

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 590**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2011 PCT/EP2011/062232**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO2012010552**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2011 E 11746191 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2596363**

54 Título: **Biomarcadores de plasma sanguíneo para terapias de combinación con bevacizumab para el tratamiento de cáncer de mama**

30 Prioridad:

19.07.2010 EP 10170008

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

26.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DE HAAS, SANNE LYSBET;
DELMAR, PAUL;
FOERNZLER, DOROTHEE;
KLAUSE, URSULA y
SCHERER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 619 590 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

Biomarcadores de plasma sanguíneo para terapias de combinación con bevacizumab para el tratamiento de cáncer de mama

5 La presente invención proporciona métodos para mejorar el efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de un paciente que padece cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, añadiendo bevacizumab (Avastin®) a un régimen de quimioterapia, determinando el nivel de expresión, en particular el nivel de expresión en plasma sanguíneo de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF con respecto a niveles de control de pacientes diagnosticados con cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. En particular, la presente invención proporciona métodos para mejorar el efecto del tratamiento, en el que dicho efecto es la supervivencia sin progresión del paciente. Adicionalmente, la presente invención proporciona métodos para evaluar la sensibilidad o capacidad de respuesta de un paciente a bevacizumab (Avastin®) en combinación con un régimen de quimioterapia, determinando el nivel de expresión, en particular el nivel de expresión en plasma sanguíneo, de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF con respecto a niveles de control en pacientes diagnosticados con cáncer de mama, en particular, cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico.

20 Por consiguiente, la presente invención se refiere a la identificación y selección de biomarcadores de cáncer de mama, o cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, que se correlacionan con sensibilidad o capacidad de respuesta contra inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo, bevacizumab (Avastin®), en combinación con regímenes quimioterapéuticos, tales como terapia con docetaxel. En este respecto, la invención se refiere al uso de (a) uno o más perfiles de expresión, específicos de plasma sanguíneo, de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF con respecto a controles establecidos en pacientes diagnosticados con cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, para identificar pacientes sensibles o receptivos a la adición de inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo, bevacizumab (Avastin®), frente a quimioterapias convencionales. Adicionalmente la invención se refiere a métodos para mejorar el efecto del tratamiento, en particular, la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, añadiendo inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo, bevacizumab (Avastin®), frente a quimioterapias convencionales, por ejemplo, terapia con docetaxel, determinando (a) uno o más niveles de expresión específicos de plasma sanguíneo de uno o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a uno o más controles, en pacientes diagnosticados con cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. Adicionalmente la invención proporciona kits y composiciones para la identificación de pacientes sensibles o receptivos a inhibidores de la angiogénesis, en particular, bevacizumab (Avastin®), determinada y definida de acuerdo con los métodos de la presente invención.

40 La angiogénesis es necesaria para el desarrollo del cáncer, regulando no solo el tamaño del tumor primario y el crecimiento sino también influyendo sobre el potencial invasivo y metastásico. Por consiguiente, los mecanismos que actúan como mediadores en los procesos angiogénicos se han investigado como posibles dianas para las terapias anticancerosas dirigidas. Al principio, en el estudio de los moduladores angiogénicos, se descubrió que la vía de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) regulaba preferentemente la actividad angiogénica en múltiples tipos de cáncer. Este factor señala a través del Receptor 2 del VEGF (VEGFR-2), el receptor de señalización de VEGF principal que actúa como mediador haciendo que brote la angiogénesis. Se han desarrollado agentes terapéuticos múltiples para modular esta ruta en varios puntos. Estas terapias incluyen, entre otras, bevacizumab, sunitinib, sorafenib y vatalanib. Aunque en el entorno clínico el uso de inhibidores angiogénicos ha demostrado tener éxito, no todos los pacientes responden o no responden plenamente a la terapia con inhibidores de la angiogénesis. Se desconoce el mecanismo o mecanismos causantes de dicha respuesta incompleta. Por lo tanto hay una creciente necesidad de identificación de subgrupos de pacientes sensibles o receptivos a terapia antiangiogénica para el cáncer. Yang *et al.* (Yang *et al.*, 2008, Clinical Cancer Research, 14: 5893-5899) hacen referencia a un examen de marcadores angiogénicos/tumorales, por ejemplo, VEGF-A tumoral, en muestras de biopsias tumorales mediante inmunohistoquímica y perfiles de expresión génica. Además el documento WO 2008/088854 A2 hace referencia a métodos para determinar la probabilidad del éxito del tratamiento de pacientes que padecen cáncer colorrectal.

55 Aunque se conocen diversos inhibidores de la angiogénesis, el inhibidor más destacado de la misma es bevacizumab (Avastin®). Bevacizumab es un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado recombinante que se une y bloquea específicamente los efectos biológicos del VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular). El VEGF es un impulsor clave de la angiogénesis tumoral - un proceso esencial necesario para el crecimiento tumoral y la metástasis, es decir, la propagación del tumor a otras partes del cuerpo. Avastin® está aprobado en Europa para el tratamiento de los estadios avanzados de cuatro tipos comunes de cáncer, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) y cáncer de riñón, que en conjunto, causan más de 2,5 millones de muertes cada año. En los Estados Unidos, Avastin® fue la primera terapia antiangiogénesis aprobada por la FDA, y ahora está aprobado para el tratamiento de cinco tipos de tumores: cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, de cerebro (glioblastoma) y de riñón (carcinoma de células renales). Hasta ahora, más de medio millón de pacientes se han tratado con Avastin, y un exhaustivo programa clínico con más de 450 ensayos

clínicos está investigando el uso adicional de Avastin en el tratamiento de varios tipos de cáncer (incluyendo el cáncer colorrectal, de mama, de pulmón no microcítico, de cerebro, gástrico, de ovario y de próstata) en diferentes situaciones (por ejemplo, enfermedad en fase avanzada o temprana). Es importante destacar, que Avastin® ha demostrado ser prometedor como un agente co-terapéutico, demostrando eficacia cuando se combina con una amplia gama de quimioterapias y otros tratamientos contra el cáncer. Se han publicado estudios en Fase III que demuestran los efectos beneficiosos de combinar bevacizumab con regímenes quimioterapéuticos convencionales (véase, por ejemplo, Saltz *et al.*, 2008, J. Clin. Oncol., 26: 2013-2019, Yang *et al.*, Clin. Cancer Res., 14: 5893-5899, Hurwitz *et al.*, 2004, N. Engl. J. Med., 350: 2335-2342). Sin embargo, al igual que en estudios previos de inhibidores angiogénicos, algunos de estos estudios en Fase III han demostrado que una parte de los pacientes experimentan una respuesta incompleta a la adición de bevacizumab (Avastin®) a sus regímenes quimioterapéuticos.

Por consiguiente, hay una necesidad de métodos de determinación de aquellos pacientes que responden o que posiblemente responden a terapias de combinación que comprenden inhibidores de la angiogénesis, en particular, bevacizumab (Avastin®). Por lo tanto el problema técnico fundamental de la presente invención es ofrecer métodos y medios para la identificación de uno o más pacientes que padecen o que son propensos a padecer cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, que puedan beneficiarse de la adición de inhibidores de la angiogénesis, en particular, bevacizumab (Avastin®), a las terapias quimioterapéuticas, por ejemplo, terapia con docetaxel.

El problema técnico se resuelve ofreciendo las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona un método *in vitro* para la identificación de un paciente receptivo o sensible a la adición de tratamiento con bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 o VEGFA y PLGF en una muestra de plasma sanguíneo de un paciente que se sospecha que padece o que es propenso a padecer cáncer de mama, mediante el cual un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF con respecto a niveles de expresión combinada de control en pacientes que padecen cáncer de mama es indicativo de una sensibilidad del paciente a la adición de bevacizumab a dicho régimen de quimioterapia.

En el presente documento también se describe un método para mejorar el efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de un paciente que padece cáncer de mama, añadiendo bevacizumab a dicho régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) determinar el nivel de expresión de una o más de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF en una muestra del paciente; y
- (b) administrar bevacizumab, en combinación con el régimen de quimioterapia, al paciente que tiene un nivel de expresión aumentado de una o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a niveles de expresión de control determinados en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

También se describe un método para mejorar el efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de un paciente que padece cáncer de mama, añadiendo bevacizumab al régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) obtener una muestra de dicho paciente;
- (b) determinar el nivel de expresión de una o más de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF; y
- (c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tenga un nivel de expresión aumentado de una o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a niveles de expresión de control determinados en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

Adicionalmente se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) determinar el nivel de expresión de una o más de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF en una muestra del paciente; y
- (b) administrar bevacizumab, en combinación con el régimen de quimioterapia, al paciente que tiene un nivel de expresión aumentado de una o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a niveles de expresión de control determinados en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

También se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) obtener una muestra de dicho paciente;
- (b) determinar el nivel de expresión de una o más de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF; y
- (c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión aumentado de una o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a los niveles de expresión de control determinados en los pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

Adicionalmente se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 5 (a) determinar el nivel de expresión de una o más de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF en una muestra del paciente; y
(b) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión de una o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a niveles de expresión de control determinados en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama, en el que el régimen de quimioterapia comprende terapia con docetaxel.

En el presente documento también se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 15 (a) obtener una muestra de dicho paciente;
(b) determinar el nivel de expresión de una o más proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF; y
(c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión aumentado de una o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a niveles de expresión de control determinados en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

en el que el régimen de quimioterapia comprende terapia con docetaxel.

En el presente documento también se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 25 (a) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA o VEGFR2 en una muestra de paciente; y
(b) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión aumentado de VEGFA o VEGFR2 con respecto a niveles de expresión de control determinados en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 35 (a) obtener una muestra de dicho paciente;
(b) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA o VEGFR2; y
(c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión aumentado de VEGFA o VEGFR2 con respecto a niveles de expresión de control determinados en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

En el presente documento también se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 45 (a) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA o VEGFR2 en una muestra de paciente; y
(b) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión aumentado de VEGFA o VEGFR2 con respecto a niveles de expresión de control determinados en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

en el que el régimen de quimioterapia comprende tratamiento con docetaxel.

En el presente documento también se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 55 (a) obtener una muestra de dicho paciente;
(b) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA o VEGFR2; y
(c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión aumentado de una o más de VEGFA o VEGFR2 con respecto a niveles de expresión de control determinados en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

en el que el régimen de quimioterapia comprende terapia con docetaxel.

65

Adicionalmente en el presente documento se describe un método para mejorar el efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de un paciente que padece cáncer de mama, añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 5 (a) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF en una muestra del paciente; y
(b) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a un nivel de expresión de control combinado determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

10 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender la terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

En el presente documento también se describe un método para mejorar el efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de un paciente que padece cáncer de mama añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 15 (a) obtener una muestra de dicho paciente;
(b) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF; y
20 (c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

25 Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 30 (a) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF en una muestra de paciente; y
(b) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

35 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

En el presente documento también se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 40 (a) obtener una muestra de dicho paciente;
(b) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF; y
45 (c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

El cáncer de mama puede ser un cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

50 Adicionalmente en el presente documento se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 55 (a) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF en una muestra del paciente; y
(b) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

60 en el que el régimen de quimioterapia comprende terapia con docetaxel.

En el presente documento también se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

65

- (a) obtener una muestra de dicho paciente;
- (b) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y PLGF; y
- (c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer,

en el que el régimen de quimioterapia comprende terapia con docetaxel.

Adicionalmente en el presente documento se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 en una muestra del paciente; y
- (b) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinado de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis alta o baja de bevacizumab. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 fue particularmente predictivo en pacientes a los que se administró bevacizumab a dosis baja.

En el presente documento también se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) obtener una muestra de dicho paciente;
- (b) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2; y
- (c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama.

El régimen de quimioterapia puede comprender la terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis del bevacizumab administrada puede ser una dosis alta o baja de bevacizumab. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 fue particularmente predictivo en pacientes a los que se administró bevacizumab a dosis baja.

En el presente documento también se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 en una muestra de paciente; y
- (b) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

en el que el régimen de quimioterapia comprende terapia con docetaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis alta o baja de bevacizumab. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 fue particularmente predictivo en pacientes a los que se administró bevacizumab a dosis baja.

Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) obtener una muestra de dicho paciente;
- (b) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2; y
- (c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

en el que el régimen de quimioterapia comprende terapia con docetaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis alta o baja de bevacizumab. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 fue particularmente predictivo en pacientes a los que se administró bevacizumab a dosis baja.

Adicionalmente en el presente documento se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- 5 (a) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y PLGF en una muestra del paciente; y
(b) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

10 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis del bevacizumab administrada puede ser una dosis alta o baja de bevacizumab.

15 En el presente documento también se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) obtener una muestra de dicho paciente;
20 (b) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y PLGF; y
(c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

25 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis del bevacizumab administrada puede ser una dosis alta o baja de bevacizumab.

30 Adicionalmente en el presente documento se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y PLGF en una muestra de paciente; y
35 (b) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

en el que el régimen de quimioterapia comprende terapia con docetaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis alta o baja de bevacizumab

40 Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método:

- (a) obtener una muestra de dicho paciente;
45 (b) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y PLGF; y
(c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

50 en el que el régimen de quimioterapia comprende terapia con docetaxel. La dosis del bevacizumab administrada puede ser una dosis alta o baja de bevacizumab.

La presente invención proporciona un método *in vitro* para la identificación de un paciente receptivo o sensible a la adición de tratamiento con bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF en una muestra de plasma sanguíneo de un paciente que padece, se sospecha que padece o que es propenso a padecer cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, mediante el cual un nivel de expresión aumentado de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF con respecto a niveles de expresión combinada de control determinados en pacientes que padecen cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico es indicativo de una sensibilidad del paciente a la adición de bevacizumab a dicho régimen de quimioterapia. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

65 Por consiguiente, el método *in vitro* para la identificación de un paciente receptivo o sensible a la adición de tratamiento con bevacizumab a un régimen de quimioterapia, como se describe en el presente documento, comprende:

(a) obtener una muestra de plasma sanguíneo de un paciente que padece, se sospecha que padece o que es propenso a padecer cáncer de mama, cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico; y

(b) determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 o VEGFA y PLGF;

mediante el cual un nivel de expresión aumentado de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF con respecto a los niveles de expresión de control determinados en pacientes que padecen de cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico es indicativo de una sensibilidad del paciente a la adición de bevacizumab a dicho régimen de quimioterapia. El régimen de quimioterapia puede comprender la terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

La presente invención proporciona un método *in vitro* para la identificación de un paciente receptivo o sensible a la adición de tratamiento con bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 en una muestra de plasma sanguíneo de un paciente que padece, o se sospecha que padece o que es propenso a padecer, cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, por lo que un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA Y VEGFR2 con respecto a los niveles de expresión combinada de control determinados en pacientes que padecen cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico es indicativo de una sensibilidad del paciente a la adición de bevacizumab a dicho régimen de quimioterapia. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

La presente invención proporciona un método *in vitro* para la identificación de un paciente receptivo o sensible a la adición de tratamiento con bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y PLGF en una muestra de plasma sanguíneo de un paciente que padece, se sospecha que padece o es propenso a padecer, cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, mediante el cual un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a niveles combinados de control determinados en pacientes que padecen cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico es indicativo de una sensibilidad del paciente a la adición de bevacizumab a dicho régimen de quimioterapia. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

Por consiguiente, la presente invención resuelve el problema técnico identificado ya que, sorprendentemente, se descubrió que los niveles de expresión específicos en plasma sanguíneo de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF en un paciente determinado, con respecto a niveles de control determinados en pacientes diagnosticados con cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastático, se correlaciona con el efecto del tratamiento en los pacientes a los que se administra un inhibidor de la angiogénesis en combinación con un régimen de quimioterapia. Específicamente, las variaciones en los niveles de expresión de las proteínas de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF fueron identificados, sorprendentemente, como marcadores/indicadores de la supervivencia sin progresión aumentada de pacientes con cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastático en respuesta a la adición de bevacizumab (Avastin®) al régimen de quimioterapia de la terapia con docetaxel. Se identificaron pacientes que mostraban una respuesta o sensibilidad a la adición de bevacizumab (Avastin®) a los regímenes de quimioterapia, que tenían un nivel de expresión de proteínas de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF aumentado con respecto a los niveles de expresión de control establecidos en muestras obtenidas de pacientes diagnosticados con cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastático. Los términos "marcador" e "indicador" se pueden utilizar indistintamente y se refieren a los niveles de expresión de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF como se describe en el presente documento.

La invención también incluye el uso de los términos "marcador" e "indicador" para referirse a una combinación de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF.

En el contexto de la presente invención, "VEGFA" se refiere a la proteína A del factor de crecimiento endotelial vascular, ilustrada por la SEQ ID NO: 1, mostrada en la Figura 8 (Número de Registro de Swiss Prot P15692, Gene ID (NCBI): 7422). El término "VEGFA" incluye la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 así como sus homólogos e isoformas. El término "VEGFA" también incluye las isoformas conocidas, por ejemplo, isoformas de corte y empalme, de VEGFA, por ejemplo VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆, así como sus variantes, homólogos e isoformas, incluyendo el factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 110 aminoácidos generado por escisión con plasmina de VEGF₁₆₅ como se describe en Ferrara Mol. Biol. Cell 21: 687 (2010), en Leung *et al.* Science 246: 1306 (1989) y en Houck *et al.* Mol. Endocrin. 5: 1806 (1991). En una realización particular de la presente invención, "VEGFA" se refiere a VEGF₁₂₁ y/o a VEGF₁₁₀. En una realización particular de la presente invención, "VEGFA" se refiere a VEGF₁₁₁. En el contexto de la invención, el término "VEGFA" también incluye proteínas que tienen una homología de al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o con las secuencias de aminoácidos de las variantes y/u homólogos de las mismas, así como con fragmentos de las secuencias, siempre que las proteínas variantes (incluyendo isoformas), proteínas homólogas y/o fragmentos sean reconocidos por uno o más anticuerpos específicos de VEGFA, tal como los clones de anticuerpo 3C5 y 26503, que están disponibles en Bender RELIATech

y R&D Systems, respectivamente y A4.6.1 como se describe en Kim *et al.*, Growth Factors 7 (1): 53-64 (1992). En el contexto de la invención, el término "isoforma" de VEGF o VEGF-A se refiere tanto a isoformas de corte y empalme como a formas generadas por escisión enzimática (por ejemplo, plasmina).

- 5 En una realización, "VEGFA" se refiere a VEGF no modificado. En el contexto de la presente invención, VEGF "no modificado" se refiere a la secuencia de aminoácidos no modificada de VEGF, a sus isoformas y a sus productos de escisión. El VEGF no modificado puede producirse, por ejemplo, sintéticamente o, preferentemente, de manera recombinante en sistemas de expresión procariotas, por ejemplo, en *E. coli*. El VEGF no modificado no lleva, por ejemplo, una modificación postraduccional, como una glucosilación. En el contexto de la invención, la expresión
- 10 "VEGF-A no modificado" también incluye sus variantes y/u homólogos, así como fragmentos de VEGF-A, a condición de que las proteínas variantes (incluyendo isoformas), proteínas y/o fragmentos sean reconocidos por anticuerpos específicos de VEGF-A no modificado, tal como el clon de anticuerpo 3C5, que está disponible en RELIA Tech GmbH, Wolfenbüttel, Alemania.
- 15 En el contexto de la presente invención, "VEGFR2" se refiere al receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular, ilustrado por SEQ ID NO: 2, mostrado en la Figura 9 (Número de Registro de Swiss Prot P35968, Gene ID (NCBI): 3791). El término "VEGFR2" incluye la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 así como sus homólogos e isoformas. En el contexto de la invención, el término "VEGFR2" también incluye proteínas que tienen una homología de al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos de
- 20 SEQ ID NO: 2, o con las secuencias de aminoácidos de sus variantes y/u homólogos, así como con fragmentos de las secuencias, siempre que las proteínas variantes (incluyendo las isoformas), las proteínas homólogas y/o los fragmentos sean reconocidos por uno o más anticuerpos específicos de VEGFR2, tal como los clones de anticuerpo 89115 y 89109, ambos disponibles en R&D Systems.
- 25 En el contexto de la presente invención, "PLGF" se refiere al factor de crecimiento placentario, ilustrado por SEQ ID NO: 3, mostrado en la Figura 10 (Número de Registro de Swiss Prot P49763, Gene ID (NCBI): 5228). El término "PLGF" incluye la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 así como sus homólogos e isoformas. En el contexto de la invención, el término "PLGF" también incluye proteínas que tienen una homología de al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o con las
- 30 secuencias de aminoácidos de sus variantes y/u homólogos, así como con fragmentos de las secuencias, siempre que las proteínas variantes (incluyendo las isoformas), las proteínas homólogas y/o los fragmentos sean reconocidos por uno o más anticuerpos específicos de PLGF, tal como los clones de anticuerpo 2D6D5 y 6A11D2, ambos disponibles en Roche Diagnostics GmbH.
- 35 Por consiguiente, la presente invención incluye la determinación de niveles de expresión de proteínas que incluyen, pero sin limitación, las secuencias de aminoácidos como las descritas en el presente documento. En este contexto, la invención incluye la detección de homólogos, variantes e isoformas de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF; pudiendo dichas isoformas o variantes, entre otras cosas, comprender variantes alélicas o variantes de corte y empalme. También se contempla la detección de proteínas que son homólogas a VEGFA, VEGFR2 y/o PLGF como
- 40 se describe en el presente documento, o a un fragmento de las mismas, que tienen, por ejemplo, al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o con un fragmento de las mismas. Como alternativa o adicionalmente, la presente invención incluye la detección de los niveles de expresión de proteínas codificadas por secuencias de ácido nucleico, o sus fragmentos, que son al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID
- 45 NO: 3 o un fragmento, variante o isoforma de las mismas. En este contexto, el término "variante" significa que la secuencia de aminoácidos de VEGFA, VEGFR2 y/o PLGF, o la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha secuencia de aminoácidos, se diferencia de las secuencias distintas identificadas por las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y/o disponibles con los números de Registro de Swiss Prot anteriormente identificados, por mutaciones, por ejemplo, deleciones, adiciones, sustituciones, inversiones, etc. Además, el término "homólogo" se refiere a moléculas que tienen una identidad de secuencia de al menos 60 %, más preferentemente de al menos 80 % y aún más preferentemente de al menos 90 % con uno o más de los polipéptidos como se muestra en las SEQ
- 50 ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, o con uno o más de sus fragmentos.
- 55 Para determinar si una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos tiene un cierto grado de identidad con una secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos, como se describe en el presente documento, el experto puede usar medios y métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, alineamientos, ya sea manualmente o usando programas informáticos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento.
- 60 De acuerdo con la presente invención, el término "idéntico" o la expresión "porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales, o que tienen el mismo porcentaje de restos de aminoácidos o de nucleótidos especificado (por ejemplo, 60 % o 65 % de identidad, preferentemente, 70-95 % de identidad, más preferentemente al menos 95 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3),
- 65 cuando se comparan y alinean para obtener una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o sobre una región designada, medido usando un algoritmo de comparación de secuencias como se sabe en la

técnica, o por alineamiento manual e inspección visual. Las secuencias que tienen, por ejemplo, una identidad de 60 % a 95 % o mayor, se consideran sustancialmente idénticas. Dicha definición también se aplica al complemento de una secuencia de ensayo. Preferentemente la identidad descrita existe sobre una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 a 25 aminoácidos o nucleótidos, más preferentemente, sobre una región que tiene una longitud de aproximadamente 50 a 100 aminoácidos o nucleótidos. Los expertos en la técnica sabrán como determinar el porcentaje de identidad entre secuencias usando, por ejemplo, algoritmos tales como los basados en el programa informático CLUSTALW (Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) o FASTDB (Brutlag App. Biosci. 6 (1990), 237-245), como se conoce en la técnica.

