, cáncer ovárico, cáncer mamario, cáncer pancreático, cáncer gástrico y cáncer pulmonar, más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer mamario, cáncer pancreático y cáncer pulmonar, todavía más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal y cáncer mamario.

En la presente memoria se describe además un método para reducir el riesgo de desarrollar hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, comprendiendo dicho método:

1. (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer el genotipo en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4),
- 25 2. (b) identificar un paciente como menos susceptible a desarrollar hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, en el que la presencia del genotipo GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) indica que dicho paciente es menos susceptible al desarrollo de hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4), y
- 30 3. (c) administrar dicho inhibidor de la angiogénesis en un paciente con el genotipo GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) identificado como menos susceptible al desarrollo de hipertensión según (b). En una realización, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer renal, cáncer ovárico, cáncer mamario, cáncer pancreático, cáncer gástrico y cáncer pulmonar, más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer mamario, cáncer pancreático y cáncer pulmonar, todavía más específicamente cáncer colorrectal, cáncer renal y cáncer pulmonar.

En una realización, el inhibidor de la angiogénesis se administra como cotratamiento con un agente quimioterapéutico o régimen de quimioterapia. En una realización adicional, el inhibidor de la angiogénesis se administra con uno o más agentes seleccionados de entre el grupo que consiste de taxanos, tales como docetaxel y paclitaxel, interferón- α , 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, gemcitabina-erlotinib y agentes quimioterapéuticos basados en el platino, tales como carboplatino, cisplatino y oxaliplatino. Además, el inhibidor de la angiogénesis puede administrarse como cotratamiento con radioterapia.

En el contexto de la presente invención, la muestra es una muestra biológica y puede ser una muestra de sangre y/o de tejido. En una realización, la muestra es una muestra de sangre, más específicamente una muestra de sangre periférica. En el contexto de la presente invención, la muestra es una muestra de ADN. La muestra de ADN puede ser de ADN de la línea germinal o ADN somático, más específicamente ADN de la línea germinal.

En una realización, el genotipo se determina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Además de la descripción detallada de la detección de SNP, posteriormente, la referencia siguiente proporciona recomendaciones para el genotipado de SNP basado en la espectrometría de masas MALDI-TOF, por ejemplo Storm et al., *Methods Mol. Biol.* 212:241-62, 2003.

3. Detección de polimorfismos de ácidos nucleicos

Las técnicas de detección para evaluar ácidos nucleicos para la presencia de un SNP implican procedimientos bien conocidos en el campo de la genética molecular. Muchos, aunque no todos, los métodos implican la amplificación de ácidos nucleicos. Se proporcionan en la técnica recomendaciones extensas sobre la realización de la amplificación. Entre las referencias ejemplares se incluyen manuales tales como PCR Technology: *Principles and Applications for DNA Amplification* (editor H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: *A Guide to Methods and Applications* (editores Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, 1994-1999, incluyendo los suplementos de actualización hasta abril de 2004; Sambrook & Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3a edición, 2001). Se dan a conocer métodos generales para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido en *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols*, Pui-Yan Kwok, editor, 2003, Humana Press.

65

Aunque los métodos típicamente utilizan etapas de PCR, también pueden utilizarse otros protocolos de amplificación. Entre los métodos de amplificación adecuados se incluyen la reacción en cadena de la ligasa (ver, por ejemplo, Wu y Wallace, *Genomics* 4:560-569, 1988); el ensayo de desplazamiento de cadena (ver, por ejemplo, Walker et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396, 1992; patente US nº 5.455.166), y varios sistemas de amplificación basados en la transcripción, incluyendo los métodos descritos en las patentes US nº 5.437.990, nº 5.409.818 y nº 5.399.491; el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS) (Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177, 1989); y la replicación de secuencias autosostenida (3SR) (Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878, 1990; documento nº WO 92/08800). Alternativamente pueden utilizarse métodos que amplifican la sonda hasta niveles detectables, tales como la amplificación de Q β -replicasa (Kramer y Lizardi, *Nature* 339:401-402, 1989; Lomeli et al., *Clin. Chem.* 35:1826-1831, 1989). Se proporciona una revisión de los métodos de amplificación conocidos en, por ejemplo, Abramson y Myers, *Current Opinion in Biotechnology* 4:41-47, 1993.

La detección del genotipo, haplotipo, SNP, microsatélites u otros polimorfismos de un individuo puede llevarse a cabo utilizando cebadores y/o sondas oligonucleótidas. Pueden prepararse oligonucleótidos mediante cualquier método adecuado, habitualmente mediante síntesis química. Pueden sintetizarse oligonucleótidos utilizando reactivos e instrumentos comercialmente disponibles. Alternativamente, pueden obtenerse de fuentes comerciales. Los métodos de síntesis de oligonucleótidos son bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Narang et al., *Meth. Enzymol.* 68:90-99, 1979; Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68:109-151, 1979; Beaucage et al., *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862, 1981, y el método en soporte sólido de la patente US nº 4.458.066). Además, pueden utilizarse modificaciones de los métodos de síntesis anteriormente indicados para impactar deseablemente el comportamiento del enzima con respecto a los oligonucleótidos sintetizados. Por ejemplo, puede utilizarse la incorporación de enlaces fosfodiéster modificados (por ejemplo fosforotioato, metilfosfonatos, fosfoamidato o boranofosfato) o enlaces que no son de un derivado de ácido fosforoso, en un oligonucleótido, con el fin de evitar el corte en un sitio seleccionado. Además, la utilización de los azúcares 2'-amino modificados tiende a favorecer el desplazamiento respecto a la digestión del oligonucleótido al hibridarlo con un ácido nucleico que también es el molde para la síntesis de una cadena nueva de ácidos nucleicos.

El genotipo de un individuo puede determinarse utilizando muchos métodos de detección que son bien conocidos de la técnica. La mayoría de ensayos implica uno de entre varios protocolos generales: hibridación utilizando oligonucleótidos específicos de alelos, extensión de cebador, ligación específica de un alelo, secuenciación o técnicas de separación electroforética, por ejemplo el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) y de heterodúplex. Entre los ensayos ejemplares se incluyen los ensayos de 5'-nucleasa, la incorporación de pigmento terminador dirigida por un molde, los ensayos de oligonucleótidos específicos de alelos de baliza molecular, ensayos de extensión de una sola base y la puntuación de los SNP por secuenciación en tiempo real con pirofosfatos. El análisis de las secuencias amplificadas puede llevarse a cabo utilizando diversas tecnologías, tales como los microchips, los ensayos de polarización de fluorescencia y la espectrometría de masas MALDI-TOF (de tiempo de vuelo con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz). Dos métodos que también pueden utilizarse son los ensayos basados en el corte invasivo con nucleasas Flap y metodologías que utilizan sondas-candado.

La determinación de la presencia o ausencia de un alelo particular generalmente se lleva a cabo mediante análisis de una muestra de ácidos nucleicos que se obtiene del individuo que debe analizarse. Con frecuencia, la muestra de ácidos nucleicos comprende ADN genómico. El ADN genómico típicamente se obtiene de muestras de sangre, pero también puede obtenerse de otras células o tejidos.

También resulta posible analizar muestras de ARN para la presencia de alelos polimórficos. Por ejemplo, puede utilizarse ARNm para determinar el genotipo de un individuo en uno o más sitios polimórficos. En este caso, la muestra de ácidos nucleicos se obtiene de células en las que se expresa el ácido nucleico diana, por ejemplo adipocitos. Dicho análisis puede llevarse a cabo mediante en primer lugar la transcripción inversa del ARN diana utilizando, por ejemplo, una transcriptasa inversa vírica y después amplificando el ADNc resultante, o utilizando una reacción combinada a alta temperatura de transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), tal como se describe en las patentes US nº 5.310.652, nº 5.322.770, nº 5.561.058, nº 5.641.865 y nº 5.693.517.

Se describen brevemente las metodologías utilizadas frecuentemente para el análisis de muestras de ácidos nucleicos para detectar los SNP. Sin embargo, puede utilizarse en la invención cualquier método conocido de la técnica para detectar la presencia de sustituciones de nucleótidos individuales.

a. Hibridación específica de alelos

Esta técnica, también denominada comúnmente hibridación de oligonucleótidos específica de alelos (ASO) (por ejemplo Stoneking et al., *Am. J. Hum. Genet.* 48:70-382, 1991; Saiki et al., *Nature* 324:163-166, 1986; patente EP nº 235.726 y documento nº WO 89/11548), se basa en distinguir entre dos moléculas de ADN que difieren en una base mediante la hibridación de una sonda oligonucleótida que es específica para una de las variantes con un producto amplificado obtenido a partir de la amplificación de la muestra de ácidos nucleicos. Este método típicamente utiliza oligonucleótidos cortos, por ejemplo de 15 a 20 bases de longitud. Las sondas se diseñan para hibridarse diferencialmente con una variante u otra. Los principios y recomendaciones para el diseño de dicha sonda se

encuentran disponibles en la técnica, por ejemplo en las referencias citadas en la presente memoria. Las condiciones de hibridación deberían ser suficientemente restrictivas para que se produzca una diferencia significativa de la intensidad de hibridación en diferentes alelos, y producir una respuesta esencialmente binaria, en la que una sonda se hibrida únicamente a uno de los alelos. Algunas sondas se diseñan para hibridarse con un segmento de ADN diana de manera que el sitio polimórfico se alinee con una posición central (por ejemplo en un oligonucleótido de 15 bases en la posición 7; en un oligonucleótido de 16 bases en la posición 8 ó 9) de la sonda, aunque este diseño no resulta necesario.

La cantidad y/o presencia de un alelo se determina mediante la medición de la cantidad de oligonucleótido específico de alelos que se hibrida con la muestra. Típicamente, el oligonucleótido se marca con un marcaje, tal como un marcaje fluorescente. Por ejemplo, se aplica un oligonucleótido específico de alelos en los oligonucleótidos inmovilizados que representan las secuencias de SNP. Tras una hibridación restrictiva y condiciones de lavado, se mide la intensidad de la fluorescencia para cada oligonucleótido SNP.

En una realización, el nucleótido presente en el sitio polimórfico se identifica mediante hibridación bajo condiciones de hibridación específicas de una secuencia, con una sonda oligonucleótida o cebador exactamente complementario a uno de los alelos polimórficos en una región que comprende el sitio polimórfico. La secuencia hibridante de la sonda o cebador y las condiciones de hibridación específicas de una secuencia se seleccionan de manera que un único desapareamiento en el sitio polimórfico desestabiliza el dúplex de hibridación de manera suficiente para que efectivamente no se forme. De esta manera, bajo condiciones de hibridación específicas de una secuencia, se formarán dúplex estables únicamente entre la sonda o cebador y la secuencia alélica exactamente complementaria. De esta manera, los oligonucleótidos de una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 35 nucleótidos, habitualmente de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos, que son exactamente complementarios a una secuencia alélica en una región que comprende el sitio polimórfico se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención.

En una realización alternativa, el nucleótido presente en el sitio polimórfico se identifica mediante hibridación bajo condiciones de hibridación suficientemente restrictivas con un oligonucleótido sustancialmente complementario a uno de los alelos de SNP en una región que comprende el sitio polimórfico, y exactamente complementario al alelo en el sitio polimórfico. Debido a que los desapareamientos que se producen en sitios no polimórficos son desapareamientos con ambas secuencias alélicas, la diferencia en el número de desapareamientos en un dúplex formado con la secuencia alélica diana y en un dúplex formado con la secuencia alélica no diana correspondiente es igual al existente al utilizar un oligonucleótido exactamente complementario a la secuencia alélica diana. En la presente realización, las condiciones de hibridación se relajan suficientemente para permitir la formación de dúplex estables con la secuencia diana, manteniendo simultáneamente suficiente astringencia para evitar la formación de dúplex estables con las secuencias no diana. Bajo condiciones de hibridación suficientemente restrictivas, sólo se formarán dúplex estables entre la sonda o cebador y el alelo diana. De esta manera, los oligonucleótidos de una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 35 nucleótidos, habitualmente de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos, que sean exactamente complementarios a una secuencia alélica en una región que comprende el sitio polimórfico y que sean exactamente complementarios a la secuencia alélica en el sitio polimórfico, se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención.

La utilización de oligonucleótidos sustancialmente, no exactamente, complementarios puede resultar deseable en formatos de ensayos en los que la optimización de las condiciones de hibridación es limitada. Por ejemplo, en un formato de ensayo multidiana de oligonucleótido inmovilizado típico, se inmovilizan sondas o cebadores para cada diana en un único soporte sólido. Las hibridaciones se llevan a cabo simultáneamente poniendo en contacto el soporte sólido con una solución que contiene el ADN diana. Debido a que todas las hibridaciones se llevan a cabo bajo condiciones idénticas, las condiciones de hibridación no pueden optimizarse separadamente para cada sonda o cebador. La incorporación de desapareamientos en una sonda o cebador puede utilizarse para ajustar la estabilidad del dúplex en el caso de que el formato de ensayo impida ajustar las condiciones de hibridación. El efecto de un desapareamiento introducido particular sobre la estabilidad de un dúplex es bien conocido, y la estabilidad del dúplex puede tanto estimarse como determinarse empíricamente de modo rutinario, tal como se ha indicado anteriormente. Las condiciones de hibridación adecuadas, que dependen del tamaño y secuencia exactos de la sonda o cebador, pueden seleccionarse empíricamente siguiendo las recomendaciones proporcionadas en la presente memoria y bien conocidas de la técnica. La utilización de sondas o cebadores oligonucleótidos para detectar diferencias de un solo par de bases en la secuencia se describe en, por ejemplo, Conner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:278-282, 1983, y en las patentes US nº 5.468.613 y nº 5.604.099.

El cambio proporcional de estabilidad entre un dúplex de hibridación perfectamente apareado y con un desapareamiento de una sola base depende de la longitud de los oligonucleótidos hibridados. Los dúplex formados con secuencias de sonda más cortas se desestabilizan proporcionalmente más con la presencia de un desapareamiento. Los oligonucleótidos de longitud comprendida entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 nucleótidos con frecuencia se utilizan para la detección específica de secuencia. Además, debido a que los extremos de un oligonucleótido hibridado experimentan una disociación y reapareamiento aleatorios continuamente debido a la energía térmica, un desapareamiento en cualquiera de los extremos desestabiliza el dúplex de hibridación menos que

un desapareamiento que se produzca internamente. Para discriminar el cambio de un solo par de bases en la secuencia diana, se selecciona una secuencia de la sonda que se hibride con la secuencia diana de manera que el sitio polimórfico se encuentre en la región interior de la sonda.

