

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 723**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2009 PCT/EP2009/059505**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2010 WO10010153**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2009 E 09800069 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2321651**

54 Título: **Identificación de sujetos susceptibles de tratamiento antiangiogénico**

30 Prioridad:

**23.07.2008 EP 08161014**

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

**30.11.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HESS, GEORG;  
HORSCH, ANDREA y  
ZDUNEK, DIETMAR**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 644 723 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

Identificación de sujetos susceptibles de tratamiento antiangiogénico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar un sujeto susceptible de tratamiento antiangiogénico basado en la determinación de la cantidad de troponina cardíaca en una muestra de dicho sujeto y la comparación de dicha cantidad con una cantidad de referencia adecuada. También se incluyen en la presente invención kits y dispositivos adaptados para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención.

10 Un objetivo de la medicina moderna es proporcionar regímenes de tratamiento personalizados o individualizados. Se trata de regímenes de tratamiento que tienen en cuenta las necesidades o riesgos individuales del paciente. Los trastornos hiperproliferativos tienen, en muchos casos, un impacto grave en la fisiología humana o animal. Muchas enfermedades graves, como el cáncer, son provocadas por la proliferación no deseada y aumentada de las células. Específicamente, las enfermedades cancerosas comprenden algunas de las afecciones médicas más amenazantes para la vida, como los carcinomas pulmonares que son una de las principales causas de muerte por cáncer en humanos.

Existen varias estrategias para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. Un tratamiento nuevo y muy prometedor contra el cáncer es el tratamiento antiangiogénico. El principio subyacente al tratamiento antiangiogénico es que los tumores solo pueden crecer si se están formando nuevos vasos sanguíneos dentro de los vasos sanguíneos. Al detener el crecimiento de los vasos sanguíneos dentro de los tumores con inhibidores de angiogénesis, se reducen significativamente los medios por los cuales los tumores se pueden extender y diseminar dentro del cuerpo. La administración del inhibidor de angiogénesis bevacizumab (Avastin) fue el primer tratamiento biológico aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés), diseñado para inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos en los tumores. El propio bevacizumab es un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se demostró, por ejemplo, que bevacizumab mejora significativamente la supervivencia en el cáncer colorrectal metastásico. La FDA también ha aprobado otros fármacos antiangiogénicos para el tratamiento contra el cáncer, por ejemplo, para mieloma múltiple, linfoma de células del manto, tumores del estroma gastrointestinal y cáncer de riñón. Más tratamientos antiangiogénicos contra el cáncer están pendientes de aprobación.

Los grandes efectos beneficiosos del tratamiento de pacientes con cáncer con fármacos antiangiogénicos, sin embargo, están siendo obstaculizados por algunos problemas. Existen pruebas de que un tratamiento que inhibe la formación de nuevos vasos tiene efectos secundarios adversos (particularmente complicaciones cardiovasculares) y, por lo tanto, puede poner en riesgo a algunos pacientes. En consecuencia, se demostró que, por ejemplo, el sorafenib induce síndromes coronarios agudos en un 2,9 % de los pacientes tratados con sorafenib (2007, *Annals of Oncology*, Volumen 18. N.º 11, 1906-1907).

DOLCI A. *ET AL.*: "Biochemical markers for predicting chemotherapy induced cardiotoxicity: Systematic review of the literature and recommendations for use", *GIORNALE ITALIANO DI CARDIOLOGIA* 200609 IT, vol. 7, n.º 9, septiembre 2006 (2006-09), páginas 604-611, divulgan que la quimioterapia se ve a menudo limitada clínicamente por la cardiotoxicidad que conduce a cardiomiopatía que evoluciona hacia una insuficiencia cardíaca. Se menciona que las troponinas cardíacas muestran una alta eficacia diagnóstica en la fase subclínica temprana de la enfermedad y se vuelven positivas aproximadamente 3 meses antes del inicio clínico de una cardiomiopatía. Su aumento puede predecir la aparición de eventos cardíacos graves durante el seguimiento.

O'BRIEN P.J.: "Blood cardiac troponin in toxic myocardial injury: Archetype of a translational safety biomarker", *EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS* 2006 GB, vol. 6, n.º 5, 2006, páginas 685-702, divulga que varios agentes antineoplásicos son cardiotóxicos y que se necesita un biomarcador de seguridad para lesiones miocárdicas. En este contexto, se mencionan las troponinas cardíacas.

LANGER B. *ET AL.*: "Prospective investigation of the significance of cardiac markers, NT-pro Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP) and Troponin T (TnT), in the HERCULES study of epirubicin/cyclophosphamide with or without trastuzumab (Herceptin(R))", *EJC SUPPLEMENTS*, vol. 2, n.º 3, marzo de 2004 (2004-03), página 143, y REUNIÓN DEL GRUPO EUROPEO DE DETECCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA - DETECCIÓN DEL CÁNCER DE MAMA EN EUROPA –ESTADO ACTUAL; 16 A 20 DE MARZO DE 2004 ISSN: 1359-6349 divulgan los resultados de un estudio sobre la importancia de NT-proBNP y troponina T en pacientes que recibieron epirubicina/ciclofosfamida con o sin trastuzumab.

ADAMCOVA MICHAELA *ET AL.*: "Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity", *EXPERT OPINION ON DRUG SAFETY*, ASHLEY, LONDON, GB, vol. 4, n.º 3, 1 de mayo de 2005 (2005-05-01), páginas 457-472, divulga que las troponinas cardíacas T e I se están convirtiendo en los biomarcadores séricos de elección para monitorizar una posible lesión miocárdica inducida por fármacos en estudios clínicos y preclínicos. La utilidad se ha demostrado después de la administración de fármacos antineoplásicos y beta-simpaticomiméticos.

CARDINALE D. *ET AL.*: "Prognostic value of troponin i in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing

high-dose chemotherapy", ACC CURRENT JOURNAL REVIEW, ELSEVIER, NL, vol. 13, n.º 9, 1 de septiembre de 2004 (2004-09-01), páginas 12-13, divulga que el patrón de liberación de TnI después de QAD identifica pacientes con diferentes riesgos de eventos cardíacos. Esta estratificación permite diferenciar el programa de monitorización y planificar, en pacientes seleccionados, estrategias preventivas dirigidas a mejorar el resultado clínico.

5 Jones *et al.*, Journal of American College of Cardiology, vol. 50, n.º 15, 1435-41 (2007) divulgan que después de una quimioterapia se puede producir una elevación de la troponina I indicativa de daño cardíaco.

10 Por lo tanto, se requieren medidas y medios para (i) identificar aquellos sujetos susceptibles de tratamiento con fármacos antiangiogénicos e (ii) identificar aquellos sujetos que estarían en alto riesgo de insuficiencia cardíaca y/o accidentes cardiovasculares agudos como consecuencia de una futura ingesta de fármacos antiangiogénicos.

15 Sin embargo, dichos medios y medidas aún no se han descrito. Por lo tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención se puede interpretar como la provisión de medios y procedimientos para satisfacer las necesidades mencionadas anteriormente.

El problema técnico se resuelve mediante los modos de realización caracterizados en las reivindicaciones y en el presente documento.

20 En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para predecir el riesgo de sufrir un accidente cardiovascular agudo y/o insuficiencia cardíaca como consecuencia de un futuro tratamiento antiangiogénico con un antagonista de VEGF, que comprende las etapas de  
 a) determinar la cantidad de troponina cardíaca en una muestra de un sujeto; y  
 25 b) comparar la cantidad de troponina cardíaca determinada en la etapa a) con la cantidad de referencia para una troponina cardíaca,  
 en el que se predice para dicho sujeto el riesgo de un accidente cardiovascular agudo y/o insuficiencia cardíaca de un futuro tratamiento antiangiogénico con un antagonista de VEGF.

30 La presente invención también se refiere a un procedimiento para identificar un sujeto que es susceptible de tratamiento antiangiogénico que comprende las etapas de  
 a) determinar la cantidad de troponina cardíaca en una muestra de dicho sujeto,  
 b) comparar la cantidad de troponina cardíaca determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia adecuada para una troponina cardíaca, e  
 35 c) identificar un sujeto susceptible de tratamiento antiangiogénico.

El procedimiento de la presente invención permite evaluar si un sujeto que necesita un tratamiento antiangiogénico será susceptible a dicho tratamiento. Al realizar el procedimiento de la presente invención, preferentemente se pueden tomar decisiones sobre si se iniciará o no dicho tratamiento antiangiogénico.