Aunque normalmente el algoritmo FASTDB no considera en su cálculo deleciones o adiciones no coincidentes internas en las secuencias, es decir, huecos, esto puede corregirse manualmente para evitar una sobreestimación del % de identidad. Sin embargo, en sus cálculos de identidad CLUSTALW tiene en cuenta los huecos de secuencia. Los expertos en esta técnica también disponen de los algoritmos BLAST (por sus siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool, herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales) y BLAST 2.0 (Altschul, 1997, Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402, Altschul, 1993 J. Mol. Ev. 36: 290-300, Altschul, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410). El programa BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3 y una expectativa (E) de 10. La matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff (1989) PNAS 89: 10915) usa alineamientos (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas.

Los algoritmos BLAST, como se ha indicado anteriormente, producen alineaciones de secuencias tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos para determinar la similitud de secuencia. Debido a la naturaleza local de los alineamientos, BLAST es especialmente útil para determinar coincidencias exactas o para identificar secuencias similares. La unidad fundamental del resultado del algoritmo BLAST es el Par de Segmentos de Alta puntuación (HSP, *High-scoring Segment Pair*). Un HSP consta de dos fragmentos de secuencias de longitudes arbitrarias pero iguales cuya alineación es localmente máxima y para los cuales la puntuación del alineamiento alcanza o excede una puntuación umbral o límite establecida por el usuario. La estrategia BLAST es la búsqueda de los HSP entre una secuencia problema y una secuencia de la base de datos, para evaluar el significado estadístico de las coincidencias encontradas, y que informe solo de aquellas coincidencias que cumplan con el umbral o significado seleccionado. El parámetro E establece el umbral estadísticamente significativo para comunicar coincidencias de secuencias de las bases de datos. E se interpreta como el límite superior de la frecuencia de que ocurra una probabilidad esperada de un HSP (o conjunto de HSP) en el contexto de la búsqueda de toda la base de datos. Cualquier secuencia de base de datos cuya coincidencia cumpla E se informa en el resultado del programa.

Para buscar moléculas idénticas o relacionadas en bases de datos de proteínas o de nucleótidos, tales como GenBank o EMBL, Pueden usarse técnicas informáticas similares que usan BLAST. Este análisis es mucho más rápido que las hibridaciones múltiples basadas en membrana. Además, la sensibilidad de la búsqueda informática puede modificarse para determinar si cualquier emparejamiento particular se clasifica como exacto o similar. La base de la búsqueda es la puntuación del producto que se define como:

$$\frac{\% \text{ de identidad de secuencia} \times \% \text{ de puntuación BLAS máxima}}{100}$$

y tiene en cuenta tanto el grado de similitud entre dos secuencias como la longitud del emparejamiento de las mismas. Por ejemplo, con una puntuación del producto de 40, el emparejamiento será exacto dentro de un error de 1-2 %, y con una puntuación de 70, el emparejamiento será exacto. Normalmente, se identifican moléculas similares seleccionando las que muestran puntuaciones del producto entre 15 y 40, aunque puntuaciones más bajas pueden identificar moléculas relacionadas. Otro ejemplo de un programa capaz de generar alineamientos de secuencias es el programa informático CLUSTALW (Thompson, 1994, Nucl. Acids Res. 2: 4673-4680) o FASTDB (Brutlag, 1990, Comp. App. Biosci. 6: 237-245) como se conoce en la técnica.

En el contexto de la invención descrita en el presente documento, los niveles de expresión, en particular niveles de expresión de las proteínas VEGFA, VEGFR2 y/o PLGF, pueden considerarse por separado, como marcadores individuales, o en grupos de dos o más, como un perfil de expresión o un panel de marcadores. En el contexto de la invención descrita en el presente documento, un perfil de expresión o un panel de marcadores en el que los perfiles de expresión de dos o más marcadores pueden considerarse conjuntamente, también pueden denominarse nivel de expresión combinada. Por ejemplo, los niveles de expresión de dos o más marcadores pueden añadirse conjuntamente y compararse con un nivel de expresión combinada de control determinado de manera similar. Por lo tanto, los métodos de la invención incluyen la determinación de un perfil de expresión, incluyendo un nivel de expresión combinada, basado en el nivel de expresión de uno o más de los marcadores.

En el contexto de la invención descrita en el presente documento, y de acuerdo con el ejemplo ilustrativo adjunto, para considerar VEGFA o VEGFR2 por separado, como valores correspondientes de expresión alta o baja del marcador, se utilizaron los siguientes valores: VEGFA valor Alto (≥ 125 pg/ml), VEGFA valor Bajo (<125 pg/ml), VEGFR2 nivel Alto (≥ 11 ng/ml) y VEGFR2 nivel Bajo (<11 ng/ml). Estos niveles se determinaron como la mediana

de la muestra, de acuerdo con un plan de análisis prospectivo. Adicionalmente, los niveles optimizados que constituyen el valor límite entre la expresión alta y baja de un marcador particular, pueden determinarse modificando el límite hasta que el subconjunto de pacientes por encima y por debajo del límite cumpla un criterio de optimización estadístico relevante. Por ejemplo, puede seleccionarse un punto de corte óptimo para maximizar las diferencias en el tratamiento de razón de riesgos entre el subconjunto por encima y por debajo, o para maximizar el efecto del tratamiento en un subgrupo, o cualquier otro criterio estadístico relevante. Sin embargo, el experto entenderá que el nivel de expresión del marcador particular y, por lo tanto, lo que constituye un nivel de expresión alto o bajo, puede variar de un paciente a otro y de una población de pacientes a otra. Por consiguiente, el experto entenderá que cuando se usan métodos de detección distintos de los descritos en el ejemplo ilustrativo adjunto, y que cuando se estudian pacientes y poblaciones de pacientes distintos de los descritos en el ejemplo ilustrativo adjunto, lo que el experto considera un nivel de expresión alto y/o bajo para un biomarcador particular puede variar de los valores que se describen en el presente documento. Teniendo en cuenta los métodos descritos en el presente documento, el experto en la materia puede determinar lo que constituye un nivel de expresión alto y/o bajo de un biomarcador particular.

Como el experto en la materia apreciará, hay muchas maneras de utilizar las mediciones de dos o más marcadores para mejorar la cuestión diagnóstica que se está investigando. En una estrategia bastante sencilla, aunque no obstante a menudo efectiva, se supone que un resultado es positivo si una muestra es positiva para al menos uno de los marcadores investigados.

De acuerdo con la presente invención, se evalúa una combinación de marcadores. Los valores medidos para marcadores de un panel marcador (o un nivel de expresión combinada), por ejemplo, para VEGFA y VEGFR2 o VEGFA y PLGF o VEGFA, VEGFR2 y PLGF, pueden combinarse matemáticamente y el valor combinado puede correlacionarse con la cuestión diagnóstica subyacente. Los valores de los marcadores pueden combinarse mediante cualquier método matemático apropiado de la técnica. Se conocen bien métodos matemáticos adecuados para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad o con un efecto de tratamiento que emplea métodos tales como, análisis discriminante (AD) (es decir, AD lineal, cuadrático, regularizado), métodos Kernel (es decir SVM), Métodos No Paramétricos (es decir Clasificadores de los k Vecinos más Próximos), PLS (Mínimos Cuadrados Parciales), Métodos Basados en Árboles (es decir, Regresión Logística), CART, Métodos de muestreo en bosques al azar, Métodos de Boosting/Bagging), Modelos Lineales Generalizados (es decir, Regresión Logística), Métodos Basados en Componentes Principales (es decir SIMCA), Modelos Aditivos Generalizados, Métodos Basados en Lógica Difusa, Métodos Basados en Redes Neuronales y Algoritmos Genéticos. El experto en la materia no tendrá problemas para seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. El método usado en la correlación de combinaciones de marcadores de acuerdo con la invención desvelada en el presente documento con, por ejemplo, supervivencia global mejorada, supervivencia sin progresión, capacidad de respuesta o sensibilidad a la adición de bevacizumab a agentes quimioterapéuticos/régimen de quimioterapia y/o la predicción de una respuesta o sensibilidad a bevacizumab (en adición a uno o más agentes quimioterapéuticos/régimen quimioterapéutico) se selecciona de AD (Análisis Discriminante Lineal, Cuadrático, Regularizado), Métodos de Kernel (es decir SVM), Métodos No Paramétricos (es decir, Clasificadores de los k Vecinos Más Próximos), PLS (Cuadrados Mínimos Parciales), Métodos Basados en Árboles (es decir, Regresión Logística, CART, Métodos de Bosques al Azar, Métodos de Boosting) o Modelos Lineales Generalizados (es decir, Regresión Logística). Los detalles relativos a estos métodos estadísticos se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I., *et al*, J. of Computational and Graphical Statistics, 12 (2003) 475-511; Friedman, J. H., J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175; Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001; Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A., Stone, C. J. (1984) Classification and regression trees, California: Wadsworth; Breiman, L., Random Forests, Machine Learning, 45 (2001) 5-32; Pepe, M. S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28 (2003); y Duda, R. O., Hart, P. E., Stork, D. G., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2ª Edición (2001).

Por consiguiente, la invención descrita en el presente documento se refiere al uso de un límite multivariado optimizado de la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo, pacientes receptivos o sensibles a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de pacientes que son poco receptivos a la terapia de adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes, sino que forman un panel de marcadores o un nivel de expresión combinada.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para mejorar el efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de pacientes que padecen cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, determinando los niveles de expresión de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA, añadiendo estos niveles de expresión de manera que cada nivel de expresión se multiplica con una función ponderada (o factor de ponderación). Sorprendentemente, el resultado ("valor", resultante de la operación matemática, o nivel de expresión combinada) se correlaciona con el efecto del tratamiento en pacientes a los que se administra bevacizumab en combinación con regímenes de quimioterapia, de tal manera que los valores por encima de un límite previamente especificado (multivariante) son indicativos de un mejor efecto del tratamiento para el paciente y los valores por debajo de este límite son indicativos

de un peor efecto del tratamiento.

5 Por consiguiente, la invención se refiere a un método para mejorar el efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de pacientes que padecen cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, determinando los niveles de expresión de VEGFA y VEGFR2, añadiendo estos niveles de expresión de manera que cada nivel de expresión se multiplica con una función ponderada (o factor de ponderación). Sorprendentemente, el resultado ("valor", resultante de la operación matemática, o nivel de expresión combinada) se correlaciona con el efecto del tratamiento en pacientes a los que se administra bevacizumab en combinación con regímenes de quimioterapia, de tal manera que los valores por encima de un límite previamente especificado (multivariante) son indicativos de un mejor efecto del tratamiento para el paciente y los valores por debajo de este límite son indicativos de un peor efecto del tratamiento.

15 La invención se refiere a un método para mejorar el efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de pacientes que padecen cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, por adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia, determinando los niveles de expresión de VEGFA y PLGF, añadiendo estos niveles de expresión de tal manera que cada nivel de expresión se multiplica con una función ponderada (o factor de ponderación). Sorprendentemente, el resultado ("valor", resultante de la operación matemática, o nivel de expresión combinada) se correlaciona con el efecto del tratamiento en pacientes a los que se administra bevacizumab en combinación con regímenes de quimioterapia de tal manera que los valores por encima de un límite previamente especificado (multivariante) son indicativos de un mejor efecto del tratamiento para el paciente y los valores por debajo de este límite son indicativos de un peor efecto del tratamiento.

25 Por consiguiente, la presente invención, se refiere a un método para mejorar el efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de pacientes que padecen cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, añadiendo bevacizumab a un régimen de quimioterapia, determinando los niveles de expresión de VEGFA, VEGFR2 y PLGF, añadiendo estos niveles de expresión de tal manera que cada nivel de expresión se multiplica con una función ponderada (o factor de ponderación). Sorprendentemente, el resultado ("valor", resultante de la operación matemática, o nivel de expresión combinada) se correlaciona con el efecto del tratamiento en pacientes a los que se administra bevacizumab en combinación con regímenes de quimioterapia de tal manera que los valores por encima de un límite previamente especificado (multivariante) son indicativos de un mejor efecto del tratamiento para el paciente y los valores por debajo de este límite son indicativos de un peor efecto de tratamiento.

35 Por ejemplo, como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, las siguientes ecuaciones pueden usarse para evaluar el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 o de VEGFA y PLGF cuando el efecto del tratamiento es la supervivencia sin progresión en pacientes que padecen cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente, metastásico y el tratamiento es bevacizumab a una dosis baja (7,5 mg/kg cada tres semanas) o a una dosis alta (15 mg/kg cada tres semanas) más terapia con docetaxel en comparación con placebo más terapia con docetaxel.

$$\text{Fórmula 1: } \text{norm(VEGFA)} + 1,3 * \text{norm(VEGFR2)}$$

$$\text{Fórmula equivalente: } 0,71 * \log_2(\text{VEGFA}) + 3,16 * \log_2(\text{VEGFR2}) - 15,6$$

45 y

$$\text{Fórmula 2: } 0,25 * \text{norm(VEGF)} + 0,21 * \text{norm(PLGF)}$$

$$\text{Fórmula equivalente: } 0,18 * \log_2(\text{VEGFA}) + 0,42 * \log_2(\text{VEGFR2}) - 3,1$$

Donde se usa la transformación \log_2 y

$$X_i \rightarrow \text{norm}(x_i) = \frac{\log_2(x_i) - \text{media}(\log_2(x))}{\text{dma}(\log_2(x))}$$

55 Donde dma es la desviación media absoluta ajustada por un factor de 1,4826.

60 Por consiguiente, en el contexto de la invención descrita en el presente documento, y de acuerdo con el ejemplo ilustrativo adjunto, un nivel alto de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 es Fórmula 1 $\geq -0,132$ y un nivel bajo de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 es Fórmula 1 $< -0,132$, con respecto a la supervivencia sin progresión para la adición de una terapia con bevacizumab a una dosis tanto baja como alta. En el contexto de la invención descrita en el presente documento y de acuerdo con el ejemplo ilustrativo adjunto, un nivel alto de expresión combinada de VEGFA y PLGF es la Fórmula 2 $\geq -0,006$ y un nivel bajo de expresión combinada de

VEGFA y PLGF es la Fórmula 2 $< -0,006$, con respecto a la supervivencia sin progresión para la adición de una terapia con bevacizumab a una dosis tanto baja como alta. Sin embargo, el experto en la técnica entenderá que los niveles de expresión medidos para marcadores de un panel de marcadores (o un nivel de expresión combinada), por ejemplo, para VEGFA y VEGFR2 o VEGFA y PLGF, pueden combinarse matemáticamente y el nivel de expresión combinada puede correlacionarse con la cuestión diagnóstica subyacente en más de una manera. Por consiguiente, los niveles de los marcadores pueden combinarse mediante cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica.

El nivel de expresión de uno o más de los marcadores VEGFA, VEGFR2 y PLGF puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica, que sea adecuado para la determinación de niveles de proteína específicos en una muestra del paciente y determinarse preferentemente mediante un método de inmunoensayo, tal como un ELISA, empleando anticuerpos específicos para uno o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF. Dichos métodos son muy conocidos y están implementados habitualmente en la técnica y corresponden a anticuerpos y/o a kits comerciales fácilmente disponibles. Por ejemplo, anticuerpos/kits de ensayo disponibles en el comercio para VEGFA, VEGFR2 y PLGF, pueden obtenerse en Bender ELIA Tech y R&D Systems, como los clones 3C5 y 26503, de R&D Systems como los clones 89115 y 89109, de Roche Diagnostics GmbH, como los clones 2D6D5 y 6A11D2, respectivamente. Preferentemente, los niveles de expresión de las proteínas marcadoras/indicadoras de la invención se evaluaron usando los reactivos y/o las recomendaciones protocolarias del fabricante del anticuerpo o del kit. El experto en la técnica también sabrá de otros medios para la determinación del nivel de expresión de uno o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF por métodos de inmunoensayo. Por lo tanto, el nivel de expresión de uno o más de los marcadores/indicadores de la invención puede determinarse de manera rutinaria y reproducible por un experto en la técnica sin carga excesiva. Sin embargo, para garantizar resultados exactos y reproducibles, la invención también incluye el análisis de muestras de pacientes en un laboratorio especializado que pueda garantizar la validación de los procedimientos analíticos.

Las proteínas VEGF₁₂₁ y VEGF₁₁₀ pueden detectarse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, muestras de tejido o de células de mamíferos pueden someterse convenientemente a ensayo para determinar, por ejemplo, proteínas, usando transferencias Western, ensayos ELISA, etc. Se dispone de muchas referencias para ofrecer una orientación en la aplicación de las técnicas anteriores (Kohler *et al.*, Hybridoma Techniques (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1980); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985); Campbell, Monoclonal Antibody Technology (Elsevier, Amsterdam, 1984); Hurrell, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982); y Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs. 147-1 58 (CRC Press, Inc., 1987)).

Si se hace referencia a la detección o nivel de VEGF₁₂₁ y VEGF₁₁₀ esto significa que la suma de ambas moléculas se mide, por ejemplo, usando un ensayo que detecta tanto VEGF₁₂₁ como VEGF₁₁₀. Los ensayos que detectan las dos moléculas VEGF₁₂₁ y VEGF₁₁₀ incluyen, por ejemplo, ensayos que tienen una sensibilidad de al menos 25% por la otra forma correspondiente (es decir, por VEGF₁₂₁ si VEGF₁₁₀ es la mejor reconocida, o por VEGF₁₁₀ si VEGF₁₂₁ es la mejor reconocida, respectivamente). En determinadas realizaciones, los ensayos tienen una sensibilidad por la otra forma correspondiente de al menos 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o mayor. En una realización tanto VEGF como VEGF₁₁₀ se midieron esencialmente con la misma sensibilidad.

En cuanto a la detección de las proteínas VEGF₁₂₁ y VEGF₁₁₀, se dispone de diversos ensayos. Por ejemplo, la muestra puede ponerse en contacto con un anticuerpo o con una combinación de anticuerpos (por ejemplo, en un ensayo de tipo sándwich) uniendo de manera preferente o específica las isoformas cortas de VEGF-A, VEGF₁₂₁ y VEGF₁₁₀, respectivamente en comparación con las isoformas VEGF-A de origen natural más largas, VEGF₁₆₅ y VEGF₁₈₉, respectivamente. Preferentemente las isoformas cortas se detectan con una sensibilidad al menos 3 veces mayor en comparación con las isoformas más largas. Se acepta una sensibilidad al menos 3 veces mayor si se establece una curva patrón usando una isoforma corta (pureza de al menos 90 % por SDS-PAGE y concentración determinada por DO 280 nm) y para una isoforma larga a una concentración predeterminada (pureza al menos 90 % por SDS-PAGE y concentración determinada por DO 280 nm) usando los mismos reactivos y la misma curva patrón el valor de la lectura de las curvas patrón es solo un tercio o menos de la concentración esperada. También se prefiere que la sensibilidad para las isoformas cortas sea al menos 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces o 9 veces mayor en comparación con las isoformas largas, especialmente en comparación con VEGF₁₆₅.

En una realización, las dos isoformas cortas VEGF₁₂₁ y VEGF₁₁₀ se detectan específicamente. Dicha detección específica es posible, por ejemplo, si se usan anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales, y si se emplean anticuerpos que se unen a la secuencia generada por la unión de los exones 4 y 8 en VEGF₁₂₁ o al extremo C terminal de VEGF₁₁₀, respectivamente. Dicho anticuerpo anti extremo C terminal de VEGF₁₁₀ no se une a ninguna isoforma de VEGF-A que comprenda el aminoácido 110 como parte de una cadena polipeptídica más larga o a fragmentos de VEGF-A más cortos que terminen, por ejemplo en el aminoácido 109. El anticuerpo monoclonal que se une a la secuencia generada por la unión de los exones 4 y 8, respectivamente, en VEGF₁₂₁ no se unirá a las secuencias de aminoácidos comprendidas en las isoformas de VEGF 165 y 189 más largas, respectivamente, ya que en ellas están presentes otras secuencias de aminoácidos debido a la unión del exón 4 y exón 7, y del exón 4 y exón 5, respectivamente (véase: Ferrara, N., Mol. Biol., of the Cell 21 (2010) 687-690). La unión específica en el sentido anterior se confirma, si el anticuerpo que se utiliza presenta reactividad cruzada menor de 10 % con un

fragmento más corto y reactividad cruzada menor de 10 % con aquellas isoformas de VEGF-A que no tengan un amino C terminal libre 110 en caso del anticuerpo anti-VEGF₁₁₀, o aquellas isoformas que no comprenden la secuencia generada por la unión de los exones 4 y 8 en el caso del anticuerpo anti-VEGF₁₂₁, respectivamente. También se prefiere que la reactividad cruzada sea menor de 5 %, 4 %, 3 %, 2 % y 1 %, respectivamente, para los dos fragmentos más cortos y que no tenga un aminoácido C terminal libre 110 o isoformas de VEGF que no tengan la secuencia generada por la unión de los exones 4 y 8, respectivamente.

De acuerdo con procedimientos convencionales pueden obtenerse anticuerpos específicos apropiados que solo se unan a las isoformas cortas de VEGF, VEGF₁₂₁ o VEGF₁₁₀, respectivamente. Normalmente un péptido que represente o que comprenda a lo sumo al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos en el C terminal de VEGF₁₁₀ o un péptido que represente o que comprenda al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos que comprenden aminoácidos C terminal y N terminal en el aminoácido 115 de VEGF₁₂₁, respectivamente, se sintetizará, opcionalmente acoplado a un transportador y se usará para inmunización. A través de etapas de inmuoabsorción apropiadas pueden obtenerse anticuerpos policlonales específicos. La reactividad de los anticuerpos monoclonales puede explorarse fácilmente con VEGF₁₂₁ o VEGF₁₁₀, respectivamente, y con una reactividad cruzada baja apropiada. La reactividad cruzada baja en términos del anticuerpo específico de VEGF₁₁₀ puede evaluarse tanto para los fragmentos más cortos de VEGF₁₁₀ (por ejemplo que no tiene el aminoácido C terminal de VEGF₁₁₀) como para las isoformas de VEGF-A que no tengan un aminoácido C terminal libre de VEGF₁₁₀. La reactividad cruzada baja en términos del anticuerpo específico de VEGF₁₂₁ puede evaluarse usando isoformas de VEGF que contengan las secuencias de aminoácidos formadas después de la unión del exón 4 y exón 7 y del exón 4 y exón 5, respectivamente.