5 Los criterios anteriormente indicados para seleccionar una secuencia de sonda que se hibrida con un alelo específico se aplican a la región hibridante de la sonda, es decir, aquella parte de la sonda que participa en la hibridación con la secuencia diana. Puede unirse una sonda a una secuencia adicional de ácidos nucleicos, tal como una cola poli-T utilizada para inmovilizar la sonda, sin alterar significativamente las características de hibridación de la sonda. El experto en la materia reconocerá que, para la utilización en los presentes métodos, una sonda unida a una secuencia
10 adicional de ácidos nucleicos que no es complementaria a la secuencia diana y que, de esta manera, no participa en la hibridación, es esencialmente equivalente a la sonda no unida.

Los formatos de ensayo adecuados para detectar híbridos formados entre secuencias de sonda y de ácidos nucleicos diana en una muestra son conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen los formatos de ensayo de diana inmovilizada (hibridación por puntos) y de sonda inmovilizada (hibridación por puntos inversa o hibridación en línea).
15 Los formatos de ensayo de hibridación por puntos e inversa por puntos se describen en las patentes US nº 5.310.893, nº 5.451.512, nº 5.468.613 y nº 5.604.099.

En un formato de hibridación por puntos, se inmoviliza sobre un soporte sólido, tal como una membrana de nilón, el ADN diana amplificado. El complejo de membrana-diana se incuba con sonda marcada bajo condiciones de hibridación adecuadas, se elimina la sonda no hibridada mediante lavado bajo condiciones convenientemente
20 astringentes y se analiza la membrana para la presencia de sonda unida.

En el formato de hibridación inversa por puntos (o hibridación en línea), las sondas se inmovilizan sobre un soporte sólido, tal como una membrana de nilón o una placa de microtitulación. El ADN diana se marca, típicamente durante la amplificación mediante incorporación de cebadores marcados. Puede marcarse uno o ambos cebadores. El complejo de membrana-sonda se incuba con el ADN diana amplificado y marcado, bajo condiciones de hibridación adecuadas, se elimina el ADN diana no hibridado mediante lavado bajo condiciones convenientemente astringentes y se analiza la membrana para la presencia de ADN diana unido. Se describe un ensayo de detección de hibridación inversa en línea
25 en el ejemplo.

Una sonda específica de alelos que sea específica para una de las variantes polimórficas se utiliza con frecuencia conjuntamente con la sonda específica de alelos para la otra variante polimórfica. En algunas realizaciones, las sondas se inmovilizan sobre un soporte sólido y la secuencia diana en un individuo se analiza utilizando ambas sondas simultáneamente. Se describen ejemplos de matrices de ácidos nucleicos en la patente WO nº 95/11995. Puede utilizarse la misma matriz o una matriz diferente para el análisis de los polimorfismos caracterizados. La patente WO nº 95/11995 también describe submatrices que se optimizan para la detección de formas variantes de un polimorfismo previamente caracterizado. Dicha submatriz puede utilizarse para detectar la presencia de los polimorfismos indicados en la presente memoria.
35

40 b. Cebadores específicos de alelos

Los polimorfismos también se detectan comúnmente utilizando la amplificación específica de alelos o los métodos de extensión de cebadores. Las reacción típicamente implican la utilización de cebadores que se diseñan para presentar como diana específica un polimorfismo a través de un desapareamiento en el extremo 3' de un cebador. La presencia de un desapareamiento afecta a la capacidad de la polimerasa de extender el cebador en el caso de que la polimerasa no presente actividad correctora de errores. Por ejemplo, para detectar una secuencia alélica utilizando un método basado en la amplificación específica de alelos o en la extensión, se diseña un cebador complementario a un alelo de un polimorfismo de manera que el nucleótido 3'-terminal se hibrida en la posición polimórfica. La presencia del alelo particular puede determinarse a partir de la capacidad del cebador de iniciar la extensión. En el caso de que el extremo 3'-terminal se encuentre desapareado, se bloquea la extensión.
45

En algunas realizaciones, se utiliza el cebador conjuntamente con un segundo cebador en una reacción de amplificación. El segundo cebador se hibrida en un sitio no relacionado con la posición polimórfica. La amplificación transcurre desde los dos cebadores, conduciendo a un producto detectable, lo que significa que la forma alélica particular se encuentra presente. Los métodos basados en la amplificación específica de alelos o en la extensión se describen en, por ejemplo, la patente WO nº 93/22456, y en las patentes US nº 5.137.806, nº 5.595.890 y nº 5.639.611, y en la patente US nº 4.851.331.
50

Mediante la utilización del genotipado basado en la amplificación específica de alelos, la identificación de los alelos sólo requiere la detección de la presencia o ausencia de las secuencias diana amplificadas. Los métodos para la detección de las secuencias diana amplificadas son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, los ensayos de electroforesis en gel y de hibridación de sondas indicados se utilizan con frecuencia para detectar la presencia de ácidos nucleicos.
55

60

En un método sin sondas alternativo, el ácido nucleico amplificado se detecta analizando el incremento de la cantidad total de ADN de doble cadena en la mezcla de reacción, que se describe en, por ejemplo, la patente US nº 5.994.056 y en las publicaciones de patente europea nº 487.218 y nº 512.334. La detección de ADN diana de doble cadena se basa en la fluorescencia incrementada que diversos pigmentos ligantes de ADN, por ejemplo verde SYBR, muestran al unirse a ADN de doble cadena.

Tal como apreciará el experto en la materia, los métodos de amplificación específicos de alelos pueden llevarse a cabo en una reacción que utiliza múltiples cebadores específicos de alelos con diana en alelos particulares. Los cebadores para dichas aplicaciones multiplex generalmente se marcan con marcajes distinguibles o se seleccionan de manera que los productos de amplificación producidos a partir de los alelos puedan distinguirse a partir del tamaño. De esta manera, por ejemplo, ambos alelos en una sola muestra pueden identificarse utilizando una sola amplificación mediante análisis en gel del producto de amplificación.

Tal como en el caso de las sondas específicas de alelos, un cebador oligonucleótido específico de alelos puede ser exactamente complementario a uno de los alelos polimórficos en la región hibridante o puede presentar algunos desapareamientos en posiciones diferentes del extremo 3' del oligonucleótido, encontrándose los desapareamientos en sitios no polimórficos de ambas secuencias alélicas.

c. Sondas detectables

i) Sondas de ensayo 5'-nucleasa

El genotipado también puede llevarse a cabo utilizando un "TaqMan[®]" o "ensayo de 5'-nucleasa", tal como se describe en la patente US nº 5.210.015, nº 5.487.972 y nº 5.804.375, y en Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280, 1988. En el ensayo TaqMan[®], las sondas de detección marcadas que se hibridan dentro de la región amplificada se añaden durante la reacción de amplificación. Las sondas se modifican de manera que eviten que las sondas actúen como cebadores para la síntesis de ADN. La amplificación se lleva a cabo utilizando una ADN polimerasa que presenta actividad de exonucleasa 5' a 3'. Durante cada etapa sintética de la amplificación, cualquier sonda que se hibride con el ácido nucleico diana cadena abajo del cebador que se está extendiendo resulta degradada por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa. De esta manera, la síntesis de una nueva cadena diana también resulta en la degradación de una sonda, y la acumulación de productos de degradación proporciona una medida de la síntesis de secuencias diana.

La sonda de hibridación puede ser una sonda específica de alelos que discrimine entre los alelos de SNP. Alternativamente, el método puede llevarse a cabo utilizando un cebador específicos de alelos y una sonda marcada que se una al producto amplificado.

Puede utilizarse cualquier método adecuado para detectar productos de degradación en un ensayo de 5'-nucleasa. Con frecuencia, la sonda de detección se marca con dos pigmentos fluorescentes, uno de los cuales puede inhibir la fluorescencia del otro pigmento. Los pigmentos se unen a la sonda, habitualmente uno se une al extremo 5'-terminal y el otro se une a un sitio interno, de manera que la inhibición se produce cuando la sonda se encuentra en un estado no hibridado y de manera que el corte de la sonda por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa se produce entre los dos pigmentos. La amplificación resulta en el corte de la sonda entre los pigmentos con una eliminación concomitante de la inhibición y un incremento de la fluorescencia observable del pigmento inicialmente inhibido. La acumulación de productos de degradación se analiza mediante la medición del incremento de la fluorescencia de la reacción. Las patentes US nº 5.491.063 y nº 5.571.673 describen métodos alternativos para detectar la degradación de la sonda que se produce concomitantemente con la amplificación.

ii) Sondas de estructura secundaria

Las sondas detectables con un cambio de estructura secundaria también resultan adecuados para la detección de un polimorfismo, incluyendo los SNP. Entre las sondas de estructura secundaria o de tallo-bucle ejemplificadas se incluyen las balizas moleculares o las sondas/cebadores Scorpion[®]. Las sondas de baliza molecular son sondas de ácidos oligonucleicos de cadena sencilla que pueden formar una estructura de horquilla en la que un fluoróforo y un inhibidor habitualmente se sitúan en los extremos opuestos del oligonucleótido. En cualquiera de los extremos de la sonda, secuencias complementarias cortas permiten la formación de un tallo intramolecular, que permite que el fluoróforo y el inhibidor se encuentren muy próximos. La porción de bucle de la baliza molecular es complementaria a un ácido nucleico diana de interés. La unión de dicha sonda a su ácido nucleico diana de interés forma un híbrido que fuerza la separación del tallo. Esto provoca un cambio de conformación que separa el fluoróforo del inhibidor y conduce a una señal fluorescente más intensa. Sin embargo, las sondas de baliza molecular son altamente sensibles a pequeñas variaciones de secuencia en la sonda diana (Tyagi S. and Kramer F. R., Nature Biotechnology, Vol. 14, páginas 303 a 308, 1996; Tyagi et al., Nature Biotechnology, Vol. 16, páginas 49 a 53, 1998; Piatek et al., Nature Biotechnology, Vol. 16, páginas 359 a 363, 1998; Marras S. et al., Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, Vol. 14, páginas 151 a 156, 1999; Tpp I. et al., BioTechniques, Vol 28, páginas 732 a 738, 2000). Un cebador/sonda Scorpion[®] comprende una sonda de estructura de tallo-bucle unida covalentemente a un cebador.

d. Secuenciación de ADN y extensiones de bases individuales

5 Los SNP también pueden detectarse mediante secuenciación directa. Entre los métodos se incluyen, por ejemplo, los métodos basados en la secuenciación dideoxi y otros métodos, tales como la secuenciación de Maxam y Gilbert (ver, por ejemplo, Sambrook y Russell, supra).

10 Entre otros métodos de detección se incluyen Pyrosequencing™ de productos de longitud oligonucleótida. Dichos métodos con frecuencia utilizan técnicas de amplificación, tales como la PCR. Por ejemplo, en la pirosecuenciación, se hibrida un cebador de secuenciación con un molde de ADN de cadena sencilla amplificación por PCR, y se incuba con los enzimas ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa, y los sustratos adenosín-5'-fosfosulfato (APS) y luciferina. Se añade a la reacción el primero de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTP). La ADN polimerasa cataliza la incorporación de los desoxinucleótidos trifosfato en la cadena de ADN en el caso de que sea complementario a la base en la cadena de molde. Cada suceso de incorporación se ve acompañado de la liberación de pirofosfato (PPI) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado. La ATP sulfurilasa convierte cuantitativamente PPI en ATP en presencia de adenosín-5'-fosfosulfato. Este ATP controla la conversión mediada por luciferasa de la luciferina en oxiluciferina, que genera luz visible en cantidades que son proporcionales a la cantidad de ATP. La luz producida en la reacción catalizada por luciferasa se detecta mediante una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) y se observa como un pico en un Pyrogram™. Cada señal de luz es proporcional al número de nucleótidos incorporados. La apirasa, un enzima degradador de nucleótidos, degrada continuamente los dNTP no incorporados y el exceso de ATP. Al completarse la degradación, se añade otro dNTP.

25 Otro método similar para caracterizar las SNP no requiere la utilización de una PCR completa, sino que típicamente utiliza únicamente la extensión de un cebador por una única molécula de ácido dideoxirribonucleico (ddNTP) marcada con fluorescencia, que es complementaria al nucleótido que se investiga. El nucleótido en el sitio polimórfico puede identificarse mediante la detección de un cebador que ha sido extendido en una base y que se encuentra marcado fluorescentemente (por ejemplo Kobayashi et al., Mol. Cell. Probes 9:175-182, 1995).

30 e. Electroforesis

Los productos de amplificación generados utilizando la reacción en cadena de la polimerasa pueden analizarse mediante la utilización de una electroforesis en gel de gradiente desnaturizante. Los diferentes alelos pueden identificarse basándose en las propiedades de fusión dependientes de las diferentes secuencias y en la migración electroforética del ADN en solución (ver, por ejemplo, Erlich, editor, PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, W.H. Freeman and Co., New York, 1992, capítulo 7).

40 La distinción entre los polimorfismos de los microsatélites puede llevarse a cabo utilizando una electroforesis capilar. La electroforesis capilar permite convenientemente la identificación del número de repeticiones en un alelo particular de un microsatélite. La aplicación de la electroforesis capilar al análisis de los polimorfismos de ADN es bien conocida por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Szantai, et al., J Chromatogr A. 1079(1-2):41-9, 2005; Bjoheim y Ekstrom, Electrophoresis 26(13):2520-30, 2005, y Mitchelson, Mol. Biotechnol. 24(1):41-68, 2003).

f. Análisis de polimorfismos a partir de la conformación de cadenas sencillas

45 Los alelos de las secuencias diana pueden diferenciarse utilizando el análisis de polimorfismos a partir de la conformación de cadenas sencillas, que identifica diferencias de bases a partir de la alteración de la migración electroforética de productos de PCR de cadena sencilla, tal como se describe en, por ejemplo, Orita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:2766-2770, 1989. Pueden generarse productos amplificados por PCR tal como se ha indicado anteriormente, y calentarse o de otro desnaturizarse, para formar productos de amplificación de cadena sencilla. Los ácidos nucleicos de cadena sencilla pueden plegarse nuevamente o formar estructuras secundarias que son parcialmente dependientes de la secuencia de bases. Las diferentes movilidades electroforéticas de los productos de amplificación de cadena sencilla puede relacionarse con las diferencias en las secuencias de bases entre los alelos de la diana.