40 El procedimiento de la presente invención es, preferentemente, un procedimiento *in vitro*. Asimismo, puede comprender otras etapas además de las mencionadas explícitamente con anterioridad. Por ejemplo, otras etapas pueden estar relacionadas con pretratamientos de muestras o evaluación de los resultados obtenidos por el procedimiento. El procedimiento de la presente invención se puede usar también para confirmación y subclasificación de un sujeto que necesita un tratamiento antiangiogénico. El procedimiento se puede llevar a cabo  
 45 manualmente o asistido por automatización. Preferentemente, las etapas (a), (b) y/o (c) pueden estar total o parcialmente asistidas por automatización, por ejemplo, mediante un equipo robótico y sensorial adecuado para la determinación en la etapa (a) y/o (b) o para una comparación implementada por ordenador en la etapa (c).

50 El término "identificación", como se usa en el presente documento, significa valorar si un sujeto es susceptible o no de tratamiento antiangiogénico. Se debe entender que un sujeto que es susceptible de tratamiento antiangiogénico no tendrá, preferentemente, un riesgo elevado de padecer un efecto secundario adverso provocado por dicho tratamiento (particularmente, insuficiencia cardíaca, un accidente cardiovascular agudo, hipertensión u otros eventos vasculares tales como apoplejía, enfermedad arterial periférica y/o angina abdominal) como consecuencia de dicho tratamiento, mientras que un sujeto que no es susceptible de tratamiento antiangiogénico tendría un riesgo elevado  
 55 de padecer los efectos adversos mencionados anteriormente como consecuencia de dicho régimen de tratamiento antiangiogénico (si se iniciara dicho régimen de tratamiento). Tal como comprenderán los expertos en la técnica, dicha valoración no suele pretender ser correcta para todos (es decir, 100 %) los sujetos a identificar. El término, sin embargo, requiere que se pueda identificar una parte estadísticamente significativa de sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). El experto en la técnica puede determinar sin mayor problema si una parte es estadísticamente significativa usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo,  
 60 determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes son de al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más  
 65 preferentemente, el procedimiento de la presente invención puede identificar apropiadamente al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de los sujetos de una población.

El término "sujeto", como se utiliza en el presente documento, se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y más preferentemente a seres humanos.

5 Sin embargo, se prevé, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención mencionado anteriormente, que el sujeto deberá "necesitar un tratamiento antiangiogénico". Sin embargo, dicho sujeto no habrá recibido ningún tratamiento antiangiogénico en el momento en que se obtiene la muestra. Por lo tanto, el sujeto no debe estar en tratamiento antiangiogénico cuando se obtiene la muestra.

10 "Un sujeto que necesita tratamiento antiangiogénico" es, preferentemente, un sujeto que padece cáncer, y más preferentemente, cáncer metastásico. Se debe entender que dicho cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, tal como neuroblastoma, carcinoma intestinal tal como carcinoma de recto, carcinoma de colon, carcinoma por poliposis adenomatosa y cáncer colorrectal hereditario no polipósico, carcinoma esofágico, carcinoma labial, carcinoma de laringe, carcinoma de hipofaringe, carcinoma de lengua, carcinoma de las glándulas salivales, carcinoma gástrico, adenocarcinoma, carcinoma de tiroides medular, carcinoma de tiroides papilar, carcinoma de tiroides folicular, carcinoma de tiroides anaplásico, carcinoma de riñón, carcinoma de parénquima de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de cuerpo uterino, carcinoma de endometrio, carcinoma coriónico, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, carcinoma de testículo, carcinoma de mama, carcinoma del tracto urinario, melanoma, tumores cerebrales tales como glioblastoma, astrocitoma, meningioma, meduloblastoma y tumores neuroectodérmicos periféricos, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma bronquial, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, mieloma múltiple, basalioma, teratoma, retinoblastoma, melanoma de coroides, seminoma, rabdomiosarcoma, craneofaringeoma, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Ewing y plasmocitoma. Preferentemente, dicho cáncer es una variedad de tipos de cáncer conocidos en la técnica que comprenden neuroblastoma, carcinoma intestinal tal como carcinoma de recto, carcinoma de colon, carcinoma por poliposis adenomatosa familiar y cáncer colorrectal hereditario no polipósico, carcinoma esofágico, carcinoma labial, carcinoma de laringe, carcinoma de hipofaringe, carcinoma de lengua, carcinoma de las glándulas salivales, carcinoma gástrico, adenocarcinoma, carcinoma de tiroides medular, carcinoma de tiroides papilar, carcinoma de tiroides folicular, carcinoma de riñón, carcinoma de parénquima de riñón, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de cuerpo uterino, carcinoma de endometrio, carcinoma coriónico, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, carcinoma de testículo, carcinoma de mama, carcinoma del tracto urinario, melanoma, tumores cerebrales tales como glioblastoma, astrocitoma, meningioma, meduloblastoma y tumores neuroectodérmicos periféricos, linfoma de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), linfoma/leucemia de linfocitos T de adulto, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma bronquial, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, mieloma múltiple, basalioma, teratoma, retinoblastoma, melanoma de coroides, seminoma, rabdomiosarcoma, craneofaringeoma, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Ewing y plasmocitoma.

40 Se contempla particularmente que dicho cáncer se seleccione del grupo que consiste en cáncer de colon metastásico (también conocido como cáncer colorrectal), cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de próstata metastásico y cáncer de páncreas.

45 El procedimiento de la presente invención también prevé que el sujeto que necesita un tratamiento antiangiogénico pueda padecer retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide o psoriasis.

50 Por otra parte, la presente invención prevé que el sujeto pueda estar en riesgo de sufrir una complicación cardiovascular, o un sujeto que sufre una complicación cardiovascular, respectivamente. Dicha complicación cardiovascular puede ser clínicamente aparente, pero también puede ser clínicamente no aparente. El procedimiento de la presente invención es particularmente beneficioso para estos sujetos, ya que el tratamiento antiangiogénico puede empeorar una complicación cardiovascular ya existente o aumentar el riesgo de la misma. El procedimiento de la presente invención permite identificar aquellos sujetos cuya afección cardiovascular empeoraría o no empeoraría como consecuencia del tratamiento antiangiogénico.

55 Un sujeto que sufre una "complicación cardiovascular" puede ser, preferentemente, un sujeto que sufre cualquier cardiovasculopatía, disfunción o evento conocido por el experto en la técnica. En particular, dicho sujeto puede presentar síntomas clínicos de cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, arteriopatía coronaria (particularmente, arteriopatía coronaria estable), cardiopatía isquémica, cardiomiopatía dilatada, angina estable, insuficiencia cardíaca congestiva.

60 El sujeto que sufre una complicación cardiovascular puede presentar síntomas clínicos (p. ej., disnea, dolor en el pecho, véase también la clasificación de la NYHA a continuación). Específicamente, los síntomas de enfermedades cardiovasculares se han clasificado en un sistema de clasificación funcional de acuerdo con la New York Heart Association (NYHA). Los pacientes de clase I no presentan síntomas evidentes de cardiovasculopatía. La actividad física no se ve limitada, y la actividad física ordinaria no provoca fatiga, palpitaciones o disnea indebidas. Los

pacientes de clase II presentan una ligera limitación de la actividad física. Se sienten cómodos en reposo, pero la actividad física ordinaria les produce fatiga, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase III muestran una marcada limitación de la actividad física. Se sienten cómodos en reposo, pero una actividad menor que la actividad normal les provoca fatiga, palpitaciones o disnea. Los pacientes de clase IV no pueden realizar ninguna actividad física sin sufrir molestias. Presentan síntomas de insuficiencia cardíaca en reposo. Si realizan alguna actividad física, aumenta el malestar. Otra característica de la complicación cardiovascular puede ser la "fracción de eyección ventricular izquierda" (FEVI), que también se conoce como "fracción de eyección". Las personas con un corazón sano tienen por lo general una FEVI intacta, que en general se describe como superior al 50 %. La mayoría de las personas con una cardiopatía sistólica que es sintomática, en general, tienen una FEVI del 40 % o inferior.

Preferentemente, un sujeto que padece de una complicación cardiovascular de acuerdo con la presente invención puede ser asignado a una clase intermedia de la NYHA, preferentemente a la clase I, II o III de la NYHA y, lo más preferentemente, a la clase II de la NYHA.

También se contempla que el sujeto que necesita un tratamiento antiangiogénico sea un sujeto con una complicación cardiovascular no detectada (no detectada en el momento en que se lleva a cabo el procedimiento de la presente invención, más precisamente, en el momento en que se obtiene la muestra que va a ser analizada).

El término "tratamiento antiangiogénico", como se usa en el presente documento, abarca preferentemente los regímenes de tratamiento que tienen por objeto reducir o inhibir la formación de vasos sanguíneos (preferentemente de nuevos vasos sanguíneos, más preferentemente de vasos sanguíneos que suministran sangre al miocardio y, por tanto, abastecen el miocardio) y, por lo tanto, abarca los regímenes de tratamiento que son capaces de inhibir la angiogénesis, particularmente de los vasos que suministran sangre al miocardio. Dichos regímenes de tratamiento son bien conocidos en la técnica y, preferentemente, reducen/inhiben la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes y/o de células precursoras endoteliales. Preferentemente, un tratamiento antiangiogénico se refiere a un tratamiento antiangiogénico basado en fármacos.

Preferentemente, los fármacos que se van a usar para el tratamiento antiangiogénico tienen una cardiotoxicidad baja, más preferentemente, dichos fármacos no tienen cardiotoxicidad y, por lo tanto, no son cardiotoxícos. En el contexto de la presente invención, preferentemente, un fármaco se considera cardiotoxico si dicho fármaco induce daño y/o necrosis en las células miocárdicas cuando éstas entran en contacto con dicho fármaco. Un fármaco cardiotoxico en el contexto de la presente invención es un fármaco que induce daño y/o apoptosis de células cardíacas (preferentemente, daño a células miocárdicas y/o apoptosis de células miocárdicas) cuando entra directamente en contacto con células miocárdicas. La forma de determinar si un fármaco induce daño a las células miocárdicas y/o apoptosis de células miocárdicas al estar en contacto directo es bien conocida en la técnica.

El procedimiento de la presente invención es particularmente ventajoso para sujetos tratados con un antagonista de VEGF (preferentemente, antagonistas de VEGF-A), particularmente con anticuerpos específicos para VEGF (preferentemente, específicos para VEGF-A). En consecuencia, el tratamiento antiangiogénico se realiza, preferentemente, mediante la ingesta de antagonistas de VEGF, más preferentemente mediante la ingesta de anticuerpos contra VEGF, lo más preferentemente mediante la ingesta de anticuerpos contra VEGF-A. El término "antagonista de VEGF" se refiere, preferentemente, a una molécula capaz de inhibir, reducir o interferir con las actividades de VEGF, incluyendo su unión a uno o más receptores de VEGF, particularmente al receptor 1 o 2 de VEGF (VEGFR-1 o VEGFR-2). El documento WO/2008/063932, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad con respecto al contenido de la divulgación, enumera una diversidad de antagonistas de VEGF. Preferentemente, el término de tratamiento antiangiogénico se refiere a anticuerpos anti-VEGF que se unen específicamente al VEGF y, por lo tanto, afectan negativamente a la interacción con al menos un receptor de VEGF, particularmente con el receptor 1 o 2 de VEGF (VEGFR-1 o VEGFR-2). Los antagonistas de VEGF abarcan también, preferentemente, moléculas antisentido dirigidas contra VEGF, aptámeros de ARN dirigidos contra VEGF y ribozimas dirigidas contra VEGF o receptores de VEGF (particularmente VEGFR-1 o 2).

Los anticuerpos anti-VEGF incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos A4.6.1, bevacizumab (Avastin®), ranibizumab (Lucentis®, véase el documento WO98/45331 o Chen *et al.*, J Mol Biol 293:865-881 (1999)), G6, B20, 2C3 y otros como se describe, por ejemplo, en el documento US2003/0190317,

las Patentes de EE. UU. 6,582,959 y 6,703,020; el documento WO98/45332; el documento WO2005/044853; el documento EP 0666868B1; y Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004). Lo más preferentemente, el anticuerpo anti-VEGF de la invención es bevacizumab.

El procedimiento de la presente invención también considera adecuados para el tratamiento antiangiogénico los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa, los inhibidores de tirosina quinasa de bajo peso molecular, los inhibidores de metaloproteinasas de matriz (Marimastat, AG3340, COL-3, Neovastat, BMS-275291), los fármacos que inhiben la proliferación celular y la migración celular de células endoteliales, los fármacos que regulan negativamente los estimuladores de angiogénesis, los fármacos que estimulan la formación de inhibidores endógenos de la angiogénesis, los fármacos que inhiben la unión de estimuladores de angiogénesis, los fármacos que inducen apoptosis de células endoteliales, los fármacos que inducen apoptosis de células endoteliales y los

fármacos que inhiben la migración celular de células endoteliales. El procedimiento de la presente invención también contempla inhibidores de EGFR de bajo peso molecular (antagonistas del receptor del factor de crecimiento epidérmico) tales como erlotinib, gefitinib y lapatinib. Además, también se contemplan endostatina (O'Reilly *et al.* (1997) Cell 88: 277-285), angiostatina (O'Reilly *et al.* (1994) Cell 79: 315-328).

5 Es conocido en la técnica que los anticuerpos contra PIGF y los antagonistas de PIGF (PIGF: factor de crecimiento placentario) son antiangiogénicos. Sin embargo, se demostró que los anticuerpos inhiben el crecimiento de vasos en tumores pero, supuestamente, no tienen efectos secundarios adversos significativos sobre el sistema cardiovascular (véase Fischer *et al.*, 2007, Cell, 131, 463-475). Por lo tanto, el tratamiento antiangiogénico en el contexto de la  
10 presente invención no incluye, preferentemente, la administración de antagonistas de PIGF; más preferentemente, el término no incluye la administración de un anticuerpo que se une específicamente a PIGF.

15 El término "muestra" se refiere a una muestra de un fluido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o un órgano. Las muestras de fluidos corporales se pueden obtener por técnicas bien conocidas e incluyen preferentemente muestras de sangre, plasma, suero u orina, más preferentemente, muestras de sangre, plasma o suero. Se pueden obtener muestras de tejidos u órganos a partir de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, biopsia. Las células separadas se pueden obtener a partir de los fluidos corporales o tejidos u órganos mediante técnicas de separación tales como centrifugación o clasificación celular. Preferentemente, las  
20 muestras de células, tejidos u órganos se obtienen a partir de dichas células, tejidos u órganos que expresan o producen los péptidos a los que se hace referencia en el presente documento.

El procedimiento de la presente invención es para sujetos que iniciarán un tratamiento antiangiogénico. En consecuencia, la muestra se obtiene preferentemente poco antes de que se inicie un tratamiento antiangiogénico. Se contempla particularmente obtener dicha muestra no más de un día, no más de tres días, no más de una semana  
25 y, más preferentemente, no más de un mes antes de que se inicie el tratamiento antiangiogénico. La expresión "troponina cardíaca" se refiere a todas las isoformas de troponinas expresadas en células del corazón y, preferentemente, en las células subendocárdicas. Estas isoformas están bien caracterizadas en la técnica como se describe, por ejemplo, en Anderson 1995, Circulation Research, vol. 76, n.º4: 681-686 y Ferrieres 1998, Clinical Chemistry, 44: 487-493. Preferentemente, la troponina cardíaca se refiere a troponina T y/o a troponina I. La  
30 troponina cardíaca más preferente en el contexto de la presente invención es troponina T.

Las secuencias de aminoácidos para la troponina T humana y la troponina I humana se divulgan en Anderson, *loc. cit.* y Ferrieres 1998, Clinical Chemistry, 44: 487-493. El término "troponina cardíaca" abarca también variantes de  
35 las troponinas específicas mencionadas anteriormente, es decir, preferentemente troponina T o troponina I. Dichas variantes tienen al menos las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales que las troponinas cardíacas específicas. En particular, comparten las mismas propiedades biológicas e inmunológicas esenciales si se pueden detectar en los mismos ensayos específicos a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, mediante ensayos ELISA que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente dichas troponinas cardíacas. Además, se debe entender que una variante, tal como se  
40 hace referencia de acuerdo con la presente invención, tendrá una secuencia de aminoácidos que difiere debido a al menos una sustitución, eliminación y/o adición de aminoácidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante sigue siendo, preferentemente, al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 92 %, un 95 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a la secuencia amino de la troponina específica. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante algoritmos que se conocen bien en la técnica.  
45 Preferentemente, el grado de identidad se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, en la que el fragmento de la secuencia de aminoácidos de la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácidos idéntico en ambas  
50 secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede llevar a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. APL. Math. 2:482 (1981)), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443 (1970)), mediante la búsqueda  
55 del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988)), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, PASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Genética de Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual. Dado que se han identificado dos secuencias para comparación, GAP y BESTFIT se emplean preferentemente para determinar su alineación óptima y, por lo tanto, el grado de identidad.  
60 Preferentemente, se usan los valores por defecto de 5,00 para el peso de huecos y de 0,30 para la longitud del peso de huecos. Las variantes a las que se ha hecho referencia anteriormente pueden ser variantes alélicas o cualquier otro homólogo, parálogo u ortólogo específico de la especie. Además, las variantes a las que se hace referencia en el presente documento incluyen fragmentos de los polipéptidos específicos o de los tipos de variantes antes mencionados, siempre que estos fragmentos tengan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales como se  
65 ha mencionado anteriormente. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, productos de degradación de los polipéptidos. Se incluyen además variantes que difieren debido a modificaciones postraduccionales tales como

fosforilación o miristilación.