La proteína o ácidos nucleicos de VEGF₁₁₁ pueden detectarse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, muestras de tejido o de células de mamífero pueden ensayarse convenientemente, por ejemplo, para detectar proteínas usando transferencias Western, ensayos ELISA, ARNm o ADN de un biomarcador genético de interés usando análisis Northern, transferencia puntual o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación con matriz, ensayo de protección con RNasa, o usando micromatrices de placa SNP de ADN, que están disponibles en el comercio, incluyendo imágenes instantáneas de micromatriz de ADN. Por ejemplo, en la técnica se conocen bien ensayos de PCR en tiempo real (RT-PCR) tales como ensayos de PCR cuantitativa. En una realización ilustrativa de la invención, un método para detectar ARNm de un biomarcador genético de interés en una muestra biológica comprende producir ADNc a partir de la muestra por transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc así producido; y detectar la presencia del ADNc amplificado. Además, dichos métodos pueden incluir una o más etapas que permitan determinar los niveles de ARNm en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles de una secuencia de ARNm de control comparativa de un gen "constitutivo" tal como un miembro de la familia de actina). Opcionalmente, la secuencia del ADNc amplificada puede determinarse.

Se dispone de muchas referencias que ofrecen una orientación a la hora de aplicar las técnicas anteriores (Kohler *et al.*, Hybridoma Techniques (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1980); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985); Campbell, Monoclonal Antibody Technology (Elsevier, Amsterdam, 1984); Hurrell, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982); y Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs. 147-1 58 (CRC Press, Inc., 1987).

En cuanto a la detección de la proteína VEGF₁₁₁, se dispone de diversos ensayos. Por ejemplo, la muestra puede ponerse en contacto con un anticuerpo o con una combinación de anticuerpos (por ejemplo en un ensayo de tipo sándwich) uniéndose de un modo preferente o específico a VEGF₁₁₁ en comparación con las isoformas de VEGF-A de origen natural más largas, VEGF₁₆₅ y VEGF₁₈₉, respectivamente. Preferentemente la isoforma corta VEGF₁₁₁ se detecta con una sensibilidad al menos 3 veces mayor en comparación con las isoformas más largas. Se acepta una sensibilidad al menos 3 veces mayor si usando una isoforma corta se estabiliza una curva patrón (pureza de al menos 90 % por SDS-PAGE y concentración determinada por DO 280 nm) y para una isoforma larga a una concentración predeterminada (pureza de al menos 90 % por SDS-PAGE y concentración determinada por DO 280 nm) usando los mismos reactivos y la misma curva patrón el valor leído de las curvas patrón es solo un tercio o menor de la concentración esperada. También se prefiere que la sensibilidad para las isoformas cortas sea al menos 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces o 9 veces mayor en comparación con las isoformas largas.

En una realización, la isoforma VEGF₁₁₁ se detecta específicamente. Dicha detección específica es posible, por ejemplo, si se usan anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales, y si se emplean los que se unen a la unión exónica única para VEGF₁₁₁. Dichos anticuerpos no se unen a otra isoforma de VEGF-A o sus productos de escisión no comprenden esta unión exónica específica. La unión específica en el sentido anterior se reconoce, si el anticuerpo que se usa presenta una reactividad cruzada menor de 10 % con otras isoformas de VEGF-A, tales como VEGF₁₂₁ o VEGF₁₆₅, respectivamente, que no tienen esta unión exónica exclusiva. También se prefiere que la reactividad cruzada, por ejemplo, con VEGF₁₂₁ sea menor de 5 %, 4 %, 3 %, 2 % y 1 %, respectivamente.

En una realización, la especificidad de VEGF₁₁₁ se evalúa comparando VEGFA₁₁₁ (pureza de al menos 90 % por SDS-PAGE y concentración determinada por DO 280 nm) y VEGF₁₂₁ (pureza de al menos 90 % por SDS-PAGE y concentración determinada por DO 280 nm) usando los mismos reactivos. Si en esta comparación la señal obtenida

por el material VEGF₁₂₁ es tan solo una decena o menor que la señal obtenida con el material VEGF₁₁₁, entonces la reactividad cruzada hacia VEGF₁₂₁ es menor que 10 %. Como el experto en la materia apreciará la señal de VEGF₁₂₁ se lee preferentemente a una concentración que produce aproximadamente el 50 % de la señal máxima para VEGF₁₁₁.

De acuerdo con procedimientos convencionales pueden obtenerse anticuerpos específicos apropiados que solo se unen a la isoforma corta de VEGF, VEGF₁₁₁. Normalmente, un péptido que representa o que comprende los aminoácidos C terminal y N terminal en el aminoácido 105 de VEGF₁₁₁ se sintetizará, opcionalmente se acoplará a un transportador y se usará para la inmunización. Preferentemente dicho péptido tendrá una longitud de al menos seis aminoácidos y comprenderá al menos los aminoácidos 105 y 106 de VEGF₁₁₁. También se prefiere que comprenda al menos los aminoácidos 104, 105, 106 y 107 de VEGF₁₁₁. Como apreciará el experto en la técnica, para obtener anticuerpos que se unan específicamente a VEGF₁₁₁, también pueden usarse péptidos más largos que comprenden, por ejemplo, 3 o más aminoácidos N y C terminal en la unión de exón entre los aminoácidos 105 y 106 de VEGF₁₁₁.

La proteína VEGF no modificada puede detectarse usando cualquier método apropiado conocido en la técnica. Preferentemente se usará un anticuerpo, como MAB 3C5, que tiene al menos las propiedades de unión preferenciales por VEGF no modificado en comparación con VEGF modificado, que se encuentra disponible en el comercio en RELIA Tech GmbH, Wolfenbüttel, Alemania. Por ejemplo, muestras de tejido o de células de mamíferos pueden ensayarse convenientemente con respecto a la proteína VEGF modificada usando transferencias Western, ensayos ELISA, etc. Se dispone de muchas referencias para proporcionar una orientación a la hora de aplicar las técnicas anteriores (Kohler *et al.*, *Hybridoma Techniques* (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1980); Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* (Elsevier, Amsterdam, 1985); Campbell, *Monoclonal Antibody Technology* (Elsevier, Amsterdam, 1984); Hurrell, *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications* (CRC Press, Boca Ratón, FL, 1982); y Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147-1 58 (CRC Press, Inc., 1987)).

Si se hace referencia a la detección o al nivel de VEGF no modificado esto significa que se miden las moléculas de VEGF no modificadas (isoformas o productos de escisión) tales como, por ejemplo, las que se unen por MAB 3C5.

En cuanto a la detección de la proteína VEGF no modificada, se dispone de diversos ensayos. Por ejemplo, la muestra puede ponerse en contacto con un anticuerpo o con una combinación de anticuerpos (por ejemplo, en un ensayo de tipo sándwich) uniéndose de un modo preferente o específico a un VEGF no modificado en comparación con un VEGF modificado, por ejemplo, como el que se produce de forma natural en una muestra del paciente. Preferentemente un VEGF no modificado se detecta usando un anticuerpo que se une específicamente a un VEGF no modificado, es decir, con un anticuerpo que tiene una sensibilidad al menos 3 veces mayor por VEGF₁₆₅ no modificado en comparación con VEGF₁₆₅ modificado. Dicha sensibilidad al menos 3 veces mayor para VEGF no modificado se evalúa comparando VEGF₁₆₅ producido de manera recombinante en *E. coli* (pureza de al menos 90 % por SDS-PAGE y concentración determinada por DO 280 nm) y VEGF₁₆₅ producido de manera recombinante en células HEK (pureza de al menos 90 % por SDS-PAGE y concentración determinada por DO 280 nm) usando los mismos reactivos. Si en esta comparación la señal obtenida para el material producido en células HEK es solo un tercio o menor de la señal obtenida con el material procedente de *E. coli*, entonces se detecta el VEGF no modificado con una sensibilidad al menos 3 veces mayor. Como apreciará el experto en la técnica la lectura de la señal es preferentemente alrededor del 50 % de la señal máxima. Preferentemente en esta evaluación se usa el ensayo del ejemplo 5. También se prefiere que el anticuerpo que se une específicamente a VEGF no modificado (VEGF₁₆₅ ex de *E. coli*) sea un anticuerpo que detecte VEGF no modificado con, y al menos una sensibilidad 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces mayor en comparación con el material VEGF modificado (VEGF₁₆₅ ex de células HEK).

En una realización el VEGF no modificado se detecta específicamente usando un anticuerpo que tiene al menos la misma preferencia de unión por el VEGF no modificado en comparación con el VEGF modificado, tal como el MAB 3C5 disponible en el comercio. En una realización la sensibilidad relativa por, o la unión preferencial de un anticuerpo con VEGF no modificado, se evalúa en un inmunoensayo de tipo sándwich, en el que el anticuerpo contra VEGF no modificado se usa como un anticuerpo de captura y se usa un anticuerpo de detección que se une a un epítipo presente en todas las isoformas de VEGF principales o productos de escisión. En una realización el anticuerpo de detección se unirá a un epítipo fuera del epítipo para MAB 3C5, es decir, no se unirá a un epítipo comprendido en un péptido sintético que abarque los aminoácidos 33 a 43 de VEGF. Preferentemente el anticuerpo de detección se unirá a un epítipo comprendido en los aminoácidos que van del 1 al 32, del 44 al 105, hasta los seis últimos aminoácidos de VEGF₁₆₅ maduro, o a un epítipo conformacional que no se solapa con el epítipo unido por MAB 3C5. En una realización el anticuerpo que se une específicamente a VEGF₁₆₅ no modificado en comparación con VEGF modificado, tiene la propiedad de unirse a un epítipo comprendido en un péptido sintético que abarca los aminoácidos 33 a 43 de VEGF.

Los anticuerpos específicos apropiados que se unen específicamente a VEGF no modificado pueden obtenerse de acuerdo con procedimientos convencionales. Normalmente una isoforma de VEGF producida de manera recombinante en *E. coli* u obtenida sintéticamente, por ejemplo, mediante síntesis polipeptídica en fase sólida, o un

péptido que represente o que comprenda un epítipo de VEGF producido de manera recombinante en *E. coli* u obtenido sintéticamente, por ejemplo, mediante síntesis polipeptídica en fase sólida, se usará como un inmunógeno. Pueden producirse anticuerpos monoclonales fácilmente de acuerdo con protocolos convencionales y explorarse con respecto a su reactividad con VEGF no modificado y a su reactividad cruzada baja apropiada con VEGF modificado. Un método de exploración preferido y conveniente se basa en el uso de VEGF165 producido de manera recombinante en *E. coli* (pureza de al menos 90 % por SDS-PAGE y concentración determinada por DO 280 nm) y de VEGF165 producido de manera recombinante en células HEK (pureza de al menos 90 % mediante SDS-PAGE y concentración determinada por DO 280 nm), respectivamente.

El nivel de expresión de una o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF puede evaluarse en una muestra de un paciente que es una muestra biológica. La muestra del paciente es una muestra de plasma sanguíneo. En una realización, la muestra es plasma EDTA. En una realización, la muestra es plasma-citrato. En la técnica se conocen bien métodos para obtener muestras de sangre, muestras de suero de sangre y muestras de plasma de sangre. La muestra del paciente puede obtenerse del paciente antes o después de la terapia neoadyuvante o antes o después de la terapia adyuvante.

En el contexto de la presente invención, bevacizumab va a administrarse añadido a, o como una terapia conjunta o como un tratamiento conjunto con uno o más agentes quimioterapéuticos administrados como parte de un régimen de quimioterapia convencional como se sabe en la técnica. Como ejemplos de agentes incluidos en dichos regímenes de quimioterapia convencionales se incluyen 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, gemcitabina, erlotinib, capecitabina, taxanos, tales como docetaxel y paclitaxel, interferón alfa, vinorelbina y agentes quimioterapéuticos basados en platino, tales como carboplatino, cisplatino y oxaliplatino. Como se demuestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, la adición de bevacizumab efectúa un aumento en la supervivencia sin progresión en los pacientes y/o en la población de pacientes definida y seleccionada de acuerdo con el nivel de expresión de uno o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF. Por tanto, bevacizumab puede combinarse con un régimen de quimioterapia, tal como terapia con docetaxel como se demuestra en el ejemplo ilustrativo que se adjunta.

Las formas de administración habituales incluyen la administración parenteral, tal como una dosis en bolo o como una infusión durante un periodo de tiempo determinado, por ejemplo, administración de la dosis diaria total durante 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 75 min, 90 min, 105 min, 120 min, 3 h, 4 h, 5 h o 6 h. Por ejemplo, dependiendo del tipo de cáncer que vaya a tratarse, 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. Como ejemplos de dosificaciones se incluyen 2,5 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal, 7,5 mg/kg de peso corporal, 10 mg/kg de peso corporal y 15 mg/kg de peso corporal proporcionadas cada semana, cada 2 semanas o cada 3 semanas. Otros ejemplos de dosificaciones son 5 mg/kg de peso corporal cada 2 semanas, 10 mg/kg cada 2 semanas, 7,5 mg/kg de peso corporal cada 3 semanas y 15 mg/kg de peso corporal cada 3 semanas. En el contexto de la invención descrita en el presente documento, una dosis baja de bevacizumab incluye, por ejemplo, dosificaciones de 2,5 mg/kg de peso corporal cada la semana, 5 mg/kg de peso corporal cada 2 semanas y 7,5 mg/kg de peso corporal cada 3 semanas. En el contexto de invención descrita en el presente documento una dosis alta de bevacizumab incluye, por ejemplo, una dosis de 5 mg/kg de peso corporal cada semana, 10 mg/kg de peso corporal cada 2 semanas y 15 mg/kg de peso corporal cada 3 semanas. Para el tratamiento del cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, las dosificaciones incluyen dosis bajas de bevacizumab, en particular de 7,5 mg/kg cada 3 semanas y dosis altas de bevacizumab, en particular 15 mg/kg de peso corporal administrado una vez cada 3 semanas. El experto en la materia reconocerá que en la presente invención se incluyen otros modos de administración de bevacizumab, como lo determina el régimen de quimioterapia y el paciente específico, y que quien mejor determina el modo de administración y la dosificación terapéutica de un modo específico es el médico tratante siguiendo los métodos conocidos en la técnica.

Los pacientes seleccionados de acuerdo con los métodos de la presente invención se tratan con bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia, y se pueden tratar además con una o más terapias anticancerosas adicionales. En ciertos aspectos, la una o más terapias anticancerosas es radiación.

En el presente documento se proporcionan también composiciones diagnósticas o kits que comprenden oligonucleótidos o polipéptidos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de uno o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF. Como se detalla en el presente documento, pueden utilizarse oligonucleótidos tales como ADN, ARN o mezclas de sondas de ADN y ARN en la detección de niveles de ARNm de las proteínas marcadoras/indicadoras, mientras que pueden utilizarse polipéptidos para detectar directamente niveles de proteínas de las proteínas marcadoras/indicadoras a través de interacción proteína-proteína específica. Los polipéptidos incluidos como sondas para los niveles de expresión de uno o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF e incluidos en los kits o en las composiciones diagnósticas descritos en el presente documento, son anticuerpos específicos para estas proteínas, o específicos para homólogos y/o formas truncadas de los mismos.

Por consiguiente, en el presente documento también se describe un kit útil para realizar los métodos descritos en el presente documento, que comprende oligonucleótidos o polipéptidos capaces de determinar el nivel de expresión de uno o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF. Los oligonucleótidos pueden comprender cebadores y/o sondas

específicos para el ARNm que codifica uno o más de los marcadores/indicadores descritos en el presente documento, y los polipéptidos pueden comprender proteínas capaces de interactuar específicamente con las proteínas marcadoras/indicadoras, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos de marcadores/indicadores.

5 En el presente documento también se describe el uso de bevacizumab en un régimen de quimioterapia mejorado para un paciente que padece cáncer de mama en el que en una muestra de un paciente se determina el nivel de expresión de las proteínas de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA y mediante el cual a un paciente que tiene un nivel aumentado de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA con respecto a niveles de control determinados en
10 pacientes diagnosticados con cáncer de mama, se le administra bevacizumab además del régimen de quimioterapia.

Pueden aplicarse los siguientes usos similares según corresponda.

15 También se describe el uso de bevacizumab para mejorar el efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de un paciente que padece cáncer de mama que comprende las siguientes etapas:

- (a) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA en una muestra del paciente; y
- (b) administrar bevacizumab, en combinación con el régimen de quimioterapia, a un paciente que tenga un nivel aumentado de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA con respecto a niveles de control determinados en
20 pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

25 Por consiguiente, también se describe el uso de bevacizumab para la mejora del efecto del tratamiento de un régimen de quimioterapia de un paciente que padece cáncer de mama que comprende las siguientes etapas:

- (a) obtener una muestra de plasma sanguíneo de dicho paciente;
- (b) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA; y
- (c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel aumentado de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA con respecto a los niveles de control determinados en
30 pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

35 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

También se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama que comprende las siguientes etapas:

- (a) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA en una muestra de paciente; y
- (b) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel aumentado de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA con respecto a los niveles de control determinados en
40 pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

45 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender una terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

Adicionalmente se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama que comprende las siguientes etapas:

- (a) obtener una muestra de plasma sanguíneo de dicho paciente;
- (b) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA; y
- (c) administrar bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel aumentado de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA con respecto a los niveles de control determinados en
50 pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel.

60 También se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama que comprende las siguientes etapas:

- (a) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2 en una muestra de un paciente; y
- (b) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

65

El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis alta o baja de bevacizumab.

5 Adicionalmente se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama que comprende las siguientes etapas:

(a) obtener una muestra de plasma sanguíneo de dicho paciente;

(b) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2; y

10 (c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

15 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab.

También se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado recurrentemente o metastásico que comprende las siguientes etapas:

(a) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2 en una muestra del paciente; y

(b) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama.

25 El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab.

30 Adicionalmente se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrentemente o metastásico que comprende las siguientes etapas:

(a) obtener una muestra de plasma sanguíneo de dicho paciente;

35 (b) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2; y

(c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama.

40 El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab.

Por consiguiente, en el presente documento se proporciona el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama que comprende las siguientes etapas:

45 (a) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2 en una muestra del paciente; y
(b) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

50 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 fue particularmente predictivo en
55 pacientes a los que se administró una dosis baja de bevacizumab.

También se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama que comprende las siguientes etapas:

(a) obtener una muestra de plasma sanguíneo de dicho paciente;

(b) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2; y

(c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

65

5 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 fue particularmente predictivo en pacientes a los que se administró bevacizumab a dosis bajas.

También se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, que comprende las siguientes etapas:

- 10
- (a) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2 en una muestra del paciente; y
 - (b) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer de mama.
- 15

El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 fue particularmente predictivo en pacientes a los que se administró una dosis baja de bevacizumab.

20 Adicionalmente se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, que comprende las siguientes etapas:

- 25
- (a) obtener una muestra de plasma sanguíneo de dicho paciente;
 - (b) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2; y
 - (c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.
- 30

El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 fue particularmente predictivo en pacientes a los que se administró una dosis baja de bevacizumab.

35 También se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, que comprende las siguientes etapas:

- 40
- (a) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2 en una muestra del paciente; y
 - (b) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

45 en el que el régimen de quimioterapia es terapia con docetaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 fue particularmente predictivo en pacientes a los que se administró una dosis baja de bevacizumab.

50 Por consiguiente, en el presente documento se describe el uso de bevacizumab para la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, que comprende las siguientes etapas:

- 55
- (a) obtener una muestra de dicho paciente;
 - (b) determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2; y
 - (c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

60 en el que el régimen de quimioterapia es terapia con docetaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 fue particularmente predictivo en pacientes a los que se administró una dosis baja de bevacizumab.

65 En el presente documento también se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama que comprende las siguientes etapas:

- (a) determinar el nivel de expresión de VEGFA y PLGF en una muestra de paciente; y
- (b) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

5 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab.

10 Por consiguiente, en el presente documento se describe el uso de bevacizumab para la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama que comprende las siguientes etapas:

- (a) obtener una muestra de plasma sanguíneo de dicho paciente;
- (b) determinar el nivel de expresión de VEGFA y PLGF; y
- 15 (c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con cáncer de mama.

20 El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab.

25 Adicionalmente, en el presente documento se desvela el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico que comprende las siguientes etapas:

- (a) determinar el nivel de expresión de VEGFA y PLGF en una muestra de paciente; y
- (b) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control
- 30 determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama.

El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab.

35 Por consiguiente, también se describe el uso de bevacizumab para la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico que comprende las siguientes etapas:

- (a) obtener una muestra de plasma sanguíneo de dicho paciente;
- 40 (b) determinar el nivel de expresión de VEGFA y PLGF; y
- (c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama.

45 El régimen de quimioterapia puede comprender terapia con taxano, tal como terapia con docetaxel o paclitaxel. La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab.

50 También se describe el uso de bevacizumab para mejorar la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico que comprende las siguientes etapas:

- (a) determinar el nivel de expresión de VEGFA y PLGF en una muestra del paciente; y
- (b) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control
- 55 determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

en el que el régimen de quimioterapia es terapia con docetaxel.

60 La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab.

Por consiguiente, en el presente documento se describe el uso de bevacizumab para la supervivencia sin progresión de un paciente que padece cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico que comprende las siguientes etapas:

- 65 (a) obtener una muestra de plasma sanguíneo de dicho paciente;
- (b) determinar el nivel de expresión de VEGFA y PLGF; y

(c) administrar bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia al paciente que tiene un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF con respecto a un nivel de expresión combinada de control determinado en pacientes diagnosticados con dicho cáncer de mama,

5 en el que el régimen de quimioterapia es terapia con docetaxel.

La dosis de bevacizumab administrada puede ser una dosis baja o alta de bevacizumab.

10 Como se documenta en el ejemplo ilustrativo adjunto, la presente invención resuelve el problema técnico identificado ya que, sorprendentemente, puede mostrar que los niveles de expresión de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA en un paciente determinado, con respecto a los niveles de control determinados en pacientes diagnosticados con cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, se correlaciona con el efecto del tratamiento en pacientes a los que administra bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia con docetaxel. Como se muestra en el ejemplo ilustrativo adjunto, sorprendentemente se descubrió que un nivel de expresión aumentado de las proteínas VEGFA o VEGFR2 se correlacionaba con una supervivencia sin progresión mejorada en pacientes que padecían cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico que cuando se trataban con bevacizumab y un régimen de quimioterapia con docetaxel en comparación con pacientes tratados con placebo y con un régimen de quimioterapia con docetaxel (Figuras 2 a 5). Sorprendentemente, también se descubrió que un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y VEGFR2 se correlacionaba con supervivencia sin progresión mejorada de pacientes que padecían cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico que cuando se trataban con bevacizumab y un régimen de quimioterapia con docetaxel en comparación con pacientes tratados con placebo y con un régimen de quimioterapia con docetaxel (Figura 6). También se descubrió sorprendentemente que un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y PLGF se correlacionaba con supervivencia sin progresión en pacientes que padecían cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico que cuando se trataban con bevacizumab y con un régimen de quimioterapia con docetaxel en comparación con los pacientes tratados con placebo y con un régimen de quimioterapia con docetaxel (Figura 7).