55 Los métodos de detección de SNP con frecuencia utilizan oligonucleótidos marcados. Los oligonucleótidos pueden marcarse mediante la incorporación de un marcaje detectable, por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Entre los marcajes útiles se incluyen los pigmentos fluorescentes, los marcajes radioactivos, por ejemplo ³²P, los reactivos electrodensos, enzimas, tales como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina, la biotina, o haptenos y proteínas para los que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales. Las técnicas de marcaje son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, supra; Sambrook y Russell, supra).

4. Métodos de tratamiento

65 La dosis de bevacizumab (Avastin®) para los tratamientos de cánceres específicos según EMEA, son las siguientes.

Para el carcinoma metastásico de colon o recto (CRCm) las dosis recomendadas son de 5 mg/kg ó 10 mg/kg de peso corporal administrados una vez cada 2 semanas, ó 7,5 mg/kg ó 15 mg/kg de peso corporal administrados una vez cada 3 semanas; para el cáncer mamario metastásico (BCm) las dosis recomendadas son de 10 mg/kg de peso corporal administrados una vez cada 2 semanas ó 15 mg/kg de peso corporal administrados una vez cada 3 semanas en forma de una infusión intravenosa, y para el cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) las dosis recomendadas son de 7,5 mg/kg ó 15 mg/kg de peso corporal administrados una vez cada 3 semanas en forma de una infusión intravenosa. El beneficio clínico en los pacientes de NSCLC se ha demostrado con dosis de tanto 7,5 mg/kg como 15 mg/kg. Para más detalles ver la sección 5.1 Pharmacodynamic Properties, Non-small cell lung cancer (NSCLC). Para el cáncer de células renales avanzado y/o metastásico (RCCm), la dosis preferentes son de 10 mg/kg de peso corporal administrados una vez cada 2 semanas en forma de una infusión intravenosa (además de la quimioterapia basada en el platino durante hasta 6 ciclos de tratamiento, seguido de bevacizumab (Avastin[®]) como agente único hasta la progresión de la enfermedad). Para el glioblastoma una dosis particular fue de 10 mg/kg cada 2 semanas.

En contexto de la presente invención, el inhibidor de la angiogénesis puede administrarse adicionalmente o como coterapia o cotratamiento con uno o más agentes quimioterapéuticos administrados como parte del régimen de quimioterapia estándar conocido de la técnica. Entre los ejemplos de agentes incluidos en dichos regímenes de quimioterapia estándares se incluyen 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, gemcitabina, erlotinib, capecitabina, taxanos, tales como el docetaxel y el paclitaxel, interferón- α , vinorelbina y agentes quimioterapéuticos basados en el platino, tales como paclitaxel, carboplatino, cisplatino y oxaliplatino. Entre los ejemplos de cotratamientos para el cáncer pancreático metastásico se incluyen gemcitabina-erlotinib más bevacizumab a una dosis de 5 ó 10 mg/kg de peso corporal administrados una vez cada dos semanas ó 7,5 mg/kg ó 15 mg/kg de peso corporal administrados una vez cada tres semanas. Entre los ejemplos de cotratamientos para el cáncer de células renales se incluyen el interferón- α más bevacizumab a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal una vez cada dos semanas. Además, un paciente puede cotratarse con una combinación de irinotecán, 5-fluorouracilo, leucovorina, también denominada IFL, tal como, por ejemplo, un bolo de IFL, con una combinación de oxaliplatino, leucovorina y 5-fluorouracilo, también denominado régimen de FOLFOX4, o con una combinación de capecitabina y oxaliplatino, también denominada XELOX. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una realización adicional de la invención, el paciente que sufre de una enfermedad maligna o de una enfermedad que implica la angiogénesis fisiológica y patológica se trata con uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, gemcitabina-erlotinib, capecitabina y/o agentes quimioterapéuticos basados en el platino, tales como paclitaxel, carboplatino y oxaliplatino. Entre los ejemplos de coterapia o cotratamiento se incluyen 5 mg/kg de bevacizumab (Avastin[®]) cada dos semanas con un bolo de IFL ó 10 mg/kg de bevacizumab (Avastin[®]) cada 2 semanas con FOLFOX4 para el cáncer colorrectal metastásico, 15 mg/kg de bevacizumab (Avastin[®]) cada 3 semanas con carboplatino/paclitaxel para el cáncer pulmonar de células no pequeñas no escamosas y 10 mg/kg de bevacizumab (Avastin[®]) cada 2 semanas con paclitaxel para el cáncer mamario metastásico. Además, el inhibidor de angiogénesis que debe administrarse puede administrarse como coterapia o como cotratamiento con radioterapia.

5. Kit

La presente exposición se refiere además a una composición diagnóstica o kit que comprende cualesquiera de los oligonucleótidos indicados y opcionalmente medios adecuados de detección.

El kit de la invención ventajosamente puede utilizarse para llevar a cabo un método de la invención y podría utilizarse, *inter alia*, en una diversidad de aplicaciones, por ejemplo en el campo diagnóstico o como una herramienta de investigación. Las partes del kit de la exposición pueden empaquetarse individualmente en viales o en combinación en recipientes o unidades multirrecipiente. La fabricación del kit sigue preferentemente procedimientos estándares que son conocidos por el experto en la materia. El kit o composiciones diagnósticas puede utilizarse para la detección de uno o más alelos variantes según los métodos de la invención indicados en la presente memoria, utilizando, por ejemplo, técnicas de amplificación tales como las indicadas en la presente memoria.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una realización adicional de la presente exposición se proporciona un kit útil para poner en práctica los métodos indicados en la presente memoria, que comprenden oligonucleótidos o polinucleótidos capaces de determinar el genotipo de uno o más SNP. Los oligonucleótidos o polinucleótidos pueden comprender cebadores y/o sondas.

La presente invención se describe en mayor detalle en referencia a las figuras y ejemplos no limitativos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1:

La determinación genética puede influir sobre la sensibilidad del endotelio al VEGF. De acuerdo con lo anterior y en el contexto de la presente invención, los presentes inventores exploraron la variabilidad en las rutas de señalización subyacentes con el fin de identificar patrones predictivos para el tratamiento antiangiogénico y del desarrollo de hipertensión bajo este régimen terapéutico. En este análisis, se evaluó en 5 ensayos diferentes la correlación entre la

variabilidad genética en la ruta de señalización de VEGF-A con el resultado clínico de pacientes con diferentes cánceres primarios avanzados. Los cinco ensayos eran ensayos paralelos y aleatorizados que pretendían investigar la eficacia y seguridad de BEV (bevacizumab) en sujetos con cáncer colorrectal metastásico (NO16966), cáncer pancreático metastásico (AVITA), cáncer pulmonar de células no pequeñas no escamosas avanzado o recurrente (AVAIL), cáncer renal metastásico (AVOREN) y cáncer mamario metastásico negativo para HER2 (AVADO).

En la totalidad de los cinco ensayos, se incluyó el muestreo opcional de biomarcadores de ADN para el análisis de los SNP. En total, se dispuso de ADN de línea germinal de 1.346 pacientes. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) comunes situados en los factores 1α y 2α inducibles por hipoxia, VEGF-A, sus receptores (VEGFR-1 y VEGFR-2) y otros genes relevantes, se seleccionaron basándose en la literatura y utilizando un enfoque de etiquetado de los SNP ($f\geq 0,1$ y $r^2\leq 0,8$). Se genotiparon con éxito 157 SNP utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF. Se calcularon estimaciones de riesgo y supervivencia utilizando análisis de regresión de Cox.

Se llevaron a cabo dos tipos de análisis.

1. 1. Correlación de los marcadores genéticos con PFS y OS.
2. 2. Correlación de los marcadores genéticos con hipertensión, no clasificada como "no relacionada con el fármaco de estudio"

El SNP rs699946 (SEC ID nº 1), situado en el promotor de VEGF-A, se encontraba asociado a una PFS mejorada en sujetos tratados con bev con un HR alélico de 1,26 (IC al 95% 1,07-1,48, $p=0,005$). No se observó ningún efecto en los sujetos tratados con placebo, sugiriendo que rs699946 (SEC ID nº 1) podría ser un marcador predictivo de resultado favorable del tratamiento con bevacizumab. Además, el SNP rs11133360 (SEC ID nº 5), situado en el promotor de VEGFR2, se encontraba asociado a una PFS mejorada en sujetos tratados con bevacizumab con un HR alélico de 1,15 (IC al 95% 1,02-1,30, $p=0,02$). En términos de OS, el SNP rs12505758 (SEC ID nº 2) en VEGFR2 era el más significativamente asociado a una OS mejorada en pacientes tratados con bev (HR alélico=1,50, IC al 95% 1,21-1,86, $p=0,0002$). No se observaron efectos para rs12505758 (SEC ID nº 2) en pacientes tratados con placebo.

Diez SNP se encontraban asociados a hipertensión inducida por bevacizumab ($p<0,05$), pero ninguno de ellos sobrepasó el umbral para los ensayos múltiples ($p<0,0003$). Los dos SNP que mostraban la asociación más fuerte ($p<0,01$) fueron: rs2305949 (SEC ID nº 3) en KDR (OR alélico=0,93, IC al 95% 0,88-0,98, $p=0,0067$) y rs4444903 (SEC ID nº 4) en EGF (OR alélico=1,06, IC al 95% 1,02-1,11, $p=0,0052$). Resulta interesante que rs2305949 (SEC ID nº 3) y rs4444903 (SEC ID nº 4) se encontraban estrechamente asociados a cambios de aminoácidos en las posiciones 273 y 708 de KDR y EGF, sugiriendo que estos cambios podrían afectar funcionalmente a ambos genes y contribuir de esta manera a la hipertensión. Cabe destacar que rs11064560 en WNK1 también se encontraba asociado a hipertensión inducida por bevacizumab (OR alélico=1,06, IC al 95% 1,01-1,10, $p=0,02$), corroborando de esta manera observaciones previas en un número limitado de pacientes [Frey et al., J. Clin. Oncol. 26: (supl. de 20 de mayo, resumen 11003), 2008].

PACIENTES Y MÉTODOS

Muestras

Los protocolos de la totalidad de los 5 ensayos fueron aprobadas por un comité de revisión institucional en cada sitio y pusieron en práctica de acuerdo con la Declaración de Helsinki, buenas prácticas clínicas vigentes de la US Food and Drug Administration y los requisitos éticos y legales exigidos localmente. En total se genotiparon 1.346 sujetos. De entre estos sujetos, 1.225 eran de raza blanca y 121 no eran de raza blanca. Debido a que los pacientes no de raza blanca son genéticamente diferentes de los pacientes de raza blanca y las frecuencias de SNP podrían ser diferentes entre ambos grupos étnicos, los pacientes no de raza blanca fueron omitidos de los análisis posteriores. Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado para los ensayos de biomarcadores genéticos.

Evaluaciones

Los pacientes se evaluaron según el protocolo de estudio descrito en las referencias siguientes:

- AVITA: Van Cutsem et al., J. Clin. Oncol. 27, 2231-7 (2009)
- AVAIL: Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, et al. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. J Clin Oncol 2009;27(8):1227-34
- AVOREN: Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. Lancet. 2007;370(9605):2103-2111
- AVADO: Miles DW, et al., J Clin Oncol 2010a;28(20):3239-47
- NO16966: Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based

chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. J Clin Oncol 2008;26(12):2013-2019

Selección de polimorfismos de un solo nucleótido

5 Se consideraron dos paneles de marcadores para el análisis: el panel de Roche y el panel de Leuven. El panel de Roche consiste de 35 polimorfismos genéticos seleccionados mediante revisión de la literatura para su relevancia potencial al tratamiento con BEV. El panel está formado de SNP y polimorfismos de repetición localizados en los genes siguientes: VEGFA, NOS3, FLT1 (VEGFR1), KDR (VEGFR2), WNK1, IL8, IL8R y IFNAR2. El panel de Leuven
10 consiste de 186 SNP-etiqueta de la cascada de señalización de VEGF o de genes candidatos para efectos secundarios conocidos, hipertensión o trombosis, e incluye los genes siguientes: el ligando de VEGF, los homólogos de VEGF (factor de crecimiento placentario o PIGF, VEGF-B y VEGF-C, así como VEGF-D o FIGF), el receptor 2 de VEGF (KDR o VEGFR-2) y el receptor 1 de VEGF (FLT1 o VEGFR-1). Las secuencias genómicas situadas 5 kb
15 cadena arriba del sitio de inicio de traducción hasta el sitio poliA de poli-adenilación 3' de cada gen, se utilizaron para seleccionar los SNP de la base de datos HapMap (HapMap compilación de datos 24/fase II Nov08, en un ensamblaje B36 del NCBI, dbSNP b126). Se seleccionaron los SNP-etiqueta utilizando el Tagger (Pe'er I. et al., Nat. Genet. 38:663-7, 2006) proporcionado en el paquete informático HAPLOVIEW (Barrett J.C. et al., Bioinformatics 21, 263-5 (2005)). Sólo se consideraron los SNP comunes, es decir, con una frecuencia alélica menor $\geq 0,1$ y un umbral de r^2 mínimo $\geq 0,8$. En total se seleccionaron 167 SNP-etiqueta siguiendo dichos criterios. Además, se seleccionaron 11
20 SNP situados en secuencias exónicas y que inducían cambios de aminoácidos no sinónimos a una frecuencia $\geq 0,1$ de la base de datos dbSNP, así como 4 SNP en VEGF (rs699947, rs833061, rs2010963 y rs3025039), 1 SNP en VEGFR-1 (rsTP53_R-1) y 1 SNP en VEGFR-2 (rs2071559), que se ha informado previamente que afectan a la función o expresión de dichos genes.

25 Existe cierto solapamiento entre marcadores en los dos paneles, y el tamaño de los paneles se ha incrementado ligeramente a lo largo de los seis ensayos, de manera que se dispone de menos marcadores para ensayos anteriores. El metaanálisis actual se restringe a los marcadores para los que se ha realizado el genotipado en por lo menos dos de los ensayo en el estudio.

30 Se definieron cuatro juegos de marcadores, del modo siguiente:

- 'Todos los marcadores' consiste de todos los marcadores analizados para los que se ha obtenido por lo menos un genotipo.
- 'Marcadores de Roche' consiste de los marcadores del panel de Roche, que habían pasado las comprobaciones de calidad (ver posteriormente) y presentan una frecuencia superior al 1% en sujetos blancos.
- 'Marcadores de eficacia de Leuven' consiste de aquellos marcadores del panel de Leuven que se encuentran en loci implicados en la ruta de VEGF, que han pasado las comprobaciones de calidad (ver posteriormente) y que presentan una frecuencia superior a 1% en sujetos blancos.
- 'Marcadores de seguridad de Leuven' consiste de aquellos marcadores del panel de Leuven que se encuentran en genes candidatos para la implicación en hipertensión o trombosis, que han pasado las comprobaciones de calidad (ver posteriormente) y que presentan una frecuencia superior a 1% en sujetos blancos.