La determinación de la cantidad de los péptidos o polipéptidos a los que se hace referencia en esta memoria descriptiva se refiere a la medición de la cantidad o concentración, preferentemente de manera semicuantitativa o cuantitativa. La medición se puede realizar de forma directa o indirecta. La medición directa se refiere a la medición de la cantidad o concentración del péptido o polipéptido basándose en una señal que se obtiene a partir del propio péptido o polipéptido y cuya intensidad se correlaciona directamente con el número de moléculas del péptido presentes en la muestra. Dicha señal, en ocasiones referida en el presente documento como señal de intensidad, se puede obtener, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química específica del péptido o polipéptido. La medición indirecta incluye la medición de una señal obtenida a partir de un componente secundario (es decir, un componente que no es el propio péptido o polipéptido) o un sistema de lectura biológica, por ejemplo, respuestas celulares cuantificables, ligandos, marcadores o productos de reacción enzimática.

De acuerdo con la presente invención, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido se puede lograr por todos los medios conocidos para determinar la cantidad de un péptido en una muestra. Dichos medios comprenden dispositivos y procedimientos de inmunoensayo que pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo en sándwich, de competición u otros. Dichos ensayos desarrollarán una señal que es indicativa de la presencia o ausencia del péptido o polipéptido. Además, la intensidad de la señal se puede correlacionar, preferentemente, de forma directa o indirecta (por ejemplo, de forma inversamente proporcional) con la cantidad de polipéptido presente en una muestra. Otros procedimientos adecuados comprenden medir una propiedad física o química específica para el péptido o polipéptido, tal como su masa molecular precisa o su espectro de RMN. Dichos procedimientos comprenden, preferentemente, biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de RMN o dispositivos de cromatografía. Además, los procedimientos incluyen procedimientos basados en ELISA de microplacas, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos (disponibles, por ejemplo, en analizadores Elecsys™), CBA (un ensayo enzimático de unión a cobalto disponible, por ejemplo, en analizadores Roche-Hitachi™) y ensayos de aglutinación de látex (disponibles, por ejemplo, en analizadores Roche-Hitachi™).

Preferentemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende las etapas de (a) poner en contacto una célula capaz de provocar una respuesta celular cuya intensidad es indicativa de la cantidad del péptido o polipéptido con dicho péptido o polipéptido durante un período de tiempo adecuado, (b) medir la respuesta celular. Para medir las respuestas celulares, la muestra o muestra procesada se añade, preferentemente, a un cultivo celular y se mide una respuesta celular interna o externa. La respuesta celular puede incluir la expresión cuantificable de un gen indicador o la secreción de una sustancia, por ejemplo, un péptido, un polipéptido o una molécula pequeña. La expresión o sustancia generará una señal de intensidad que se correlaciona con la cantidad del péptido o polipéptido.

También preferentemente, la determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido comprende la etapa de medir una señal de intensidad específica que se puede obtener a partir del péptido o polipéptido en la muestra. Tal como se ha descrito anteriormente, dicha señal puede ser la intensidad de señal observada en una variable m/z específica para el péptido o polipéptido, observada en espectros de masas o un espectro de RMN específico para el péptido o polipéptido.

La determinación de la cantidad de un péptido o polipéptido puede comprender, preferentemente, las etapas de (a) poner en contacto el péptido con un ligando específico, (b) eliminar (opcionalmente) el ligando no unido, (c) medir la cantidad de ligando unido. El ligando unido generará una señal de intensidad. La unión, de acuerdo con la presente invención, incluye tanto la unión covalente como la no covalente. Un ligando, de acuerdo con la presente invención, puede ser cualquier compuesto, por ejemplo, un péptido, polipéptido, ácido nucleico o molécula pequeña, que se une al péptido o polipéptido descrito en el presente documento. Los ligandos preferentes incluyen anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos tales como receptores o socios de unión para el péptido o polipéptido y fragmentos de los mismos que comprenden los dominios de unión para los péptidos y aptámeros, por ejemplo, aptámeros de ácidos nucleicos o péptidos. Los procedimientos para preparar dichos ligandos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la identificación y producción de anticuerpos o aptámeros adecuados también se ofrecen por parte de los proveedores comerciales. El experto en la técnica está familiarizado con procedimientos para desarrollar derivados de dichos ligandos con mayor afinidad o especificidad. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones aleatorias en los ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos. Estos derivados se pueden someter entonces a ensayo para su unión de acuerdo con procedimientos de cribado conocidos en la técnica, por ejemplo, visualización de fagos. Los anticuerpos a los que se hace referencia en el presente documento incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub> que son capaces de unirse a antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos híbridos humanizados en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo donante no humano que exhibe una especificidad de antígeno deseada se combinan con secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Las secuencias donantes incluirán normalmente al menos los residuos de aminoácidos de unión al antígeno del donante, pero también pueden comprender otros residuos de aminoácidos estructural y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Dichos híbridos se pueden preparar por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el ligando o agente se une específicamente al péptido o polipéptido. De acuerdo con la presente

invención, unión específica significa que el ligando o agente no se debe unir sustancialmente a ("reaccionar de forma cruzada" con) otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra que se va a analizar. Preferentemente, el péptido o polipéptido unido específicamente se debe unir con una afinidad al menos 3 veces mayor, más preferentemente al menos 10 veces mayor e incluso más preferentemente al menos 50 veces mayor que cualquier otro péptido o polipéptido relevante. La unión no específica puede ser tolerable si todavía se puede distinguir y medir inequívocamente, por ejemplo, de acuerdo con su tamaño en ensayo de inmunotransferencia, o por su abundancia relativamente mayor en la muestra. La unión del ligando se puede medir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Preferentemente, dicho procedimiento es semicuantitativo o cuantitativo. Los procedimientos adecuados se describen a continuación.

En primer lugar, la unión de un ligando se puede medir directamente, por ejemplo, por RMN o resonancia de plasmón superficial.

En segundo lugar, si el ligando también sirve como sustrato de una actividad enzimática del péptido o polipéptido de interés, se puede medir un producto de reacción enzimática (por ejemplo, la cantidad de una proteasa se puede medir midiendo la cantidad de sustrato escindido, por ejemplo, en un ensayo de inmunotransferencia). De forma alternativa, el ligando puede presentar propiedades enzimáticas por sí mismo y el complejo "ligando/péptido o ligando/polipéptido" o el ligando que estaba unido por el péptido o polipéptido, respectivamente, se puede poner en contacto con un sustrato adecuado que permita la detección mediante la generación de una señal de intensidad. Para la medición de productos de reacción enzimática, la cantidad de sustrato es preferentemente saturante. El sustrato también se puede marcar con un marcador detectable antes de la reacción. Preferentemente, la muestra se pone en contacto con el sustrato durante un periodo de tiempo adecuado. Un periodo de tiempo adecuado se refiere al tiempo necesario para producir una cantidad detectable, preferentemente cuantificable, del producto que se va a producir. En lugar de medir la cantidad de producto, se puede medir el tiempo necesario para la aparición de una cantidad dada (por ejemplo, detectable) de producto.

En tercer lugar, el ligando se puede acoplar de forma covalente o no covalente a un marcador que permita la detección y medición del ligando. El marcaje se puede realizar mediante procedimientos directos o indirectos. El marcaje directo implica el acoplamiento del marcador de forma directa (covalente o no covalentemente) al ligando. El marcaje indirecto implica la unión (covalente o no covalentemente) de un ligando secundario al primer ligando. El ligando secundario se debe unir específicamente al primer ligando. Dicho ligando secundario se puede acoplar a un marcador adecuado y/o ser la diana (receptor) del ligando terciario que se une al ligando secundario. El uso de ligandos secundarios, terciarios o incluso de orden superior se utiliza a menudo para aumentar la señal. Los ligandos secundarios y de orden superior adecuados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios y el sistema bien conocido de estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc.). El ligando o sustrato también se puede "marcar" con uno o más marcadores conocidos en la técnica. Dichos marcadores pueden entonces ser dianas para ligandos de orden superior. Los marcadores adecuados incluyen biotina, digoxigenina, His-Tag, glutatión-S-transferasa, FLAG, GFP, marcador myc, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A, proteína de unión a maltosa y similares. En el caso de un péptido o polipéptido, el marcador está preferentemente en el extremo N-terminal y/o en el extremo C-terminal. Los marcadores adecuados son todos los marcadores detectables por un procedimiento de detección apropiado. Los marcadores típicos incluyen partículas de oro, perlas de látex, éster de acridano, luminol, rutenio, marcadores enzimáticamente activos, marcadores radiactivos, marcadores magnéticos (por ejemplo, "perlas magnéticas", incluyendo marcadores paramagnéticos y superparamagnéticos) y marcadores fluorescentes. Los marcadores enzimáticamente activos incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, luciferasa y derivados de los mismos. Los sustratos adecuados para la detección incluyen di-amino-bencidina (DAB), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, NBT-BCIP (cloruro de 4-nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4 cloro-3-indolil-fosfato, disponible como solución de reserva preparada de Roche Diagnostics), CDP-Star™ (Amersham Biosciences), ECF™ (Amersham Biosciences). Una combinación enzima-sustrato adecuada puede dar como resultado un producto de reacción coloreado, fluorescencia o quimioluminiscencia, que se puede medir de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando una película sensible a la luz o un sistema de cámara adecuado). En cuanto a la medición de la reacción enzimática, los criterios dados anteriormente se aplican de manera análoga. Los marcadores fluorescentes típicos incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), Cy3, Cy5, Texas Red, fluoresceína y los tintes Alexa (por ejemplo, Alexa 568). Otros marcadores fluorescentes están disponibles, por ejemplo, en Molecular Probes (Oregon). También se contempla el uso de puntos cuánticos como marcadores fluorescentes. Los marcadores radiactivos típicos incluyen <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y similares. Un marcador radiactivo se puede detectar por cualquier procedimiento conocido y apropiado, por ejemplo, una película sensible a la luz o un dispositivo de formación de imágenes de fósforo. Procedimientos de medición adecuados de acuerdo con la presente invención incluyen también precipitación (particularmente inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (quimioluminiscencia generada por electroerosión), RIA (radioinmunoensayo), ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), inmunoensayos enzimáticos de tipo intercalado, inmunoensayos de electroquimioluminiscencia de tipo intercalado (ECLIA), fluoroinmunoensayo de lantánidos con disociación mejorada (DELFLIA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría o nefelometría reforzada con látex, o inmunoensayos en fase sólida. Otros procedimientos conocidos en la técnica (tales como electroforesis en gel, electroforesis en gel 2D, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), inmunotransferencia y espectrometría de masas) se pueden usar solos o en combinación con marcaje u otros procedimientos de detección, como se describió con anterioridad.

La cantidad de un péptido o polipéptido se puede determinar, también preferentemente, como sigue: (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para el péptido o polipéptido como se especificó anteriormente con una muestra que comprende el péptido o polipéptido y (b) medir la cantidad de péptido o polipéptido que está  
5 unido al soporte. El ligando, elegido preferentemente del grupo que consiste en ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, está preferentemente presente sobre un soporte sólido en forma inmovilizada. Los materiales para la fabricación de soportes sólidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, materiales de columna disponibles comercialmente, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas metálicas coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa,  
10 membranas, láminas, duracitos, pocillos y paredes de bandejas de reacción, tubos de plástico, etc. El ligando o agente puede estar unido a numerosos vehículos diferentes. Ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los procedimientos adecuados para fijar/inmovilizar dicho ligando se conocen bien e incluyen, pero no se limitan a, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. También se contempla el uso de "matrices de suspensión" como matrices de acuerdo con la presente invención (Nolan 2002, Trends Biotechnol. 20(1):9-12). En dichas matrices de suspensión, el vehículo, por ejemplo, una microperla o microesfera, está presente en suspensión. La matriz consiste en diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que portan diferentes ligandos. Se conocen en general procedimientos para producir dichas  
15 matrices, por ejemplo, basados en química en fase sólida y grupos protectores fotolábiles (Patente de EE. UU. 5.744.305).

El término "cantidad" como se usa en la presente memoria comprende la cantidad absoluta de un polipéptido o péptido, la cantidad o concentración relativa de dicho polipéptido o péptido, así como cualquier valor o parámetro que se correlacione con el mismo o se pueda derivar de él. Dichos valores o parámetros comprenden valores de señal de intensidad de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas de dichos péptidos mediante mediciones directas, por ejemplo, valores de intensidad en espectros de masas o espectros de RMN. Asimismo, se incluyen todos los valores o parámetros que se obtienen mediante mediciones indirectas especificadas en otra parte de la presente descripción, por ejemplo, niveles de respuesta determinados a partir de sistemas de lectura biológica en respuesta a los péptidos o señales de intensidad obtenidos a partir de ligandos unidos de forma específica. Se debe entender que los valores que se correlacionan con las cantidades o parámetros anteriormente mencionados también se pueden obtener por medio de todas las operaciones matemáticas convencionales.  
25

El término "comparación", como se utiliza en el presente documento, abarca la comparación de la cantidad del péptido o polipéptido comprendida en la muestra que se va a analizar con una cantidad de una fuente de referencia adecuada especificada en otra parte de la presente descripción. Se debe entender que comparación, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una comparación de parámetros o valores correspondientes, por ejemplo, una cantidad absoluta se compara con una cantidad de referencia absoluta mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia o una señal de intensidad obtenida a partir de una muestra de ensayo se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de una muestra de referencia. La comparación mencionada en la etapa (b) del procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo manualmente o asistida por ordenador. Para una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada se puede comparar con valores correspondientes a referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos mediante un programa informático. El programa informático puede evaluar adicionalmente el resultado de la comparación, es decir, proporcionar automáticamente la evaluación deseada en un formato de salida adecuado. Basándose en la comparación de la cantidad determinada en la etapa a) y la cantidad de referencia, es posible evaluar si un sujeto es susceptible de tratamiento antiangiogénico o no. Por lo tanto, la cantidad de referencia se debe elegir de modo que una diferencia o una similitud en las cantidades comparadas permitan identificar aquellos sujetos que son susceptibles de tratamiento antiangiogénico.  
35  
40  
45

Por consiguiente, el término "cantidades de referencia" como se usa en el presente documento se refiere a las cantidades de los polipéptidos que permiten identificar un sujeto susceptible o no susceptible de tratamiento antiangiogénico. En consecuencia, la referencia se puede derivar de (i) un sujeto conocido como susceptible de tratamiento antiangiogénico (particularmente un sujeto cuyo cáncer se trató con éxito y que no experimentó un efecto secundario adverso tal como insuficiencia cardíaca y/o un accidente cardiovascular de dicho tratamiento antiangiogénico) o (ii) un sujeto del que se sabe que no es susceptible de tratamiento antiangiogénico (por ejemplo, un sujeto que ha experimentado un efecto secundario adverso de dicho tratamiento, tal como insuficiencia cardíaca y/o un accidente cardiovascular).  
50  
55

Además, las cantidades de referencia definen, preferentemente, umbrales. Las cantidades de referencia adecuadas o cantidades umbral se pueden determinar por el procedimiento de la presente invención a partir de una muestra de referencia que se va a analizar conjuntamente, es decir, simultáneamente o subsiguientemente, con la muestra de ensayo. Una cantidad de referencia preferente que sirve como un umbral se puede derivar del límite superior de la normalidad (LSN), es decir, el límite superior de la cantidad fisiológica que se encuentra en una población de sujetos (por ejemplo, pacientes inscritos para un ensayo clínico). El LSN para una población dada de sujetos se puede determinar por varias técnicas bien conocidas.  
60  
65

Más preferentemente, se obtendrá una referencia determinando los valores para al menos un rasgo característico de un grupo de sujetos de referencia, es decir, un grupo de sujetos de los que se sabe que son susceptibles de tratamiento antiangiogénico, un grupo de sujetos del que se sabe que no son susceptibles de un tratamiento antiangiogénico, una población que comprende el sujeto que se va a investigar y calculando la referencia mediante medidas estadísticas apropiadas incluyendo aquellas a las que se hace referencia en otra parte del presente documento, como mediana, promedio, cuantiles, PLS-DA, procedimientos de regresión logística, clasificación Random forest u otros que dan un valor umbral. El valor umbral debe tener en cuenta la configuración clínica deseada de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica y pronóstica.

De este modo, la cantidad de referencia que define una cantidad umbral para una troponina cardíaca y, preferentemente, para la troponina T como se menciona de acuerdo con la presente invención es, preferentemente, de 7 pg/ml, más preferentemente de 30 o 20 pg/ml, y aún más preferentemente de 10 pg/ml.

Preferentemente, una cantidad de troponina cardíaca inferior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca indica que dicho sujeto es susceptible de tratamiento antiangiogénico.

Preferentemente, una cantidad de troponina cardíaca superior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca indica que dicho sujeto no es susceptible de tratamiento antiangiogénico. Para dicho sujeto se contemplará un tratamiento que no sea un tratamiento antiangiogénico. La presente invención también contempla que un sujeto que no es susceptible de tratamiento antiangiogénico es, preferentemente, susceptible de tratamiento con un antagonista de PIGF, preferentemente con un anticuerpo contra PIGF (PIGF: factor de crecimiento placentario, véase el comentario sobre P1FG en el presente documento). Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención, en un modo de realización, permite diferenciar si un sujeto es elegible para un tratamiento antiangiogénico o un tratamiento con un anticuerpo contra PIGF.

Los pacientes con tumores tratados con fármacos antiangiogénicos presentan mayor riesgo de sufrir accidentes cardiovasculares agudos e insuficiencia cardíaca (véase más arriba). Fue un hallazgo de los estudios subyacentes a la presente invención que se requiera la determinación de la cantidad de troponina T cardíaca y la comparación de la cantidad así determinada con una cantidad de referencia para identificar con fiabilidad los pacientes con tumores que son susceptibles de tratamiento antiangiogénico o que no son susceptibles de tratamiento antiangiogénico.

Los experimentos llevados a cabo en el contexto de la presente invención sugieren firmemente que los sujetos con niveles aumentados de troponina cardíaca no deben ser tratados con fármacos antiangiogénicos, ya que estos pacientes corren un elevado riesgo de sufrir un accidente cardiovascular agudo en el futuro. Los fármacos antiangiogénicos no solo bloquean la formación de nuevos vasos sanguíneos en los tumores, sino que también bloquean la formación de nuevos vasos en regiones ateroscleróticas en las que se desea una nueva formación. Los resultados de los estudios llevados a cabo en el contexto de la presente invención indican que los individuos con niveles aumentados de los biomarcadores a los que se hace referencia en el presente documento presentan mayor riesgo de accidentes cardiovasculares agudos cuando toman fármacos que previenen el crecimiento y/o la formación de nuevos vasos sanguíneos. Específicamente, se determinó la cantidad de troponina T en muestras de suero de una cohorte de pacientes que comprendía pacientes con diversos tumores. Los experimentos mostraron que la prevalencia de complicaciones cardiovasculares en pacientes con tumores es mucho mayor de lo que se sospechaba y que existe una clara necesidad de identificar aquellos sujetos que tienen menos probabilidad de beneficiarse de un tratamiento antiangiogénico, en particular, aquellos sujetos con complicaciones cardiovasculares previamente no detectadas. En caso de que el paciente resulte no ser susceptible de tratamiento antiangiogénico, se puede evitar un tratamiento de alto coste que pondría en riesgo a dicho sujeto.

Por otra parte, el procedimiento de la presente invención es ventajoso, puesto que puede ser implementado en sistemas portátiles, tales como tiras de análisis.

En conjunto, los pacientes con un aumento de la cantidad de troponina T presentan mayor riesgo de padecer insuficiencia cardíaca y/o accidentes cardiovasculares agudos cuando reciben medicación antiangiogénica (debido a dicho tratamiento). Los pacientes con una cantidad que no está aumentada no presentan un riesgo elevado de sufrir insuficiencia cardíaca y/o accidentes cardiovasculares agudos cuando reciben medicación antiangiogénica.

Por otra parte, además de la troponina T, también se determinó la cantidad de NT-proBNP en muestras de los pacientes mencionados anteriormente. Se demostró que la determinación de NT-proBNP agrega un valor diagnóstico y pronóstico adicional. Los resultados indican que los sujetos con niveles incrementados tanto de NT-proBNP como de troponina T presentan un riesgo aumentado de sufrir un accidente cardiovascular cuando toman la medicación de un tratamiento antiangiogénico. Por lo tanto, la determinación tanto un péptido natriurético como una troponina cardíaca permite identificar correctamente una proporción estadísticamente más significativa de sujetos que cuando únicamente se determina la troponina cardíaca como marcador único. Sin embargo, la determinación de una troponina cardíaca sola ya permite identificar sujetos con una elevada significación.

Por consiguiente, el procedimiento de la presente invención puede comprender adicionalmente la determinación de

la cantidad de un péptido natriurético en una muestra del paciente y la comparación de la cantidad determinada de esa manera con una cantidad de referencia.

El término "péptido natriurético" comprende péptidos de tipo péptido natriurético atrial (ANP) y péptido de tipo péptido natriurético cerebral (BNP) y variantes de los mismos que tienen el mismo potencial predictivo. Los péptidos natriuréticos de acuerdo con la presente invención comprenden péptidos de tipo ANP y BNP y variantes de los mismos (véase, por ejemplo, Bonow, 1996, *Circulation* 93: 1946-1950). Los péptidos del tipo ANP comprenden pre-proANP, proANP, NT-proANP y ANP. Los péptidos de tipo BNP comprenden pre-proBNP, proBNP, NT-proBNP y BNP. El péptido pre-pro (134 aminoácidos en el caso de pre-proBNP) comprende un péptido señal corto que se escinde enzimáticamente para liberar el pro-péptido (108 aminoácidos en el caso de proBNP). El pro-péptido se escinde adicionalmente en un pro-péptido N-terminal (péptido NT-pro, 76 aminoácidos en el caso de NT-proBNP) y la hormona activa (32 aminoácidos en el caso del BNP, 28 aminoácidos en el caso de ANP). Los péptidos natriuréticos preferentes de acuerdo con la presente invención son NT-proANP, ANP, NT-proBNP, BNP y variantes de los mismos. El ANP y el BNP son las hormonas activas y tienen una vida media más corta que sus respectivas contrapartes inactivas, NT-proANP y NT-proBNP. El BNP se metaboliza en la sangre, mientras que el NT-proBNP circula por la sangre como una molécula intacta y, como tal, se elimina por vía renal. La vida media *in vivo* del NT-proBNP es 120 minutos mayor que la del BNP, que es de 20 min (Smith 2000, *J Endocrinol.* 167: 239-46). Los análisis previos son más robustos con NT-proBNP permitiendo el transporte fácil de la muestra a un laboratorio central (Mueller 2004, *Clin Chem Lab Med* 42: 942-4). Las muestras de sangre se pueden almacenar a temperatura ambiente durante varios días o se pueden enviar o transportarse sin pérdida de recuperación. Por el contrario, el almacenamiento de BNP durante 48 horas a temperatura ambiente o a 4 grados Celsius conduce a una pérdida de concentración de al menos un 20 % (Mueller *loc. cit.*, Wu 2004, *Clint Chem* 50: 867-73). Por lo tanto, dependiendo del curso temporal o de las propiedades de interés, puede ser ventajosa la medición de las formas activas o inactivas del péptido natriurético. Péptidos natriuréticos más preferentes de acuerdo con la presente invención son BNP y NT-proBNP o sus variantes. Los péptidos natriuréticos más preferentes de acuerdo con la presente invención son NT-proBNP o sus variantes. Como se analizó anteriormente de forma sucinta, el NT-proBNP humano, tal como se hace referencia de acuerdo con la presente invención, es un polipéptido que comprende, preferentemente, 76 aminoácidos de longitud correspondiente a la porción N-terminal de la molécula de NT-proBNP humana. La estructura de BNP y de NT-proBNP humanos se ha descrito ya en detalle en la técnica anterior, por ejemplo, en los documentos WO 02/089657, WO 02/083913 o Bonow *loc. cit.* Preferentemente, el NT-proBNP humano como se usa en el presente documento es NT-proBNP humano tal como se divulga en el documento EP 0 648 228 B1. Estos documentos de la técnica anterior se incorporan en el presente documento a modo de referencia con respecto a las secuencias específicas de NT-proBNP y sus variantes que se divulgan en los mismos. El NT-proBNP al que se hace referencia de acuerdo con la presente invención comprende además variantes alélicas y otras variantes de dicha secuencia específica para el NT-proBNP humano que se analizó anteriormente. Específicamente, se contemplan polipéptidos variantes que, a nivel de los aminoácidos, son idénticos al menos en un 60 %, más preferentemente al menos en un 70 %, al menos en un 80 %, al menos en un 90 %, al menos en un 95 %, al menos en un 98 % o al menos en un 99 % idénticos al NT-proBNP humano. La forma de determinar el grado de identidad se especifica en otra parte del presente documento. Sustancialmente similares y también previstos son los productos de degradación proteolítica que todavía son reconocidos por los medios diagnósticos o por ligandos dirigidos contra el respectivo péptido de longitud completa. También están incluidos polipéptidos variantes que tienen eliminaciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de NT-proBNP humano, siempre que dichos polipéptidos tengan las propiedades de NT-proBNP. Las propiedades de NT-proBNP como se mencionan en el presente documento son propiedades inmunológicas y/o biológicas. Preferentemente, las variantes de NT-proBNP tienen propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítomos) comparables a las de NT-proBNP. De este modo, las variantes serán reconocibles por los medios o ligandos mencionados anteriormente que se usaron para la determinación de la cantidad de los péptidos natriuréticos. Las propiedades biológicas y/o inmunológicas de NT-proBNP se pueden detectar mediante el ensayo que se describe en Karl *et al.* (Karl 1999, *Scand J Clin Invest* 230:177-181), Yeo *et al.* (Yeo 2003, *Clinica Chimica Acta* 338:107-115). Las variantes también incluyen péptidos modificados postraduccionales tales como péptidos glicosilados. Además, una variante de acuerdo con la presente invención es también un péptido o polipéptido que ha sido modificado después de la recogida de la muestra, por ejemplo, mediante unión covalente o no covalente al péptido de un marcador, particularmente un marcador radiactivo o fluorescente.

La forma de determinar las cantidades de referencia adecuadas se describe anteriormente en el presente documento.

Preferentemente, una cantidad de referencia que define una cantidad umbral para el péptido natriurético, y preferentemente para NT-proBNP, tal como se hace referencia de acuerdo con la presente invención, es de 250 pg/ml, 400, 500 o de 1000 pg/ml. De los umbrales para NT-proBNP mencionados anteriormente, 250 pg/ml es el umbral más preferente (preferentemente en una muestra de suero).

Preferentemente, una cantidad de troponina cardíaca inferior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca y una cantidad de un péptido natriurético inferior a la cantidad de referencia para dicho péptido natriurético indican que dicho sujeto es susceptible de tratamiento antiangiogénico.

Preferentemente, una cantidad de troponina cardíaca superior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca y una cantidad de un péptido natriurético superior a la cantidad de referencia para dicho péptido natriurético indican que dicho sujeto no es susceptible de tratamiento antiangiogénico. Para dicho sujeto se contemplará un tratamiento que no sea un tratamiento antiangiogénico.

5 Si, en una muestra de un sujeto, (i) la cantidad de troponina cardíaca es superior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca y la cantidad de un péptido natriurético es inferior a la cantidad de referencia para un péptido natriurético, o (ii) la cantidad de troponina cardíaca es inferior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca y la cantidad de un péptido natriurético es superior a la cantidad de referencia para un péptido natriurético, dicho sujeto necesita ser monitorizado cuidadosamente si dicho sujeto está siendo tratado con fármacos antiangiogénicos.

15 El término "predicción" como se usa para evaluar la probabilidad de acuerdo con la que dicho sujeto desarrollará un accidente cardiovascular, preferentemente un accidente cardiovascular agudo dentro de una ventana de tiempo definida (ventana predictiva), si dicho sujeto toma fármacos antiangiogénicos (en el futuro). Por lo tanto, el procedimiento mencionado anteriormente es particularmente ventajoso para la evaluación de riesgos para sujetos que son candidatos a recibir fármacos antiangiogénicos. En consecuencia, la muestra se obtiene preferentemente poco antes de que se inicie una terapia antiangiogénica. Se contempla particularmente obtener dicha muestra no más de un día, no más de tres días, no más de una semana y, más preferentemente, no más de un mes antes de que se inicie el tratamiento antiangiogénico.

25 La ventana predictiva es un intervalo en el cual el sujeto desarrollará un accidente cardiovascular o morirá de acuerdo con la probabilidad pronosticada (si está tomando fármacos antiangiogénicos). La ventana predictiva puede ser toda la vida restante del sujeto tras el análisis por el procedimiento de la presente invención. Preferentemente, sin embargo, la ventana predictiva es un intervalo de un mes, seis meses o uno, dos, tres, cuatro, cinco o diez años después de iniciar un tratamiento antiangiogénico. Tal como comprenderán los expertos en la técnica, dicha valoración no suele pretender ser correcta para el 100 % de los sujetos a analizar. El término, sin embargo, requiere que la evaluación sea válida para una parte estadísticamente significativa de los sujetos a analizar. El experto en la técnica puede determinar sin mayor problema si una parte es estadísticamente significativa utilizando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983. Los intervalos de confianza preferentes son de al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %. Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferentemente, la probabilidad prevista por la presente invención permite que la predicción sea correcta para al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de los sujetos de una cohorte dada.

40 El término "predictor del riesgo de un accidente cardiovascular agudo" tal como se usa en el presente documento significa que el sujeto que se va a analizar por el procedimiento de la presente invención se asigna o bien al grupo de sujetos de una población que tiene un valor normal (es decir, no elevado) y, por lo tanto, un riesgo normal de desarrollar un accidente cardiovascular agudo, o bien a un grupo de sujetos con un riesgo elevado, o a un grupo de sujetos con un riesgo significativamente elevado. Un riesgo elevado como se menciona de acuerdo con la presente invención también significa que el riesgo de desarrollar un accidente cardiovascular dentro de una ventana predictiva predeterminada es elevado para un sujeto con respecto al riesgo promedio de un accidente cardiovascular en una población de sujetos como se define en el presente documento. Preferentemente, para una ventana predictiva de un año, el riesgo promedio está dentro del intervalo del 1,5 al 2,0 %, preferentemente, inferior al 2,0 %. Un riesgo elevado, tal como se usa en el presente documento se refiere, preferentemente, a un riesgo de más de un 2,0 %, preferentemente más de un 4,0 %, y lo más preferentemente entre un 3,0 % y un 5,0 %, con respecto a una ventana predictiva de un año. Un riesgo significativamente elevado tal como se usa en el presente documento, se refiere preferentemente a un riesgo superior a un 5,0 %, preferentemente dentro del intervalo de un 5,0 % a un 8,0 %, o incluso superior con respecto a un intervalo predictivo de un año.

55 Los accidentes cardiovasculares agudos son, preferentemente, síndromes coronarios agudos (SCA). Los pacientes con SCA pueden mostrar una angina de pecho inestable (API) o un infarto de miocardio (IM). El IM puede ser un infarto de miocardio con elevación de ST (IMEST) o un infarto de miocardio sin elevación de ST (IMSEST). La aparición de un SCA puede ir seguida por una disfunción ventricular izquierda (DVI) y síntomas de insuficiencia cardíaca. Cómo diagnosticar un accidente cardiovascular agudo es bien conocido en la técnica.

60 Preferentemente, una cantidad de troponina cardíaca en una muestra de un sujeto superior a la cantidad de referencia es indicativa de que un sujeto tiene un riesgo elevado de un accidente cardiovascular agudo, si dicho sujeto recibe tratamiento antiangiogénico. Las cantidades de referencia preferentes se pueden ver en otra parte en el presente documento.

65 Preferentemente, una cantidad de troponina cardíaca en una muestra de un sujeto inferior a la cantidad de referencia es indicativa de que un sujeto no tiene un riesgo elevado y, por lo tanto, tiene un riesgo promedio de un accidente cardiovascular agudo (si recibe tratamiento antiangiogénico en el futuro).

Si también se determina un péptido natriurético, se aplica lo siguiente:

5 Preferentemente, una cantidad de troponina cardíaca inferior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca y una cantidad de un péptido natriurético inferior a la cantidad de referencia para dicho péptido natriurético es indicativa de que un sujeto no tiene un alto riesgo y, por tanto, tiene un riesgo promedio de un accidente cardiovascular agudo (para las cantidades de referencia preferentes, véase más arriba en el presente documento).

10 Preferentemente, una cantidad de troponina cardíaca superior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca y una cantidad de un péptido natriurético superior a la cantidad de referencia para dicho péptido natriurético es indicativa de que un sujeto tiene un riesgo elevado de un accidente cardiovascular agudo (para las cantidades de referencia preferentes, véase más arriba en el presente documento).

15 Mediante la realización de las etapas del procedimiento mencionado anteriormente, también se puede predecir el riesgo de padecer hipertensión, insuficiencia cardíaca u otros eventos vasculares (particularmente, accidente cerebrovascular, enfermedad arterial periférica y/o angina abdominal), preferentemente como consecuencia de dicho tratamiento para un sujeto como se define anteriormente.

20 Por último, la presente invención se refiere, preferentemente, al uso de una troponina cardíaca para identificar un sujeto que es susceptible de tratamiento antiangiogénico. Más preferentemente, la presente invención se refiere al uso de una troponina cardíaca y un péptido natriurético para identificar un sujeto que es susceptible de tratamiento antiangiogénico.

25 Todas las referencias citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan en el presente documento a modo de referencia con respecto a su contenido de divulgación completo y al contenido de divulgación que se menciona específicamente en esta memoria descriptiva.

La figura muestra:

30 **Figura 1:** NT-proBNP y troponina T en sujetos que padecen cáncer y en individuos sanos. Se indican las medianas de las cantidades para el percentil 75; N = número de individuos.

Los siguientes Ejemplos se limitan a ilustrar la presente invención. No se interpretarán, de ninguna manera, como limitantes del alcance de la invención.

### 35 **Ejemplo 1: Determinación de troponina T y NT-proBNP en muestras de suero y plasma**

Se determinaron los niveles de troponina T y NT-proBNP en un colectivo de 324 pacientes que padecían de diversos tipos de tumores. Sorprendentemente, la mayoría de los pacientes con tumores (56 %) tenían niveles de NT-proBNP superiores a 125 pg/ml, indicando insuficiencia cardíaca. Además, un 85 % de los pacientes con tumores presentaban niveles detectables de troponina T (niveles superiores a 1 pg/ml de troponina T que indicaban necrosis del tejido cardíaco). En un 29 % de los pacientes se midieron incluso niveles de troponina T mayores de 10 pg/ml.

45 En conjunto, los resultados del estudio subyacente a la presente invención muestran que la determinación de una troponina cardíaca (y de NT-proBNP) permite la identificación de sujetos que están en riesgo de sufrir un accidente cardiovascular como consecuencia de un tratamiento antiangiogénico y, por lo tanto, permite la identificación de sujetos que son susceptibles o no susceptibles de un tratamiento antiangiogénico.

### **Ejemplo 2:**

50 Un paciente varón de 59 años de edad padece cáncer colorrectal avanzado. El paciente tiene antecedentes de enfermedad coronaria y, por lo tanto, tiene dos endoprótesis vasculares implantadas. El cáncer colorrectal avanzado requiere un tratamiento adecuado. Se examina al paciente y se determinan las cantidades de troponina T (11 pg/ml) y NT-proBNP (620 pg/ml) en una muestra de suero. Además, se determina la FEVI (35 %) que indica una función sistólica ventricular izquierda reducida. El sujeto se somete posteriormente a pruebas de esfuerzo cardíaco. Dado que la prueba de estrés cardíaco solo indica regiones en el miocardio con defectos de perfusión no reversibles (y no hay regiones con defectos de perfusión reversibles), no se lleva a cabo una revascularización del miocardio. Se inicia un tratamiento con inhibidores de VEGF. Cuatro meses después del inicio de la terapia, el paciente sufre un infarto de miocardio.

### 60 **Ejemplo 3:**

65 Un paciente varón de 62 años de edad y exfumador sufre un infarto de miocardio. Tres años más tarde, se le diagnostica un cáncer colorrectal avanzado y necesita un tratamiento adecuado del cáncer. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) se determina mediante ecocardiografía (40 %), indicando una disfunción sistólica leve. Por otra parte, se determinan las cantidades de una troponina T (12 pg/ml) y NT-proBNP (410 pg/ml) en una muestra del paciente. El paciente se somete a una prueba de esfuerzo cardíaco que muestra que una región de la

pared posterior del miocardio tiene una contractilidad disfuncional (defectos de perfusión reversibles). La angiografía coronaria se lleva a cabo indicando un 80 % de estenosis de la arteria que suministra sangre a la región de contractilidad disfuncional. Cuatro semanas después de una revascularización satisfactoria de las regiones miocárdicas afectadas, se determinaron de nuevo los niveles de troponina T (4 pg/ml) y NT-proBNP (180 pg/ml). Se inicia un tratamiento con inhibidores de VEGF. El paciente no padece efectos secundarios adversos durante el tratamiento.

**Ejemplo 4:**

Los niveles de troponina T y/o NT-proBNP se determinaron en muestras de suero obtenidas de 27 pacientes tratados con bevacizumab antes de iniciar el tratamiento y durante el tratamiento. En la mayoría de los pacientes (más de un 80 %), los niveles de los marcadores permanecieron sin cambios, es decir, no hubo un aumento significativo, indicando que la terapia no tuvo efectos secundarios adversos sobre el sistema cardiovascular. En algunos pacientes, sin embargo, hubo un aumento significativo de los marcadores medidos, lo que indica un riesgo de complicaciones cardiovasculares. A continuación en el presente documento se muestran ejemplos.

Paciente (número ID: 4201): Las muestras se obtuvieron al inicio del tratamiento, así como 14, 21 y 35 días después de iniciar el tratamiento (sin efectos secundarios adversos sobre el sistema cardiovascular)

ID del paciente	Muestra obtenida (d)	Troponina T (pg/ml)	NT-proBNP (pg/ml)
4201	0	4	38
4201	14	1	51
4201	21	1	26
4201	35	1	16

Paciente (número ID: 4208): Troponina T y NT-proBNP medidas 13 y 57 días después de iniciar el tratamiento. Se observaron aumentos significativos de los marcadores medidos, lo que indica un riesgo de complicaciones cardiovasculares.

ID del paciente	Muestra obtenida (d)	Troponina T (pg/ml)	NT-proBNP (pg/ml)
4208	13	13	296
4208	57	44	844

Paciente (número ID: 4210): Las muestras se obtuvieron al inicio del tratamiento, así como 14 días después de iniciar el tratamiento. En el inicio del tratamiento, el nivel de troponina T se incrementó significativamente (también el nivel de NT-proBNP: 1916 pg/ml). Durante el tratamiento, hubo un aumento adicional de la troponina T, lo que indica un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares.

ID del paciente	Muestra obtenida (d)	Troponina T (pg/ml)
4210	0	42
4210	14	80

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para predecir el riesgo de sufrir un accidente cardiovascular agudo y/o insuficiencia cardíaca como consecuencia de un futuro tratamiento antiangiogénico con un antagonista de VEGF, que comprende las etapas de
- 10 a) determinar la cantidad de troponina cardíaca en una muestra de un sujeto; y  
b) comparar la cantidad de troponina cardíaca determinada en la etapa a) con la cantidad de referencia para una troponina cardíaca,
- 15 en el que se predice para dicho sujeto el riesgo de un accidente cardiovascular agudo y/o insuficiencia cardíaca de un futuro tratamiento antiangiogénico con un antagonista de VEGF.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha muestra se obtiene no más de un mes antes de que se inicie dicho tratamiento.
3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 y 2, en el que dicho sujeto padece cáncer.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tratamiento antiangiogénico con un antagonista de VEGF se realiza mediante la administración de un anticuerpo anti-VEGF.
- 20 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que una cantidad de troponina cardíaca superior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca indica que dicho sujeto tiene un riesgo aumentado de sufrir un accidente cardiovascular agudo y/o insuficiencia cardíaca si recibe tratamiento antiangiogénico con un antagonista de VEGF.
- 25 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha troponina cardíaca es troponina T y la cantidad de referencia para troponina T es de 10 pg/ml.
- 30 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además determinar la cantidad de un péptido natriurético en una muestra de dicho sujeto y comparar la cantidad determinada de este modo con una cantidad de referencia.
- 35 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que una cantidad de troponina cardíaca superior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca y una cantidad de un péptido natriurético superior a la cantidad de referencia para dicho péptido natriurético indican que dicho sujeto tiene un riesgo aumentado de sufrir un accidente cardiovascular agudo y/o insuficiencia cardíaca si recibe tratamiento antiangiogénico con un antagonista de VEGF.
- 40 9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que (i) una cantidad de troponina cardíaca superior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca y una cantidad de un péptido natriurético inferior a la cantidad de referencia para un péptido natriurético, o (ii) una cantidad de troponina cardíaca inferior a la cantidad de referencia para dicha troponina cardíaca y una cantidad de un péptido natriurético superior a la cantidad de referencia para un péptido natriurético indican que dicho sujeto necesita ser monitorizado cuidadosamente si dicho sujeto está siendo tratado con fármacos antiangiogénicos.
- 45 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el péptido natriurético es NT-proBNP y la cantidad de referencia para NT-proBNP es de 250 pg/ml.
- 50 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el riesgo aumentado del sujeto de sufrir un accidente cardiovascular y/o insuficiencia cardíaca indica que no se tratará a dicho sujeto mediante tratamiento antiangiogénico con un antagonista de VEGF.

Fig. 1