30 Por lo tanto, la invención se refiere a un método de predicción *in vitro* de la respuesta o la sensibilidad a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de un paciente que padece, se sospecha que padece o es propenso a padecer, cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrentemente o metastásico, que comprende determinar el nivel de expresión, incluyendo niveles de expresión combinada, de VEGFA y VEGFR2 o de PLGF y VEGFA en una muestra del paciente. Por consiguiente, en el contexto de los métodos descritos en el presente documento, la invención proporciona el uso de sondas específicas, incluyendo, por ejemplo, moléculas de unión como anticuerpos y aptámeros, para la preparación de una composición diagnóstica para predecir la respuesta o la sensibilidad a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de un paciente que padece, se sospecha que padece o es propenso a padecer, cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, que comprende determinar el nivel de expresión, incluyendo los niveles de expresión combinada, de VEGFA y VEGFR2 o PLGF y VEGFA en una muestra del paciente. Por consiguiente, la invención se refiere al uso de sondas específicas, incluyendo, por ejemplo, moléculas de unión como anticuerpos y aptámeros, para la preparación de una composición de diagnóstico para predecir la respuesta o la sensibilidad a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de un paciente que padece, se sospecha que padece o es propenso a padecer, cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrentemente o metastásico que comprende determinar el nivel de expresión de VEGFA y VEGFR2 en una muestra del paciente.

50 La invención proporciona un método de predicción *in vitro* de la respuesta o la sensibilidad a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de un paciente que padece, se sospecha que padece o es propenso a padecer, cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, que comprende determinar el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 en una muestra del paciente. Por consiguiente, en el contexto de los métodos descritos en el presente documento, la invención proporciona el uso de sondas específicas, incluyendo, por ejemplo, moléculas de unión como anticuerpos y aptámeros, para la preparación de una composición de diagnóstico para predecir la respuesta o la sensibilidad a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de un paciente que padece, se sospecha que padece o es propenso a padecer, cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico que comprende determinar el nivel de expresión combinada de VEGFA y VEGFR2 en una muestra del paciente.

60 La invención proporciona un método de predicción *in vitro* de la respuesta o la sensibilidad a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de un paciente que padece, se sospecha que padece, o es propenso a padecer, cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, que comprende determinar el nivel de expresión combinada de VEGFA y PLGF en una muestra del paciente. Por consiguiente, en el contexto de los métodos descritos en el presente documento, la invención proporciona el uso de sondas específicas, incluyendo, por ejemplo, moléculas de unión como anticuerpos y aptámeros, para la preparación de una composición de diagnóstico para predecir la respuesta o la sensibilidad a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de un paciente que padece, se sospecha que padece o es

propenso a padecer cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico que comprende determinar el nivel de expresión combinada de VEGFA y PLGF en una muestra del paciente.

5 La invención proporciona un método de predicción *in vitro* de la respuesta o sensibilidad a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de un paciente que padece, se sospecha que padece, o es propenso a padecer, cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, que comprende determinar el nivel de expresión combinada de VEGFA, VEGFR2 y PLGF en una muestra del paciente. Por consiguiente, en el contexto de los métodos descritos en el presente documento, la
 10 invención proporciona el uso de sondas específicas, incluyendo, por ejemplo, moléculas de unión como anticuerpos y aptámeros, para la preparación de una composición de diagnóstico para predecir la respuesta o la sensibilidad a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de un paciente que padece, se sospecha que padece o es propenso a padecer, cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico que comprende determinar el nivel de expresión combinada de VEGFA, VEGFR2 y PLGF
 15 en una muestra del paciente.

La frase “que responde a”, en el contexto de la presente invención, indica que un sujeto/paciente que padece, se sospecha que padece o es propenso a padecer cáncer de mama, en particular, cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, muestra una respuesta a un régimen de quimioterapia que
 20 comprende bevacizumab. Un experto podrá determinar fácilmente si una persona tratada con bevacizumab, de acuerdo con los métodos de la invención, muestra una respuesta. Por ejemplo, una respuesta puede reflejarse por una disminución de padecer cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, tal como un crecimiento tumoral disminuido y/o detenido, una reducción del tamaño de un tumor y/o una mejora de uno o más síntomas del cáncer. Preferentemente, la respuesta puede reflejarse por índices
 25 reducidos o disminuidos de la conversión metastásica del cáncer de mama, tal como la prevención de la formación de metástasis o una reducción del número o tamaño de las metástasis (véase, por ejemplo, Eisenhauser *et al.*, New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (versión 1.1) Eur. J. Cancer 2009 45: 228-247).

La frase “sensible a”, en el contexto de la presente invención, indica que un sujeto/paciente que padece, se sospecha que padece o es propenso a padecer cáncer de mama, en particular, cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, muestra de alguna manera una reacción positiva al tratamiento con bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia. La reacción del paciente puede ser menos
 30 pronunciada cuando se compara con la de un paciente “que responde” como se describe anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, el paciente puede experimentar menos sufrimiento asociado a la enfermedad, aunque no pueda medirse ninguna reducción en el crecimiento tumoral o indicador metastásico y/o la reacción del paciente al bevacizumab en combinación con el régimen de quimioterapia puede ser solo de una naturaleza transitoria, es decir, el crecimiento de un tumor o tumores y/o de una o más metástasis solo puede reducirse o detenerse temporalmente.
 35

La frase “un paciente que padece”, de acuerdo con la invención, se refiere a un paciente que muestra signos clínicos de cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. Las frases “se sospecha que padece”, “es susceptible a”, “es propenso a padecer” o “es propenso a”, en el contexto de cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico,
 40 se refieren a un síntoma de enfermedad en un paciente, basándose, por ejemplo, en una posible predisposición genética, una exposición previa o eventual a compuestos peligrosos y/o carcinogénicos, o exposición a peligros físicos carcinogénicos, tales como radiación.
 45

La frase “efecto de tratamiento de un régimen de quimioterapia” en el contexto de la presente invención incluye las expresiones “supervivencia global” y “supervivencia sin progresión”.
 50

La frase “supervivencia global” en el contexto de la presente invención, se refiere a la cantidad de tiempo que sobrevive el paciente durante y después del tratamiento. Como apreciará el experto, una supervivencia global del paciente se mejora o potencia si el paciente pertenece a un subgrupo de pacientes que tiene un tiempo de supervivencia medio estadísticamente significativo más largo, en comparación con otro subgrupo de pacientes.
 55

La frase “supervivencia sin progresión” en el contexto de la presente invención, se refiere a la cantidad de tiempo durante y después del tratamiento durante el cual, de acuerdo con la valoración del médico tratante o del investigador, la enfermedad del paciente no empeora, es decir no avanza. Como apreciará el experto, una supervivencia sin progresión del paciente se mejora o potencia si el paciente experimenta una cantidad de tiempo más prolongada durante la cual la enfermedad no progresa, en comparación con el tiempo de supervivencia sin progresión medio o promedio de un grupo de control de pacientes en situación similar.
 60

Los términos “administración” o “administrar”, como se usan en el presente documento, significan la administración de un inhibidor de angiogénesis, por ejemplo, bevacizumab (Avastin®), y/o de un régimen de composición farmacéutica/tratamiento que comprende un inhibidor de angiogénesis, por ejemplo, bevacizumab (Avastin®), a un
 65

paciente que necesite dicho tratamiento o intervención médica mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica para la administración de un anticuerpo terapéutico. Como vías de administración no limitantes se incluyen la administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal o intrabronquial (por ejemplo, como la que se efectúa por inhalación). Particularmente preferida en el contexto de la presente invención es la administración parenteral, por ejemplo, administración intravenosa.

El término “anticuerpo” se usa en el presente documento en el sentido más amplio e incluye, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos con CDR injertada, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de anticuerpos y construcciones de fragmentos, por ejemplo, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab, fragmentos Fv, fragmentos Fv monocatenarios (scFv), scFv biespecíficos, diacuerpos, anticuerpos de un solo dominio (dAb) y minicuerpos, que presentan la actividad biológica deseada, en particular, unión específica a uno o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF, o a homólogos, variantes, fragmentos y/o isoformas de los mismos.

El término “aptámero” se usa en el presente documento en el sentido más amplio e incluye, pero sin limitación, oligonucleótidos, incluyendo moléculas de ARN, ADN y ARN/ADN, o moléculas peptídicas, que presentan la actividad biológica deseada, en particular, unión específica a uno o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF, o a homólogos, variantes, fragmentos y/o isoformas de los mismos.

Como se usa en el presente documento, “régimen de quimioterapia” o “agente quimioterapéutico” incluye cualquier agente activo que pueda proporcionar un efecto terapéutico anticanceroso y que pueda ser un agente químico o un agente biológico, en particular, que sea capaz de interferir con las células cancerosas o tumorales. Agentes preferidos activos son aquellos que actúan como agentes antineoplásicos (quimiotóxicos o quimioestáticos) que inhiben o previenen el desarrollo, la maduración o proliferación de células malignas. Como ejemplos no limitantes de un régimen de quimioterapia o de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno (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)), alquil sulfonatos (por ejemplo, busulfán) y triazinas (por ejemplo, dacarbazina (DTIC)); antimetabolitos tales como análogos de ácido fólico (por ejemplo, metotrexato, trimetrexato), análogos de pirimidina (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina, fluorodesoxiuridina, gemcitabina, arabinósido citosina (AraC, citarabina), 5-azacitidina, 2,2'-difluorodesoxiciditina) 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 de la vinca (por ejemplo, vinblastina (VLB), vincristina y vinorelbina), docetaxel, estramustina y fosfato de estramustina), epipodofilotoxinas (por ejemplo, etopósido, tenipósido), antibióticos, (por ejemplo, actinomicina D, daunomicina (rubidomicina), daunorrubicón, doxorubicina, epirubicina, mitoxantrona, idarrubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C, actinomicina), enzimas (por ejemplo, L-asparaginasa) y modificadores de respuesta biológica (por ejemplo, interferón-alfa, IL-2, G-CSF, GM-CSF); agentes heterogéneos, incluyendo complejos de coordinación de platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino), antracenedionas (por ejemplo, mitoxantrona), urea sustituida (es decir, hidroxiiurea), derivados de metilhidrazina (por ejemplo, N-metilhidrazina (MH), procarbazona), supresores adrenocorticoideos (por ejemplo, mitotano (o,p'-DDD), aminoglutetimida); hormonas y antagonistas incluyendo antagonistas adrenocorticoesteroides (por ejemplo, prednisona y equivalentes, dexametasona, aminoglutetimida), progestinas (por ejemplo, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol), estrógenos (por ejemplo, dietilestilbestrol, etinil estradiol y sus equivalentes); antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno), andrógenos (por ejemplo, propionato de testosterona, fluoximeserona y sus equivalentes), antiandrógenos (por ejemplo, flutamida, análogos de la hormona liberadora de gonadotropina, leuprolida), antiandrógenos no esteroideos (por ejemplo, flutamida), inhibidores del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, erlotinib, lapatinib, gefitinib) anticuerpos (por ejemplo, trastuzumab), irinotecán y otros agentes tales como leucovorina. Para el tratamiento de cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico, los agentes quimioterapéuticos para la administración con bevacizumab incluyen taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel (véase también el ejemplo ilustrativo proporcionado en el presente documento).

En el contexto de la presente invención, “homología”, con referencia a una secuencia de aminoácidos, se entiende que se refiere a una identidad de secuencia de al menos 80 %, particularmente a una identidad de al menos 85 %, de al menos 90 % o de al menos 95 % sobre la longitud completa de las secuencias definidas por las SEQ ID NO proporcionadas en el presente documento. En el contexto de la presente invención un experto entendería que homología cubre una o más variaciones alélicas adicionales de las proteínas marcadoras/indicadoras en diferentes poblaciones y grupos étnicos.

Como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” se refiere a un péptido, a una proteína, a un oligopéptido o a un polipéptido que incluye cadenas de aminoácidos de una longitud determinada, estando los restos de aminoácidos ligados por enlaces peptídicos covalentes. Sin embargo, en la invención también se incluyen peptidomiméticos de dichas proteínas/polipéptidos en los que uno o más aminoácidos y/o uno o más enlaces

peptídicos se han reemplazado por análogos funcionales, por ejemplo, un resto de aminoácido distinto de los 20 aminoácidos del código genético, por ejemplo, selenocisteína. Los péptidos, oligopéptidos y proteínas pueden denominarse polipéptidos. En el presente documento los términos polipéptido y proteína se usan indistintamente. El término polipéptido también se refiere a, y no excluye, modificaciones del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Dichas modificaciones se describen bien en textos fundamentales y en monográficos más detallados, así como en bibliografía de investigación voluminosa. El término polipéptido también se refiere e incluye el término "anticuerpo" como se usa en el presente documento.

Los términos "tratamiento" y "tratando", como se usan en el presente documento, se refieren a remediar, mejorar, disminuir la gravedad, o a disminuir la evolución de la enfermedad, o a cualquier parámetro o síntoma de los mismos. Preferentemente dicho paciente es un paciente humano y la enfermedad que va a tratarse es cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico.

Los términos "evaluar" o "evaluación" de dicho paciente se refieren a métodos de determinación de los niveles de expresión de una o más de las proteínas marcadoras/indicadoras descritas en el presente documento, incluyendo VEGFA, VEGFR2 y PLGF, y/o para seleccionar a dichos pacientes basándose en los niveles de expresión de dichas proteínas marcadoras/indicadoras con respecto a los niveles de control establecidos en pacientes a los que se les ha diagnosticado un cáncer de mama, en particular, cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico.

La expresión "nivel de expresión" como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración o a la cantidad de proteínas marcadoras/indicadoras de la presente invención en una muestra.

Además de los métodos descritos anteriormente, la invención también incluye métodos de inmunoensayo adicionales para evaluar o determinar el nivel de expresión de VEGFA, VEGFR2 y PLGF, tal como por transferencia de Western y detección basada en ELISA. Como se sabe en la técnica, el nivel de expresión de las proteínas marcadoras/indicadoras de la invención también pueden evaluarse a nivel de ARNm mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como transferencia Northern, PCR en tiempo real y RT-PCR. En la técnica se conocen bien métodos y sistemas de detección basados en inmunoensayo y en ARNm y pueden deducirse de libros de texto convencionales, tales como Lottspeich (Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, 1998) o Sambrook y Russell (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A., 2001). Los métodos descritos son de uso particular para determinar los niveles de expresión de VEGFA, VEGFR2 y PLGF en un paciente o en un grupo de pacientes con respecto a niveles de control establecidos en una población a la que se ha diagnosticado un cáncer de mama, en particular, cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico.

El nivel de expresión de VEGFA, VEGFR2 y PLGF también puede determinarse a nivel de proteína aprovechando técnicas de inmunoaglutinación, inmunoprecipitación (por ejemplo, inmunodifusión, inmunolectroforesis, inmunofijación), transferencia de Western (por ejemplo, inmunocitoquímica (*in situ*), cromatografía de afinidad, inmunoensayos enzimáticos), y similares. Las cantidades de polipéptido purificado en solución también pueden determinarse por métodos físicos, por ejemplo, fotometría. Los métodos de cuantificación de un polipéptido particular en una mezcla normalmente se basan en la unión específica, por ejemplo, de anticuerpos. Los métodos de detección y cuantificación específicos que aprovechan la especificidad de los anticuerpos comprenden, por ejemplo, métodos de inmunoensayo. Por ejemplo, la concentración/cantidad de proteínas marcadoras/indicadoras de la presente invención en una muestra del paciente puede determinarse mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Como alternativa, puede realizarse análisis de Transferencia Western o inmunotinción. La transferencia Western combina la separación de una mezcla de proteínas por electroforesis y la detección específica con anticuerpos. La electroforesis puede ser multidimensional tal como electroforesis 2D. Normalmente, los polipéptidos se separan en electroforesis 2D por su peso molecular aparente a lo largo de una dimensión y por su punto isoeléctrico a lo largo de la otra dirección.

Como se ha mencionado anteriormente, el nivel de expresión de las proteínas marcadoras/indicadoras también puede reflejarse en un aumento de la expresión de uno o más genes correspondientes que codifican VEGFA, VEGFR2 y/o PLGF. Por lo tanto, puede realizarse una evaluación cualitativa del producto génico antes de la traducción (por ejemplo ARNm cortado y empalmado, no cortado ni empalmado o parcialmente cortado y empalmado) para evaluar la expresión del gen o genes correspondientes. El experto en la materia conoce el uso de métodos convencionales en este contexto o puede deducir estos métodos de libros de texto convencionales (por ejemplo, Sambrook, 2001, loc. cit.). Por ejemplo, pueden obtenerse datos cuantitativos sobre las concentraciones/cantidades respectivas de ARNm que codifica uno o más de VEGFA, VEGFR2 y/o PLGF mediante Transferencia de Northern, PCR en Tiempo Real y similar.

El kit, como se describe en el presente documento, puede usarse ventajosamente para realizar un método de la invención y puede, entre otras cosas, emplearse en diversas aplicaciones, por ejemplo, en el campo del diagnóstico o como una herramienta de investigación. Las partes del kit de la invención pueden envasarse individualmente en viales o en combinación en envases o en unidades multienvase. La fabricación del kit sigue preferentemente procedimientos convencionales que son conocidos por el experto en la técnica. El kit o las composiciones de

diagnóstico pueden usarse para la detección del nivel de expresión de VEGFA, VEGFR2 y/o PLGF de acuerdo con los métodos de la invención descritos en el presente documento, empleando, por ejemplo, técnicas inmunohistoquímicas descritas en el presente documento.

5 Aunque se ilustra mediante el uso de bevacizumab, en el presente documento también se describe el uso de otros inhibidores de angiogénesis, como se sabe en la técnica para su uso en combinación con regímenes de quimioterapia convencionales. La expresión "inhibidor de angiogénesis", como se usa en el presente documento, se refiere a todos los agentes que alteran la angiogénesis (por ejemplo, el proceso de formación de nuevos vasos
10 sanguíneos) e incluyen agentes que bloquean la formación de y/o detienen o reducen el crecimiento de vasos sanguíneos. Como ejemplos no limitantes de inhibidores de angiogénesis se incluyen, además de bevacizumab, pegaptanib, sunitinib, sorafenib y vatalanib. Preferentemente, el inhibidor de angiogénesis para su uso de acuerdo con los métodos de la presente invención, es bevacizumab. Como se usa en el presente documento, el término "bevacizumab" incluye todos los anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de anticuerpo anti-VEGF correspondientes, que cumplen con los requisitos necesarios para obtener una autorización comercial como un producto idéntico o
15 biosimilar en un país o un territorio seleccionado del grupo de países que consiste en Estados Unidos, Europa y Japón.

Para su uso en los métodos de detección descritos en el presente documento, el experto tiene la capacidad de etiquetar los polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos u oligonucleótidos incluidos en la presente invención. Como se
20 realiza habitualmente en la técnica, las sondas de hibridación para su uso en la detección de niveles de ARNm y/o los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos para su uso en métodos de inmunoensayo pueden marcarse y visualizarse de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica, como ejemplos no limitantes de sistemas normalmente utilizados se incluyen el uso de radiomarcadores, marcadores enzimáticos, etiquetas fluorescentes, complejos de biotina-avidina, quimioluminiscencia y similares.

25 El experto en la técnica, por ejemplo, el médico tratante, tiene la posibilidad de administrar fácilmente, al paciente/grupo de pacientes seleccionado y definido en el presente documento, bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia. En determinados contextos, el médico tratante puede modificar, cambiar o rectificar los esquemas de administración para bevacizumab y el régimen de quimioterapia de acuerdo con su experiencia profesional. Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para el tratamiento o mejora de la supervivencia global y/o supervivencia sin progresión de un paciente que padece, o se sospecha que padece, cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, con bevacizumab, con bevacizumab en combinación con un régimen de quimioterapia, por el cual dicho paciente/grupo de pacientes se caracteriza en la evaluación de una muestra biológica del paciente, en particular una
35 muestra de plasma sanguíneo, exhibiendo dicha muestra un nivel de expresión aumentado de uno o más de VEGFA, VEGFR2 Y PLGF con respecto a niveles de control establecidos en pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. En el presente documento también se describe el uso de bevacizumab en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente que padece, o se sospecha que padece, cáncer de
40 mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, en el que los pacientes se seleccionan o se caracterizan por el estado de la proteína marcadora/indicadora desvelada en el presente documento (es decir, uno o más de un nivel de expresión aumentado de VEGFA, VEGFR2 y PLGF con respecto a niveles de control establecidos en pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer de mama, en particular cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico).

45 El experto reconocerá que el descubrimiento de que el nivel de expresión de uno o más de VEGFA, VEGFR2 y PLGF en pacientes con cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, sea predictivo de la sensibilidad, o de la capacidad de respuesta del paciente, a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia puede tener implicaciones para otros cánceres.

50 Las figuras muestran:

Figura 1: Curva de Kaplan Meier de supervivencia sin progresión para la población de biomarcador global para terapia con bevacizumab (dosis alta o baja) más docetaxel frente a terapia con placebo más docetaxel para
55 pacientes que se tratan de cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. La línea de puntos cortos representa placebo más docetaxel. La línea continua representa dosis baja de bevacizumab (7,5 mg/kg cada 3 semanas) más docetaxel. La línea de puntos largos representa dosis alta de bevacizumab (15 mg/kg cada 3 semanas) más docetaxel.

60 Figura 2: Diagrama de bosque de razón de riesgo de supervivencia sin progresión antes de comenzar la terapia antineoplásica posterior con biomarcador (placebo y dosis baja de bevacizumab), un análisis dicotomizado, para terapia con bevacizumab (dosis baja) más docetaxel frente a terapia con placebo más docetaxel para pacientes que se tratan de cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico.

65 Figura 3: Diagrama de bosque de razón de riesgo de supervivencia sin progresión antes de comenzar la terapia antineoplásica posterior con biomarcador (placebo y dosis alta de bevacizumab), un análisis dicotomizado, para

terapia con bevacizumab (dosis alta) más docetaxel frente a terapia con placebo más docetaxel para pacientes que se tratan de cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico.