Genotipado

Se muestreó sangre periférica en tubos Vacutainer de plástico con K2EDTA. Tras la centrifugación, se extrajo el ADN de la línea germinal de la fracción celular de leucocitos precipitada, siguiendo procedimientos estándares.

50 Para los SNP del panel de Roche, el genotipado se llevó a cabo con enmascaramiento en los Roche Translational Research Sciences Genetics laboratories (Basel, Suiza) utilizando la amplificación PCR específica para alelos, la secuenciación de Sanger y las plataformas de análisis de fragmentos (AVAIL, AVITA, AVOREN, AVADO, NO16966).

55 Para los SNP del panel de Leuven, el genotipado se llevó a cabo con enmascaramiento en el Vesalius Research Center (Leuven, Bélgica) utilizando la plataforma Sequenom iPLEX (Sequenom Inc., San Diego, CA, USA). Cualquier SNP que no proporcionase un genotipo robusto en la primera ronda de genotipado se rediseñó utilizando un juego diferente de cebadores de reacción en cadena de la polimerasa y se sometió nuevamente a ensayo. Globalmente, 157 (85,3%) fueron genotipados con éxito, con una tasa de éxito global de 98,5%. Los 27 SNP que no pudieron genotiparse con el segundo diseño se excluyeron del estudio.

60 Se diseñaron los cebadores de amplificación siguientes para los SNP rs699946 (SEC ID nº 1), rs12505758 (SEC ID nº 2), rs2305949 (SEC ID nº 3), rs4444903 (SEC ID nº 4) y rs11133360 (SEC ID nº 5). Para rs699946 (SEC ID nº 1), se utilizaron ACGTTGGATGCTACCACTAGTGTGGCTTG (SEC ID nº 6) y ACGTTGGATGTGAGCTCCACACTGCCTTC (SEC ID nº 7). Para SNP rs12505758 (SEC ID nº 2), se utilizaron

ACGTTGGATGCTTTACTCTGCCAAATCTATG (SEQ ID nº 8) y ACGTTGGATGGCTAATAAGCTTATACATTTG (SEQ ID nº 9). Para rs2305949 (SEC ID nº 3), se utilizaron ACGTTGGATGATCCTATACCTAGAGCAAG (SEC ID nº 10) y ACGTTGGATGATCTGTGCAAAGTTATAGGC (SEC ID nº 11). Para rs4444903 (SEC ID nº 4), se utilizaron ACGTTGGATGCTTCTTTCCAGCCCAATCC (SEC ID nº 12) y ACGTTGGATGAAGAAAGGAAGAACTGATGG (SEC ID nº 13). Para rs11133360 (SEC ID nº 5), se utilizaron ACGTTGGATGTTTCACATTGCTATGCCCAA (SEC ID nº 14) y ACGTTGGATGCTCTTTCTTCACTTTGACTG (SEC ID nº 15).

Se diseñaron los cebadores de amplificación no extendidos (sondas) siguientes para los SNP rs699946 (SEC ID nº 1), rs12505758 (SEC ID nº 2), rs2305949 (SEC ID nº 3), rs4444903 (SEC ID nº 4) y rs11133360 (SEC ID nº 5). Para rs699946 (SEC ID nº 1), se utilizó ATTAGTCAATTCTCTGACAGAGACA (SEC ID nº 16). Para rs12505758 (SEC ID nº 2), se utilizó TTA CTCTGCCAAATCTATGATGCCA (SEC ID nº 17). Para rs2305949 (SEC ID nº 3), se utilizó CTAGAGCAAGTAAATTGAAAAA (SEC ID nº 18). Para rs4444903 (SEC ID nº 4), se utilizó GCATCTCCAATCCAAGGGTTGT (SEC ID nº 19). For rs11133360 (SEC ID nº 5), se utilizó CACATTGCTATGCCCAACACATC (SEC ID nº. 20).

Comprobación de la calidad

Se comprobó la calidad de los datos del modo siguiente:

- Se comprobó la uniformidad de la cadena de ensayo
- Se resumieron los niveles de datos faltantes
- Se excluyeron los marcadores con frecuencia alélica menor ($MAP < 1\%$)
- Se excluyeron los marcadores que no cumplían un ensayo de homogeneidad de las frecuencias alélicas
- Se llevaron a cabo pruebas del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para ayudar a la interpretación

Tras la comprobación de calidad, 25 marcadores de Roche, 133 marcadores de eficacia de Leuven y 22 marcadores de seguridad de Leuven se sometieron a análisis de asociación de los datos agrupados.

Análisis estadístico

Se utilizó un análisis agrupado de datos de pacientes individuales, estratificados según estudio, para todos los marcadores con frecuencia homogénea. Los marcadores de eficacia candidatos se sometieron a ensayo para la asociación a PFS y OS utilizando la regresión de Cox de riesgos proporcionales. Los marcadores de seguridad candidatos se sometieron a ensayo para la asociación a hipertensión utilizando la regresión logística. El análisis primario incluía sujetos blancos tratados con BEV por ITT (para las variables de eficacia) y de SP (hipertensión), según el caso. Se realizaron ajustes en todas las pruebas de asociación para las covariables siguientes: Región, estudio y dosis y régimen de quimioterapia de fondo. También se ajustó un subconjunto de las variables siguientes, seleccionadas según variable de valoración mediante regresión paso a paso hacia atrás: Estado funcional de ECOG (0 vs. 1), género (varón vs. mujer), edad, LDH, nivel de fosfatasa alcalina (dentro del intervalo normal vs. superior al intervalo normal), albúmina sérica ($< 2,9$ g/dl vs. $\geq 2,9$ g/dl) y número de línea base de sitios metastásicos (> 2 vs. ≤ 2). Con el fin de investigar si cualesquiera asociaciones detectadas reflejaban efectos temporales y no de tratamiento, también se llevaron a cabo pruebas de asociación en sujetos blancos tratados con placebo. Con el fin de caracterizar adicionalmente cualesquiera asociaciones detectadas, se llevó a cabo en sujetos blancos un análisis de la interacción Genotipo x Tratamiento.

Datos

26 marcadores de Roche, 136 marcadores de eficacia de Leuven y 22 marcadores de seguridad de Leuven pasaron las comprobaciones de calidad y se sometieron a análisis de homogeneidad. La Tabla 1 muestra el número de sujetos que se incorporarán en el metaanálisis. Se indica que 3 sujetos en la población de ITT no se encontraban en la de SP y 3 sujetos presentaban valores faltantes para la dosis semanal aleatorizada (RNDWD).

Tabla 1: conjuntos y tamaños de sujetos para el análisis

Población de análisis	Recuento
<i>PGx-ITT-Todos brazos-Todas las etnicidades</i>	1346
<i>PGx-ITT-Todos brazos-Blancos</i>	1225
<i>PGx-ITT-BEV-Todas las etnicidades</i>	668
<i>PGx-ITT-BEV-Blancos</i>	629
<i>PGx-ITT-P80-Blancos</i>	593
<i>PGx-SP-Todos brazos-Blancos</i>	1223
<i>PGx-SP-BEV-Todas las etnicidades</i>	667
<i>PGx-SP-BEV-Blancos</i>	628

Características clínicas de la población de pacientes genéticos

En la Tabla 2 se tabulan las características demográficas y de variables según ensayo clínico y globalmente para los sujetos en *PGx-ITT-BEV-Todas las etnicidades*. Las distribuciones de las variables se ilustran gráficamente en la figura 1-4.

Tabla 2: resumen de los datos demográficos y de variables

	AVAIL	AVOREN	AVITA	AVADO		Todos
	BO17704	BO17705	BO17706	BO17708	NO16966	
Tipo de cáncer	NSCLC	Renal	Pancreático	Mama	Colorrectal	
N	119	108	161	350	610	1348
BEV	83	59	79	238	210	669
PBO	36	49	81	110	400	676
Hombre	0,71	0,72	0,64	0	0,61	0,47
Edad (años (SD))	57,39 (9,85)	59,7 (10,57)	61,7 (9,59)	54,73 (10,84)	59,56 (11,46)	58,38 (11,13)
Blanco	0,92	0,99	0,95	0,96	0,85	0,91
OS (Mediana)	424	1011	213	873,5	636	614
Cens. (OS)	0,36	0,47	0,09	0,37	0,19	0,26
PFS (Mediana)	197	413	150	256	267,5	250
Cens. (PFS)	0,03	0,11	0,04	0,07	0,04	0,05
BOR (PR/CR)	0,42	0,37	0,14	0,49	0,51	0,44
Hipertensión	0,21	0,2	0,14	0,15	0,08	0,13

Se disponía de datos clínicos para 1.348 sujetos de 5 ensayos, con un número aproximadamente igual en el grupo de tratamiento y de placebo. En contraste con los demás ensayos, no participaron varones en BO17708 (AVADO), que era un ensayo sobre el cáncer mamario avanzado. Las distribuciones de edad y las proporciones de blancos eran generalmente homogéneas, excepto por una proporción ligeramente inferior de sujetos blancos en el ensayo de mayores dimensiones, NO16966. Las medianas de longitud de OS y PFS variaban ampliamente, al igual que las tasas de censura. Tal como se esperaba, la censura para OS fue mucho mayor que para PFS, y en términos estadísticos, el efecto era de reducir la potencia para detectar la asociación a OS en comparación con a la PFS. Las tasas de BOR fueron de 49% en los sujetos tratados con BEV y de 46% en los sujetos tratados con PBO. Las tasas de hipertensión fueron de 18% en los sujetos tratados con BEV y de 7% en los sujetos tratados con PBO.

Para la PFS se produjeron 592 sucesos, y para la OS, se produjeron 438 sucesos, de 629 sujetos blancos tratados con BEV en el grupo PGx-ITT. Para la hipertensión se produjeron 113 sucesos de un total de 628 sujetos blancos tratados con BEV en el grupo PGx-SP. La Tabla 3 muestra el número de sujetos blancos que se incorporarán en el metaanálisis.

Tabla 3: recuentos de sujetos para el metaanálisis farmacocinético de sujetos blancos

Población	Tratamiento	Recuento
ITT	BEV	629
ITT	PBO	593
PS	BEV	628
PS	PBO	592

ITT: población por intención de tratar PS: población de seguridad

Resultados EficaciaSupervivencia libre de progresiónAnálisis en el subgrupo de pacientes tratados con bevacizumab

La asociación más fuerte de VEGF-A con la PFS fue para rs699946 (SEC ID nº 1) (p=0,005). Aunque el resultado no era significativo tras el ajuste para ensayos múltiples, proporcionó una señal consistente cadena arriba con el marcador rs699947, según Schneider et al., J. Clin. Oncol. 26:4672, 2008. En la figura 5 se proporciona un diagrama de dispersión de la asociación a lo largo del gen completo.

Marcador	Chr	BP	MAF	N	HR	IC al 95%	Valor de p	Gen
rs699946	Chr6	43732669	0,18	542	1,26	(1,07,1,48)	0,0047	VEGFA

Respecto a los portadores de AA, la HR para los portadores de rs699946 (SEC ID nº 1) AG era de 1,26 (IC al 95% 1,07-1,48, p=0,005). Esto significa que cada alelo G adicional se encontraba asociado a un incremento de 27% del riesgo de progresión o muerte. No se observó ningún efecto en los sujetos tratados con placebo, sugiriendo que rs699946 (SEC ID nº 1) podría ser un marcador predictivo de resultado favorable del tratamiento con bevacizumab.

Tal como se muestra en la figura 6, se observaron efectos consistentes para rs699946 (SEC ID nº 1) en todos los estudios excepto en AVOREN/BO17705 (cáncer renal), el estudio más pequeño bajo consideración.

Además, el rs11133360 (SEC ID nº 5) se encontraba débilmente asociado (p=0,02) a la PFS (figura 13).

Marcador	Chr	BP	MAF	N	HR	IC al 95%	Valor de p	Gen
rs11133360	Chr4	55982752	0,45	579	1,15	(1,02,1,30)	0,02	KDR

Respecto a los portadores de TT, la HR para los portadores de rs11133360 (SEC ID nº 5) CT era de 1,15 (IC al 95% 1,02-1,30, p=0,02). Esto significa que cada alelo C adicional se encontraba asociado a un incremento de 15% del riesgo de progresión o muerte.

Análisis de supervivencia global

Análisis en el subgrupo de pacientes tratados con bevacizumab

En el análisis de asociaciones para la OS, 6/133 marcadores presentaba p<0,05 en los sujetos blancos tratados. Uno de ellos, rs12505758 (SEC ID nº 2) era significativo tras el ajuste de Bonferroni para 158 ensayos. El marcador es un SNP intrónico en KDR (receptor con dominio insertado de quinasa, VEGFR2, FLK1) y se encuentra en LD ($r^2=0,31$) con otro SNP intrónico, rs1531289 en el gen (fuente: HapMap compilación 22; el marcador no se encuentra disponible en HapMap v3 compilación 2). El marcador no se encuentra asociado en sujetos blancos tratados con placebo, por lo tanto puede decirse que presenta cualidades predictivas, pero no pronósticas. Una inspección del gráfico Forest (figura 7) muestra que el efecto se encuentra controlado principalmente por NO16966 (cáncer colorrectal) y BO17705 (AVOREN, cáncer renal). El efecto es débil o nulo en los otros tres estudios.

Marcador	Chr	BP	MAF	N	HR	IC al 95%	Valor de p	Gen
rs12505758	Chr4	55966898	0,12	581	1,50	(1,21, 1,86)	2,00E-04	KDR

Respecto a los portadores de TT, la HR para los portadores de rs12505758 (SEC ID nº 2) TC era de HR alélica=1,50 (IC al 95% 1,21-1,86, p=0,0002). Esto significa que cada alelo C adicional se encontraba asociado a un incremento de 50% del riesgo de muerte. No se observaron efectos para rs12505758 (SEC ID nº 2) en pacientes tratados con placebo.

Los gráficos de Kaplan-Meier muestran una proporción de riesgos estimada creciente a medida que crece el número de copias del alelo menor (figura 8).

Información adicional sobre los SNP

Debido a que el SNP rs699946 (SEC ID nº 1) se encuentra localizado en el promotor de VEGF, los presentes inventores examinaron su efecto sobre la expresión de VEGF-A en las muestras de plasma humano. Los presentes inventores encontraron que los portadores de GG presentaban una mediana de expresión de VEGF incrementada en 27% en comparación con los portadores de AG y AA (tipo salvaje). El alelo menor de rs699946 (SEC ID nº 1) se encontraba ligado al alelo menor de rs699947 ($D'=0,98$, $r^2=0,23$), que es otro SNP de promotor de VEGF que previamente se ha demostrado que se asocia a la respuesta a la terapia con bevacizumab [Schneider et al., J. Clin. Oncol. 26:4672, 2008]. Además, rs699946 (SEC ID nº 1) también se encuentra ligado a rs833058 (-6589 C>T), que emergió como el segundo resultado en VEGF para la PFS en el metaanálisis ($D'=0,95$, $r^2=0,35$).

Conclusión de la investigación adicional: Los presentes inventores demostraron que el alelo G de rs699946 (SEC ID nº 1) en el promotor de VEGF-A se asocia a una expresión plasmática incrementada de VEGF-A y que rs699946 (SEC ID nº 1) se encuentra ligado a rs699947, otro SNP de promotor de VEGF-A que previamente se ha demostrado que se encuentra asociado a la respuesta al bevacizumab (Schneider et al.).

El rs11133360 (SEC ID nº 5) en VEGFR-2 es un SNP intrónico situado entre los exones que codifica los dominios extracelulares de la proteína VEGFR-2. Los presentes inventores encontraron que las HUVEC homocigóticas para el alelo C menor presentaban una proliferación incrementada al estimularlas con VEGF en comparación con los portadores de CT y TT. Resulta importante que rs11133360 también se encuentra fuertemente ligado a rs2305948 ($D'=1$), un SNP no sinónimo que induce la sustitución Val297Ile y que se ha informado que afecta a la unión de VEGF a VEGFR-2.

Resultados - hipertensión

Los dos SNP que mostraban la asociación más fuerte ($p < 0,01$) fueron: rs2305949 (SEC ID nº 3) en KDR (OR alélica=0,93, IC al 95% 0,88-0,98, $p=0,0067$) y rs4444903 (SEC ID nº 4) en EGF (OR alélica=1,06, IC al 95% 1,02-1,11, $p=0,0052$); ver la Tabla 4, pero ninguno de ellos sobrepasó el umbral para los ensayos múltiples ($p < 0,0003$). Resulta interesante que rs2305949 (SEC ID nº 3) y rs4444903 (SEC ID nº 4) se encontraban estrechamente asociados a cambios de aminoácidos en las posiciones 273 y 708 de KDR y EGF, sugiriendo que estos cambios podrían afectar funcionalmente a ambos genes y contribuir de esta manera a la hipertensión.

10 Tabla 4: resultados de asociaciones para marcadores SNP de hipertensión

Marcador	Chr	BP	MAF	N	OR	IC al 95%	Valor de p	Gen
rs2305949	4	55980456	0,22	578	0,93	(0,88,0,98)	0,0067	KDR
rs4444903	4	111053559	0,43	609	1,06	(1,02,1,11)	0,005	EGF

Chr = cromosoma; MAF: frecuencia alelo menor; OD = proporción de probabilidades ("Odds ratio")

rs2305949 (SEC ID nº 3) (KDR)

15 Tal como se muestra en la figura 9, se observó una frecuencia más elevada de hipertensión para el portador de CC. La figura 10 muestra que tres estudios (NO16966, AVAIL/BO17704 y AVOREN/BO17705), controlan la asociación. El gráfico Forest para los sujetos blancos tratados con placebo (no mostrado) muestra que el efecto medio en los estudios se produce débilmente en la dirección opuesta, de manera que se puede concluir que el marcador presenta características predictivas.

20 rs4444903 (SEC ID nº 4) (EGF)

Tal como se muestra en la figura 11, se observó una frecuencia más alta de hipertensión en el portador de GA, con una frecuencia mínima para los portadores de AA, mientras que la frecuencia del portador de GG era intermedia. Para el marcador rs4444903 (SEC ID nº 4) en EGF, el examen del gráfico Forest (figura 12) mostraba una consistencia razonable entre estudios, observando el efecto más débil en BO17708/AVADO (cáncer de mama). El gráfico Forest para sujetos en el brazo de placebo (no mostrado) muestra que el marcador presenta características predictivas y no pronósticas.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> F. Hoffmann - La Roche AG Life Science Research Partners vzw VIB vzw
 <120> Método para predecir el riesgo de hipertensión asociado a la terapia antiangiogénesis
 35 <130> 30616
 <150> EP11179500.1
 <151> 2011-08-31
 40 <160> 20
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 45 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 agctggacct accactagtgt ttggcttgtt taaattctct gacagagaca ractgtcccc 60
 50 gggggcgggg aaggcagtgt ggagctcacc ccctgagggg a 101
 <210> 2
 <211> 101
 <212> ADN
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 ctaataagct tatacatttg aaaatatgtc aacatatctc gatgcaatac ytgcatcat 60
 agatttgga gagtaaagg accaaaatct agactttgag a 101

ES 2 589 455 T3

<210> 3
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 3
 tcagaaccac atcataaatc ctatacccta gagcaagtaa attgaaaaa yagaacatga 60
 gagagcaaat aagcctataa ctttgcacag atttatTTTT t 101
 <210> 4
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 gaggaatcgt atctccatat ttcttctttc agccccaatc caagggttgt rgctggaact 60
 15 ttccatcagt tcttcctttc tttttcctct ctaagccttt g 101
 <210> 5
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 gcttgaaatc tcagagagat aacatttcac attgctatgc ccaacacatc ycatcaagca 60
 ttctcagagt gcttcataat agtcagtcaa agtgaagaaa g 101
 25 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> un cebador sintetizado artificialmente para la PCR
 <400> 6
 acgttgatg ctaccactag tgttgcttg 30
 35 <210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> un cebador sintetizado artificialmente para la PCR
 <400> 7
 45 acgttgatg tgagctccac actgcctc 29
 <210> 8
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> un cebador sintetizado artificialmente para la PCR
 <400> 8
 55 acgttgatg cttactctg ccaaatctat g 31
 <210> 9
 <211> 31

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> un cebador sintetizado artificialmente para la PCR

 <400> 9
 acgttgatg gctaataagc ttatacatt g 31

 10 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> un cebador sintetizado artificialmente para la PCR

 <400> 10
 20 acgttgatg atcctatacc ctagagcaag 30

 <210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> un cebador sintetizado artificialmente para la PCR

 <400> 11
 30 acgttgatg atctgtgcaa agttataggc 30

 <210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> un cebador sintetizado artificialmente para la PCR

 <400> 12
 40 acgttgatg tcttcttca gcccacatcc 30

 <210> 13
 <211> 30
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> un cebador sintetizado artificialmente para la PCR

 <400> 13
 50 acgttgatg aagaaaggaa gaactgatg 30

 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> un cebador sintetizado artificialmente para la PCR

 <400> 14
 acgttgatg tttcacattg ctatgcccaa 30

 65 <210> 15

<211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> un cebador sintetizado artificialmente para la PCR

<400> 15
 acgttgatg ctcttcttc acttgactg 30

10 <210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> una sonda sintetizada artificialmente

<400> 16
 attagtcaat tctctgacag agaca 25

20 <210> 17
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> una sonda sintetizada artificialmente

<400> 17
 ttactctgcc aatctatga tgcca 25

30 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> una sonda sintetizada artificialmente

40 <400> 18
 ctagagcaag taaattgaaa aaa 23

45 <210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> una sonda sintetizada artificialmente

<400> 19
 gcatctccaa tccaagggtt gt 22

55 <210> 20
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> una sonda sintetizada artificialmente

<400> 20
 cacattgcta tgccaacac atc 23

65

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la susceptibilidad de un paciente al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia que comprende un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, comprendiendo dicho método:
- (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer el genotipo en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4), e
- (b) identificar un paciente como más o menos susceptible al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o con un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, basándose en dicho genotipo, en el que la presencia del genotipo AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) indica que dicho paciente es más susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) o en el que la presencia de genotipo GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) indica que dicho paciente es menos susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4).
2. Método según la reivindicación 1, en el que la terapia comprende además un agente quimioterapéutico o un régimen de quimioterapia.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el agente quimioterapéutico o régimen de quimioterapia comprende uno o más agentes seleccionados de entre el grupo que consiste de taxanos, interferón- α , 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, gemcitabina-erlotinib y agentes quimioterapéuticos basados en el platino.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer es cáncer pancreático, cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de mama o cáncer de pulmón.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra es una muestra de sangre.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el genotipo se determina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.
7. Composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la angiogénesis según las reivindicaciones 1 a 6 para la utilización en el tratamiento de un paciente que lo necesita, en el que dicho paciente se ha determinado de acuerdo con el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que es menos susceptible al desarrollo de hipertensión asociada a una terapia que comprende el inhibidor de la angiogénesis.
8. Inhibidor de angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo en VEGF que el bevacizumab para la utilización en la reducción del riesgo de desarrollar hipertensión asociada a la terapia que comprende un inhibidor de angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo en VEGF que el bevacizumab, comprendiendo dicho método:
- (a) determinar en una muestra derivada de un paciente que sufre de cáncer el genotipo en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4), e
- (b) identificar un paciente como menos susceptible a desarrollar hipertensión asociada a una terapia con un inhibidor de la angiogénesis que comprende bevacizumab o un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo de VEGF que el bevacizumab, en el que la presencia del genotipo GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) indica que dicho paciente es menos susceptible a desarrollar hipertensión que un paciente que presenta un genotipo de GA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4), en el que dicho inhibidor de angiogénesis se administra en un paciente con el genotipo GG o AA en el polimorfismo rs4444903 (SEC ID nº 4) identificado como menos susceptible a desarrollar hipertensión según (b).
9. Inhibidor de angiogénesis para la utilización según la reivindicación 8, en el que la terapia comprende además un agente quimioterapéutico o un régimen de quimioterapia.
10. Inhibidor de angiogénesis para la utilización según la reivindicación 9, en el que el agente quimioterapéutico o régimen de quimioterapia comprende uno o más agentes seleccionados de entre el grupo que consiste de taxanos, interferón- α , 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, gemcitabina-erlotinib y agentes quimioterapéuticos basados en el platino.
11. Inhibidor de angiogénesis para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el cáncer es cáncer pancreático, cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de mama o cáncer de pulmón.

12. Inhibidor de angiogénesis para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la muestra es una muestra de sangre.
 13. Inhibidor de angiogénesis para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que el genotipo se determina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.
- 5