5
10
Figura 4: Curva de Kaplan Meier de supervivencia sin progresión antes de comenzar la terapia antineoplásica posterior para nivel de expresión bajo (<125 pg/ml) de VEGFA, (Figura 4A), y nivel de expresión alto (≥ 125 pg/ml) de VEGFA, (Figura 4B), para terapia con bevacizumab (dosis baja o alta) más docetaxel frente a terapia con placebo más docetaxel para pacientes que se tratan de cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. La línea de puntos cortos representa placebo más docetaxel. La línea continua representa dosis baja de bevacizumab (7,5 mg/kg cada 3 semanas) más docetaxel. La línea de puntos largos representa dosis alta de bevacizumab (15 mg/kg cada 3 semanas) más docetaxel.

15
20
Figura 5: Curva de Kaplan Meier de supervivencia sin progresión antes de comenzar la terapia antineoplásica posterior para nivel de expresión bajo (<11 ng/ml) de VEGFR2, (Figura 5A), y nivel de expresión alto (≥ 11 ng/ml) de VEGFR2, (Figura 5B), para terapia con bevacizumab (dosis baja o alta) más docetaxel frente a terapia con placebo más docetaxel para pacientes que se tratan de cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. La línea de puntos cortos representa placebo más docetaxel. La línea continua representa dosis baja de bevacizumab (7,5 mg/kg cada 3 semanas) más docetaxel. La línea de puntos largos representa dosis alta de bevacizumab (15 mg/kg cada 3 semanas) más docetaxel.

25
30
Figura 6: Curva de Kaplan Meier de supervivencia sin progresión antes de comenzar la terapia antineoplásica posterior para un nivel de expresión bajo combinado (Fórmula 1 < -0,132) y nivel de expresión alto combinado (Fórmula 1 $\geq -0,132$) de VEGFA y VEGFR2 para terapia con bevacizumab (dosis baja o alta) más docetaxel frente a terapia con placebo más docetaxel para pacientes que se tratan de cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. La línea continua representa placebo más docetaxel. La línea de puntos largos representa dosis baja de bevacizumab (7,5 mg/kg cada 3 semanas) más docetaxel. La línea de puntos cortos representa dosis alta de bevacizumab (15 mg/kg cada 3 semanas) más docetaxel.

35
40
Figura 7: Curva de Kaplan Meier de supervivencia sin progresión antes de comenzar la terapia antineoplásica posterior para nivel de expresión bajo combinado (Fórmula 2 < -0,006) y nivel de expresión alto combinado (Fórmula 2 $\geq -0,006$) de VEGFA y PLGF para terapia con bevacizumab (dosis alta o baja) más docetaxel frente a terapia con placebo más docetaxel para pacientes que se tratan de cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico. La línea continua representa placebo más docetaxel. La línea de puntos largos representa dosis baja de bevacizumab (7,5 mg/kg cada 3 semanas) más docetaxel. La línea de puntos cortos representa dosis alta de bevacizumab (15 mg/kg cada 3 semanas) más docetaxel.

Figura 8: SEQ ID N° 1, secuencia de aminoácidos ejemplar de VEGFA.

Figura 9: SEQ ID N° 2, secuencia de aminoácidos ejemplar de VEGFR2.

40
Figura 10: SEQ ID N° 3, secuencia de aminoácidos ejemplar de PLGF.

Figura 11: Mediciones de concentraciones en aumento de VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ y VEGF₁₈₉ medidas en una microplaca IMPACT.

45
Figura 12: Mediciones de concentraciones en aumento de VEGF₁₁₀, VEGF₁₂₁, y VEGF₁₆₅ medidas usando el ensayo Elecsys® en el analizador automatizado Elecsys®.

50
Figura 13: Datos de muestras de EDTA y citrato de los mismos pacientes medidos dos veces con el ensayo IMPACT. La concentración de VEGFA es aproximadamente 40 % mayor para plasma con EDTA que para Citrato con una correlación Spearman para la comparación del método de EDTA-citrato de aproximadamente 0,8.

55
Figura 14: Se muestran los recuentos (señal de electroquimioluminiscencia, ECL) medidos cuando las concentraciones en aumento de VEGF₁₆₅, producido de manera recombinante en *E. coli* o en células HEK, respectivamente, se midieron en el analizador automatizado Elecsys®.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo ilustrativo no limitante.

Ejemplo 1

60
En el ensayo clínico AVADO (BO17708), pacientes con cáncer de mama HER-2 negativo, localmente avanzado, recurrente o metastásico, no tratados se asignaron al azar con docetaxel 100 mg/m² más bevacizumab 7,5 mg/kg cada 3 semanas (n=248), con bevacizumab 15 mg/kg (n=247) cada tres semanas o con placebo (n=241), véase la Figura 1, véase también Miles, J. Clin. Oncol., 24 de mayo de 2010 (publicado en línea).

65
En este ensayo clínico se disponía de muestras iniciales de plasma sanguíneo de 396 pacientes.

Una investigación del estado de los biomarcadores relacionados con angiogénesis y tumorigénesis reveló que los niveles de expresión de tres biomarcadores con respecto a los niveles de control determinados en toda la población de pacientes con biomarcador se correlacionó con un parámetro de tratamiento mejorado. En particular, los pacientes que presentaban un nivel de expresión más alto de VEGFA con respecto a los niveles de control determinados en toda la población de pacientes con biomarcador, demostraron una supervivencia sin progresión prolongada en respuesta a la adición de bevacizumab a la terapia con docetaxel. Los pacientes que exhibían un nivel de expresión más alto de VEGFR2 con respecto a los niveles de control determinados en toda la población de pacientes con biomarcador, demostraron una supervivencia sin progresión prolongada en respuesta a la adición de bevacizumab a terapia con docetaxel. También, los pacientes que exhibían un nivel de expresión combinada más alto de VEGFA y VEGFR2 con respecto a niveles de control determinados en toda la población de pacientes con biomarcador, demostraron una supervivencia sin progresión prolongada en respuesta a la adición de bevacizumab a terapia con docetaxel. Además, los pacientes que exhibían un nivel de expresión combinada más alto de VEGFA y PLGF con respecto a los niveles de control determinados en toda la población de pacientes, demostraron una supervivencia sin progresión prolongada en respuesta a la adición de bevacizumab a la terapia con docetaxel.

Pacientes y métodos inmunoquímicos

En el estudio BO17708 participó un total de 736 pacientes, y las muestras de plasma sanguíneo de 396 de los participantes estaban disponibles para análisis con biomarcador. Las características iniciales de los 396 pacientes en el análisis con biomarcador y del resto de los pacientes para los cuales no fue posible análisis con biomarcador se proporcionan en la Tabla 1A y en la Tabla 1B.

Tabla 1A. Características iniciales

	biomarcador evaluable N=396	biomarcador no evaluable N=334
Sexo		
Mujer	396 (100 %)	334 (100 %)
n	396	334
Tratamiento aleatorizado		
placebo + docetaxel	129 (33 %)	109 (33 %)
bevacizumab (7,5 mg/kg) + docetaxel	129 (33 %)	118 (35 %)
bevacizumab (15 mg/kg) + docetaxel	138 (35 %)	107 (32 %)
n	396	334
Edad (años)		
Media	54,4	52,8
DT	10,72	10,46
DTM	0,54	0,57
Mediana	55,0	53,0
Min-Máx	29-83	26 - 77
n	396	334
Categoría de edad (años)		
<65	316 (80 %)	288 (86 %)
> = 65	80 (20 %)	46 (14 %)
n	396	334

ES 2 619 590 T3

	biomarcador evaluable N=396	biomarcador no evaluable N=334
Raza		
Blanca	375 (95 %)	234 (70 %)
Negra	4 (1 %)	3 (< 1 %)
Otra	17 (4 %)	97 (29 %)
n	396	334
Peso (kg)		
Media	68,79	67,23
DT	14,097	14,185
DTM	0,708	0,780
Mediana	67,00	66,70
Min-Máx	42,8 - 135,6	37,5 - 121,2
n	396	331
Altura (cm)		
Media	161,79	160,41
DT	7,158	7,351
DTM	0,360	0,402
Mediana	162,00	160,0
Min-Máx	137,0 -189,0	140,0 - 184,0
n	396	334
Estado de Tabaquismo		
Nunca ha fumado	252 (64 %)	232 (70 %)
Ex-fumador	99 (25 %)	61 (18 %)
fumador habitual	44 (11 %)	38 (11 %)
n	395	331
Años fumando un paquete diario		
Media	24,06	33,63
DT	79,907	81,309
DTM	7,294	8,925
Mediana	10,00	15,00
Min-Máx	0,3 - 860,0	0,5 - 720,0
n	120	83

Tabla 1B. Características iniciales

	biomarcador evaluable N=396	biomarcador no evaluable N=334
Área de Superficie Corporal (m ²)		
Media	1,726	1,698
DT	0,1725	0,1796
DTM	0,0087	0,0099
Mediana	1,710	1,700
Min-Máx	1,35 -2,42	1,29 - 2,33
n	396	331
Estado Funcional (ECOG)		
0	247 (63 %)	196 (60 %)
1	143 (37 %)	133 (40 %)
2	1 (<1 %)	-
n	391	329
LVEF		
< = mediana (64)	181 (35 %)	172 (55 %)
> mediana (64)	177 (49 %)	138 (45 %)
n	358	310
Intervalo Sin Enfermedad		
< = 24 meses	138 (35 %)	118 (35 %)
> 24 meses	255 (65 %)	216 (65 %)
n	393	334
Estado ER de Receptor Hormonal		
Negativo	104 (26 %)	103 (31 %)
Positivo	290 (73 %)	229 (69 %)
Desconocido	2 (< 1 %)	2 (< 1 %)
n	396	334
Estado Combinado ER/PgR		
Negativo	81 (21 %)	82 (25 %)
Positivo	314 (79 %)	250 (75 %)
n	395	332
Número de Sitios Metastásicos		

	biomarcador evaluable N=396	biomarcador no evaluable N=334
< 3	209 (53 %)	175 (53 %)
> = 3	183 (47 %)	156 (47 %)
n	392	331

Análisis de plasma sanguíneo

5 Se recogieron muestras de plasma después de la aleatorización y antes de administrar cualquier tratamiento del estudio. Todas las muestras se obtuvieron de pacientes que después se trataron con docetaxel 100 mg/m² más o con bevacitumab 7,5 mg/kg cada tres semanas, con bevacizumab 15 mg/kg cada tres semanas o con placebo hasta la progresión de la enfermedad.

10 Se extrajeron un total de 4,9 ml de sangre en un tubo S-monovette® (EDTA) (o un tubo con plasma citrado para los 16 pacientes con terapia anticoagulante). Inmediatamente después Se mezclaron invirtiendo cuidadosamente el tubo y se centrifugaron durante 30 minutos a aproximadamente 1500 g en una centrífuga (a temperatura ambiente durante 10 minutos). Inmediatamente después de esto, el plasma del sobrenadante se dividió en alícuotas en un tubo de transferencia de polipropileno transparente de 5 ml. Después de esto, el plasma se dividió en alícuotas en dos tubos de almacenamiento de plástico (de aproximadamente 1,25 ml cada uno). Las muestras se conservaron en una posición vertical a -70 °C. En algunos casos, las muestras se conservaron a -20 °C durante hasta un mes y después se llevaron a una temperatura de -70 °C.

20 Las muestras se usaron para medir los niveles de VEGFA, receptor-1 de VEGF (VEGFR1), VEGFR2, PLGF y E-SELECTINA usando una tecnología de microplaca multiparamétrica inmunológica (IMPACT) de Roche Diagnostics GmbH.

Tecnología de ensayo múltiple IMPACT.

25 Roche Profesional Diagnostics (Roche Diagnostics GmbH) ha desarrollado una plataforma multimarcadora con el nombre operativo IMPACT (*Immunological MultiParameter Chip Technology*). Esta tecnología se usó para medir los marcadores de proteína mencionados anteriormente en la sección de "análisis de plasma sanguíneo". La tecnología se basa en una pequeña microplaca de poliestireno fabricada mediante los procedimientos desvelados en los documentos EP 0939319 y EP 1610129. La superficie de la microplaca se cubrió con una capa de estreptavidina, sobre la cual se aplicaron después anticuerpos biotinilados para cada ensayo. Para cada marcador, las aplicaciones de anticuerpos se cargaron en una línea vertical sobre la microplaca. Durante el ensayo, la matriz se exploró con muestras de especímenes que contenían los analitos específicos.

Para los análisis descritos, se usaron microplacas del Lote01

35 El volumen de plasma necesario por espécimen para medir todos los marcadores en una microplaca fue de 8 l, que se aplicó junto con 32 µl de un tampón de incubación (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, Thesit al 0,1 %, albúmina de suero bovino al 0,5 % y Oxyprion al 0,1 % como un agente conservante). Después de la incubación durante 12 minutos y lavado de la microplaca usando un tampón de lavado (Tris 5 mM pH 7,9, Thesit al 0,01 % y Oxyprion al 0,00 %), se añadió la mezcla de anticuerpo monoclonal digoxigenilada (40 µl de tampón de incubación incluyendo una mezcla de los anticuerpos específicos de analito marcados con Digoxigenina) y se incubó durante 6 minutos más para unirse sobre los analitos capturados. El segundo anticuerpo se detectó finalmente con 40 µl de un tampón de reactivo (TAPS 62,5 mM pH 8,7, NaCl 1,25 M, albúmina de suero bovino al 0,5 %, Tween 20 al 0,063 % y Oxyprion al 0,1 %), incluyendo un conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina acoplado con látex fluorescente. Usando este marcador, pudieron detectarse 10 acontecimientos de unión individuales en una sola aplicación, dando como resultado una sensibilidad muy alta justo hasta la concentración fmol/l. Las microplacas se transportaron en la unidad de detección, y una cámara de dispositivo acoplado a carga (CCD) generó una imagen que se transformó en intensidades de señal usando un programa informático especial. Las aplicaciones individuales se localizaron automáticamente en posiciones predefinidas y se cuantificaron mediante análisis de formación de imágenes. Para cada marcador, las líneas de 10-12 aplicaciones se cargaron en las microplacas, y se requirió un mínimo de 5 aplicaciones para determinar la concentración media de las muestras. Las ventajas de la tecnología son la disponibilidad de multiplexar hasta 10 parámetros en un formato de tipo sándwich o competitivo. Los calibradores y las muestras de los pacientes se midieron por duplicado. Se diseñó un proceso que contenía un total de 100 determinaciones, incluyendo 2 multiconroles como un control del proceso. Dado que algunos de los analitos seleccionados reaccionan entre sí (es decir VEGFA y PLGF con VEGFR1 o VEGFR2 o VEGFA forma heterodímeros con PLGF), los 5 analitos se dividieron en tres microplacas diferentes de la siguiente manera:

- Microplaca 1: VEGFA
- Microplaca 2: VEGFR1, VEGFR2, E-Selectina

Microplaca 3: PLGF

Se usaron los siguientes anticuerpos para los diferentes ensayos:

Analito	Anticuerpo de captura	Fabricante	Anticuerpo de detección	Fabricante
VEGFA	<VEGF-A>M-3C5	Bender RELIATech	<VEGF>M-26503	R&D Systems
VEGFR1	<VEGF-R1>M-49560	Roche Diagnostics	<VEGF-R1>M-49543	Roche Diagnostics
VEGFR2	<VEGF-R2>M-89115	R&D Systems	<VEGF-R2>M-89109	R&D Systems
E-Selectina	<E-Selectina>M-BBIG-E5	R&D Systems	<E-Selectina>M-5D11	R&D Systems
PLGF	<PLGF>M-2D6D5	Roche Diagnostics	<PLGF>M-6A11D2	Roche Diagnostics

5

Análisis estadístico

Se usó la mediana de las muestras para dicotomizar valores de biomarcador como inferior (por debajo de la mediana) o superior (en o por encima de la mediana).

10

La proporción de riesgo del efecto del tratamiento en el subgrupo de pacientes con niveles de biomarcador altos o bajos se estimó con un análisis de regresión de cox de riesgo proporcional.

15

Además, se usaron regresiones cox de riesgo proporcional para evaluar la asociación entre el nivel del biomarcador y el efecto del tratamiento. El modelo incluyó las siguientes covaranzas: tratamiento del ensayo clínico, nivel de biomarcador, factores de estratificación binaria (estado ER/PgR, enfermedad medible al inicio, antes de la terapia con taxano adyuvante), término de interacción del tratamiento mediante el nivel de biomarcador. Se usó el ensayo Wald para el término interacción para determinar la asociación entre el nivel biomarcador y el efecto del tratamiento. Se consideró que un valor de P por debajo de 0,05 era significativo.

20

Resultados

Marcadores de plasma sanguíneo

25

En la Tabla 2 se representan las estadísticas descriptivas iniciales de los biomarcadores.

Tabla 2: estadísticas descriptivas de valores (iniciales) de biomarcadores

	VEGFA (pg/ml)	VEGFR2 (ng/ml)	PLGF (pg/ml)
min	20,0	0,1	5,8
cu 25 %	64,5	9,1	17,04
mediana	125,0	11,0	21,31
cu 75 %	240,5	13,4	27,02
máx	3831,1	72,4	282,10
media	216,5	11,6	24,58
dt	322,63	4,58	20,38

30

La Tabla 3 presenta los resultados de los análisis de la asociación de VEGFA o de VEGFR2 con el efecto de tratamiento sobre la supervivencia sin progresión.

Tabla 3

	Dosis baja		Dosis alta	
	HR (IC 95 %)	Interacción valor de p	HR (IC 95 %)	Interacción valor de p
VEGFA bajo	0,96 (0,62 - 1,48)	P=0,0136	0,86 (0,56 - 1,32)	P=0,0808
VEGFA alto	0,52 (0,33 - 0,81)		0,49(0,31 - 0,76)	

	Dosis baja		Dosis alta	
	HR (IC 95 %)	Interacción valor de p	HR (IC 95 %)	Interacción valor de p
VEGFR2 bajo	1,10 (0,73 - 1,67)	P=0,0342	0,75 (0,49 - 1,16)	P=0,2545
VEGFR2 alto	0,46 (0,28 - 0,74)		0,54 (0,35 - 0,85)	

En este análisis, se usaron, para VEGFA, VEGFA bajo (<125 pg/ml) y VEGFA alto (≥125 pg/ml), y para VEGFR2, VEGFR2 bajo (<11 ng/ml) y VEGFR2 alto (≥11 ng/ml).

5 Estos resultados muestran que la Proporción de Riesgo para el efecto del tratamiento es significativamente mejor en el subconjunto de pacientes con VEGFA alto en comparación con pacientes con VEGFA bajo. Estos resultados también muestran que la Proporción de Riesgo para el efecto del tratamiento es significativamente mejor en el subconjunto de pacientes con VEGFR2 alto en comparación con pacientes con VEGFR2 bajo. Se observó la misma
10 tendencia cuando se comparaban dosis bajas y altas de bevacizumab con respecto a placebo, la evidencia estadística de la diferencia entre el subgrupo de biomarcador alto y bajo es más fuerte en los pacientes tratados con una dosis baja de bevacizumab. Por lo tanto, cada uno de VEGFA y VEGFR2 son biomarcadores predictivos independientes para el efecto de tratamiento con bevacizumab sobre la Supervivencia Sin Progresión.

15 La Tabla 4 representa el análisis de la asociación de combinaciones de biomarcadores con el efecto del tratamiento sobre la supervivencia sin progresión para bevacizumab a dosis baja (7,5 mg/kg cada 3 semanas) y para bevacizumab a dosis alta (15 mg/kg cada 3 semanas).

Para este análisis

20 Fórmula 1: $\text{norm}(\text{VEGFA}) + 1,3 * \text{norm}(\text{VEGFR2})$

Fórmula equivalente: $0,71 * \log_2(\text{VEGFA}) + 3,16 * \log_2(\text{VEGFR2}) - 15,6$

y

25 Fórmula 2: $0,25 * \text{norm}(\text{VEGF}) + 0,21 * \text{norm}(\text{PLGF})$

Fórmula equivalente: $0,18 * \log_2(\text{VEGFA}) + 0,42 * \log_2(\text{VEGFR2}) - 3,1$

30 Donde se usa la transformación \log_2 y

$$x_i \rightarrow \text{norm}(x_i) = \frac{\log_2(x_i) - \text{media}(\log_2(x))}{\text{dma}(\log_2(x))}$$

Donde dma es la desviación media absoluta ajustada por un factor de 1,4826.

35 **Tabla 4: asociación con efecto de tratamiento sobre la Supervivencia Sin Progresión (análisis bi-marcador) para una dosis baja (7,5 mg/kg cada 3 semanas) de bevacizumab y para una dosis alta (15 mg/kg cada 3 semanas) de bevacizumab**

	Dosis Baja (7,5 mg/kg) frente a Placebo		Dosis Alta (15 mg/kg) frente a Placebo	
	HR (IC 95 %)	Interacción valor de p	HR (IC 95 %)	Interacción valor de p
VEGFA y VEGFR2 baja	1,1 (0,72,1,69)	0,0077	0,84 (0,54, 1,3)	0,0580
VEGFA y VEGFR2 alta	0,474 (0,3,0,75)		0,483 (0,31,0,76)	
VEGFA y PLGF baja	1,01 (0,65,1,58)	0,037	0,845 (0,53,1,34)	0,12
VEGFA y PLGF alta	0,518 (0,33,0,81)		0,507 (0,33,0,78)	

En este análisis, un nivel de expresión combinada alto de VEGFA y VEGFR2 es la Fórmula 1 $\geq -0,132$ y un nivel de expresión combinada bajo de VEGFA y VEGFR2 es la Fórmula 1 $< -0,132$, y un nivel de expresión combinada alto de VEGFA y PLGF es la Fórmula 2 $\geq -0,006$ y un nivel de expresión combinada bajo de VEGFA y PLGF es la Fórmula 2 $< -0,006$.

Estos resultados muestran que la Proporción de Riesgo para el efecto del tratamiento es significativamente mejor en el subconjunto de pacientes con la combinación VEGFA y VEGFR2 alta en comparación con los pacientes con la combinación VEGFA y VEGFR2 baja. Estos resultados también muestran que la Proporción de Riesgo para el efecto del tratamiento es significativamente mejor en el subconjunto de pacientes con una combinación de VEGFA y PLGF alta en comparación con los pacientes con combinación de VEGFA y PLGF baja. Se observó la misma tendencia cuando se comparaba una dosis baja y alta de bevacizumab con respecto a placebo, la evidencia estadística de la diferencia entre el subgrupo de biomarcador alto y bajo es más fuerte en pacientes tratados con una dosis baja de bevacizumab. Por lo tanto, la combinación de VEGFA y VEGFR2 y la combinación de VEGFA y PLGF son cada una biomarcadores predictivos independientes para el efecto del tratamiento de bevacizumab sobre la Supervivencia Sin Progresión.

El valor predictivo de VEGF-A en el grupo de bevacizumab 15 mg/kg se exploró adicionalmente subdividiendo la cohorte en cuartiles de acuerdo con los niveles de VEGF-A. Los intervalos del índice de confianza del 95 % para todos los cuartiles se solaparon. En el primer cuartil (<64 pg/ml), se observó un efecto de tratamiento muy limitado (proporción de riesgo 0,86). En el cuartil más alto (> 240 pg/ml), la proporción de riesgo para la SSP fue de 0,39 (IC 95 %: 0,19-0,77) y la diferencia en la SSP media fue más pronunciada que en los otros grupos. En general, el punto estimado de los cuartiles muestra una mejora constante en la proporción de riesgo con el aumento de los niveles de VEGF-A. Estos resultados se muestran en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5: SSP de acuerdo con el cuartil de VEGF-A

Meses de SSP Media					
Cuartil VEGF-A	n.º de pacientes	n.º de acontecimientos	Bevacizumab 15 mg/kg + docetaxel	Placebo + docetaxel	HR (IC 95 %)
1º	71	43	8,6	8,3	0,86 (0,47-1,59)
2º	68	43	8,5	7,2	0,75 (0,42-1,44)
3º	65	43	8,4	6,5	0,55 (0,30-1,01)
4º	61	36	10,3	7,5	0,39 (0,19-0,77)

Ejemplo 2 Detección de isoformas más cortas de VEGF-A usando el ensayo IMPACT

Este ejemplo demuestra que, basándose en los anticuerpos usados para la detección de VEGF-A sobre la plataforma IMPACT, las isoformas más cortas de VEGF-A se miden preferencialmente en comparación con las isoformas más largas de VEGF-A.

El ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente en la sección relacionada con la tecnología IMPACT usando los anticuerpos enumerados en la tabla antes de la sección "análisis estadístico".

Se disponía de cuatro formas de VEGF-A diferentes, es decir VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ y VEGF₁₈₉ y se utilizaron en el análisis. VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁ (ambas derivadas de la expresión en *E. coli*) y VEGF₁₆₅ (obtenida de manera recombinante en una línea celular de insecto) se adquirieron en R&D Systems, Minneapolis, EE.UU. y VEGF₁₈₉ se obtuvo en RELIATech, Wolfenbüttel, Alemania. Más tarde resultó que VEGF₁₈₉ parecía ser bastante inestable y que los datos obtenidos con ese material no eran fiables. Como se muestra en la Figura 11, las isoformas más cortas que tenían 111 o 121 aminoácidos, respectivamente, que se habían producido en *E. coli* y que no estaban modificadas secundariamente, por ejemplo, no estaban glucosiladas, se detectaron mejor en comparación con las isoformas más largas con 165 aminoácidos. VEGF₁₆₅ se había obtenido en una línea de células de insecto y estaba al menos parcialmente glucosilada. El producto de escisión por plasmina VEGF₁₁₀ interesante desde un punto de vista biológico, no estaba disponible para el ensayo en este momento, pero se esperaba que la detección de esta isoforma fuese comparable con la observada para la molécula VEGF con 111 aminoácidos.

Ejemplo 3: detección de isoformas cortas de VEGF usando el Analizador Elecsys®

Este ejemplo describe experimentos que demuestran que para detectar isoformas cortas de VEGF en plasma humano, podía usarse un ensayo usando el Analizador Elecsys® y un ensayo correspondiente.

El ensayo con VEGF-A se transfirió desde IMPACT al sistema de diagnóstico *in vitro* automatizado Elecsys® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Se usó el mismo anticuerpo de captura que el del ensayo IMPACT, <hVEGF-A>-3C5 (RELIATech, Wolfenbüttel), aunque el anticuerpo de captura <hVEGF-A>-m25603 (R&D Systems, Minneapolis) usado en el sistema IMPACT se reemplazó por <hVEGF-A>-mA4.6.1 (Genentech, South San Francisco).

Los inmunoensayos ejecutados en el sistema Elecsys® automatizado son inmunoensayos usando electroquimioluminiscencia (ECLIA) como tecnología generadora de señal. En el presente ensayo de tipo sándwich el anticuerpo de captura biotinilado se une a micropartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina y el anticuerpo de detección marcado con rutenio permite la generación de señales. Se incubaron 75 µl de <VEGF-A>-m3C5 marcado con biotina a 1,5 µg/ml y 75 µl de <VEGF-A>MA.4.6.1 marcado con rutenio a 2 µg/ml ambos en tampón de reacción (Tris 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, thesit al 0,1 %, IgG bovina al 0,2 %, albúmina de suero bovino al 1 %) durante 9 minutos con 20 µl de muestra. Se añadieron 30 µl de una suspensión de micropartículas después de los 9 primeros minutos de incubación y después se incubó toda la mezcla durante 9 minutos más. Durante estas etapas de incubación se formó un sándwich de anticuerpo-analito-anticuerpo que se unió a las micropartículas. Finalmente las micropartículas se transfirieron a la cámara de detección del sistema Elecsys para la generación y la lectura de las señales.

La preferencia del producto de escisión/ isoforma del ensayo con VEGF-A en Elecsys® se evaluó con proteínas recombinantes purificadas: VEGF 110 (producidas por escisión con plasmina en Genentech, South San Francisco), VEGF 121 y VEGF 165 (ambas producidos en una línea de célula de insecto y proporcionadas por R&D Systems, Minneapolis). La unión preferencial de las isoformas cortas de VEGF que se había observado con el Ensayo IMPACT® se confirmó en el ensayo Elecsys. Como se muestra en la Figura 12, en el ensayo Elecsys® las isoformas de VEGF 121 y el producto de escisión por plasmina VEGF 110, respectivamente, se detectaron con una sensibilidad aproximadamente 5 veces mayor en comparación con VEGF 165.

Ejemplo 4: detección de isoformas cortas de VEGF en plasma recogido en citrato de sodio y EDTA

Se extrajeron muestras de plasma por pares de pacientes con cáncer de mama HER2+ localmente recurrente o metastásico en un tubo de recogida Monovette con Citrato (5 ml) y Monovette con EDTA (5 ml). A los 30 minutos de la extracción de la sangre, los tubos con la sangre se colocaron en la centrífuga y se centrifugaron a 1500 g a temperatura ambiente durante 10 minutos, hasta que se separaron las células y el plasma. Inmediatamente después de la centrifugación, el plasma se transfirió cuidadosamente a un tubo de transferencia de propileno y después se dividió en alícuotas del mismo modo en 2 tubos de conservación (cada uno a la mitad de volumen de aproximadamente 1,25 ml) usando una pipeta. Los niveles de VEGF-A en las muestras se midieron usando el ensayo IMPACT descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 13, la concentración de VEGFA es aproximadamente 40 % más alta para las muestras de plasma recogidas y conservadas en EDTA en comparación con las muestras de plasma recogidas y conservadas en citrato con una correlación Spearman para CM de Citrato - EDTA de aproximadamente 0,8 para muestras iniciales recogidas antes de tratamiento

Ejemplo 5: medición comparativa de VEGF165 no modificado y modificado en el analizador Elecsys

Este ejemplo describe experimentos que demuestran que para detectar VEGF no modificado en plasma humano puede utilizarse el analizador Elecsys® y un ensayo correspondiente.

El ensayo de VEGF-A se transfirió desde IMPACT al sistema de diagnóstico *in vitro* automatizado Elecsys® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Se usó el mismo anticuerpo de captura que en el ensayo IMPACT, <hVEGF-A>-m3C5 (RELIATech GmbH, Wolfenbüttel), aunque el anticuerpo de detección <hVEGF-A>-m25603 (R&D Systems, Minneapolis) usado en el sistema IMPACT se reemplazó por <hVEGF-A>-mA4.6.1 (Genentech, South San Francisco).

Los inmunoensayos desarrollados en el sistema Elecsys automatizado son inmunoensayos que usan electroquimioluminiscencia (ECLIA) como tecnología generadora de señal. En el presente ensayo de tipo sándwich el anticuerpo de captura marcado con biotina se une a micropartículas magnéticas revestidas con estreptavidina y el ensayo de detección marcado con rutenio permite la generación de señales. Se incubaron 75 µl de <VEGF-A>-m3C5 marcado con biotina a 1,5 µg/ml y 75 µl de <VEGF-A>MA.4.6.1 marcado con rutenio a 2 µg/ml, ambos en tampón de reacción (Tris 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, thesit al 0,1 %, IgG bovina al 0,2 %, albúmina de suero bovino al 1 %) durante 9 minutos con 20 µl de muestra. Se añadieron 30 µl de una suspensión de micropartículas después de los 9 primeros minutos de incubación y la mezcla entera se incubó después durante 9 minutos más. Durante estas etapas de incubación se formó el sándwich anticuerpo-analito-anticuerpo que se unía a las micropartículas. Finalmente las micropartículas se transfirieron a la cámara de detección del sistema Elecsys para la generación y la lectura de la señal.

La preferencia del ensayo Elecsys con VEGF-A se evaluó con proteínas recombinantes purificadas: VEGF165 (producido de manera recombinante en *E. coli* por Peprtech) y VEGF165 (producido de manera recombinante en células HEK en Roche Diagnostics, Alemania). La unión preferencial de VEGF165 no modificado que se había observado con el ensayo IMPACT se confirmó en el ensayo Elecsys. Como se muestra en la Figura 14, en el ensayo Elecsys, el VEGF 165 no modificado se detectó con una sensibilidad aproximadamente 5 veces más alta que el VEGF 165 modificado.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> F. Hoffmann-La Roche AG *et al.*
- <120> Biomarcadores de plasma sanguíneo para terapias de combinación con Bevacizumab para el tratamiento de cáncer de mama
- 15 <130> S2247 PCT S3
- <150> EP 10 17 0008.6
- <151> 19-07-2010
- 20 <160> 3
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 25 <211> 232
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 30

ES 2 619 590 T3

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
 130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
 145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
 165 170 175

Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
 180 185 190

His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
 195 200 205

Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
 210 215 220

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 225 230

<210> 2
 <211> 1356
 <212> PRT

ES 2 619 590 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
1          5          10          15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro
20          25          30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr
35          40          45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
50          55          60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser
65          70          75          80

Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn
85          90          95

Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser
100         105         110

Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser
115         120         125

Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys
130         135         140