Figura 1

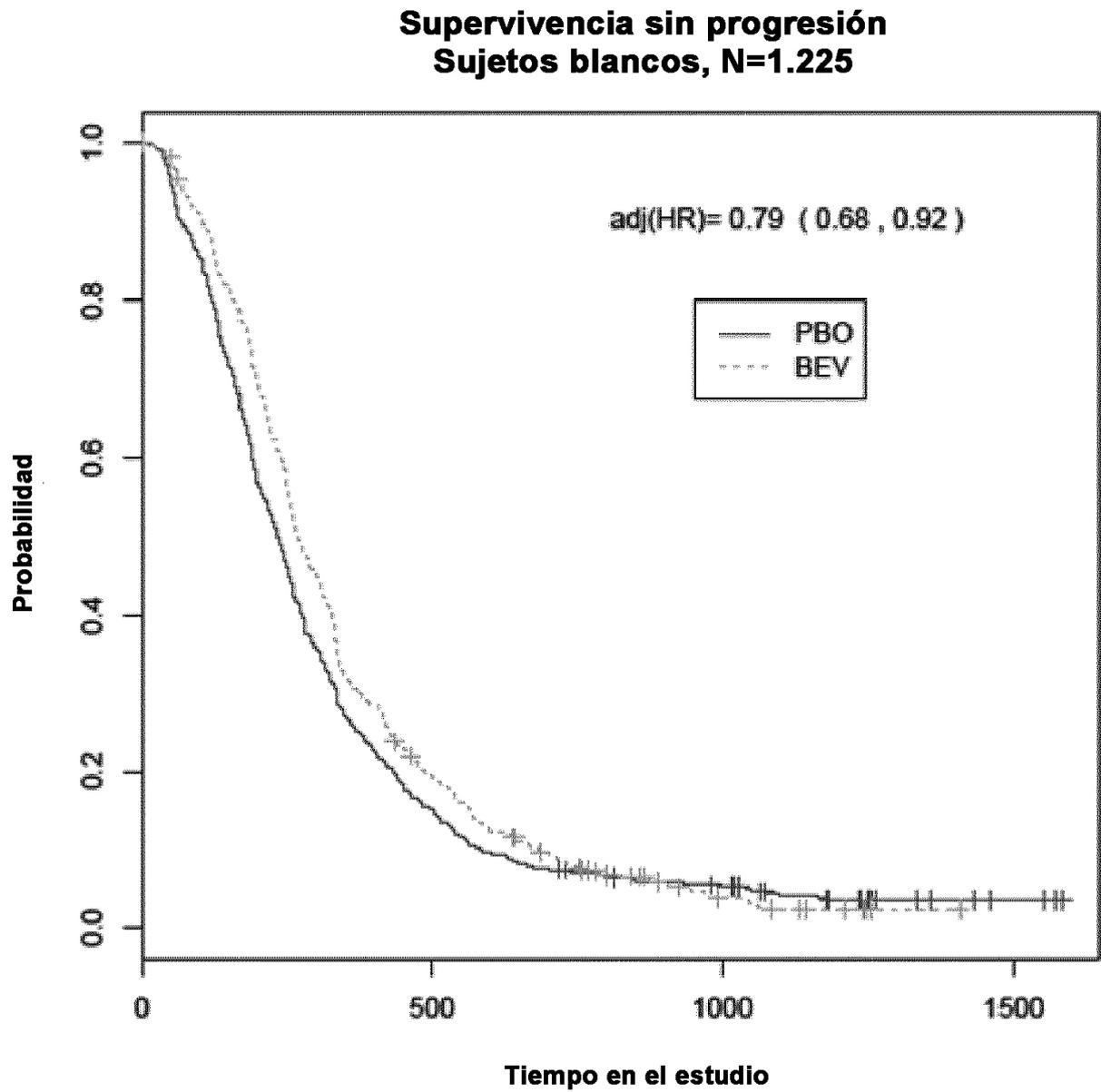


Figura 2

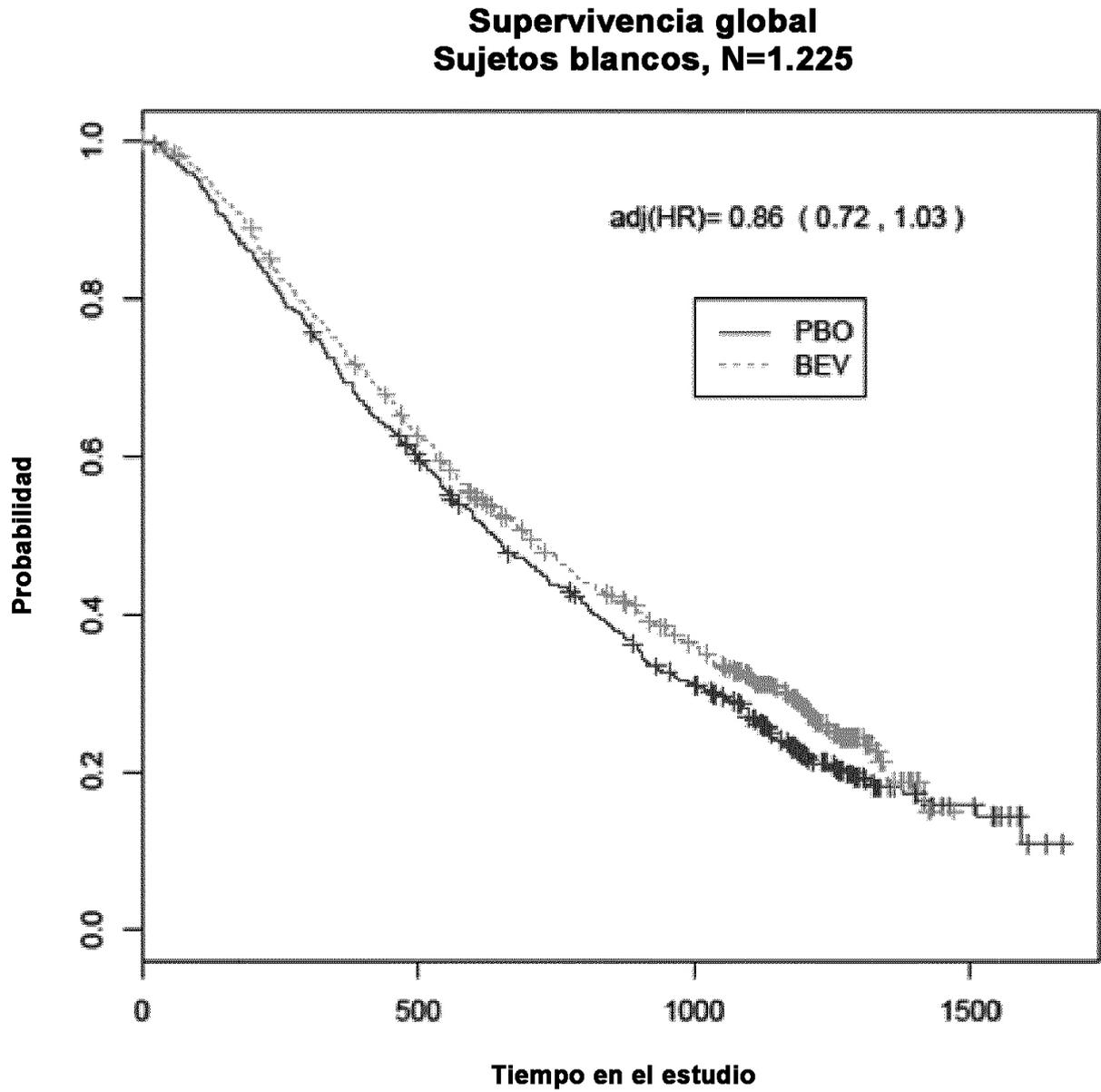


Figura 3

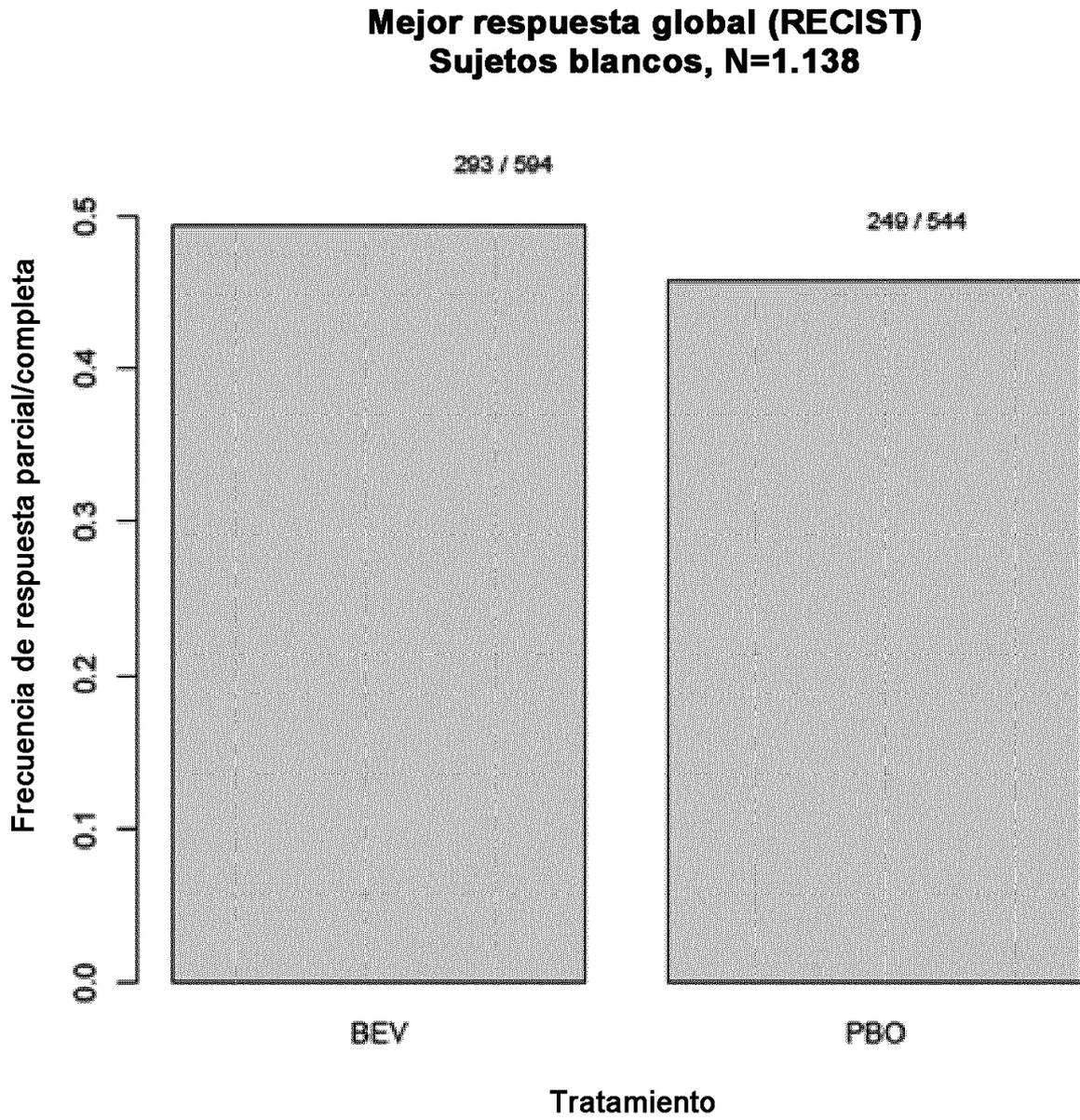


Figura 4

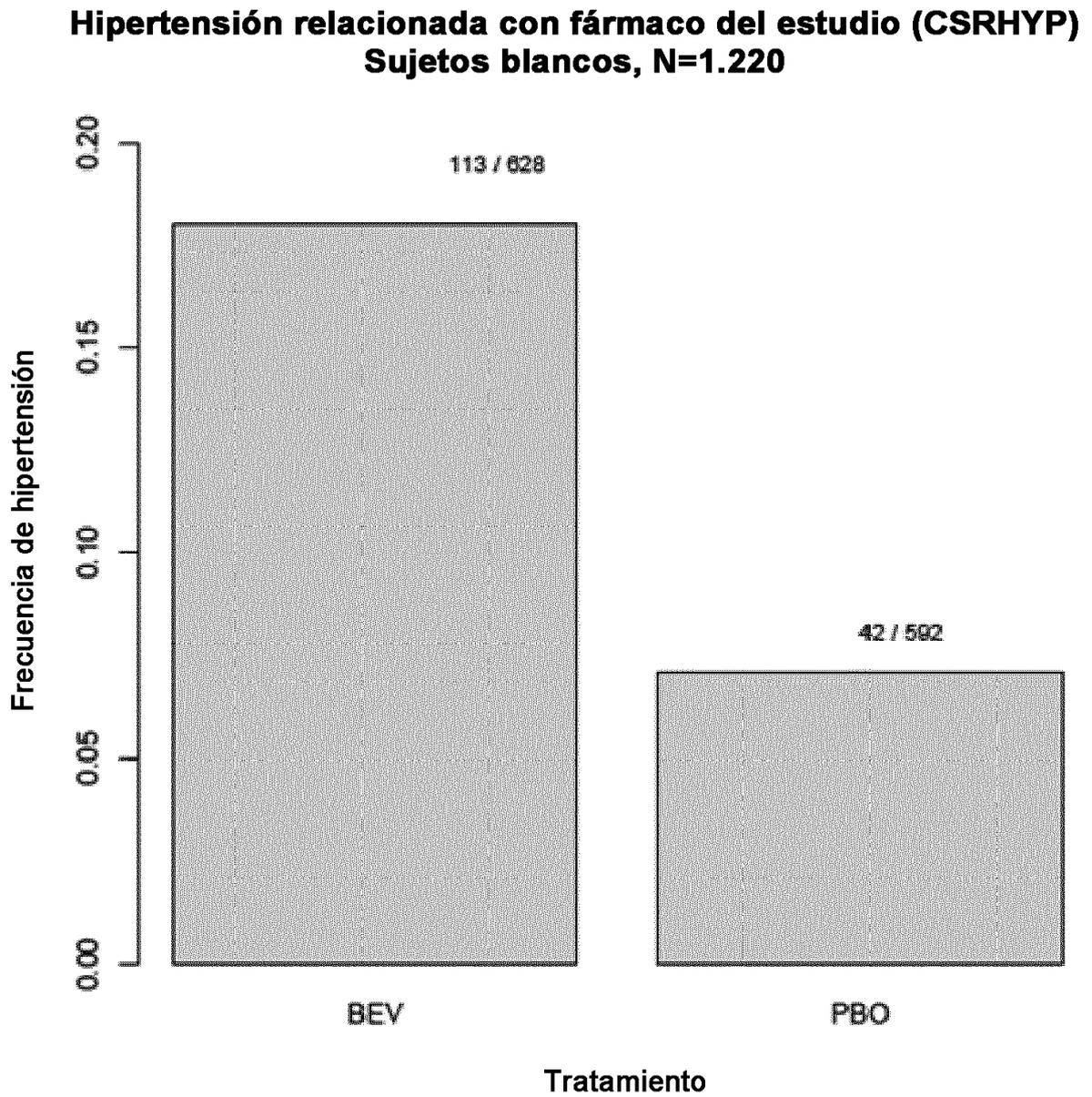


Figura 5

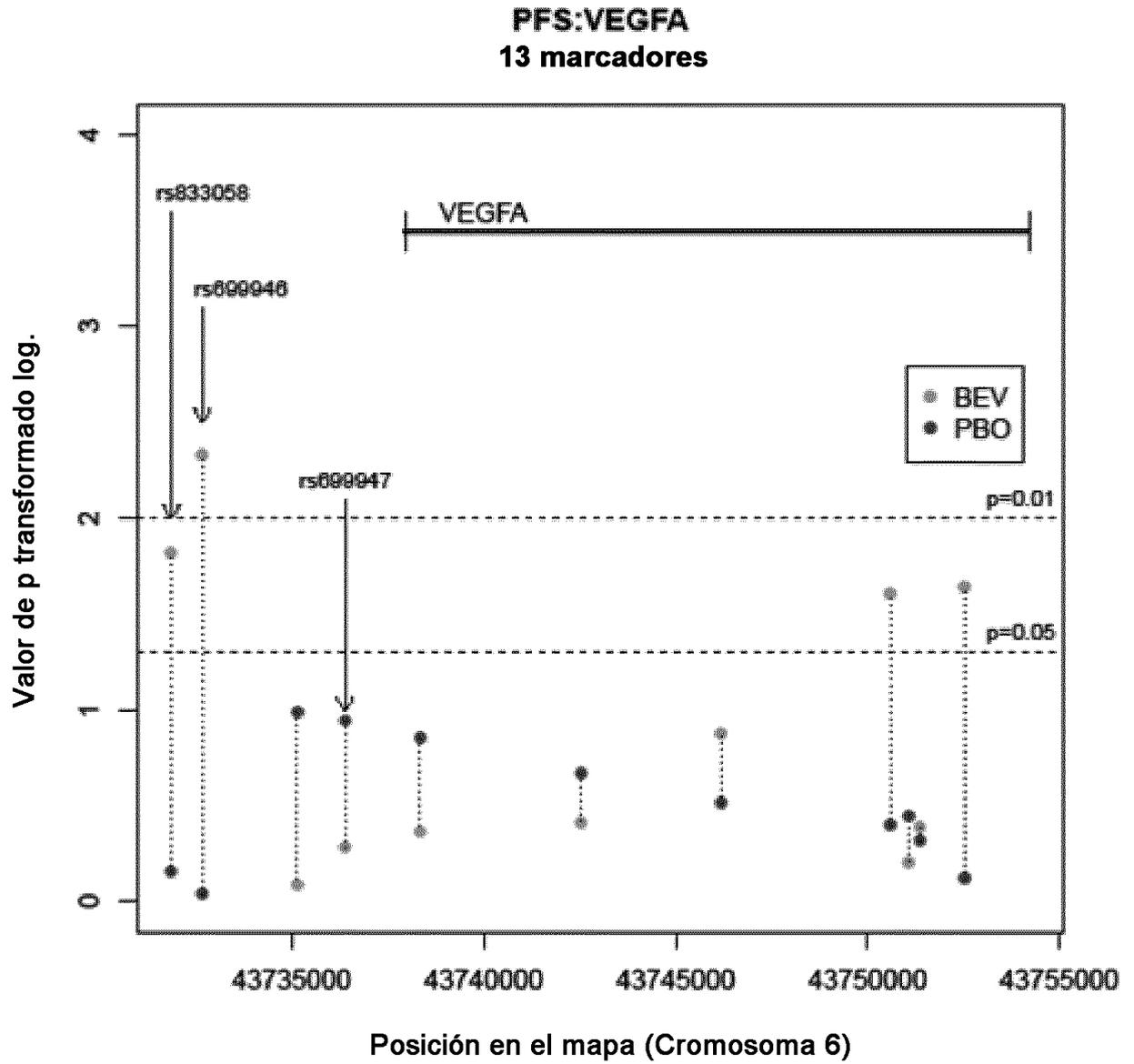


Figura 6

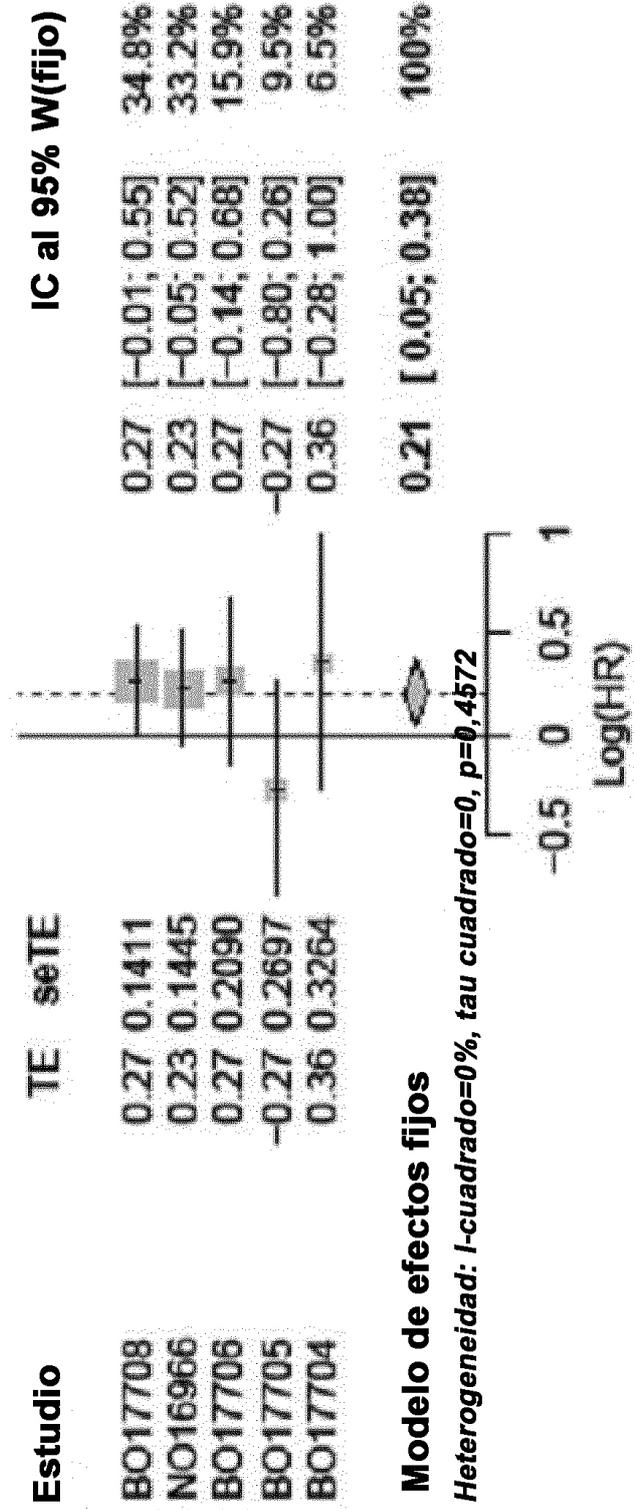


Figura 7

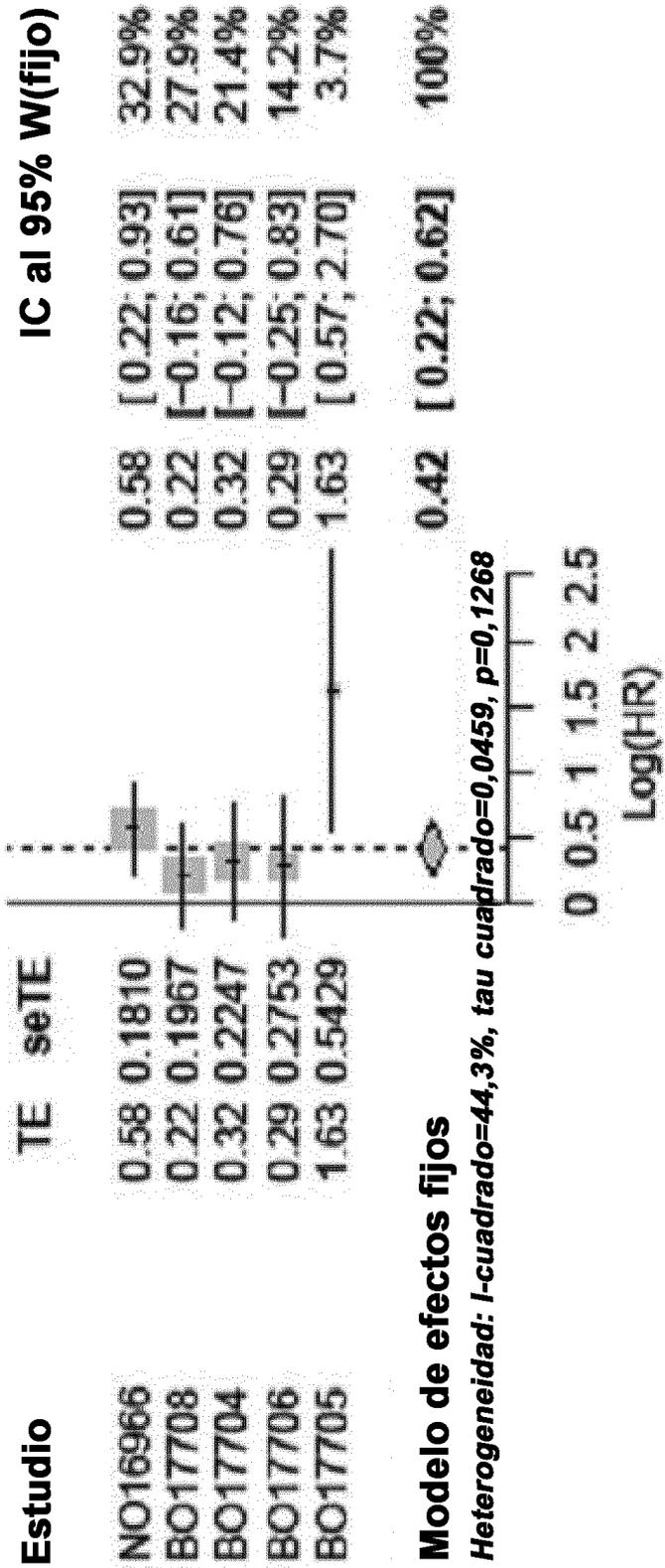


Figura 8

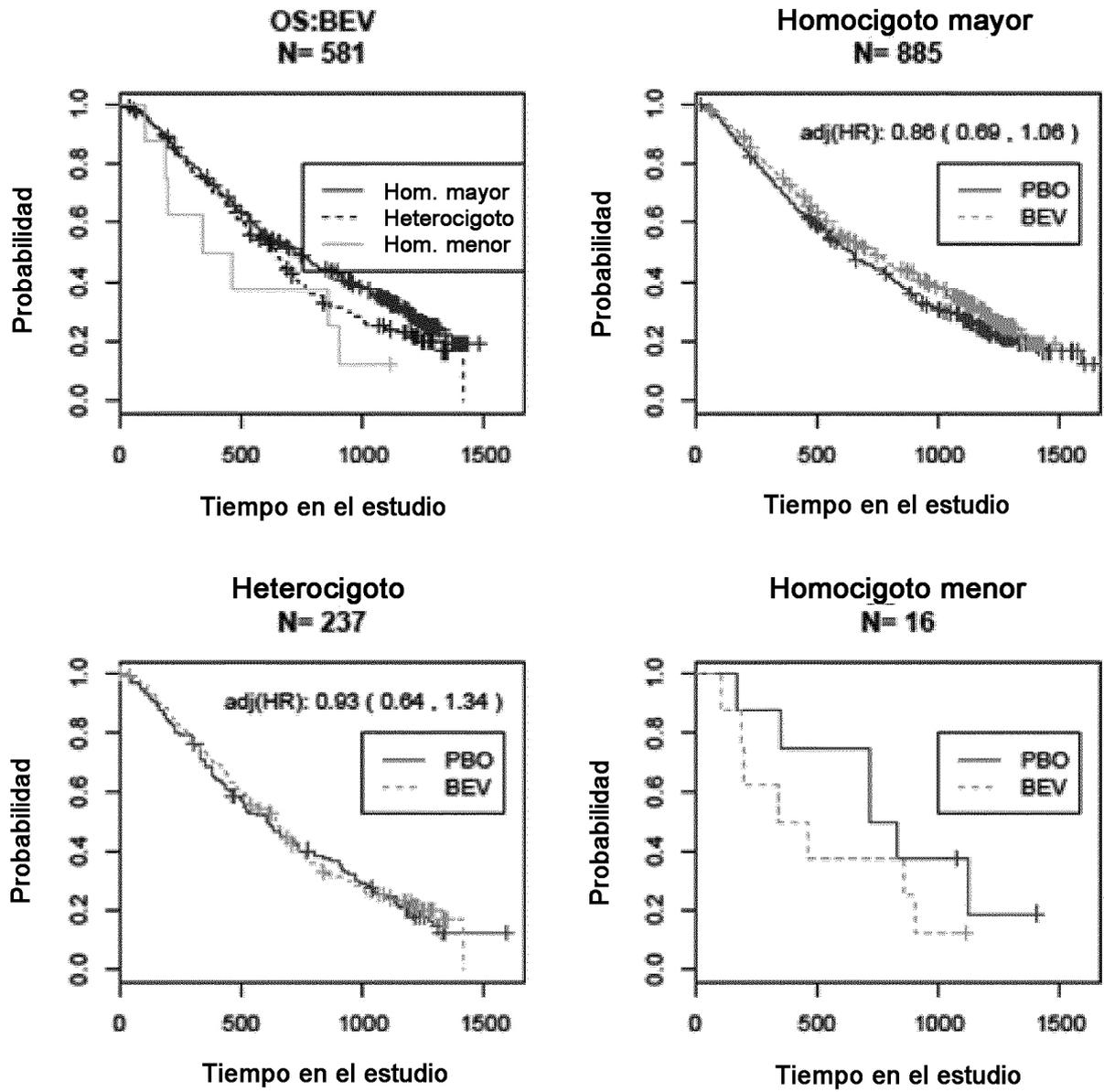


Figura 9

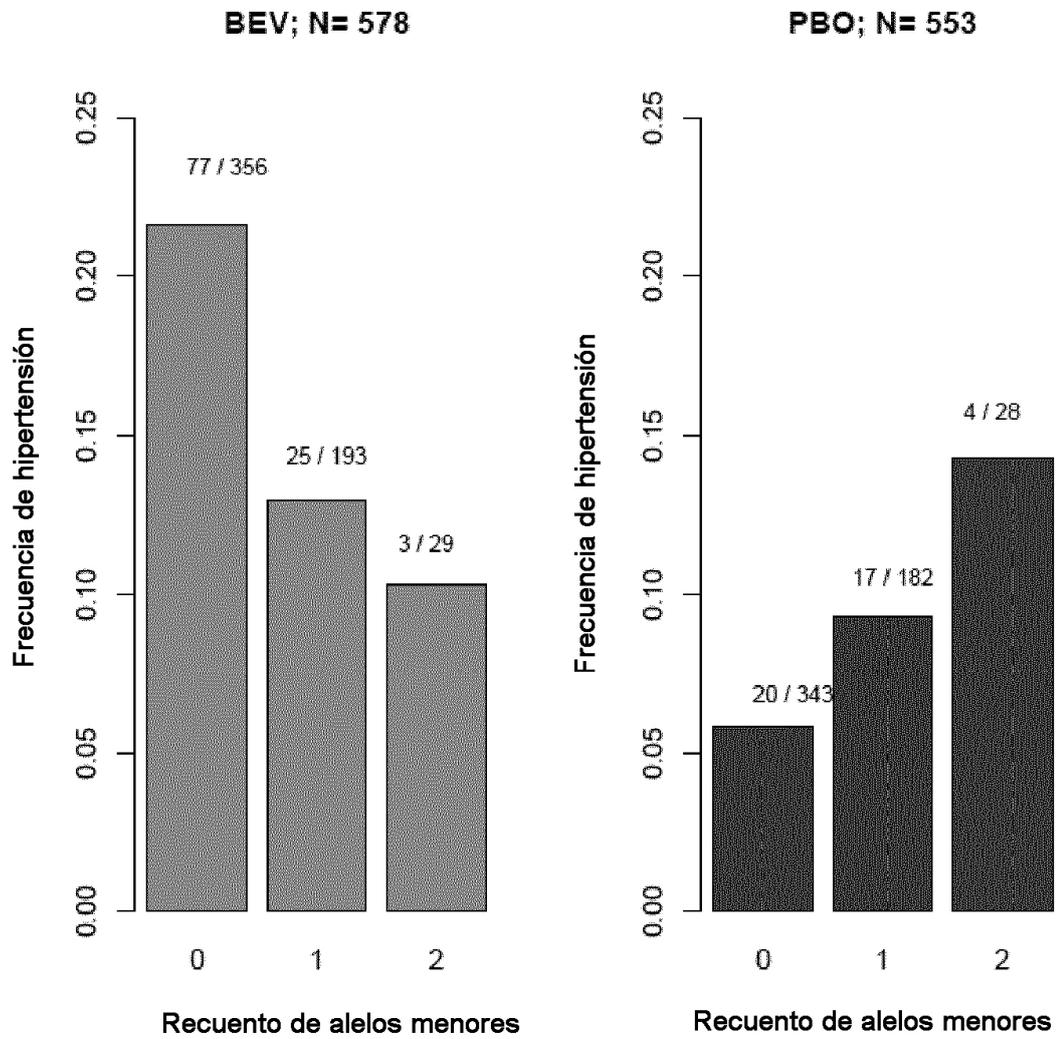


Figura 10

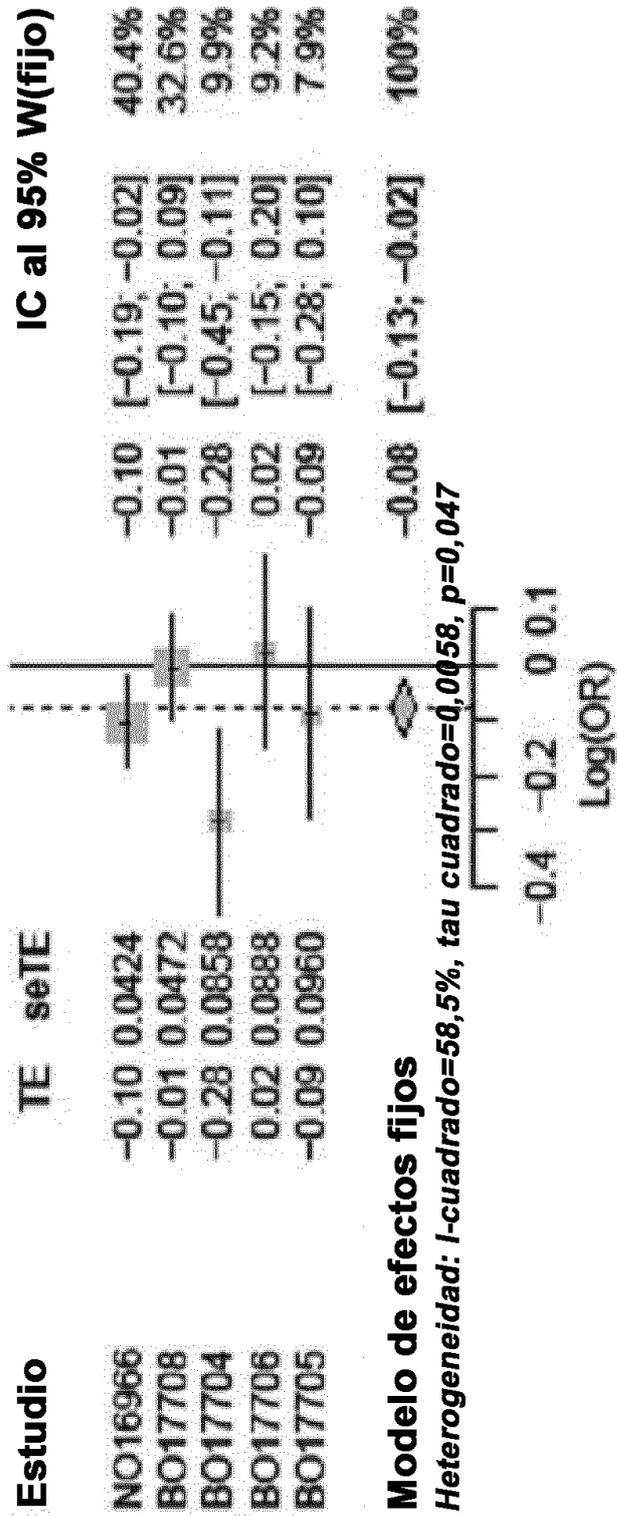


Figura 11

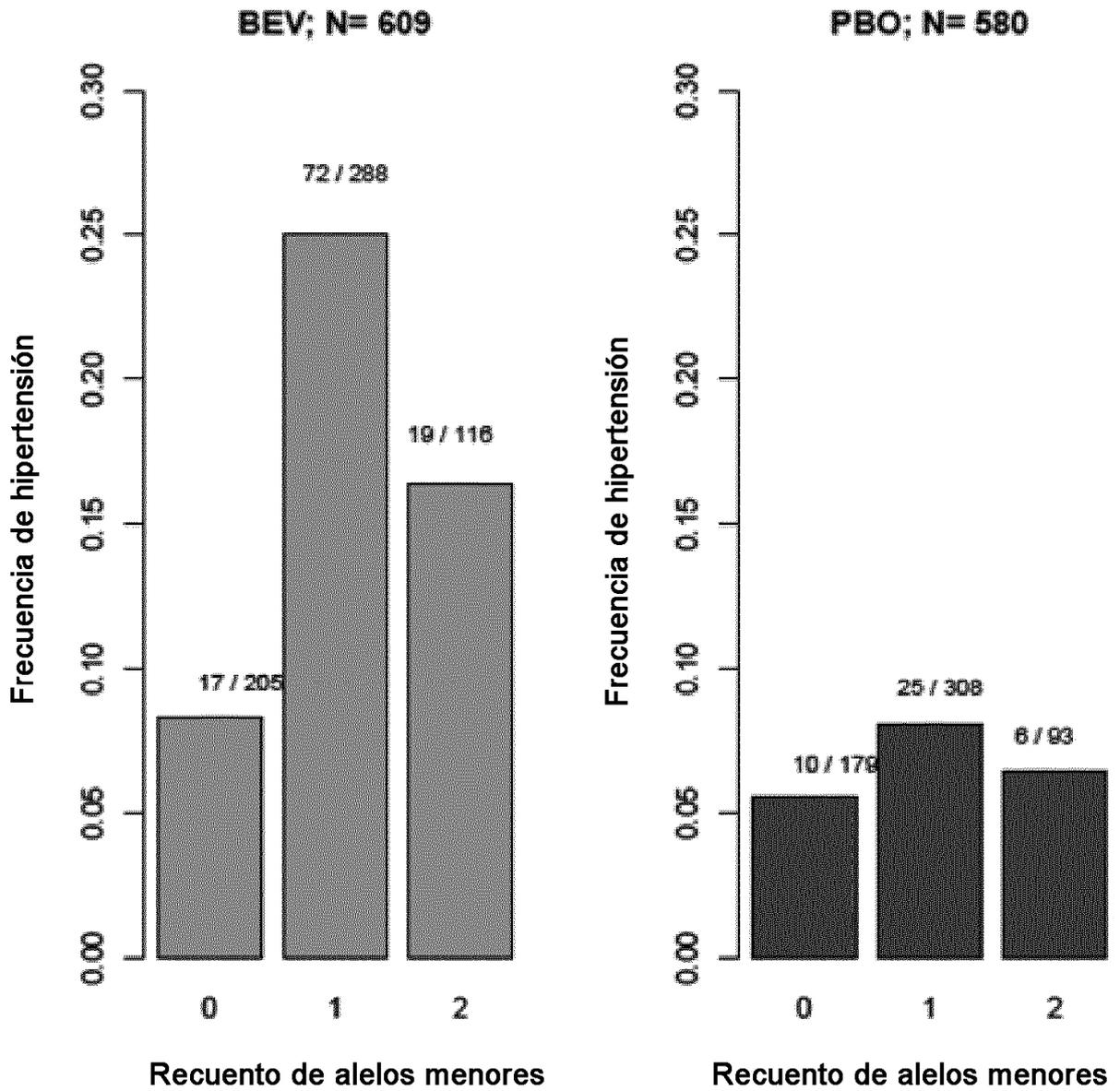


Figura 12

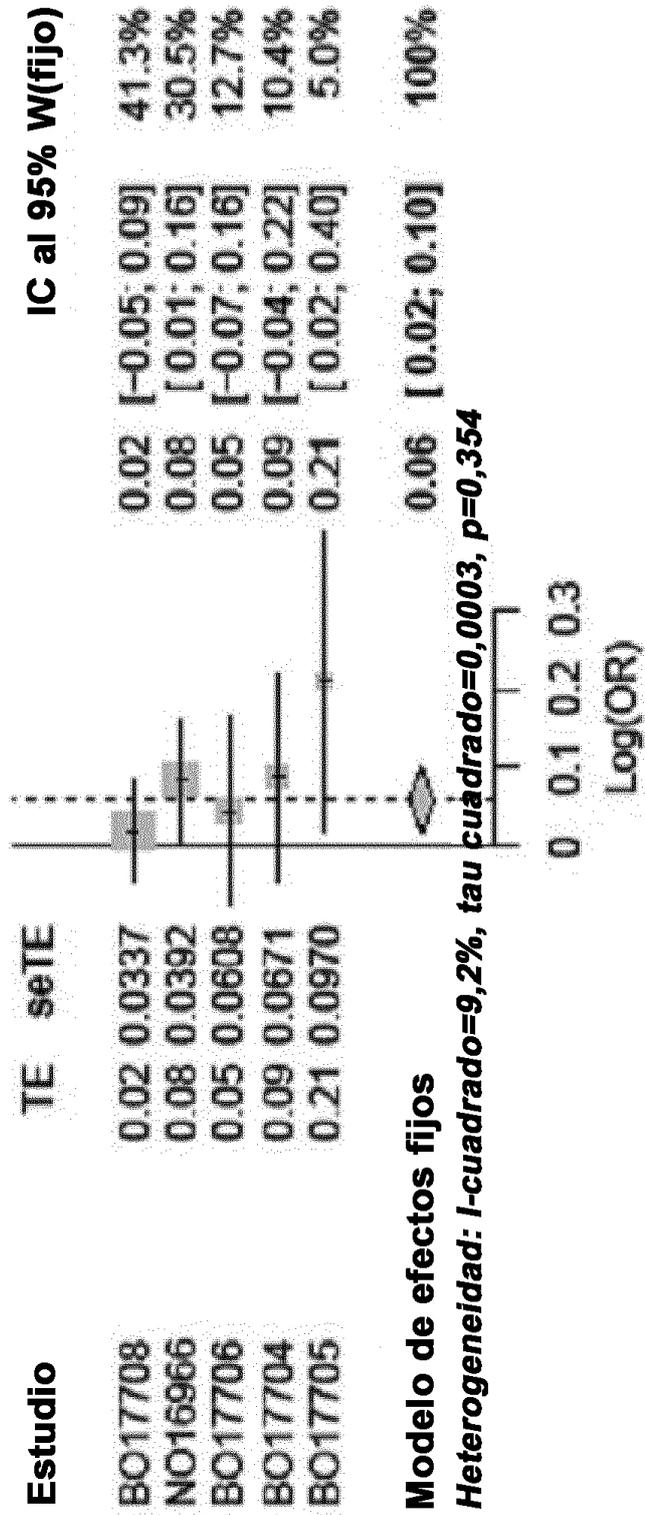


Figura 13

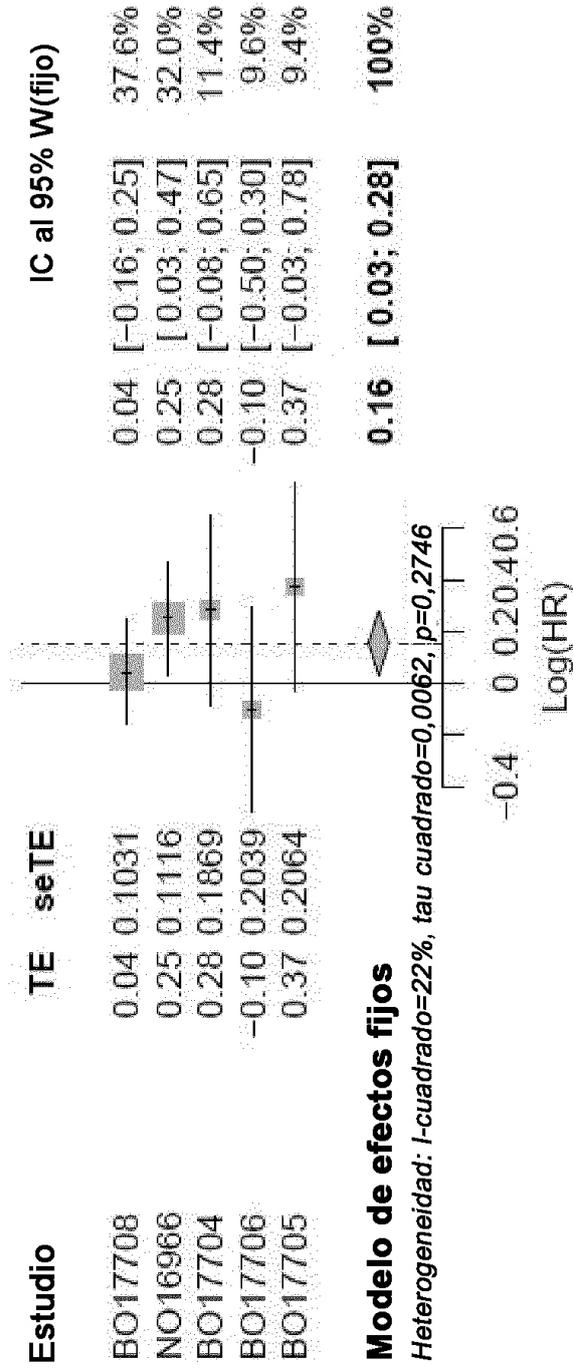


Figura 14

	SNP_ID	Alelo diagnóstico raro	SECUENCIA
SEC ID nº 1	rs699946	G	AGCTGGACCTACCACTAGTGTGGCTTGTAAATTTCTGACAGAGACA[A/G]ACTGTCCC GGGGGCGGGGAAGGCAGTGTGGAGCTCACCCCTGAGGGAG
SEC ID nº 2	rs12505758	C	CTAATAAGCTTATACATTTGAAAATATGTCAA CATATCTCGATGCAATAC[C/T]TGGCATCATA GATTTGGCAGAGTAAAGGGACCAAAATCTAGACTTTGAGA
SEC ID nº 3	rs2305949	T	TCAGAACCCACATCATAAATCCTATACCCCTAGAGCAAGTAAATTTGAAAAA[C/T]AGAACATGA GAGAGCAAATAAGCCCTATAACTTTGCACAGATTTATTTTT
SEC ID nº 4	rs4444903	A	GAGGAATCGTATCTCCATATTTCTTTTTCAGCCCCAATCCAAGGGTTGT[A/G]GCTGGAAC TTCCATCAGTTCTTCTTTCTTTCTCTCTAAGCCCTTG
SEC ID nº 5	rs11133360	C	GCTTGAATCTCAGAGAGATAACATTTTCA CATTGCTATGCCCAACACATC[C/T]CATCAAGCA TTCTCAGAGTCTTCATAAATAGTCAGTCAAAGTGAAGAAAAG