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser
145         150         155         160

```

5

ES 2 619 590 T3

Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg
 165 170 175
 Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile
 180 185 190
 Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser
 195 200 205
 Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr
 210 215 220
 Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 225 230 235 240
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 245 250 255
 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 260 265 270
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
 275 280 285
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 290 295 300
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met
 325 330 335
 Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala
 340 345 350
 Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly
 355 360 365
 Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr
 370 375 380
 Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu
 385 390 395 400
 Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val
 405 410 415
 Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val

ES 2 619 590 T3

			420					425					430			
Asp	Ser	Tyr	Gln	Tyr	Gly	Thr	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Tyr	
		435						440				445				
Ala	Ile	Pro	Pro	Pro	His	His	Ile	His	Trp	Tyr	Trp	Gln	Leu	Glu	Glu	
	450					455					460					
Glu	Cys	Ala	Asn	Glu	Pro	Ser	Gln	Ala	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Pro	Tyr	
465					470					475					480	
Pro	Cys	Glu	Glu	Trp	Arg	Ser	Val	Glu	Asp	Phe	Gln	Gly	Gly	Asn	Lys	
				485					490					495		
Ile	Glu	Val	Asn	Lys	Asn	Gln	Phe	Ala	Leu	Ile	Glu	Gly	Lys	Asn	Lys	
			500					505					510			
Thr	Val	Ser	Thr	Leu	Val	Ile	Gln	Ala	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Leu	Tyr	
		515					520						525			
Lys	Cys	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Val	Gly	Arg	Gly	Glu	Arg	Val	Ile	Ser	
	530					535					540					
Phe	His	Val	Thr	Arg	Gly	Pro	Glu	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Asp	Met	Gln	
545					550					555					560	
Pro	Thr	Glu	Gln	Glu	Ser	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Thr	Ala	Asp	Arg	Ser	
				565					570					575		
Thr	Phe	Glu	Asn	Leu	Thr	Trp	Tyr	Lys	Leu	Gly	Pro	Gln	Pro	Leu	Pro	
			580					585					590			
Ile	His	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp	Thr	
		595					600					605				
Leu	Trp	Lys	Leu	Asn	Ala	Thr	Met	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asp	Ile	
	610					615						620				
Leu	Ile	Met	Glu	Leu	Lys	Asn	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Asp	Tyr	
625					630					635					640	
Val	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Arg	Lys	Thr	Lys	Lys	Arg	His	Cys	Val	Val	
				645					650					655		
Arg	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Arg	Val	Ala	Pro	Thr	Ile	Thr	Gly	Asn	
			660					665						670		
Leu	Glu	Asn	Gln	Thr	Thr	Ser	Ile	Gly	Glu	Ser	Ile	Glu	Val	Ser	Cys	
		675					680					685				

ES 2 619 590 T3

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn
 690 695 700

Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg
 705 710 715 720

Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr
 725 730 735

Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe
 740 745 750

Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu
 755 760 765

Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile
 770 775 780

Ile Leu Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Gly Gly Glu Leu Lys Thr Gly
 785 790 795 800

Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu His
 805 810 815

Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp
 820 825 830

Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val
 835 840 845

Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Arg Thr
 850 855 860

Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg
 865 870 875 880

Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu
 885 890 895

Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu
 900 905 910

Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu
 915 920 925

Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Thr Lys Gly Ala Arg
 930 935 940

ES 2 619 590 T3

Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys
 945 950 955 960

Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly
 965 970 975

Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro
 980 985 990

Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys T
 995 1000 1005

Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys
 1010 1015 1020

Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu
 1025 1030 1035

Lys Asn Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile
 1040 1045 1050

Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro
 1055 1060 1065

Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr
 1070 1075 1080

Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
 1085 1090 1095

Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu
 1100 1105 1110

Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro
 1115 1120 1125

Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp
 1130 1135 1140

His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Ser Glu Leu Val Glu
 1145 1150 1155

His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala Gln Gln Asp Gly Lys
 1160 1165 1170

Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu Ser Met Glu Glu
 1175 1180 1185

ES 2 619 590 T3

Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser Cys Met Glu
 1190 1195 1200

 Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn Thr Ala
 1205 1210 1215

 Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg Pro
 1220 1225 1230

 Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu
 1235 1240 1245

 Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val
 1250 1255 1260

 Leu Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu
 1265 1270 1275

 Ser Pro Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser
 1280 1285 1290

 Val Ala Ser Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly
 1295 1300 1305

 Tyr His Ser Asp Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu
 1310 1315 1320

 Ala Glu Leu Leu Lys Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser
 1325 1330 1335

 Thr Ala Gln Ile Leu Gln Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser
 1340 1345 1350

 Pro Pro Val
 1355

5 <210> 3
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 3

ES 2 619 590 T3

Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe Leu Gln Leu Leu Ala Gly
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
 20 25 30

Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
 35 40 45

Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
 50 55 60

Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
 65 70 75 80

Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
 85 90 95

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
 100 105 110

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
 115 120 125

Glu Cys Arg His Ser Pro Gly Arg Gln Ser Pro Asp Met Pro Gly Asp
 130 135 140

Phe Arg Ala Asp Ala Pro Ser Phe Leu Pro Pro Arg Arg Ser Leu Pro
 145 150 155 160

Met Leu Phe Arg Met Glu Trp Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ser Gln Ser
 165 170 175

Ala Val Trp Pro Ser Ser Pro Val Pro Glu Glu Ile Pro Arg Met His
 180 185 190

Pro Gly Arg Asn Gly Lys Lys Gln Gln Arg Lys Pro Leu Arg Glu Lys
 195 200 205

Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
 210 215 220

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para la identificación de un paciente con capacidad de respuesta o sensible a la adición de un tratamiento de bevacizumab a un régimen de quimioterapia, comprendiendo dicho método determinar el nivel de expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 o VEGFA y PLGF en una muestra de plasma sanguíneo de un paciente que se sospecha que padece, o que es propenso a padecer, cáncer de mama, mediante el cual un nivel de expresión combinada aumentado de VEGFA y de VEGFR2 o de VEGFA y de PLGF con respecto a niveles de expresión combinada de control determinados en pacientes que padecen cáncer de mama, es indicativo de una sensibilidad del paciente a la adición de bevacizumab a dicho régimen de quimioterapia.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la dosis de bevacizumab administrada es una dosis baja de bevacizumab.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en el que la dosis baja de bevacizumab es de 7,5 mg/kg de peso corporal cada 3 semanas.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la dosis de bevacizumab administrada es una dosis alta de bevacizumab.
- 20 5. El método de la reivindicación 4, en el que la dosis alta de bevacizumab es de 15 mg/kg de peso corporal cada 3 semanas o de 10 mg/kg de peso corporal cada 2 semanas.
- 25 6. Un método de predicción *in vitro* de la respuesta o la sensibilidad a la adición de bevacizumab a un régimen de quimioterapia de un paciente que se sospecha que padece, que padece o que es propenso a padecer cáncer de mama, que comprende determinar el nivel de expresión combinada de las proteínas VEGFA y VEGFR2 o VEGFA y PLGF en una muestra de plasma sanguíneo.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho nivel de expresión se detecta mediante un método de inmunoensayo.
8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho método de inmunoensayo es ELISA.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha muestra del paciente es una muestra de plasma sanguíneo.
- 35 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho cáncer de mama es cáncer de mama HER-2 negativo localmente avanzado, recurrente o metastásico.
- 40 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho régimen de quimioterapia comprende docetaxel o paclitaxel.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho paciente se está tratando conjuntamente con una o más terapias anticancerosas.
- 45 13. El método de la reivindicación 12, en el que dicha terapia anticancerosa es radiación.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha muestra se obtiene antes o después de terapia neoadyuvante o adyuvante.

Figura 1

Supervivencia Sin Progresión Antes de Iniciar la Terapia Antineoplásica
Población Evaluable con Biomarcador

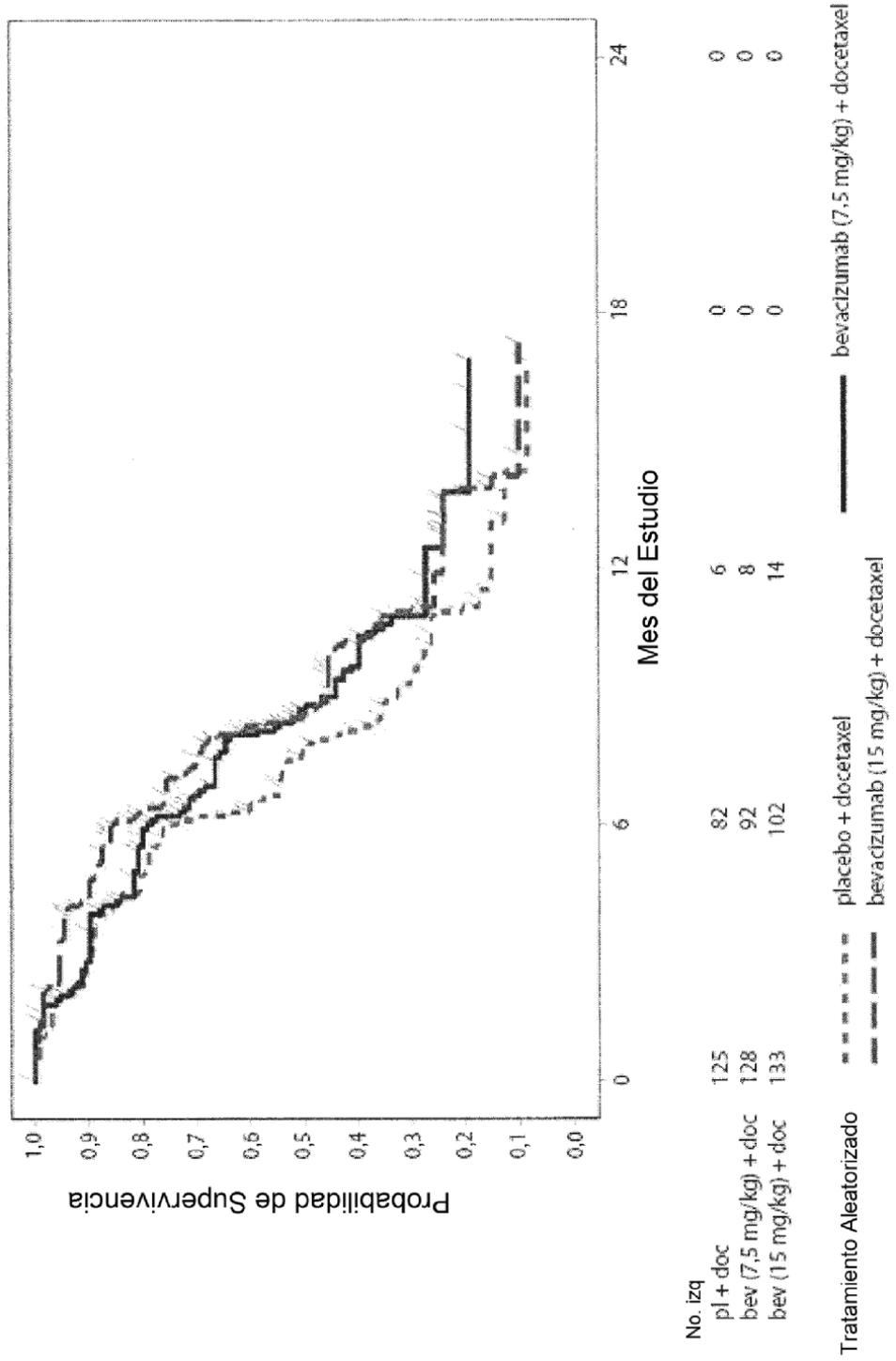
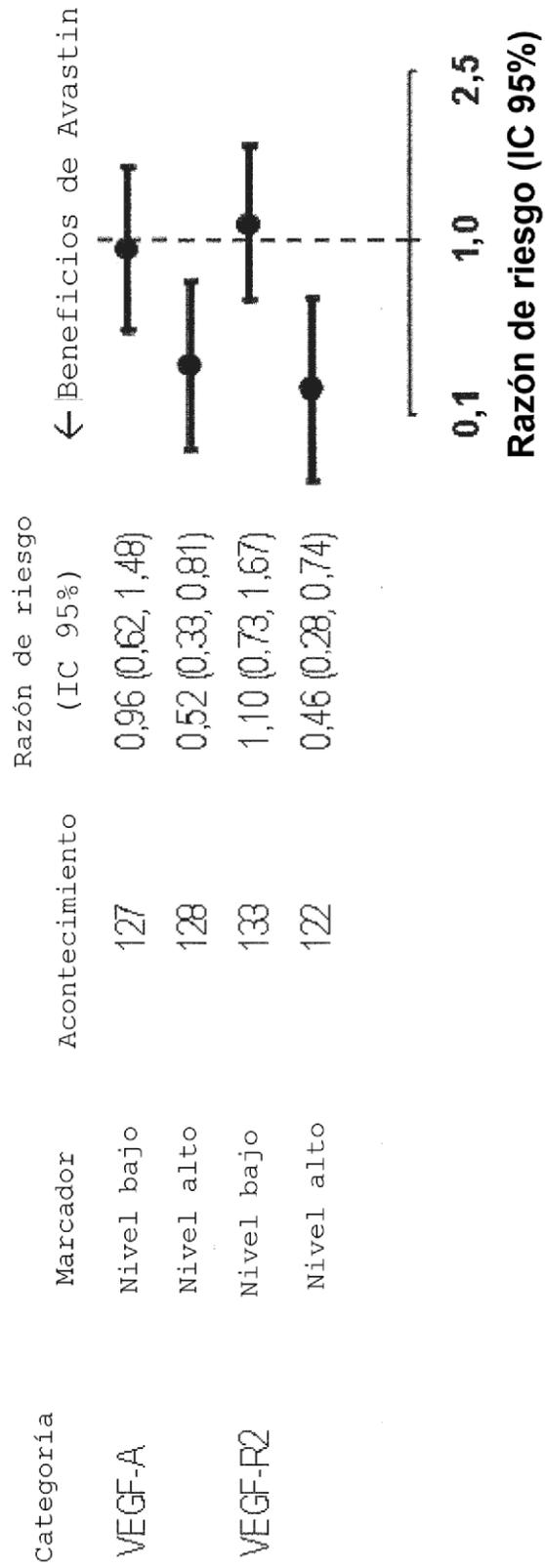
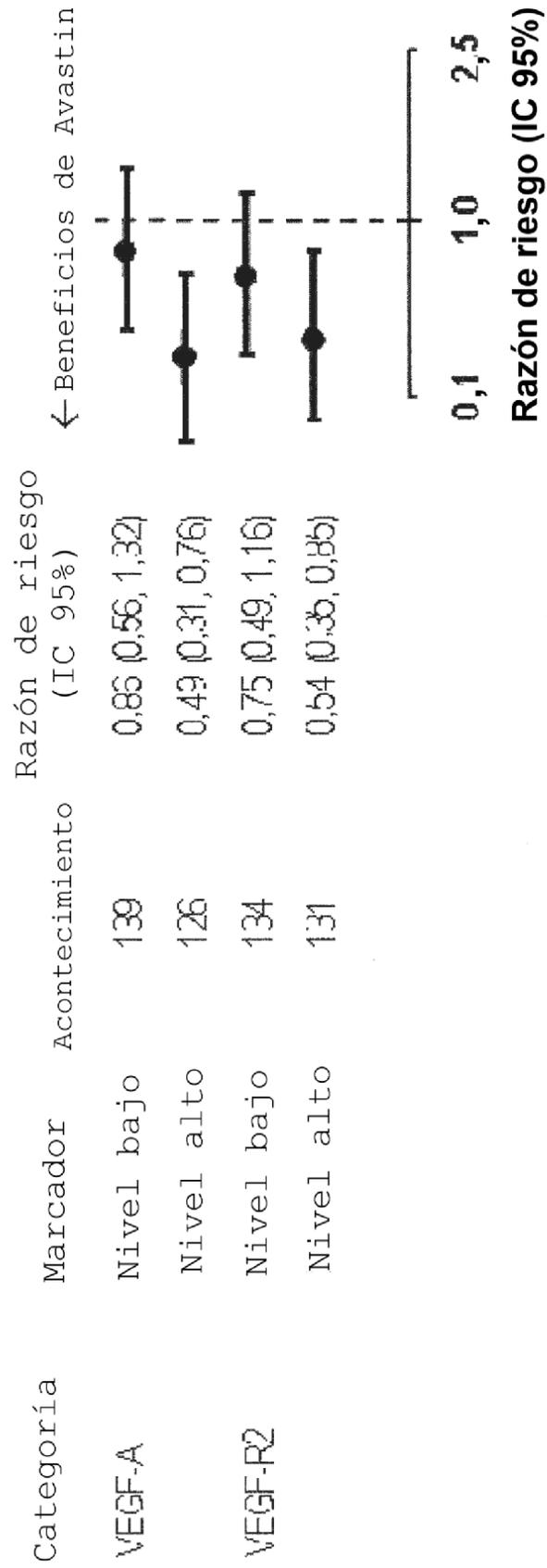


Figura 2



Terapia Antineoplásica con Biomarcador (Placebo y Dosis Baja de Avastin)

Figura 3



Terapia Antineoplásica con Biomarcador (Placebo y Dosis Alta de Avastin)

Figura 4A

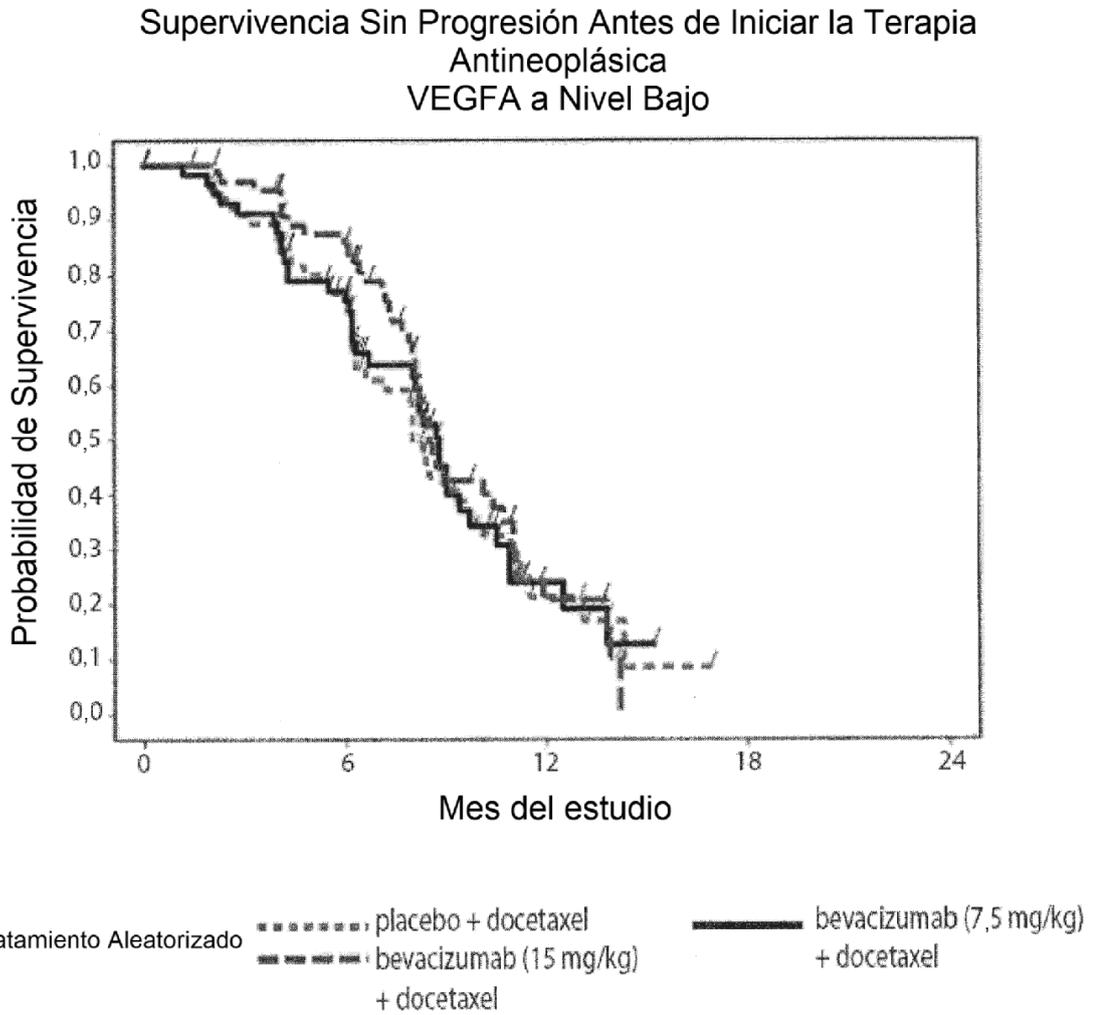


Figura 4B

Supervivencia Sin Progresión Antes de Iniciar la Terapia Antineoplásica VEGFA a Nivel Alto

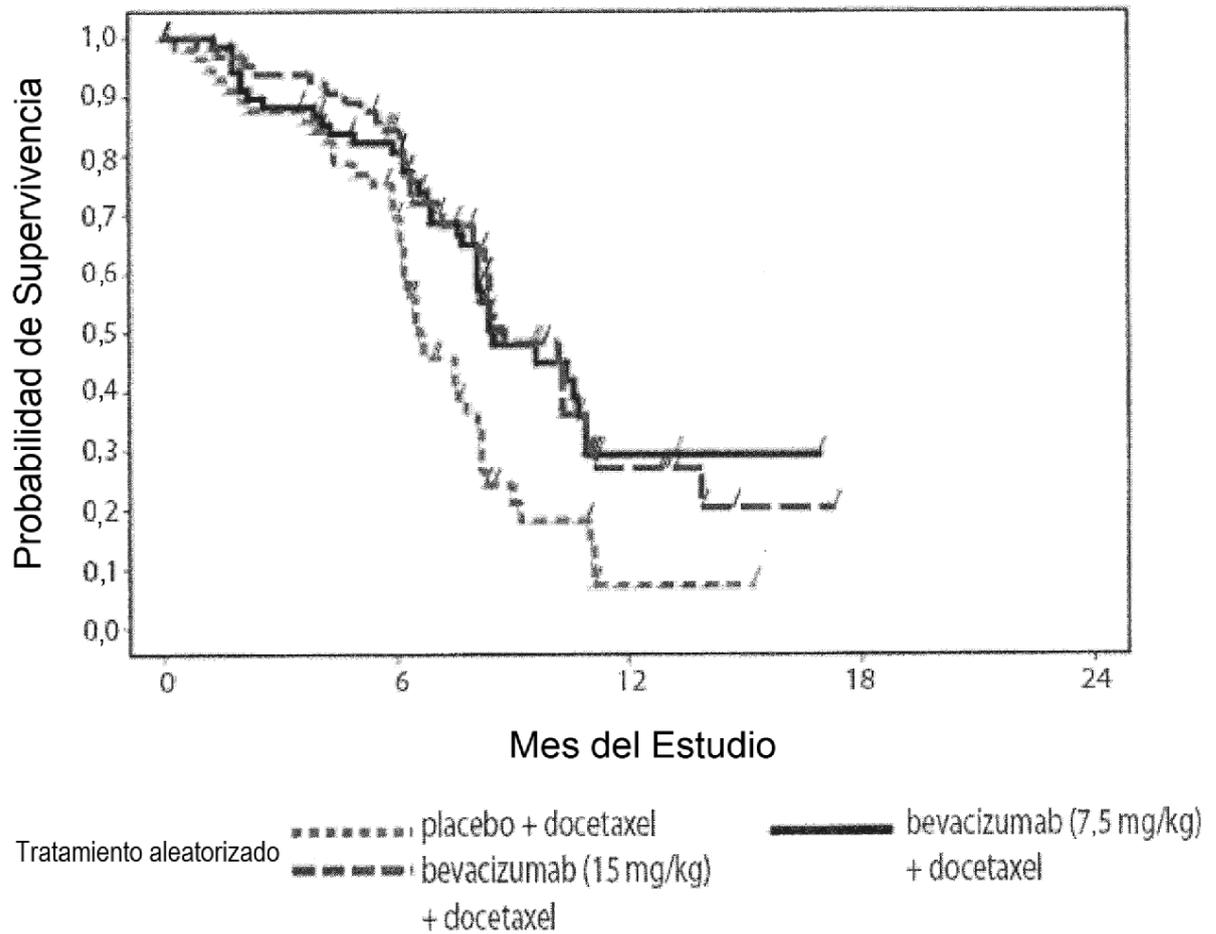
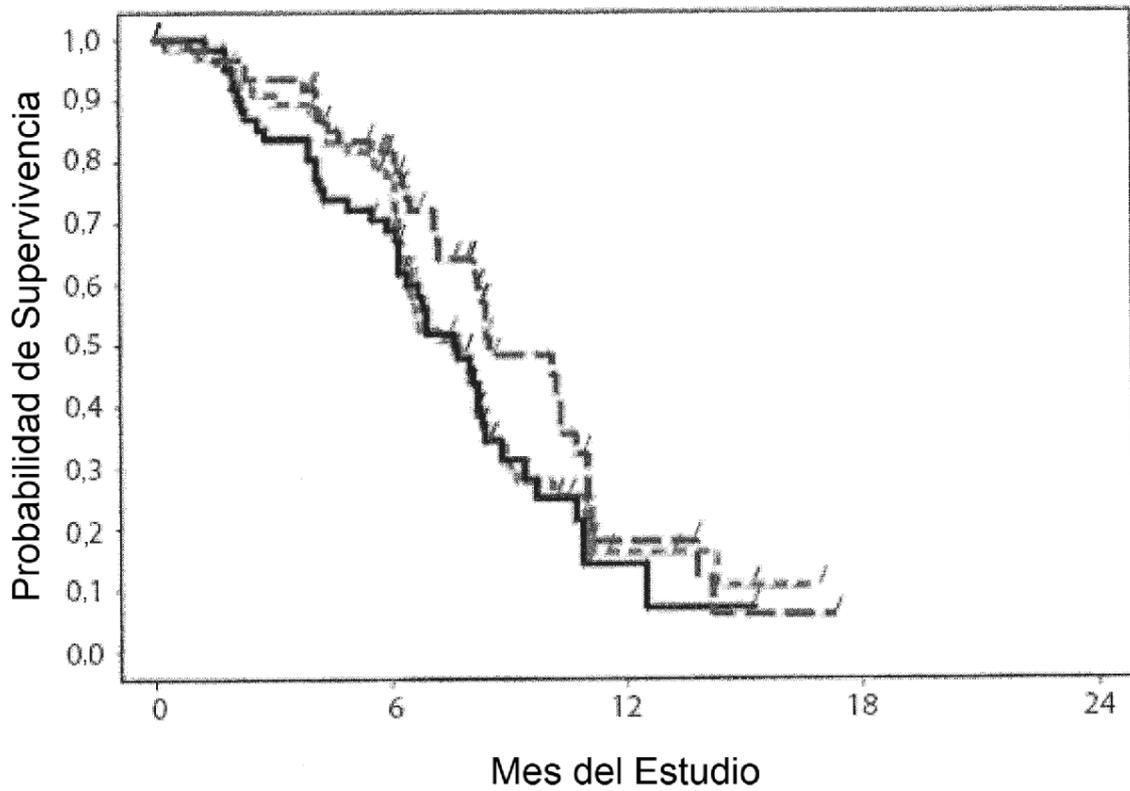


Figura 5A

Supervivencia Sin Progresión Antes de Iniciar la Terapia Antineoplásica VEGFR2 a Nivel Bajo

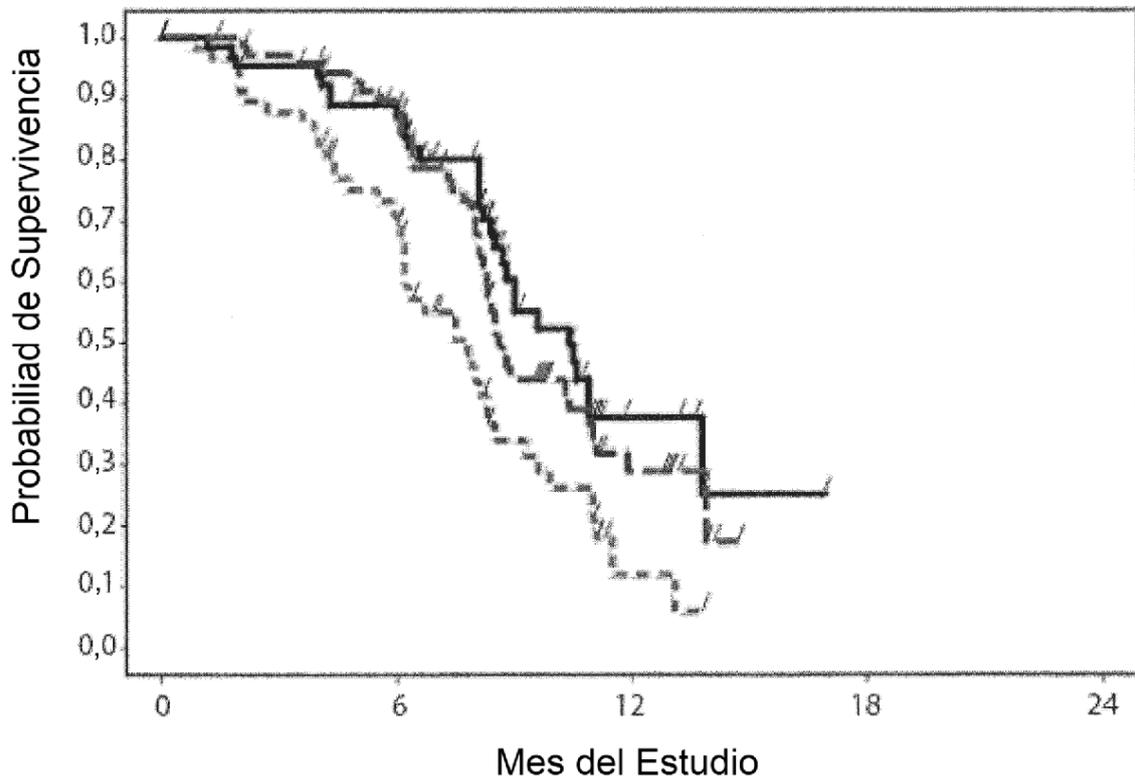


Tratamiento Aleatorizado

- placebo + docetaxel
- - - - - bevacizumab (15 mg/kg) + docetaxel
- bevacizumab (7,5 mg/kg) + docetaxel

Figura 5B

Supervivencia Sin Progresión Antes de Iniciar Terapia Antineoplásica VEGFR2 a Nivel Alto

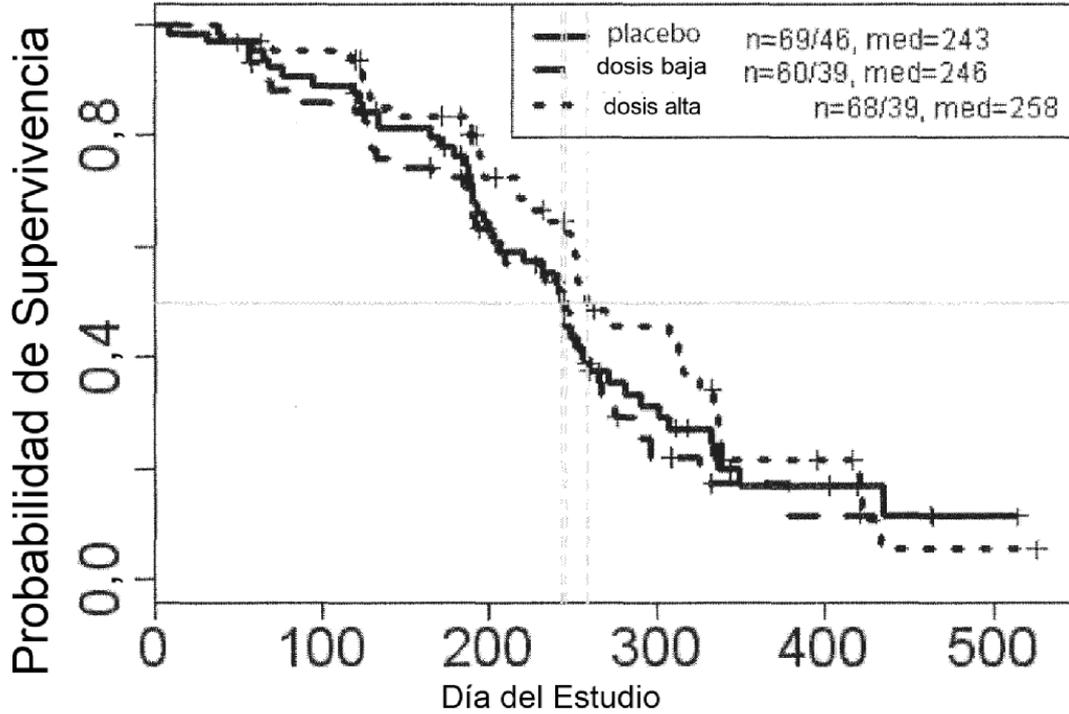


Tratamiento Aleatorizado

- placebo + docetaxel
- - - - - bevacizumab (15 mg/kg) + docetaxel
- bevacizumab (7,5 mg/kg) + docetaxel

Figura 6

Efecto de bevacizumab en pacientes con dosis baja de VEGFA y VEGFR2.
Supervivencia Sin Progresión



Efecto de bevacizumab en pacientes con dosis alta de VEGFA y VEGFR2.
Supervivencia Sin Progresión

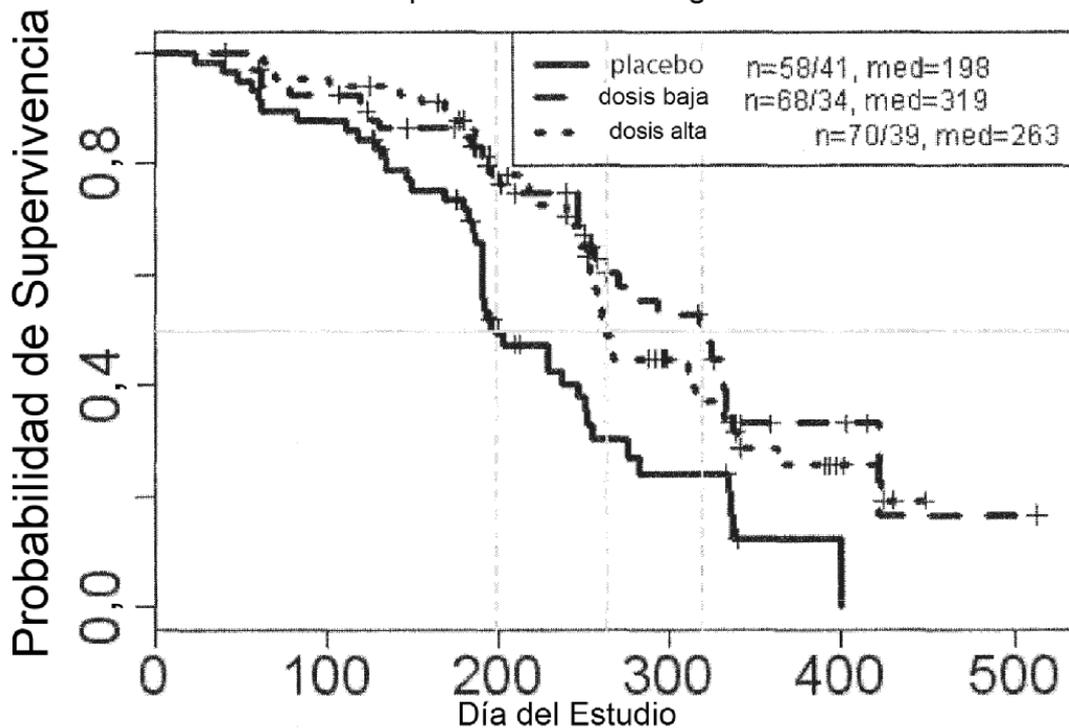
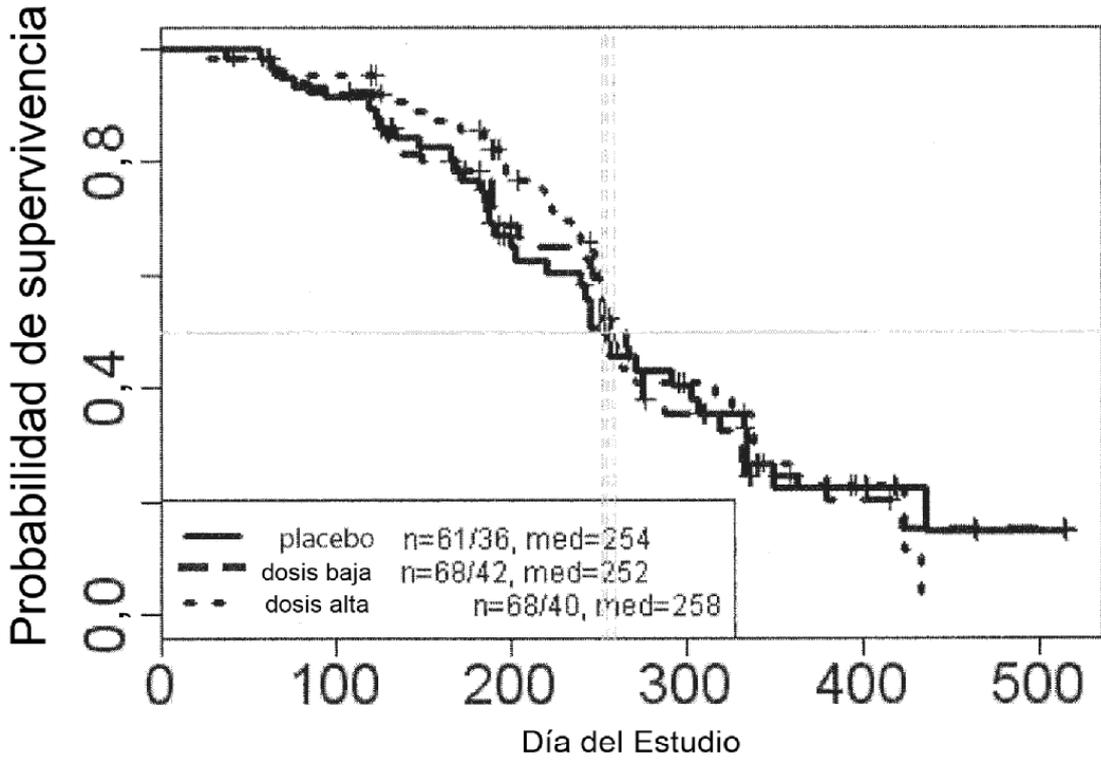


Figura 7

Efecto de bevacizumab en pacientes con dosis baja de VEGFA y PLGF
Supervivencia Sin Progresión



Efecto de bevacizumab en pacientes con dosis alta de VEGFA y PLGF
Supervivencia Sin Progresión

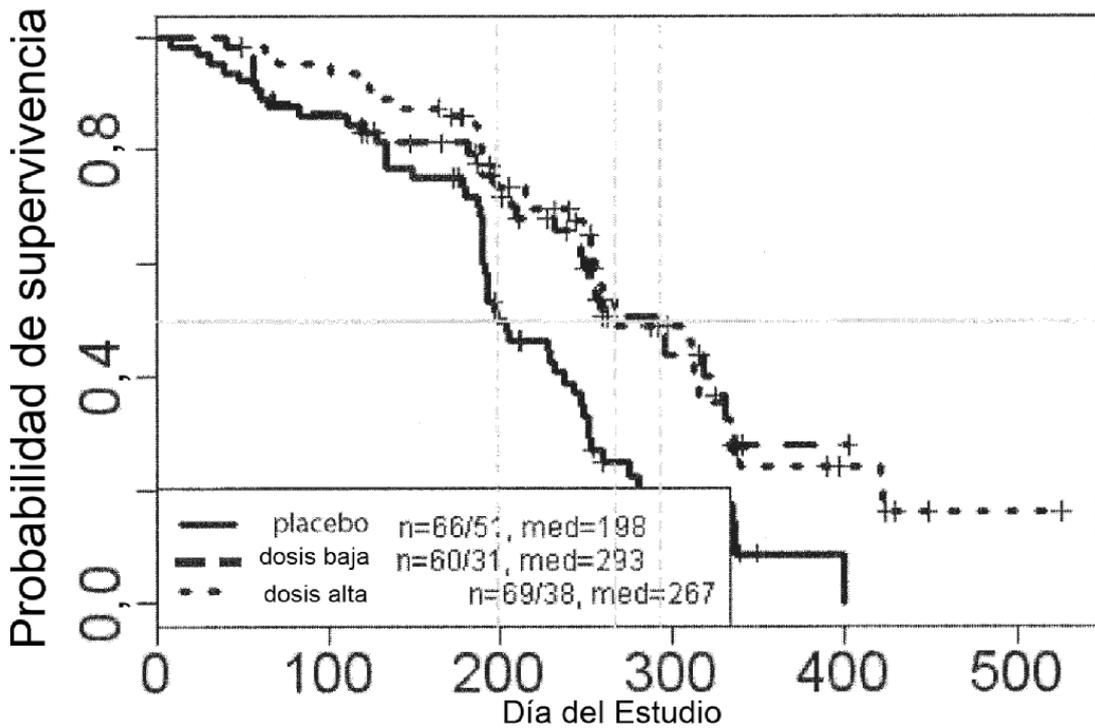


Figura 8: SEQ ID NO:1, Secuencia de aminoácidos ejemplar de VEGFA.

10 20 30 40 50 60
 MNFLLSVHW SLALLLYLHH AKWSQAAPMA EGGGQNHHEV VKFMDVYQRS YCHPIETLVD

70 80 90 100 110 120
 IFQEYPDEIE YIFKPSCVPL MRCGGCCNDE GLECVPTTEES NITMQIMRIK PHQGQHIGEM

130 140 150 160 170 180
 SFLQHNKCEC RPKKDRARQE KKSVRGKGKG QKRKRKKSRY KSWSVYVGAR CCLMPWSLPG

190 200 210 220 230
 PHPCGPCSER RKHLFVQDPQ TCKCCKNTD SRCKARQLEL NERTCRCDKP RR

Figura 9: SEQ ID NO:2, Secuencia de aminoácidos ejemplar de VEGFR2.

10 20 30 40 50 60
 MQSKVLLAVA LWLCVETRAA SVGLPSVSLD LPRLSIQKDI LTIKANTTLQ ITCRGQRDL

70 80 90 100 110 120
 WLWPNQSGS EQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGA YKCFYRETDL ASVIYVYVQD

130 140 150 160 170 180
 YRSPFIASVS DQHGVMYITE NKNKTVVIPC LGSISNLNVS LCARYPEKRF VPDGNRISWD

190 200 210 220 230 240
 SKKGFTIPSY MISYAGMVFC EAKINDESYQ SIMYIVVVVG YRIYDVVLSH SHGIELSVGE

250 260 270 280 290 300
 KLVLNCTART ELNVGIDENW EYPSSKHQHK KLVNRDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRS

310 320 330 340 350 360
 DQGLYTCAAS SGLMTKKNST FVRVHEKPFV AFGSGMESLV EATVGERVRI PAKYLGYP

370 380 390 400 410 420
 EIKWYKNGIP LESNHTIKAG HVLTIMEVSE RDTGNYTVIL TNPISKEKQS HVVSLVVYVP

430 440 450 460 470 480
 PQIGEKSLIS PVDSYQYGT QTLTCTVYAI PPPHHIHWYW QLEEECANEP SQAVSVTNPY

490 500 510 520 530 540
 PCEEWRSVED FQGGNKIEVN KNQFALIEGK NKTVSTLVIQ AANVSALYKC EAVNKVGRGE

550 560 570 580 590 600
 RVISFHVTRG PEITLQPD MQ PTEQESVSLW CTADRSTFEN LTWYKLGQP LPIHVGELPT

610 620 630 640 650 660
 PVCKNLDTLW KLNATMFSNS TNDILIMELK NASLQDQGDY VCLAQDRKTK KRHCVVRQLT

670 680 690 700 710 720
 VLERVAPTIT GNLENQTTSI GESIEVSCTA SGNPPPQIMW FKDNETLVED SGIVLKDGNR

Figura 9 (continuación): SEQ ID NO:2, Secuencia de aminoácidos ejemplar de VEGFR2.

<u>730</u>	<u>740</u>	<u>750</u>	<u>760</u>	<u>770</u>	<u>780</u>
NLTI RR VRKE	DEGLYTCQAC	SVLGCAKVEA	FFIIIEGAQEK	TNLEIIIIILVG	TAVIAMFFWL
<u>790</u>	<u>800</u>	<u>810</u>	<u>820</u>	<u>830</u>	<u>840</u>
LLVIILRTVK	RANGGELKTG	YLSIVMDPDE	LPLDEHCERL	PYDASKWEFP	RDRLKLGKPL
<u>850</u>	<u>860</u>	<u>870</u>	<u>880</u>	<u>890</u>	<u>900</u>
GRGAFGQVIE	ADAFGIDKTA	TCRTVAVKML	KEGATHSEHR	ALMSELKILI	HIGHHLNVVN
<u>910</u>	<u>920</u>	<u>930</u>	<u>940</u>	<u>950</u>	<u>960</u>
LLGACTKPGG	PLMVIVEFCK	FGNLSTYLRS	KRNEFV VP YKT	KGARFRQ GK D	YVGAIPVDLK
<u>970</u>	<u>980</u>	<u>990</u>	<u>1000</u>	<u>1010</u>	<u>1020</u>
RRLDSITSSQ	SSASSGFVEE	KSLSDVEEEE	APEDLYKDFL	TLEHLICYSF	QVAKGMEFLA
<u>1030</u>	<u>1040</u>	<u>1050</u>	<u>1060</u>	<u>1070</u>	<u>1080</u>
SRKCIHRDLA	ARNILLSEKN	VVKICDFGLA	RDIYKDPDYV	RKGDARLPLK	WMA PET IFDR
<u>1090</u>	<u>1100</u>	<u>1110</u>	<u>1120</u>	<u>1130</u>	<u>1140</u>
VYTIQSDVWS	FGVLLWEIFS	LGASPYPGVK	IDEEFCRRLK	EGTRMRAPDY	TTPEMYQTML
<u>1150</u>	<u>1160</u>	<u>1170</u>	<u>1180</u>	<u>1190</u>	<u>1200</u>
DCWHGEP SQR	PTFSELVEHL	G NLLQANAQ Q	DGKDYIVLPI	SETLSMEEDS	GLSLPTSPVS
<u>1210</u>	<u>1220</u>	<u>1230</u>	<u>1240</u>	<u>1250</u>	<u>1260</u>
CMEEEEVCDP	KFHYDNTAGI	SQYLQNSKRK	SRPVS VK TFE	DIPLEEPEVK	VIPDDNQTDS
<u>1270</u>	<u>1280</u>	<u>1290</u>	<u>1300</u>	<u>1310</u>	<u>1320</u>
GMVLASEELK	TLEDRTKLSP	SFGGMVPSKS	RESVASEGSN	QTSGYQSGYH	SDDTDTTVYS
<u>1330</u>	<u>1340</u>	<u>1350</u>			
SEEAELKLI	EIGVQTGSTA	QILQPDSGTT	LSSPPV		

Figura 10: SEQ ID NO:3, Secuencia de aminoácidos ejemplar de PLGF.

10 20 30 40 50 60
MPVMRLFPFCF LQLLAGLALP AVPPQQWALS AGNGSSEVEV VPFQEVWGRS YCRALERLVD

70 80 90 100 110 120
VVSEYPSEVE HMFSPSCVSL LRCTGCCGDE NLHCVPVETA NVTMQLLKIR SGDRPSYVEL

130 140 150 160 170 180
TFSQHVRCEC RHSPGRQSPD MPGDFRADAP SFLPPRRSLP MLFRMEWGCA LTGSQSAVWP

190 200 210 220
SSPVPEEIIPR MHPGRNGKKQ QRKPLREKMK PERCGDAVPR R

Figura 11:

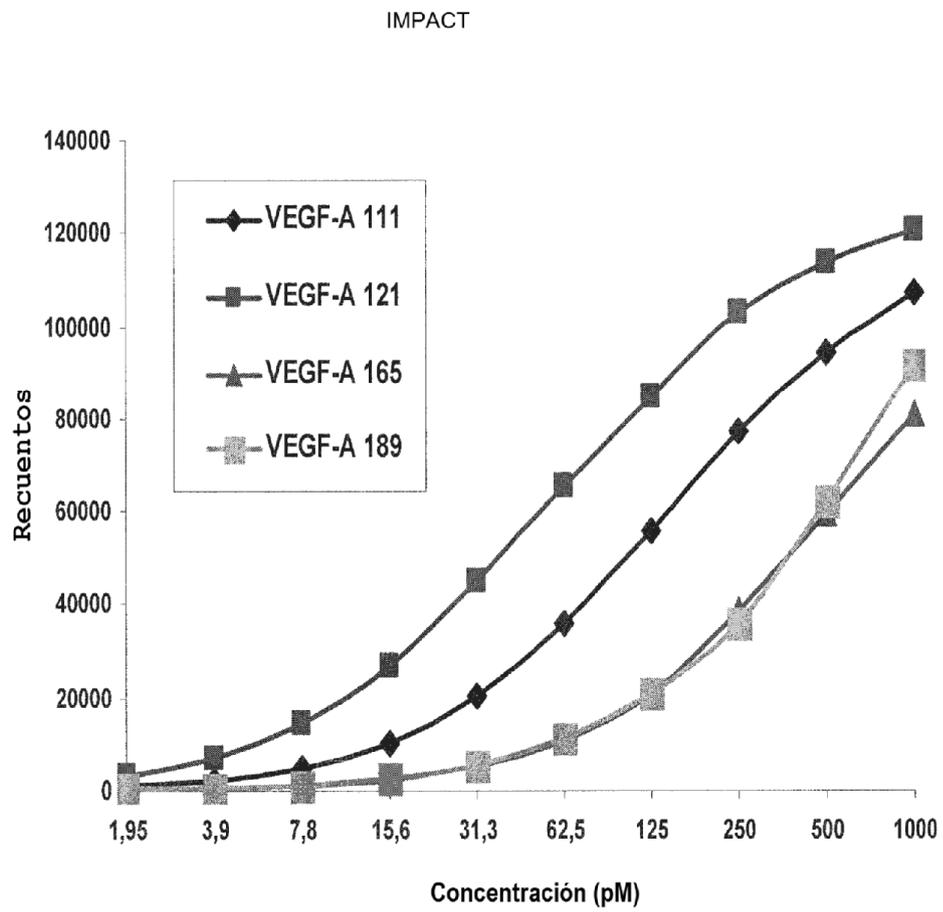


Figura 12:

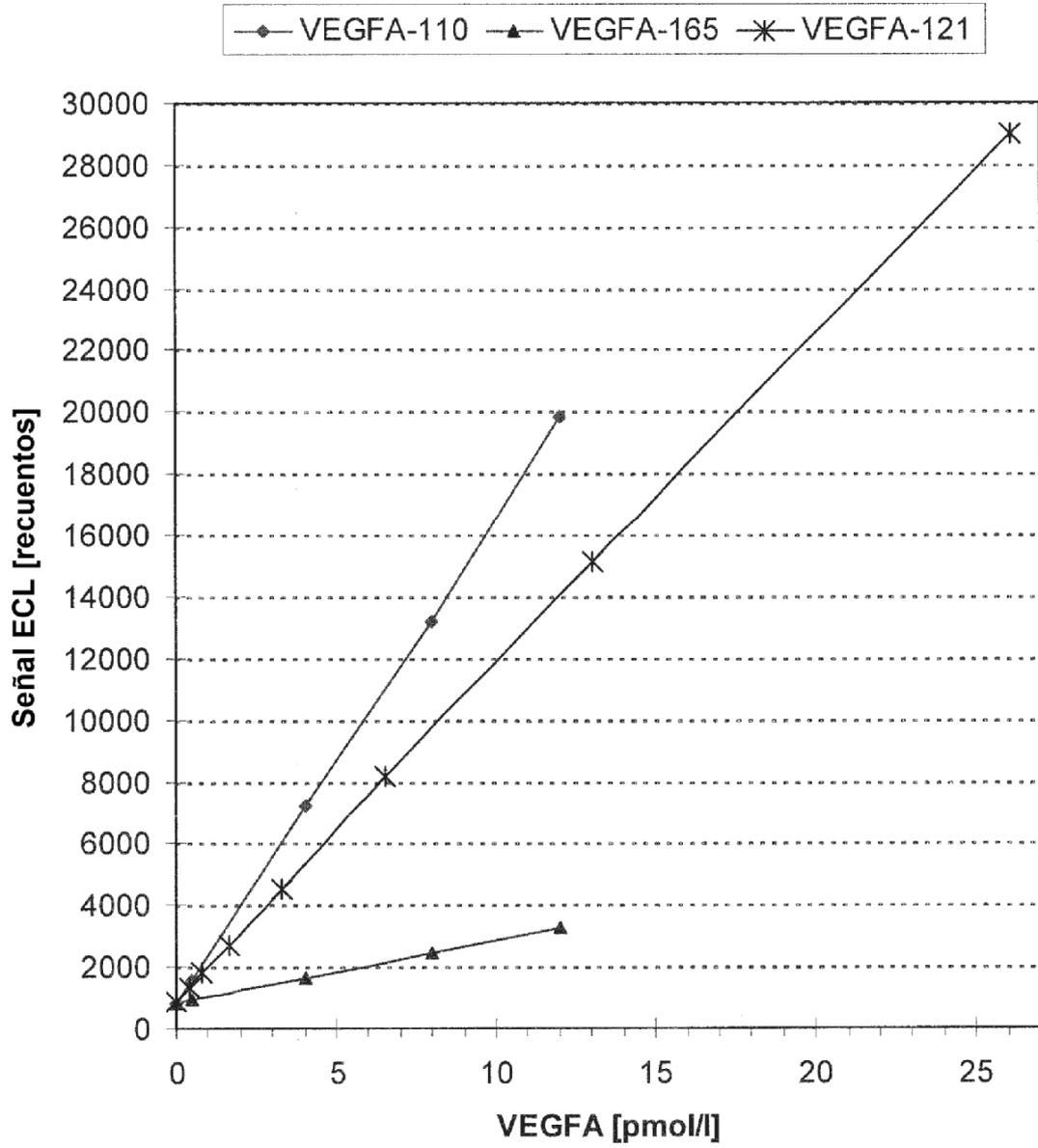


Figura 13:

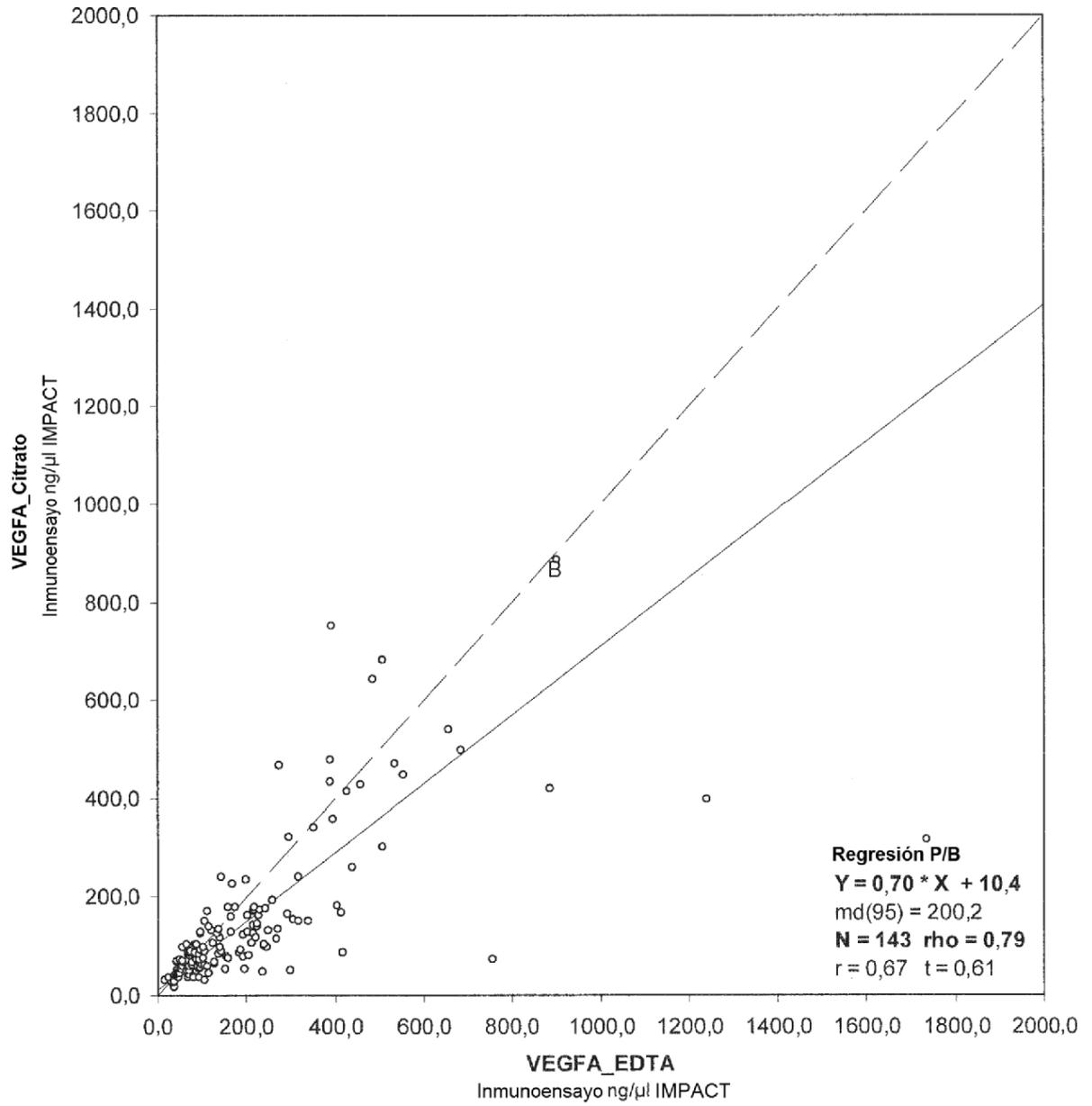


Figura 14:

