

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 968**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2014 PCT/JP2014/063134**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14185540**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2014 E 14727633 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2997377**

54 Título: **Biomarcadores para pronosticar y evaluar la reactividad de sujetos con cáncer de endometrio a compuestos con lenvatinib**

30 Prioridad:

**14.05.2013 US 201361823034 P**

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

**30.10.2018**

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)  
4-6-10 Koishikawa Bunkyo-ku  
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**FUNAHASHI, YASUHIRO;  
KADOWAKI, TADASHI y  
SACHDEV, PALLAVI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 687 968 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 para pronosticar y evaluar la reactividad de sujetos con cáncer de endometrio a compuestos con lenvatinib.

Referencia cruzada a solicitud relacionada

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los EE. UU. n.º 61/823.034, presentada el 14 de mayo de 2013.

Campo técnico

La presente invención se refiere, generalmente, a biomarcadores y cáncer de endometrio.

Técnica anterior

- 10 Se han desarrollado diversos inhibidores de cinasa como agentes antitumorales. Por ejemplo, se conoce un grupo de compuestos que tienen actividad inhibidora contra las tirosina cinasas receptoras, tales como el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR, por sus siglas en inglés), que inhiben la angiogénesis y se consideran una nueva clase de agentes antitumorales. El mesilato de lenvatinib (también conocido como E7080) es un inhibidor de tirosina cinasa oral dirigido a VEGFR1-3, el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR, por sus siglas en inglés) 1-4, el receptor redispuesto durante la transfección (RET, por sus siglas en inglés), KIT, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, por sus siglas en inglés). En estudios clínicos de fase I de mesilato de lenvatinib, se observó la respuesta al tratamiento en diversos tipos de tumores, p. ej., cánceres de endometrio.

- 20 Infelizmente, la mayoría de los tratamientos antitumorales se asocian a efectos secundarios indeseables, tales como náuseas intensas, vómitos o mucha fatiga. Además, aunque los tratamientos antitumorales han tenido éxito, no producen respuestas clínicas significativas en todos los pacientes que los reciben, lo cual resulta en efectos secundarios indeseables, retrasos y costes asociados al tratamiento ineficaz. Por lo tanto, existe una gran necesidad de biomarcadores que puedan usarse para pronosticar la respuesta de un sujeto a un agente antitumoral antes de su administración.

- 25 El documento WO 2012/157672 describe que, en un subgrupo de pacientes con melanoma que tenían B-raf y PTEN naturales o B-raf y PTEN mutados, los niveles altos de Ang2, IL6, CXCR4, COL4A3, MEIS1, FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 o VEGFR1 y los niveles bajos de SHC1, NRP2, ARHGAP22, SCG2 o PML son factores pronóstico de reactividad a compuestos de lenvatinib.

- 30 El documento WO 2012/166899 describe que, en sujetos con cáncer de tiroides o renal, los niveles bajos de Ang2, VEGFA, IFNG o KDR soluble o los niveles altos de IL-6, IL-13, PDGFAB, CSF3, CCL3, CCL4, FLT4 o FGF2 son factores pronóstico de reactividad a compuestos de lenvatinib. Sin embargo, el documento WO 2012/166899 no describe ni sugiere que Ang2 pueda usarse como factor pronóstico de reactividad a compuestos de lenvatinib en pacientes con cáncer de endometrio.

- 35 Llovet et al. Clin. Cancer Res., 18(8):2290-2300 (2012), informan que, en pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado, aunque los biomarcadores de angiogénesis Ang2 y VEGF fueron factores pronóstico de supervivencia, estos biomarcadores no fueron factores pronóstico de la reactividad al inhibidor de angiogénesis, sorafenib.

Por lo tanto, no se espera que un biomarcador de angiogénesis como Ang2 sirva como biomarcador de la reactividad a inhibidores de la angiogénesis en todos los cánceres.

- 40 El documento EP 2293071 se refiere a métodos para pronosticar el desenlace clínico o determinar el ciclo de tratamiento en un sujeto que padece cáncer colorrectal y para monitorizar la progresión del cáncer colorrectal en un sujeto. El documento WO 2012/154935 se refiere a biomarcadores que son útiles para pronosticar la reactividad o no reactividad de un sujeto a un agente antitumoral tal como lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Compendio de la invención

- 45 La presente solicitud se basa, al menos en parte, en la identificación de biomarcadores que son factores pronóstico de una reactividad de un sujeto con cáncer de endometrio a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib). El nivel de expresión de determinados genes (p. ej., las proteínas y el ARNm de los genes indicados en la Tabla 1) antes del tratamiento se identifica como un factor pronóstico útil de la reactividad (p. ej., supervivencia y/o respuesta tumoral) a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib). Por lo tanto, los biomarcadores y composiciones descritos en la presente memoria son útiles, por ejemplo, para identificar, estratificar y/o seleccionar a un paciente o un subconjunto de pacientes que tienen cáncer de endometrio que se podrían beneficiar del tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib). Además, los métodos descritos en la presente memoria son útiles, por ejemplo, para seleccionar las

modalidades de tratamiento adecuadas (p. ej., tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib) o un tratamiento alternativo para el cáncer de endometrio) para un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio.

5 En un aspecto, la descripción proporciona un método para pronosticar la respuesta de un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. El método implica someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto y determinar que la concentración de la proteína Ang2 en la muestra biológica es baja, en comparación con un testigo. El sujeto que tiene una concentración baja de la proteína Ang2 en la muestra biológica se identifica como con probabilidad de responder al tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

10 Además, la descripción proporciona un método para pronosticar la respuesta de un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. El método implica someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto y determinar que la concentración de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA en la muestra biológica es baja, en comparación con un testigo. El sujeto que tiene una concentración baja de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$ , o VEGFA en la muestra biológica se identifica como con probabilidad de responder al tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

20 En un segundo aspecto, la descripción proporciona un método para pronosticar la respuesta de un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. El método implica someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto y determinar que la concentración de la proteína Ang2 en la muestra biológica es alta, en comparación con un testigo. El sujeto que tiene una concentración alta de la proteína Ang2 en la muestra biológica se identifica como sin probabilidad de responder al tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

25 Además, la descripción proporciona un método para pronosticar la respuesta de un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. El método implica someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto y determinar que la concentración de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA en la muestra biológica es alta, en comparación con un testigo. El sujeto que tiene una concentración alta de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$ , o VEGFA en la muestra biológica se identifica como sin probabilidad de responder al tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

30 En un tercer aspecto, la descripción proporciona un método para seleccionar a un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio para un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Este método implica someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto humano y determinar que la concentración de la proteína Ang2 en la muestra biológica es baja, en comparación con un testigo. El método implica, además, seleccionar al sujeto humano que tiene una concentración baja de la proteína Ang2 en la muestra biológica para el tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

35 Además, la descripción proporciona un método para seleccionar a un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio para un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Este método implica someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto humano y determinar que la concentración de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA en la muestra biológica es baja, en comparación con un testigo. El método implica, además, seleccionar al sujeto humano que tiene una concentración baja de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA en la muestra biológica para el tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

40 En un cuarto aspecto, la descripción proporciona un método para tratar un cáncer de endometrio. El método implica proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto que padece cáncer de endometrio; medir, en la muestra biológica, un nivel de expresión de la proteína Ang2 que es bajo en comparación con un testigo; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

45 Además, el método implica proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto que padece cáncer de endometrio; medir, en la muestra biológica, un nivel de expresión de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA que es bajo en comparación con un testigo; y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

50 En un quinto aspecto, la descripción proporciona un método para tratar un cáncer de endometrio. El método implica administrar al sujeto que padece cáncer de endometrio una cantidad terapéuticamente eficaz de lenvatinib o una sal

farmacéuticamente aceptable de este, en donde el sujeto se ha identificado como que tiene un nivel de expresión de la proteína Ang2 que es bajo en comparación con un testigo. En determinadas realizaciones, se ha identificado que el sujeto tiene una concentración baja de la proteína Ang2 en una muestra biológica obtenida del sujeto humano.

5 Además, el método implica administrar al sujeto que padece cáncer de endometrio una cantidad terapéuticamente eficaz de lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde el sujeto se ha identificado como que tiene un nivel de expresión de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA que es bajo en comparación con un testigo. En determinadas realizaciones, se ha identificado que el sujeto tiene una concentración baja de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA en una muestra biológica obtenida del sujeto humano.

10 Las siguientes realizaciones se contemplan para todos los aspectos mencionados anteriormente.

En una realización, el lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este es mesilato de lenvatinib.

15 En una realización, el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio avanzado. En otra realización, el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio recurrente. En una realización, el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio en estadio III. En una realización, el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio en estadio IV. En una realización, el cáncer de endometrio es una forma inoperable de cáncer de endometrio en estadio III o estadio IV.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de fluido uterino, una muestra de orina, una muestra de tumor de endometrio archivada y una muestra de biopsia de endometrio.

20 En algunas realizaciones, el testigo es un valor de corte preestablecido. En una realización, el valor de corte preestablecido es una concentración de la proteína Ang2 que se determina en función del análisis de la curva de rendimiento diagnóstico (ROC, por sus siglas en inglés) que predice la respuesta tumoral con un valor predictivo positivo más alto en comparación con la ausencia de corte, y en donde una concentración de la proteína Ang2 igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de Ang2 y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de Ang2. La respuesta tumoral es un índice de respuesta objetivo (ORR, por sus siglas en inglés), un índice de beneficio clínico (CBR, por sus siglas en inglés) o % de reducción del volumen tumoral máxima. En otra realización, el valor de corte preestablecido es una concentración de la proteína Ang2 que se determina en función de modelos de simulación que predicen la supervivencia, y en donde una concentración de la proteína Ang2 igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de Ang2 y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de Ang2. En este contexto, la supervivencia es supervivencia sin progresión (PFS, por sus siglas en inglés) o supervivencia global (OS, por sus siglas en inglés). En una realización específica, el valor de corte preestablecido es una concentración de la proteína Ang2 que está dentro del intervalo de 1866,5 a 6024,5 (p. ej., 2082,5 pg/ml), y en donde una concentración de la proteína Ang2 igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de Ang2 y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de Ang2.

40 En algunas realizaciones, el método incluye, además, comunicar los resultados de la prueba al médico del sujeto. En determinadas realizaciones, el método incluye, además, modificar la historia clínica del sujeto para indicar que es probable o improbable que el sujeto responda a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En realizaciones específicas, la historia se crea en un medio de lectura informática. En determinadas realizaciones, el método incluye, además, prescribir un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este al sujeto si el perfil de expresión del biomarcador pronostica que el sujeto responderá a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En determinadas realizaciones, el método incluye, además, prescribir un tratamiento que no comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este al sujeto si el perfil de expresión del biomarcador pronostica que el sujeto no responderá a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas realizaciones, el método incluye, además, administrar al sujeto un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este si el perfil de expresión del biomarcador pronostica que el sujeto responderá a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas realizaciones, el método incluye, además, administrar al sujeto un tratamiento que no comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este si el perfil de expresión del biomarcador pronostica que el sujeto no responderá a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

55 En una realización, la concentración de la proteína se mide mediante un método inmunológico. En algunas realizaciones, el método inmunológico se selecciona del grupo que consiste en inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, inmunoensayo quimioluminiscente, inmunoensayo electroquimioluminiscente, inmunoensayo turbidimétrico con látex, inmunoensayo fotométrico con látex, ensayo inmunocromatográfico y transferencia western. En otra realización, la concentración de la proteína se mide mediante espectrometría de masas.

- 5 En un sexto aspecto, la presente descripción proporciona lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este para uso para tratar el cáncer de endometrio en un sujeto humano, en donde el sujeto humano se identifica mediante los métodos descritos anteriormente como un sujeto que es probable que responda a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable de lenvatinib es mesilato de lenvatinib. En una realización, el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio avanzado. En otra realización, el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio recurrente. En una realización, el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio en estadio III. En una realización, el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio en estadio IV. En una realización, el cáncer de endometrio es una forma inoperable de cáncer de endometrio en estadio III o estadio IV.
- 10 En un séptimo aspecto, la descripción proporciona un agente de detección de la proteína Ang2 para su uso para pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una realización, el agente de detección de la proteína Ang2 es un anticuerpo anti-Ang2.
- 15 Además, la descripción proporciona un agente de detección de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA para su uso para pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En una realización, el agente de detección de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA es un anticuerpo anti-HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA.
- 20 En una octava realización, la descripción presenta un kit que comprende un agente de detección de la proteína Ang2 para su uso para pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En determinadas realizaciones, el agente de detección de la proteína Ang2 es un anticuerpo anti-Ang2. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-Ang2 es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-Ang2 es un anticuerpo policlonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un agente detectable. En una realización, el agente detectable es peroxidasa de rábano picante, biotina, un resto fluorescente, un resto radioactivo, una etiqueta de histidina o una etiqueta peptídica. En una realización, una microplaca se recubre con el anticuerpo etiquetado de manera detectable. En determinadas realizaciones, la microplaca es una microplaca de 96 pocillos. En determinadas realizaciones, el kit incluye, opcionalmente, uno o más patrones de concentración, uno o más tampones (p. ej., tampones de lavado), uno o más diluyentes (p. ej., diluyentes de ensayo y/o calibración), y uno o más reactivos que facilitan detectar si el agente de detección de la proteína Ang2 se une específicamente a Ang2 en una muestra biológica obtenida del sujeto (p. ej., reactivos de color, disoluciones de terminación).
- 25 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-Ang2 es un anticuerpo policlonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un agente detectable. En una realización, el agente detectable es peroxidasa de rábano picante, biotina, un resto fluorescente, un resto radioactivo, una etiqueta de histidina o una etiqueta peptídica. En una realización, una microplaca se recubre con el anticuerpo etiquetado de manera detectable. En determinadas realizaciones, la microplaca es una microplaca de 96 pocillos. En determinadas realizaciones, el kit incluye, opcionalmente, uno o más patrones de concentración, uno o más tampones (p. ej., tampones de lavado), uno o más diluyentes (p. ej., diluyentes de ensayo y/o calibración), y uno o más reactivos que facilitan detectar si el agente de detección de la proteína se une específicamente a HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA en una muestra biológica obtenida del sujeto (p. ej., reactivos de color, disoluciones de terminación).
- 30 Además, la descripción presenta un kit que comprende un agente de detección de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA para su uso para pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En determinadas realizaciones, el agente de detección de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA es un anticuerpo anti-HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un agente detectable. En una realización, el agente detectable es peroxidasa de rábano picante, biotina, un resto fluorescente, un resto radioactivo, una etiqueta de histidina o una etiqueta peptídica. En una realización, una microplaca se recubre con el anticuerpo etiquetado de manera detectable. En determinadas realizaciones, la microplaca es una microplaca de 96 pocillos. En determinadas realizaciones, el kit incluye, opcionalmente, uno o más patrones de concentración, uno o más tampones (p. ej., tampones de lavado), uno o más diluyentes (p. ej., diluyentes de ensayo y/o calibración), y uno o más reactivos que facilitan detectar si el agente de detección de la proteína se une específicamente a HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA en una muestra biológica obtenida del sujeto (p. ej., reactivos de color, disoluciones de terminación).
- 35 Además, la descripción presenta un kit que comprende un agente de detección de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA para su uso para pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En determinadas realizaciones, el agente de detección de la proteína HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA es un anticuerpo anti-HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un agente detectable. En una realización, el agente detectable es peroxidasa de rábano picante, biotina, un resto fluorescente, un resto radioactivo, una etiqueta de histidina o una etiqueta peptídica. En una realización, una microplaca se recubre con el anticuerpo etiquetado de manera detectable. En determinadas realizaciones, la microplaca es una microplaca de 96 pocillos. En determinadas realizaciones, el kit incluye, opcionalmente, uno o más patrones de concentración, uno o más tampones (p. ej., tampones de lavado), uno o más diluyentes (p. ej., diluyentes de ensayo y/o calibración), y uno o más reactivos que facilitan detectar si el agente de detección de la proteína se une específicamente a HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PGF, sIL-2R $\alpha$ , Tie-2, TNF- $\alpha$  o VEGFA en una muestra biológica obtenida del sujeto (p. ej., reactivos de color, disoluciones de terminación).
- 40 A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica al cual corresponde esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente para poner en práctica o evaluar la presente invención, a continuación, se describen los métodos y materiales de ejemplo. En caso de conflicto, prevalecerá la presente solicitud, incluidas las definiciones. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.
- 45 A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica al cual corresponde esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente para poner en práctica o evaluar la presente invención, a continuación, se describen los métodos y materiales de ejemplo. En caso de conflicto, prevalecerá la presente solicitud, incluidas las definiciones. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.
- 50 Otros rasgos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.
- 55 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación gráfica del cambio en los niveles de biomarcadores sanguíneos después del tratamiento E7080.

La Figura 2 es una serie de gráficas que muestran la correlación entre los niveles iniciales de itosina, quimiocina y factores angiogénicos (CAF, por sus siglas en inglés) con la respuesta tumoral.

5 La Figura 3 es una serie de gráficas que muestran que no hay una correlación significativa entre el peso, la edad y la histología con la supervivencia sin progresión (PFS) y la supervivencia global (OS).

La Figura 4 muestra los resultados de un análisis multivariante que no identifica posibles factores de combinación con Ang-2 como predicciones del desenlace clínico mejoradas.

10 La Figura 5 incluye dos gráficas que muestra la mediana de PFS y la mediana de OS de subgrupos de pacientes con cáncer de endometrio estratificados por niveles iniciales de Ang-2.

La Figura 6 incluye dos gráficas que muestran el enriquecimiento de poblaciones de pacientes con mejor índice de respuesta objetivo (ORR) en función del nivel inicial de Ang-2.

#### Descripción de realizaciones

15 La presente descripción proporciona métodos y composiciones para predecir la respuesta de un sujeto con cáncer de endometrio (tal como un paciente humano) a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib). La descripción proporciona biomarcadores predictivos (p. ej., niveles de expresión de proteína o ARN) para identificar a aquellos sujetos que padecen, se presume que padecen o están en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio (p. ej., cáncer de endometrio avanzado o recurrente) para quienes la administración de un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej. mesilato de lenvatinib) es probable que sea eficaz o ineficaz. Los biomarcadores, composiciones y métodos descritos en la presente memoria son útiles para seleccionar las modalidades terapéuticas adecuadas (p. ej., un tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib) o un tratamiento alternativo) para sujetos que padecen, se presume que padecen o están en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio. Además, la presente solicitud proporciona métodos para seleccionar pacientes que padecen, se presume que padecen o están en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio que podrían beneficiarse de un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib), así como métodos de tratamiento.

#### Definiciones

30 El término “nivel de expresión disminuido/reducido” significa un nivel de expresión (cantidad) que es más bajo que el nivel de expresión en un testigo.

El término “nivel de expresión elevado” significa un nivel de expresión (cantidad) que es más alto que el nivel de expresión en un testigo.

El término “nivel de expresión de un gen” significa un nivel de expresión (cantidad) de la proteína codificada por el gen o el ARN transcrito a partir del gen.

35 El término “concentración baja” significa una concentración de la sustancia que se analiza que es más baja que la concentración de dicha sustancia en un testigo.

El término “concentración alta” significa una concentración de la sustancia que se analiza que es más alta que la concentración de dicha sustancia en un testigo.

40 El término “lenvatinib” se refiere a 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida. Este compuesto se describe en el Ejemplo 368 (véase la columna 270) de la patente estadounidense n.º 7.253.286. La patente estadounidense n.º 7.253.286 se incorpora como referencia en su totalidad en la presente memoria. El término “compuesto de lenvatinib” se refiere a “lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este”. Un ejemplo de una sal farmacéuticamente aceptable de lenvatinib es mesilato de lenvatinib. El mesilato de lenvatinib también se denomina E7080.

45 El término “sal farmacéuticamente aceptable” no está particularmente restringido al tipo de sal. Los ejemplos de dichas sales incluyen, pero no se limitan a, sal de adición de ácido inorgánica tal como sal de ácido clorhídrico, sal de ácido sulfúrico, sal de ácido carbónico, sal de bicarbonato, sal de ácido bromhídrico y sal de ácido yodhídrico; sal de adición de ácido carboxílico orgánica tal como sal de ácido acético, sal de ácido maleico, sal de ácido láctico, sal de ácido tartárico y sal de ácido trifluoroacético; sal de adición de ácido sulfónico orgánica tal como sal de ácido metanosulfónico, sal de ácido hidroximetanosulfónico, sal de ácido hidroxietanosulfónico, sal de ácido bencenosulfónico, sal de ácido toluenosulfónico y sal taurina; sal de adición de amina tal como sal de trimetilamina, sal de trietilamina, sal de piridina, sal de procaína, sal de picolina, sal de dicitohexilamina, sal de N,N'-dibenciletilendiamina, sal de N-metilglucamina, sal de dietanolamina, sal de trietanolamina, sal de tris(hidroximetilamino)metano y sal de fenetilbencilamina; y sal de adición de aminoácido tal como sal de arginina,

sal de lisina, sal de serina, sal de glicina, sal de ácido aspártico y sal de ácido glutámico. En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de ácido metanosulfónico (“mesilato”). La forma de sal de ácido metanosulfónico (es decir, el mesilato) de 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinacarboxamida se describe en la patente estadounidense 7.612.208, que se incorpora como referencia en la presente memoria en su totalidad.

“Polipéptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en la presente memoria y significan cualquier cadena de aminoácidos ligados por péptidos, independientemente de la longitud o modificación postraduccion. Típicamente, un polipéptido descrito en la presente memoria está “aislado” cuando constituye al menos 60 %, en peso, de la proteína total en una preparación, p. ej., 60 % de la proteína total en una muestra. En algunas realizaciones, un polipéptido descrito en la presente memoria consiste en al menos 75 %, al menos 90 % o al menos 99 %, en peso, de la proteína total en una preparación.

El término “que responde a un tratamiento” significa que el sujeto al que se le administró el tratamiento muestra una respuesta positiva al tratamiento proporcionado. Los ejemplos no limitantes de dicha respuesta positiva son: una disminución en el tamaño del tumor, una disminución en la metástasis de un tumor o un período más extenso de supervivencia después del tratamiento.

El término “sujeto” significa un mamífero que incluye, pero no se limita a, un humano, un chimpancé, un orangután, un gorila, un babuino, un mono, un ratón, una rata, un cerdo, un caballo, un perro y una vaca.

#### Cáncer de endometrio

El cáncer de endometrio se refiere a varios tipos de neoplasias que surgen en el endometrio, o revestimiento del útero. La mayoría de los cánceres de endometrio son carcinomas (generalmente adenocarcinomas). En otras palabras, se originan a partir de la capa simple de células epiteliales que recubre el endometrio y forma las glándulas endometriales. Algunas veces, los carcinomas de endometrio se clasifican en dos grupos: El tipo I incluye los cánceres que se encuentran en mujeres pre y perimenopáusicas y generalmente son mínimamente invasivos; el tipo II incluye los cánceres que se presentan en mujeres mayores, posmenopáusicas y que tienen un peor pronóstico que el tipo I. A diferencia de los carcinomas de endometrio, los sarcomas estromales endometriales poco comunes son cánceres que se originan en el tejido conjuntivo no glandular del endometrio.

Para elegir un plan de tratamiento para los pacientes, los médicos deben determinar cómo se ha diseminado el cáncer de endometrio en un paciente, en otras palabras, el “estadio” del cáncer de endometrio. El estadio del cáncer de endometrio se determina en función de un examen del tejido retirado durante una operación (determinación quirúrgica del estadio). El sistema de estadificación observa cuánto se ha diseminado el cáncer. El cáncer de endometrio se puede diseminar localmente al cuello uterino y otras partes del útero. También se puede diseminar regionalmente hacia los ganglios linfáticos cercanos. Además, este cáncer puede hacer metástasis en ganglios linfáticos distantes, la parte superior del abdomen, el epiplón u otros órganos tales como el pulmón, hígado, huesos y cerebro.

Los dos sistemas utilizados para estadificar cáncer de endometrio son el sistema FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) y el sistema de determinación de estadio del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés). Estos sistemas son básicamente iguales; la diferencia entre el sistema AJCC y el sistema FIGO es que el sistema FIGO no incluye el estadio 0. Ambos sistemas de estadificación clasifican el cáncer de endometrio en función de tres factores: la extensión del tumor (T), si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos (N) y si se ha diseminado a sitios distantes (M). A continuación, la información sobre el tumor, ganglios linfáticos y cualquier cáncer diseminado se combina para asignar el estadio de la enfermedad, un proceso llamado agrupación de estadios. Los estadios se describen usando el número 0 y numerales romanos del I al IV. Algunos estadios se dividen en subestadios indicados por letras y números.

Estadio 0: Tis, N0, M0 – Este estadio también se conoce como carcinoma *in situ*. Solo se encuentran células cancerosas en la capa superficial de células del endometrio, sin crecimiento en las capas de células inferiores. El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes. Se trata de una lesión precancerosa. Este estadio no se incluye en el sistema de estadificación FIGO.

Estadio I: T1, N0, M0 – El cáncer solo crece en el cuerpo del útero. También puede crecer en las glándulas del cuello uterino, pero no crece en el tejido conjuntivo de sostén del cuello uterino. El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a sitios distantes.

Estadio IA: T1a, N0, M0 – En esta forma temprana del estadio I, el cáncer está en el endometrio y puede haber crecido desde el endometrio hasta menos de la mitad de la capa de músculo subyacente del útero (el miometrio). No se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a sitios distantes.

Estadio IB: T1b, N0, M0 – El cáncer ha crecido desde el endometrio hacia el miometrio, hasta más de la mitad del miometrio. El cáncer no se ha diseminado más allá del cuerpo del útero.

Estadio II: T2, N0, M0 – El cáncer se ha diseminado desde el cuerpo del útero y crece en el tejido conjuntivo de sostén del cuello uterino (el estroma cervical). El cáncer no se ha diseminado fuera del útero. El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a sitios distantes.

Estadio III: T3, N0, M0 – El cáncer se ha diseminado fuera del útero o en los tejidos cercanos en la zona pélvica.

- 5 Estadio IIIA: T3a, N0, M0 – El cáncer se ha diseminado a la superficie externa del útero (denominada serosa) y/o a las trompas de Falopio o los ovarios (los anejos uterinos). El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a sitios distantes.

Estadio IIIB: T3b, N0, M0 – El cáncer se ha diseminado a la vagina o a los tejidos alrededor del útero (el parametrio). El cáncer no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a sitios distantes.

- 10 Estadio IIIC1: T1 a T3, N1, M0 – El cáncer crece en el cuerpo del útero. Puede haberse diseminado a algunos tejidos cercanos, pero no crece dentro de la vejiga ni el recto. El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos pélvicos, pero no a los ganglios linfáticos alrededor de la aorta ni a sitios distantes.

- 15 Estadio IIIC2: T1 a T3, N2, M0 – El cáncer crece en el cuerpo del útero. Puede haberse diseminado a algunos tejidos cercanos, pero no crece dentro de la vejiga ni el recto. El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos alrededor de la aorta (ganglios linfáticos periaórticos), pero no a sitios distantes.

Estadio IV: El cáncer se ha diseminado a la superficie interna de la vejiga urinaria o el recto hasta los ganglios linfáticos en la ingle, y/o a órganos distantes, tales como los huesos, el epiplón o los pulmones.

- 20 Estadio IVA: T4, cualquier N, M0 – El cáncer se ha diseminado al revestimiento interno del recto o la vejiga urinaria (denominado la mucosa). Puedo o no haberse diseminado a ganglios linfáticos cercanos, pero no se ha diseminado a sitios distantes.

Estadio IVB: cualquier T, cualquier N, M1 – El cáncer se ha diseminado a ganglios linfáticos distantes, la parte superior del abdomen, el epiplón o los órganos alejados del útero, tales como los huesos, el epiplón o los pulmones. El cáncer puede tener cualquier tamaño y puede o no haberse diseminado a ganglios linfáticos.

Métodos para pronosticar la reactividad al tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib

- 25 Se han identificado varios genes cuyos niveles de expresión (p. ej., niveles de expresión de ARNm o proteína) son útiles para pronosticar la reactividad de un sujeto que tiene un cáncer de endometrio al tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). Estos genes según se identifican mediante el ID de gen, URL relacionada, ID de proteína y núms. De acceso a UniProtKB se indican en la Tabla 1.

Tabla 1: Lista de biomarcadores

Símbolo oficial del gen	ID de gen	URL	Símbolo alternativo	N.º de acceso a UniProtKB
Ang2	285	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/285">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/285</a>	Ang-2/ANG-2/ANG2 (90)/ ANG290/ANGPT2	O15123
HGF	3082	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3082">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3082</a>	HGF (86)	P14210
IL-8	3576	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3576">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3576</a>	IL-8 (40)	P10145
IP-10	3627	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3627">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3627</a>	CXCL10	P02778
MCP-1	6347	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6347">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6347</a>	CCL2	P13500
MIP-1a	6348	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6348">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6348</a>	CCL3/MIP1a/MIP-1α	P10147
PGF	5228	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5228">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5228</a>	PGF (91)	P49763
sIL2-Ra	3559	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3559">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3559</a>	sIL2-Ra(76)	P01589

Símbolo oficial del gen	ID de gen	URL	Símbolo alternativo	N.º de acceso a UniProtKB
TIE-2	7010	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7010">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7010</a>	TEK/CD202B/TIE2/ VMCM/VMCM1	Q02763
TNF	7124	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124</a>	TNFa/TNF- $\alpha$	P01375
VEGFA	7422	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422</a>	VEGF/VEGFA(100)/VEGFA100	P15692

5 Las angiopoyetinas son factores de crecimiento proteicos que promueven la angiogénesis (la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes) y la maduración de vasos sanguíneos tumorales. Estudios con ratones con genes inactivados han demostrado que la Angiopoyetina 2 (Ang2) es necesaria para la formación de los vasos sanguíneos maduros. La expresión de Ang2 en las células endoteliales es suficiente para reclutar células mieloides e inducir la inflamación incluso en ausencia de estímulos proinflamatorios precedentes.

10 El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés) es un factor de crecimiento, movilidad y morfógeno celular paracrino. Lo secretan las células mesenquimales y se dirige y actúa principalmente en células epiteliales y endoteliales, pero también actúa en células genitoras hematopoyéticas. Tiene una función principal en el desarrollo embrionario de los órganos, en la regeneración de órganos en adultos y en la curación de heridas. El HGF regula el crecimiento celular, el movimiento celular y la morfogénesis al activar la cascada de señalización de la tirosina cinasa después de unirse al receptor protooncógeno c-Met.

15 La interleucina 8 (IL-8) es una quimiocina producida por macrófagos y otros tipos de células tales como las células epiteliales y las células endoteliales. La IL-8 puede unirse a diversos receptores incluidos CXCR1 y CXCR2.

20 La proteína inducida por interferón gamma 10 (IP-10) es una citocina pequeña que pertenece a la familia de las quimiocinas CXC. La secretan diversos tipos de células (p. ej., monocitos, células endoteliales y fibroblastos) en respuesta a IFN- $\gamma$ . A esta proteína se le han atribuido diversas funciones, tales como quimioatracción a monocitos/macrófagos, linfocitos T, linfocitos citolíticos y células dendríticas, promoción de la adhesión de los linfocitos T a células endoteliales, actividad antitumoral e inhibición de la formación de colonias en la médula espinal y angiogénesis.

La proteína quimiotáctica monocítica 1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) es una citocina pequeña que pertenece a la familia de las quimiocinas CC. Tiene una función en el reclutamiento de monocitos, linfocitos T de memoria y células dendríticas en los sitios de inflamación producidos por lesión o infección tisular.

25 La proteína inflamatoria de macrófagos 1a (MIP-1a, por sus siglas en inglés) pertenece a la familia de citocinas quimiotácticas. Esta proteína es esencial para las respuestas inmunitarias a la infección e inflamación. Activa los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) que pueden conducir a la inflamación neutrófila aguda. Además, induce la síntesis y la liberación de otras citocinas proinflamatorias tales como la interleucina 1 (IL-1), IL-6 y TNF- $\alpha$  en fibroblastos y macrófagos.

30 El factor de crecimiento placentario (PGF, por sus siglas en inglés) es un miembro de la subfamilia del factor de crecimiento endotelial vascular. La expresión del factor de crecimiento placentario dentro de las lesiones ateroscleróticas humanas se asocia a la inflamación plaquetaria y al crecimiento neovascular.

El receptor de la interleucina-2 alfa soluble (sIL-2Ra) es el dominio extracelular secretado del IL-2R alfa y lo expresan células de leucemia, células de linfoma, una fracción de los linfocitos citolíticos, así como linfocitos T y B recientemente activados.

35 Tie-2 es un receptor tirosina cinasa de superficie celular que se une y lo regulan las angiopoyetinas (Ang1, Ang2, Ang3, Ang4). Este receptor se expresa principalmente en células endoteliales en humanos. Posee un dominio extracelular único que contiene dos bucles similares a inmunoglobulina separados por tres repeticiones similares a factor de crecimiento epidérmico que se conectan a tres repeticiones similares a fibronectina tipo III. La vía de señalización de TIE-2 parece ser esencial para la comunicación entre las células endoteliales-células de músculo liso en la morfogénesis venosa. Los defectos en TIE-2 se asocian a malformaciones venosas heredadas.

40 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés) es una citotoxina derivada de monocitos que parece relacionarse con la regresión tumoral, el choque séptico y la caquexia.

45 El factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A, por sus siglas en inglés) es un mitógeno glucosilado que actúa específicamente en células endoteliales y tiene varios efectos, incluido mediar la permeabilidad vascular aumentada, inducir la angiogénesis, la vasculogénesis y el crecimiento de células endoteliales, promover la migración celular e inhibir la apoptosis.

Un nivel de expresión bajo (p. ej., expresión de proteína o ARNm) en comparación con un testigo de uno o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11) genes indicados en la Tabla 1 indica/pronostica que un sujeto responderá a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). Por ejemplo, concentraciones bajas (en comparación con un testigo) de una proteína Ang2 en una muestra biológica obtenida de un sujeto antes de tratarlo con el tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib pronostican que el sujeto responderá a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib).

En determinadas realizaciones, se determina que un sujeto responde a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib) si el sujeto exhibe una respuesta parcial tras tratarse con el tratamiento. "Respuesta parcial" significa al menos 30 % de disminución en la suma del diámetro más largo (LD, por sus siglas en inglés) de las lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado inicial. En algunas realizaciones, se determina que un sujeto responde a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib, si el sujeto exhibe reducción del volumen tumoral después de tratarse con el tratamiento. "% de reducción del volumen tumoral máxima" (MTS, por sus siglas en inglés) significa el cambio porcentual en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia los diámetros sumados en el inicio. En otras realizaciones, se determina que un sujeto responde a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib, si el sujeto exhibe supervivencia sin progresión. "Supervivencia sin progresión" (PFS) se refiere al período desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la última fecha antes de ingresar al estado de enfermedad progresiva (PD, por sus siglas en inglés). PD significa al menos 20 % de aumento en la suma del LD de las lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado más pequeño registrado desde el inicio del tratamiento, o el aspecto de una o más lesiones nuevas. En algunas realizaciones, se determina que un sujeto responde a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib, si el sujeto exhibe supervivencia sin progresión y reducción del volumen tumoral.

La presente descripción proporciona métodos para identificar a un sujeto que tiene cáncer de endometrio que es probable que tenga beneficios de supervivencia (p. ej., PFS) y reducción del volumen tumoral tras un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). En este método, una muestra biológica del sujeto, obtenida antes de tratarse con el tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib, se somete a ensayo y se mide el nivel de la proteína Ang2. Una concentración baja de la proteína Ang2 en comparación con un testigo indica que el sujeto probablemente tendrá beneficios de supervivencia (p. ej., PFS) y reducción del volumen tumoral tras el tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib. En cambio, una concentración alta de la proteína Ang2 en comparación con un testigo indica que el sujeto probablemente no tendrá beneficios de supervivencia (p. ej., PFS) y reducción del volumen tumoral tras el tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib.

Los métodos descritos en la presente memoria también permiten la identificación de un sujeto que tiene cáncer de endometrio que es probable que tenga beneficios de supervivencia (p. ej., PFS) tras un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). En este método, una muestra biológica del sujeto, obtenida antes de tratarse con el tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib, se somete a ensayo y se mide el nivel de al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez o uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once de la proteína Ang2, HGF, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1a, PGF, sIL-2Ra, Tie-2, TNF $\alpha$  y VEGFA. Una concentración baja de cualquiera de estas proteínas (ya sea sola o en combinación con las otras indicadas anteriormente) en comparación con un testigo indica que el sujeto probablemente tendrá beneficios de supervivencia (p. ej., PFS) tras el tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib. En cambio, una concentración alta de cualquiera de estas proteínas (ya sea sola o en combinación con las otras indicadas anteriormente) en comparación con un testigo indica que el sujeto probablemente no tendrá beneficios de supervivencia (p. ej., PFS) tras el tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib. En determinadas realizaciones, el sujeto con una concentración baja de una o más de las proteínas indicadas anteriormente es probable que tenga una supervivencia sin progresión de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós o veintitrés meses o veinticuatro meses.

La presente descripción proporciona, además, un método para identificar a un sujeto que tiene cáncer de endometrio que es probable que tenga una reducción del volumen tumoral tras un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). En este método, una muestra biológica del sujeto se somete a ensayo y se mide la concentración de la proteína Ang2 y/o IL-8. Una concentración baja de la proteína Ang2 y/o IL-8 en comparación con un testigo indica que el sujeto probablemente tendrá una reducción del volumen tumoral. En cambio, una concentración alta de la proteína Ang2 y/o IL-8 en comparación con un testigo indica que el sujeto probablemente no exhibirá una reducción del volumen tumoral.

En una realización, el sujeto padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio. En algunas realizaciones, el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio avanzado. En otras realizaciones, el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio recurrente. En determinadas realizaciones, el cáncer de endometrio es cáncer en estadio III. En algunas realizaciones, el cáncer de endometrio es cáncer en estadio IV. En determinadas realizaciones, el cáncer de endometrio es cáncer inoperable en estadio III o estadio IV.

La concentración de la proteína o proteínas de interés se puede medir usando cualquier método conocido en la técnica tal como un ensayo inmunológico. Los ejemplos no limitantes de dichos métodos incluyen inmunoensayo

enzimático, radioinmunoensayo, inmunoensayo quimioluminiscente, inmunoensayo electroquimioluminiscente, inmunoensayo turbidimétrico con látex, inmunoensayo fotométrico con látex, ensayo inmunocromatográfico y transferencia western. En determinadas realizaciones, la concentración de la proteína o proteínas de interés se mide mediante espectrometría de masas.

## 5 Testigos

Según se describieron anteriormente, los métodos de la presente invención pueden implicar medir el nivel de expresión (p. ej., concentración de ARNm o proteína) de uno o más genes (p. ej., uno o más genes representados en la Tabla 1) en una muestra biológica de un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio, en donde el nivel de expresión de uno o más de los genes, en comparación con un testigo, pronostica la respuesta de un sujeto al tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). En determinadas realizaciones, cuando la concentración de una proteína en la Tabla 1 en una muestra biológica de un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio es más baja que la del testigo, el sujeto se identifica como probable que responda a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib. En este contexto, el término "testigo" incluye una muestra (del mismo tejido) obtenida de un sujeto que se sabe que no responde a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). El término "testigo" también incluye una muestra (del mismo tejido) obtenida en el pasado de un sujeto que se sabe que no responde a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib y se usa como referencia para comparaciones futuras para evaluar muestras tomadas de sujetos para los cuales se pronosticará la reactividad terapéutica. El nivel de expresión/concentración "testigo" para una proteína específica en un tipo de célula o tejido específico puede preestablecerse mediante un análisis de la expresión proteica en uno o más (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 o más) sujetos, de la misma especie, que no han respondido al tratamiento con un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). Este valor de referencia preestablecido (que puede ser un nivel de expresión/concentración promedio o mediana tomado de múltiples sujetos que no han respondido al tratamiento) luego puede utilizarse para la concentración/nivel de expresión "testigo" de la proteína o ácido nucleico en la comparación con la muestra de prueba. En dicha comparación, se pronostica que el sujeto responde a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib) si el nivel de expresión del gen que se analiza es más bajo que la referencia preestablecida.

La concentración "testigo" para una proteína específica en un tipo de célula o tejido específico puede preestablecerse alternativamente mediante un análisis de la expresión génica en uno o más sujetos que han respondido al tratamiento con un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). Este valor de referencia preestablecido (que puede ser un nivel de expresión promedio o mediana de este tomado de múltiples sujetos que han respondido al tratamiento) luego puede utilizarse como el nivel de expresión "testigo" en la comparación con la muestra de prueba. En dicha comparación, se pronostica que el sujeto responderá al tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib) si la concentración de la proteína que se analiza es igual o comparable a la (al menos 85 %, pero menos de 100 % de), la referencia preestablecida.

En determinadas realizaciones, el "testigo" es un valor de corte predeterminado.

### Valores de corte

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria incluyen determinar si la concentración de una proteína(s) de interés (p. ej., una o más de las proteínas indicadas en la Tabla 1) está por debajo o por encima de un valor de corte predeterminado.

Un valor de corte es típicamente una concentración de una proteína por debajo o por encima del cual se considera que pronostica la reactividad de un sujeto a un tratamiento de interés. Por lo tanto, según los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, una concentración de referencia (p. ej., de una proteína de la Tabla 1) se identifica como un valor de corte, por debajo o por encima del cual se pronostica la reactividad a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). Algunos valores de corte no son absolutos en el sentido de que dichas correlaciones clínicas todavía pueden permanecer significativas en un intervalo de valores a cualquier lado del corte; sin embargo, se puede seleccionar un valor de corte óptimo (p. ej., puntuaciones H variables) de concentración de proteínas para un tipo de muestra específico. Los valores de corte determinados para su uso en los métodos descritos en la presente memoria pueden compararse con, p. ej., intervalos de concentraciones publicados, pero pueden individualizarse para la metodología usada y la población de pacientes. Se entenderá que las mejoras en los valores de corte óptimos podrían determinarse dependiendo de la sofisticación de los métodos estadísticos utilizados y de la cantidad y fuente de muestras utilizadas para determinar los valores del nivel de referencia para los diferentes genes y tipos de muestras. Por consiguiente, los valores de corte establecidos se pueden ajustar hacia arriba o abajo, en función de reevaluaciones periódicas o cambios en la metodología o distribución de la población.

La concentración de referencia de una o más proteínas se puede determinar mediante una variedad de métodos. El nivel de referencia se puede determinar mediante la comparación de una proteína de interés en, p. ej., poblaciones de sujetos (p. ej., pacientes) que responden a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej.,

mesilato de lenvatinib) o que no responden a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante análisis de histogramas, en los que una cohorte entera de pacientes se presenta gráficamente, en donde un primer eje representa la concentración de una proteína de interés y un segundo eje representa la cantidad de sujetos en la cohorte cuya muestra contiene una o más concentraciones. La determinación de la concentración de referencia de una proteína a continuación puede hacerse en función de una cantidad o concentración que diferencia mejor a estos grupos separados. El nivel de referencia puede ser un único número, aplicable de la misma forma a cualquier sujeto, o el nivel de referencia puede variar, según subpoblaciones específicas de sujetos. Por ejemplo, sujetos mayores pueden tener un nivel de referencia diferente que sujetos jóvenes para el mismo cáncer. Además, un sujeto con una enfermedad más avanzada (p. ej., una forma de cáncer de endometrio más avanzada) puede tener un valor de referencia diferente que uno con una forma de la enfermedad más leve.

El valor de corte preestablecido puede ser una concentración proteica que se determina en función del análisis de la curva de rendimiento diagnóstico (ROC). Las curvas ROC se utilizan para determinar un valor de corte para una prueba clínica. Consideremos la situación donde hay dos grupos de pacientes y mediante el uso de una técnica estándar establecida un grupo se conoce por responder a un compuesto de lenvatinib y el otro se conoce por no responder a un compuesto de lenvatinib. Una medición utilizando una muestra biológica de todos los miembros de los dos grupos se utiliza para someter a prueba la reactividad a un compuesto de lenvatinib. La prueba hallará que algunos, pero no todos los que responden, responden a un compuesto de lenvatinib. La relación de los que responden hallada por la prueba con respecto a la cantidad total de los que responden (conocida por la técnica estándar establecida) es el índice de positivos verdaderos (también conocido como sensibilidad). La prueba hallará que algunos, pero no todos los que no responden, no responden a un compuesto de lenvatinib. La relación de los que no responden hallada por la prueba con respecto a la cantidad total de los que no responden (conocida por la técnica estándar establecida) es el índice de negativos verdaderos (también conocido como especificidad). La esperanza es que el análisis de la curva ROC de la prueba de reactividad a lenvatinib hallará un valor de corte que minimizará la cantidad de falsos positivos y falsos negativos. Una ROC es una representación gráfica que ilustra el rendimiento de un sistema estratificador de clases binario a medida que varía su umbral de discriminación. Se crea al graficar la fracción de positivos verdaderos entre los positivos con respecto a la fracción de los falsos positivos entre los negativos, en variados ajustes de umbral.

En una realización, la concentración proteica se determina en función del análisis ROC que pronostica la respuesta tumoral con un valor pronóstico positivo, en donde una concentración de la proteína de interés (p. ej., Ang2) igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de la proteína de interés y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de la proteína de interés. El valor pronóstico positivo es la proporción de resultados de prueba positivos que son positivos verdaderos; refleja la probabilidad de que una prueba positiva refleje la afección subyacente que se evalúa. Los métodos para construir curvas ROC y determinar valores pronóstico positivos se conocen en la técnica. En determinadas realizaciones, la respuesta tumoral es un índice de respuesta objetivo (ORR), un índice de beneficio clínico (CBR) o % de reducción del volumen tumoral máxima.

En otra realización, el valor de corte preestablecido puede ser una concentración proteica que se determina en función de modelos de estimulación que pronostican la supervivencia, y en donde una concentración de la proteína de interés (p. ej., Ang2) igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de la proteína de interés y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de la proteína de interés. En algunas realizaciones, la supervivencia es supervivencia sin progresión (PFS). En otras realizaciones, supervivencia es supervivencia global (OS).

En determinadas realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 1866,5 a 6024,5 pg/ml. En algunas realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 1866,5 a 2500 pg/ml. En algunas realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 1866,5 a 3000 pg/ml. En algunas realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 1866,5 a 3500 pg/ml. En otras realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 2000 a 3000 pg/ml. En otras realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 2000 a 4000 pg/ml. En otras realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 2000 a 5000 pg/ml. En otras realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 3000 a 4000 pg/ml. En determinadas realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 3000 a 5000 pg/ml. En otras realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 3000 a 6000 pg/ml. En otras realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 4000 a 5000 pg/ml. En otras realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 está dentro de un intervalo de concentración de 4000 a 6000 pg/ml. En algunas realizaciones, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 es un intervalo de concentración de 5000 a 6000 pg/ml. En una realización específica, el valor de corte preestablecido para la proteína Ang2 es aproximadamente 2082,5 pg/ml. En todas estas realizaciones, una concentración de la proteína Ang2 igual o menor que el valor de corte preestablecido es una

concentración baja de Ang2 y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de Ang2. En este contexto “aproximadamente” significa  $\pm 10\%$ .

#### Muestras biológicas

5 Las muestras biológicas adecuadas para los métodos descritos en la presente memoria incluyen cualquier fluido biológico, célula, tejido o fracción de estos, que incluye biomoléculas del analito de interés tal como una proteína o ácido nucleico (p. ej., ADN o ARNm). Una muestra biológica puede ser, por ejemplo, un espécimen obtenido de un sujeto (p. ej., un mamífero tal como un humano) o puede derivar de dicho sujeto. Por ejemplo, una muestra puede ser una sección de tejido obtenido mediante una biopsia, tejido tumoral archivado o células que se colocan o adaptan a un cultivo tisular. Una muestra biológica también puede ser un fluido biológico tal como sangre, plasma, suero, orina o tal como una muestra absorbida en un sustrato (p. ej., vidrio, polímero, papel). Una muestra biológica también puede incluir una muestra de tejido del endometrio. En realizaciones específicas, la muestra biológica es una célula(s) tumoral(es) o un tejido tumoral obtenido de una región del sujeto que se presume que contiene un tumor o una lesión precancerosa. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser una muestra de tumor de endometrio. Una muestra biológica se puede fraccionar adicionalmente, si se desea, hasta una fracción que contiene tipos de células específicas. Por ejemplo, una muestra de sangre se puede fraccionar en suero o en fracciones que contienen tipos específicos de células sanguíneas tales como glóbulos rojos o glóbulos blancos (leucocitos). Si se desea, una muestra puede ser una combinación de muestras de un sujeto, tal como una combinación de una muestra de tejido y fluido.

20 Las muestras biológicas se pueden obtener de un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio. En determinadas realizaciones, el sujeto padece cáncer de endometrio avanzado. En algunas realizaciones, el sujeto padece cáncer de endometrio recurrente. En otras realizaciones, el sujeto padece un cáncer de endometrio en estadio III. En determinadas realizaciones, el sujeto padece un cáncer de endometrio en estadio IV. En otras realizaciones, el sujeto padece un cáncer de endometrio inoperable en estadio III o estadio IV.

25 Se pueden emplear cualesquiera métodos adecuados para obtener las muestras biológicas, aunque los métodos de ejemplo incluyen, p. ej., flebotomía, procedimiento de punción biopsia con aguja fina. Las muestras también se pueden recoger, p. ej., mediante microdissección (p. ej., microdissección de captura por láser (LCM, por sus siglas en inglés) o microdissección por láser (LMD, por sus siglas en inglés)).

30 Los métodos para obtener y/o almacenar muestras que conserven la actividad o integridad de las moléculas (p. ej., ácidos nucleico o proteínas) en la muestra son conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, una muestra biológica se puede poner en contacto adicionalmente con uno o más agentes adicionales tales como tampones e/o inhibidores, incluidos uno o más de inhibidores de nucleasa, proteasa y fosfatasa, que conservan o minimizan cambios en las moléculas (p. ej., ácidos nucleicos o proteínas) en la muestra. Dichos inhibidores incluyen, por ejemplo, quelantes tales como ácido etilendiaminetetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés), ácido etilenglicol bis(P-aminoetil éter) N,N,N1,N1-tetraacético (EGTA, por sus siglas en inglés), inhibidores de proteasa tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés), aprotinina, leupeptina, antipaina, y similares, e inhibidores de fosfatasa tales como fosfato, fluoruro de sodio, vanadato y similares. Los tampones y condiciones adecuados para aislar moléculas son conocidos para los expertos en la técnica y pueden variar dependiendo, por ejemplo, del tipo de molécula en la muestra que se va a caracterizar (véase, por ejemplo, Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (Suplemento 47), John Wiley & Sons, New York (1999); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3° ed. Burtis and Ashwood, eds. W.B. Saunders, Filadelfia, (1999)). Una muestra también se puede procesar para eliminar o minimizar la presencia de sustancias interferentes. Por ejemplo, una muestra biológica se puede fraccionar o purificar para quitar uno o más materiales que no son de interés. Los métodos de fraccionamiento o purificación de una muestra biológica incluyen, pero no se limitan a, métodos cromatográficos tales como cromatografía líquida, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía por afinidad. Para su uso en los métodos descritos en la presente memoria, una muestra puede estar en una variedad de estados físicos. Por ejemplo, una muestra puede ser un líquido o sólido, se puede disolver o suspender en un líquido, puede estar en una emulsión o gel, o puede absorberse en un material.

#### Determinar los niveles de expresión/concentraciones de biomarcadores

55 La expresión génica se puede detectar como, p. ej., expresión de proteína o ARN de un gen diana. Es decir, la presencia o el nivel de expresión (cantidad) de un gen se puede determinar al detectar y/o medir el nivel de ARNm o expresión proteica del gen. En algunas realizaciones, la expresión génica se puede detectar como la actividad de una proteína codificada por un gen tal como un gen representado en la Tabla 1.

En una realización, la expresión de un gen se puede determinar al detectar y/o medir la expresión o concentración de una proteína codificada por el gen. Los métodos para determinar la expresión/concentración proteica se conocen en la técnica. Un método usado generalmente implica el uso de anticuerpos específicos para la proteína diana de interés. Por ejemplo, los métodos para determinar la expresión proteica incluyen, pero no se limitan a, transferencia

- western o análisis de inmunotransferencia por puntos, inmunohistoquímica (p. ej., inmunohistoquímica cuantitativa), inmunocitoquímica, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA, por sus siglas en inglés), enzimoimmunoanálisis de absorción por puntos (ELISPOT; Coligan, J. E., et al., eds. (1995) *Current Protocols in Immunology*. Wiley, New York), radioinmunoensayo, inmunoensayo quimioluminiscente, inmunoensayo electroquimioluminiscente, 5 inmunoensayo turbidimétrico por látex, inmunoensayo fotométrico por látex, ensayo inmunocromatográfico y análisis de matriz de anticuerpos (véase, p. ej., las publicaciones estadounidenses núms. 20030013208 y 2004171068, cuyas divulgaciones se incorporan a la presente como referencia en su totalidad). Se puede encontrar una descripción adicional de muchos de los métodos mencionados anteriormente y métodos adicionales para detectar la expresión proteica en, p. ej., Sambrook et al. (supra).
- 10 En un ejemplo, la presencia o cantidad de expresión proteica de un gen (p. ej., un gen representado en la Tabla 1) se puede determinar usando una técnica de transferencia western. Por ejemplo, se puede preparar un lisado a partir de una muestra biológica, o la propia muestra biológica se puede poner en contacto con tampón Laemmli y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Las proteínas obtenidas por SDS-PAGE, separadas por tamaño, luego pueden transferirse a una membrana de filtro 15 (p. ej., nitrocelulosa) y someterse a técnicas de inmunotransferencia usando un anticuerpo etiquetado de manera detectable específico para la proteína de interés. La presencia o cantidad de anticuerpo etiquetado de manera detectable unido indica la presencia o cantidad de proteína en la muestra biológica.
- En otro ejemplo, se puede usar un inmunoensayo para detectar y/o medir la expresión proteica de un gen (p. ej., un gen representado en la Tabla 1). Como se indicó anteriormente, para la detección, se puede llevar a cabo un 20 inmunoensayo con un anticuerpo que lleva un resto de detección (p. ej., un agente fluorescente o enzima). Las proteínas de una muestra biológica se pueden conjugar directamente con una matriz de fase sólida (p. ej., una placa de ensayo con múltiples pocillos, nitrocelulosa, agarosa, sefarosa, partículas codificadas o perlas magnéticas) o se pueden conjugar con un primer miembro de un par de una unión específica (p. ej., biotina o estreptavidina) que se acopla a una matriz de fase sólida tras unirse con un segundo miembro del par de unión específica (p. ej., 25 estreptavidina o biotina). Dicho acoplamiento a una matriz de fase sólida permite que las proteínas se purifiquen de otros componentes interferentes o irrelevantes de la muestra biológica antes de ponerse en contacto con el anticuerpo de detección y también permite el posterior lavado del anticuerpo no unido. Al igual que anteriormente, la presencia o cantidad de anticuerpo etiquetado de manera detectable unido indica la presencia o cantidad de proteína en la muestra biológica.
- 30 No hay ninguna restricción específica en relación con la forma del anticuerpo y la presente descripción incluye anticuerpos policlonales, así como anticuerpos monoclonales. También se incluyen el antisero obtenido al inmunizar animales, tales como conejos con una proteína o fragmento de esta de la descripción (es decir, una proteína o un fragmento inmunológico de esta de la Tabla 1), así como anticuerpos policlonales y monoclonales de todas las clases, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados producidos por recombinación genética.
- 35 Una proteína intacta o su péptido parcial se pueden usar como el antígeno para la inmunización. Como péptidos parciales de las proteínas, por ejemplo, se pueden proporcionar el fragmento del extremo amínico (N) de la proteína y el fragmento del extremo carboxílico (C).
- Un gen que codifica una proteína de interés o un fragmento de esta (p. ej., un fragmento inmunológico) se inserta en un vector de expresión conocido, y, al transformar las células hospedantes con el vector descrito en la presente 40 memoria, la proteína deseada o un fragmento de esta se recupera del exterior o interior de las células hospedantes usando métodos estándares. Esta proteína se puede utilizarse como el antígeno de sensibilización. Además, las células que expresan la proteína, lisados celulares o una proteína químicamente sintetizada de la descripción se pueden utilizar también como antígeno sensibilizante.
- 45 El mamífero que se inmuniza mediante el antígeno sensibilizante no está restringido; sin embargo, es preferible seleccionar animales teniendo en cuenta la compatibilidad con las células genitoras utilizadas en la fusión celular. Generalmente, se utilizan animales que pertenecen a los órdenes de los roedores, lagomorfos o primates. Los ejemplos de animales que pertenecen a la orden de los roedores que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, ratones, ratas y hámsteres. Los ejemplos de animales que pertenecen a la orden de los lagomorfos que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, conejos. Los ejemplos de animales que pertenecen a la orden de los primates que se 50 pueden utilizar incluyen, por ejemplo, monos. Los ejemplos de monos que se pueden utilizar incluyen el orden inferior de los catarrinos (monos del viejo mundo), por ejemplo, *Macaca fascicularis*, monos resus, babuinos y chimpancés.
- Se pueden utilizar métodos conocidos para inmunizar a los animales con el antígeno de sensibilización. Por ejemplo, el antígeno de sensibilización se puede inyectar por vía intraperitoneal o subcutánea en los mamíferos. 55 Específicamente, el antígeno sensibilizante se disuelve y suspende adecuadamente en disolución fisiológica, disolución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), etc., y se mezcla con una cantidad adecuada de adyuvante general, si se desea, por ejemplo, con adyuvante completo de Freund. A continuación, la disolución se emulsiona e inyecta en el mamífero. Luego, el antígeno sensibilizante mezclado adecuadamente con adyuvante incompleto de Freund se administra preferiblemente varias veces cada 4 a 21 días. También puede

utilizarse un vehículo adecuado cuando se inmuniza a un animal con el antígeno sensibilizante. Después de la inmunización, la elevación en el nivel de anticuerpo en suero se detecta mediante los métodos habituales.

Los anticuerpos policlonales contra las proteínas de la presente descripción pueden prepararse de la siguiente manera. Después de verificar que se ha alcanzado el nivel de anticuerpo en suero deseado, se extrae sangre del mamífero sensibilizado con el antígeno. El suero se aísla de la sangre utilizando métodos convencionales. El suero que contiene el anticuerpo policlonal puede utilizarse como el anticuerpo policlonal, o según sea necesario, la fracción que contiene anticuerpo policlonal puede aislarse adicionalmente del suero. Por ejemplo, puede prepararse una fracción de anticuerpos que reconocen específicamente la proteína de la descripción mediante el uso de una columna de afinidad a la cual se acopla la proteína. A continuación, la fracción puede purificarse adicionalmente mediante el uso de una columna de Proteína A o Proteína G para preparar inmunoglobulina G o M.

Para obtener anticuerpos monoclonales, después de verificar que se ha alcanzado el nivel de anticuerpo en suero deseado en el mamífero sensibilizado con el antígeno descrito anteriormente, se toman inmunocitos del mamífero y se usan para la fusión celular. Con este fin, se puede mencionar a los esplenocitos como inmunocitos preferibles. Como células genitoras fusionadas con los inmunocitos mencionados anteriormente, se utilizan preferiblemente células de mieloma mamífero. Más preferiblemente, las células de mieloma que han adquirido el rasgo, que se pueden utilizar para distinguir las células de fusión mediante agentes, se utilizan como la célula genitora.

La fusión celular entre los inmunocitos mencionados anteriormente y las células de mieloma puede llevarse a cabo según métodos conocidos, por ejemplo, el método de Galfre and Milstein (Methods Enzymol. 73:3-46, 1981).

El hibridoma obtenido a partir de la fusión celular se selecciona al cultivar las células en un medio de selección estándar, por ejemplo, medio de cultivo HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en este medio HAT se continúa durante un período suficiente para que las células (células no fusionadas) distintas del hibridoma objetivo perezcan, normalmente en uno pocos días a unas pocas semanas. A continuación, se lleva a cabo el método de dilución limitante habitual y el hibridoma que produce el anticuerpo objetivo se barre y clona.

A diferencia del método mencionado anteriormente para obtener hibridomas, al inmunizar un animal distinto de un humano con el antígeno, se puede obtener un hibridoma que produce los anticuerpos humanos objetivo que tienen la actividad de unirse a las proteínas mediante el método de sensibilizar linfocitos humanos, por ejemplo, linfocitos humanos infectados por el virus de EB, con proteínas, células que expresan proteínas o lisados de estas *in vitro* y fusionar los linfocitos sensibilizados con células de mieloma derivadas del humano, por ejemplo, U266, que tiene una capacidad de división celular permanente.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos al trasplantar los hibridomas obtenidos en la cavidad abdominal de un ratón y extraer la ascitis se pueden purificar, por ejemplo, mediante precipitación en sulfato de amonio, columna de proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico DEAE, una columna de afinidad a la cual la proteína de la presente descripción se puede acoplar, etc.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener como anticuerpos recombinantes producidos mediante el uso la técnica de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck C.A.K. y Larrick, J.W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD (1990)). Los anticuerpos recombinantes se producen al clonar el ADN codificante de inmunocitos, tal como el hibridoma o linfocitos sensibilizados productores de anticuerpos, incorporarlo en un vector adecuado e introducir este vector en un hospedante para producir el anticuerpo. La presente descripción abarca, además, dichos anticuerpos recombinantes.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo específicos para una proteína codificada por uno o más biomarcadores también se pueden generar mediante métodos *in vitro* tales como visualización en fagos.

Además, el anticuerpo de la presente descripción puede ser un fragmento de anticuerpo o anticuerpo modificado, siempre que se una a una proteína codificada por un biomarcador de la presente descripción. Por ejemplo, Fab, F (ab')<sub>2</sub>, Fv o Fv de cadena simple (scFv) en el que el Fv de cadena H y el Fv de cadena L se enlazan adecuadamente mediante un enlazador (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, (1988)) pueden proporcionarse como fragmentos de anticuerpo. Específicamente, los fragmentos de anticuerpo se generan al tratar los anticuerpos con enzimas, por ejemplo, papaína o pepsina. Alternativamente, se pueden generar al construir un gen que codifica un fragmento de anticuerpo, introducirlo en un vector de expresión y expresar este vector en células hospedantes adecuadas (véase, por ejemplo, Co et al., J. Immunol., 152:2968-2976, 1994; Better et al., Methods Enzymol., 178:476-496, 1989; Pluckthun et al., Methods Enzymol., 178:497-515, 1989; Lamoyi, Methods Enzymol., 121:652-663, 1986; Rousseaux et al., Methods Enzymol., 121:663-669, 1986; Bird et al., Trends Biotechnol., 9:132-137, 1991).

Los anticuerpos pueden conjugarse con diversas moléculas, tales como sustancias fluorescentes, sustancias radioactivas y sustancias luminiscentes. Los métodos para acoplar dichos restos a un anticuerpo ya están establecidos y son convencionales en el campo (véase, p. ej., US 5.057.313 y 5.156.840).

Los ejemplos de métodos que someten a ensayo la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos incluyen, por ejemplo, medición de la absorbancia, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), enzimoimmunoanálisis (EIA), radioinmunoensayo (RIA) e/o inmunofluorescencia. Por ejemplo, cuando se utiliza ELISA, una proteína codificada por un biomarcador de la presente descripción se agrega a una placa recubierta con los anticuerpos de la presente descripción y, a continuación, se agrega la muestra de anticuerpo, por ejemplo, sobrenadantes de cultivo de células productoras de anticuerpo o anticuerpos purificados. A continuación, se agrega el anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario, que se etiqueta mediante fosfatasa alcalina y dichas enzimas, la placa se incuba y lava, y la absorbancia se mide para evaluar la actividad de unión a antígeno después de agregar un sustrato enzimático tal como fosfato de p-nitrofenilo. Al igual que la proteína, se puede utilizar un fragmento de proteína, por ejemplo, un fragmento que comprende un extremo C, o un fragmento que comprende un extremo N. Para evaluar la actividad del anticuerpo de la presente descripción, se puede utilizar BIAcore (GE Healthcare).

Mediante el uso de estos métodos, el anticuerpo de la presente descripción y una muestra que se presume que contiene una proteína de la presente descripción se ponen en contacto, y la proteína codificada por un biomarcador de la presente descripción se detecta o se somete a ensayo al detectar o someter a ensayo el complejo inmunitario formado entre el anticuerpo mencionado anteriormente y la proteína.

Los métodos de ensayo de determinación cuantitativa basados en espectrometría de masas, por ejemplo, pero sin limitarse a, estrategias basadas en monitorización de múltiples reacciones (MRM, por sus siglas en inglés) en combinación con patrones internos etiquetados con isótopos estables, son una alternativa a los inmunoensayos para la medición cuantitativa de proteínas. Estas estrategias no requieren el uso de anticuerpos y, por consiguiente, el análisis se puede llevar a cabo de manera rentable y más rápida (véase, por ejemplo, Addona et al., *Nat. Biotechnol.*, 27:633-641, 2009; Kuzyk et al., *Mol. Cell Proteomics*, 8:1860-1877, 2009; Paulovich et al., *Proteomics Clin Appl.*, 2:1386-1402, 2008). Además, la MRM ofrece capacidades superiores de multiplicación que permiten la cuantificación simultánea de numerosas proteínas en paralelo. La teoría básica de estos métodos se ha establecido bien y se utilizan ampliamente para el análisis del metabolismo de fármacos y la farmacocinética de moléculas pequeñas.

En otra realización, el nivel de expresión de un gen de interés se determina al medir los niveles de ARN. Se puede emplear una variedad de métodos adecuados para detectar y/o medir el nivel de la expresión de ARNm de un gen. Por ejemplo, la expresión de ARNm se puede determinar usando transferencia Northern o análisis de inmunotransferencia por puntos, transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR; p. ej., RT-PCR cuantitativa), hibridación *in situ* (p. ej., hibridación *in situ* cuantitativa) o análisis de matriz de ácido nucleico (p. ej., matrices de oligonucleótidos o chips génicos). Los detalles de dichos métodos se describen a continuación y en, p. ej., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Segunda edición*, tomos 1, 2 y 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., Nov. 1989; Gibson et al. (1999) *Genome Res.*, 6(10):995-1001; y Zhang et al. (2005) *Environ Sci. Technol.*, 39(8):2777-2785; la publicación estadounidense n.º 2004086915; la patente europea n.º 0543942; y la patente estadounidense n.º 7.101.663; cuyas descripciones de cada una se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

En un ejemplo, la presencia o cantidad de una o más poblaciones de ARNm diferenciadas en una muestra biológica puede determinarse al aislar el ARNm total de la muestra biológica (véase, p. ej., Sambrook et al. (supra) y la patente estadounidense n.º 6.812.341) y someter el ARNm aislado a electroforesis en gel de agarosa para separar el ARNm por tamaño. Los ARNm separados por tamaño luego se transfieren (p. ej., mediante difusión) a un soporte sólido tal como una membrana de nitrocelulosa. La presencia o cantidad de una o más poblaciones de ARNm en la muestra biológica se puede determinar utilizando una o más sondas de polinucleótidos etiquetadas de manera detectable, complementarias a la secuencia del ARNm de interés, a la que se unen y, por lo tanto, vuelven detectable a sus correspondientes poblaciones de ARNm. Las etiquetas detectables incluyen, p. ej., etiquetas fluorescentes (p. ej., umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, alofocianina (APC, por sus siglas en inglés), o ficoeritrina), luminiscentes (p. ej., europio, terbio, Qdot™ nanopartículas suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA), radiológicas (p. ej., <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P o <sup>3</sup>H) y enzimáticas (peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa).

En otro ejemplo, la presencia o cantidad de poblaciones de ARNm diferenciadas (p. ej., ARNm codificado por uno o más genes representados en la Tabla 1) en una muestra biológica puede determinarse usando matrices de ácido nucleico (u oligonucleótidos) (p. ej., una matriz descritas más adelante en "Matrices"). Por ejemplo, el ARNm aislado de una muestra biológica puede amplificarse usando RT-PCR con, p. ej., síntesis de primera cadena mediada por cebador de hexámero u oligo(dT) aleatorio. Los amplicones pueden fragmentarse en segmentos más cortos. La etapa de RT-PCR puede utilizarse para etiquetar de manera detectable los amplicones, u, opcionalmente, los amplicones pueden etiquetarse de manera detectable después de la etapa de RT-PCR. Por ejemplo, la etiqueta detectable se puede conjugar enzimáticamente (p. ej., mediante traducción por nick o cinasa tal como T4 polinucleótido cinasa) o químicamente con los amplicones utilizando cualquiera de una variedad de técnicas adecuadas (véase, p. ej., Sambrook et al., supra). A continuación, los amplicones etiquetados de manera detectable se pueden poner en contacto con una pluralidad de conjuntos de sondas polinucleotídicas, cada conjunto contiene una o más de una sonda (p. ej., un oligonucleótido) polinucleotídica específica para (y capaz de unirse a) un amplicón correspondiente, y donde la pluralidad contiene muchos conjuntos de sondas, cada uno correspondiente a

un amplicón diferente. Generalmente, los conjuntos de sondas se unen a un soporte sólido y la posición de cada conjunto de sonda se predetermina sobre el soporte sólido. La unión de un amplicón etiquetado de manera detectable a una sonda correspondiente de un conjunto de sondas indica la presencia o cantidad de un ARNm diana en la muestra biológica. Se describen métodos adicionales para detectar la expresión del ARNm utilizando matrices de ácidos nucleicos en, p. ej., las patentes estadounidenses núms. 5.445.934; 6.027.880; 6.057.100; 6.156.501; 6.261.776; y 6.576.424; cuyas descripciones de cada una se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Los métodos para detectar y/o para cuantificar una etiqueta detectable dependen de la naturaleza de la etiqueta. Los productos de reacciones catalizadas mediante enzimas adecuadas (donde la etiqueta detectable es una enzima; véase más atrás) pueden ser, sin limitación, fluorescentes, luminiscentes o radioactivos o pueden absorber luz visible o ultravioleta. Los ejemplos de detectores adecuados para detectar dichas etiquetas detectables incluyen, sin limitación, películas de rayos x, contadores de radioactividad, contadores de centelleo, espectrofotómetros, colorímetros, fluorímetros, luminómetros y densitómetros.

Los métodos para detectar o medir la expresión génica (p. ej., la expresión de proteína o ARNm) opcionalmente pueden llevarse a cabo en formatos que permiten la preparación, procesamiento y análisis rápido de múltiples muestras. Esto puede ser, por ejemplo, en placas de ensayo de múltiples pocillos (p. ej., 96 pocillos o 386 pocillos) o matrices (p. ej., chips de ácido nucleico o chips de proteínas). Se pueden proporcionar disoluciones concentradas de diversos reactivos manualmente o robóticamente, y después de la preparación de la muestra (p. ej., RT-PCR, etiquetado o fijación celular), el pipeteado, la dilución, la mezcla, la distribución, el lavado, la incubación (p. ej., la hibridación), la lectura de la muestra, la recolección de datos (datos ópticos) y/o el análisis (análisis de imágenes asistido por computadora) se pueden llevar a cabo robóticamente utilizando programa informático de análisis disponible comercialmente, robótica e instrumentación de detección capaz de detectar la señal generada a partir del ensayo. Los ejemplos de dichos detectores incluyen, pero no se limitan a, espectrofotómetros, luminómetros, fluorímetros y dispositivos que miden la desintegración de los radioisótopos. Los ensayos basados en células de alto rendimiento (p. ej., la detección de la presencia o el nivel de una proteína diana en una célula) pueden utilizar la tecnología del lector VTI HCS ArrayScan® o el lector HCS KineticScan® (Cellomics Inc., Pittsburgh, PA).

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de dos genes, tres genes, cuatro genes, cinco genes, seis genes, siete genes, ocho genes, nueve genes, 10 genes, 11 genes o al menos dos genes, al menos tres genes, al menos cuatro genes, al menos cinco genes, al menos seis genes, al menos siete genes, al menos ocho genes, al menos nueve genes o al menos 10 genes de la Tabla 1 se puede evaluar y/o medir.

Para auxiliar en la detección de la presencia o nivel de expresión de uno o más de los genes representados en la Tabla 1, se puede utilizar cualquier parte de la secuencia de ácido nucleico de los genes, p. ej., como sondas o cebadores polinucleotídicos de hibridación (p. ej., para amplificación o transcripción inversa). Las sondas y cebadores pueden ser oligonucleótidos de longitud suficiente para proporcionar hibridación específica con un ARN, ADN, ADNc o fragmentos de estos aislados de la muestra biológica. Dependiendo de la aplicación específica, se pueden emplear condiciones de hibridación variables para lograr grados variables de selectividad de una sonda o cebador con respecto a la secuencia diana. Los cebadores y sondas se pueden etiquetar de manera detectable con reactivos que facilitan la detección (p. ej., etiquetas fluorescentes, etiquetas químicas (véase, p. ej., las patentes estadounidenses núms. 4.582.789 y 4.563.417), o bases modificadas).

Las condiciones de rigurosidad estándares se describen en Sambrook, et al. (supra) y Haymes, et al. *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985). Para que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo necesita ser suficientemente complementaria en secuencia para ser capaz de formar una estructura bicatenaria estable en las condiciones de hibridación específicas (p. ej., concentraciones de disolvente y sal) empleadas.

Se puede utilizar hibridación para evaluar la homología entre dos secuencias de ácido nucleico. Una secuencia de ácido nucleico descrita en la presente memoria, o un fragmento de esta, se puede utilizar como una sonda de hibridación según las técnicas de hibridación estándares. La hibridación de una sonda de interés (p. ej., una sonda que contiene una porción de una secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria o su complemento) con ADN, ARN, ADNc, o fragmentos de estos a partir de una fuente de prueba es una indicación de la presencia de ADN o ARN correspondiente a la sonda en la fuente de prueba. Las condiciones de hibridación son conocidas para los expertos en la técnica y se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991. Las condiciones de hibridación moderadas se definen como hibridación en 2X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC, por sus siglas en inglés) a 30 °C, posteriormente un lavado en 1 X de SSC, SDS al 0,1 % a 50 °C. Las condiciones muy rigurosas se definen como hibridación en 6X de SSC 45 °C y posteriormente un lavado en 0,2 X de SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C.

Los cebadores se pueden utilizar en una variedad de métodos del tipo PCR. Por ejemplo, las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se pueden utilizar para amplificar secuencias específicas del ADN, así como del ARN, incluidas secuencias del ADN genómico total o ARN celular total. Los cebadores de PCR se diseñan para flanquear la región que interesa amplificar. Los cebadores se pueden ubicar cerca del extremo en 5', el extremo en 3' o en cualquier lugar dentro de la secuencia de nucleótidos que se va a amplificar. La longitud

del amplicón se fija según las metas del experimento. Para qPCR, la longitud diana es cercana a los 100 bp y para la PCR estándar, es cercana a los 500 bp. Generalmente, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá se emplea para diseñar los cebadores oligonucleotídicos que son idénticos o similares en secuencia a las hebras opuestas de la plantilla que se va a amplificar. Los cebadores de PCR se pueden sintetizar químicamente, como una molécula de ácido nucleico simple (p. ej., utilizando síntesis de ADN automatizada en la dirección 3' a 5' utilizando tecnología de fosforamidita) o como una serie de oligonucleótidos. Por ejemplo, se puede sintetizar uno o más pares de oligonucleótidos largos (p. ej., >100 nucleótidos) que contienen la secuencia deseada, donde cada par contiene un segmento corto de complementariedad (p. ej., aproximadamente 15 nucleótidos) de manera que se forme una estructura doble cuando el par de oligonucleótidos se aparee. Se utiliza ADN polimerasa para extender los oligonucleótidos, que resultan en una molécula de ácido nucleico bicatenaria simple por par de oligonucleótidos.

Además, las secuencias de ácido nucleico o fragmentos de estas (p. ej., sondas de oligonucleótidos) se pueden utilizar en matrices de ácido nucleico (tales como las matrices de ácido nucleico descritas más adelante en "Matrices") para la detección y/o determinación cuantitativa de la expresión génica.

#### 15 Crear un perfil de respuesta

Los métodos descritos en la presente memoria también se pueden utilizar para generar un perfil de respuesta al tratamiento con compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib) para un sujeto que padece cáncer de endometrio. El perfil puede incluir, p. ej., información que indica el nivel de expresión de uno o más genes (p. ej., uno o más genes representados en la Tabla 1) pre y postratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este; y/o el análisis histológico de cualesquiera tumores de endometrio. Los perfiles de respuesta descritos en la presente memoria pueden contener información sobre la expresión o nivel de expresión de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos 10 genes indicados en la Tabla 1. La información resultante (perfil de respuesta al tratamiento con lenvatinib) se puede utilizar para pronosticar la respuesta de un sujeto (p. ej., un paciente humano) que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib).

Se entenderá que un perfil de respuesta a un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib) puede estar en forma electrónica (p. ej., una historia clínica electrónica del paciente almacenada en una computadora u otros medios electrónicos (de lectura informática) tales como un DVD, CD o disquete) o en forma escrita. El perfil de respuesta al compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib) también puede incluir información para diversos (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, 10, 20, 30, 50 o 100 o más) sujetos (p. ej., pacientes humanos). Dichos perfiles de respuesta para múltiples sujetos se pueden utilizar, p. ej., en análisis (p. ej., análisis estadísticos) de características específicas de cohortes de sujetos.

La reactividad de un sujeto a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib) puede clasificarse de varias maneras y la clasificación depende de la enfermedad del sujeto (p. ej., cáncer de endometrio avanzado o recurrente), la gravedad de la enfermedad, y el medicamento específico que se le administra al sujeto. En el sentido más simple, la reactividad es cualquier disminución en el estado de enfermedad en comparación con el pretratamiento y la no reactividad es la falta de cualquier cambio en el estado de enfermedad en comparación con el pretratamiento. La reactividad de un sujeto (p. ej., un humano) con un cáncer de endometrio se puede clasificar en función de uno o más de varios indicios clínicos objetivos tales como, pero sin limitarse a, tamaño del tumor, beneficio clínico (CB, por sus siglas en inglés), supervivencia sin progresión (PFS), supervivencia global (OS), % de reducción del volumen tumoral máximo (MTS) índice de respuesta objetivo (ORR).

El "beneficio clínico" se refiere a tener uno de los siguientes estados - Respuesta completa (CR, por sus siglas en inglés), respuesta parcial (PR); o enfermedad estable (SD) con 6 meses o más de supervivencia sin progresión (PFS). La "respuesta completa" significa la desaparición completa de todas las lesiones diana. "Respuesta parcial" significa al menos 30 % de disminución en la suma del diámetro más largo (LD, por sus siglas en inglés) de las lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado inicial. La "enfermedad progresiva" (PD) significa al menos 20 % de aumento en la suma del LD de las lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado más pequeño registrado desde el inicio del tratamiento, o el aspecto de una o más lesiones nuevas. La "enfermedad estable" significa ni suficiente reducción de las lesiones diana para calificar como PR ni suficiente aumento para calificar como enfermedad progresiva (PD), tomando como referencia el LD sumado más pequeño desde el inicio del tratamiento.

La "supervivencia global" (OS) se define como el tiempo desde aleatorización hasta la muerte por cualquier causa. La "aleatorización" significa aleatorización de un paciente a un grupo de prueba o un grupo testigo cuando se determina el plan de tratamiento para un paciente.

La "supervivencia sin progresión" (PFS) se refiere al período desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la última fecha antes de ingresar al estado PD.

El “% de reducción del volumen tumoral máxima” (MTS) significa el cambio porcentual en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia los diámetros sumados en el inicio.

El “índice de respuesta objetivo” (ORR) compara sujetos con respuesta completa (CR) o respuesta parcial (PR) con sujetos con enfermedad estable (SD) o enfermedad progresiva (PD).

## 5 Métodos de tratamiento

Los métodos descritos en la presente memoria permiten evaluar si un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio es probable que responda o no a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). A un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio que es probable que responda a un compuesto de lenvatinib se le puede administrar lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib). En cambio, a un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio que es probable que no responda a un compuesto de lenvatinib se le puede administrar un tratamiento diferente que es adecuado como tratamiento para el cáncer de endometrio.

Los métodos de la presente memoria permiten la estratificación de sujetos que padecen, se presume que padecen o están en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio en grupos de sujetos que es probable que se beneficien y grupos de sujetos que es menos probable que se beneficien de un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). La capacidad de seleccionar a dichos sujetos entre un conjunto de sujetos con cáncer de endometrio que se consideran para recibir tratamiento con un compuesto de lenvatinib es beneficiosa para la administración de un tratamiento eficaz al sujeto.

El lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib) exhibe efectos antitumorales potentes, en parte, por medio de la inhibición de la angiogénesis. Los sujetos que se consideran para el tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib) incluyen, pero no se limitan a, sujetos que padecen, se presume que padecen o es probable que desarrollen un cáncer de endometrio. En una realización, el sujeto que se va a tratar con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib) padece, se presume que padece o es probable que desarrolle cáncer de endometrio avanzado. En determinadas realizaciones, el sujeto que se va a tratar con un tratamiento que comprende un compuesto lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib) padece, se presume que padece o es probable que desarrolle un cáncer de endometrio recurrente. En otras realizaciones, el sujeto que se va a tratar con un tratamiento que comprende un compuesto lenvatinib padece, se presume que padece o es probable que desarrolle un cáncer de endometrio en estadio I. En una realización, el sujeto que se va a tratar con un tratamiento que comprende un compuesto lenvatinib padece, se presume que padece o es probable que desarrolle un cáncer de endometrio en estadio II. En otra realización, el sujeto que se va a tratar con un tratamiento que comprende un compuesto lenvatinib padece, se presume que padece o es probable que desarrolle un cáncer de endometrio en estadio III. En otra realización, el sujeto que se va a tratar con un tratamiento que comprende un compuesto lenvatinib padece, se presume que padece o es probable que desarrolle un cáncer de endometrio en estadio IV. En algunas realizaciones, el cáncer de endometrio es inoperable en estadio III o estadio IV.

Si es más probable que el sujeto que padece un cáncer de endometrio responda a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (en función de las concentraciones de uno o más de los biomarcadores descritos anteriormente (p. ej., la proteína Ang2)), entonces se le puede administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib). Un profesional sanitario puede determinar una cantidad eficaz del compuesto tomando en cuenta, por ejemplo, las características del paciente (edad, sexo, peso, raza, etc.), la progresión de la enfermedad y la exposición previa al fármaco. Si es menos probable que el sujeto responda a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib, entonces se le puede administrar al sujeto, opcionalmente, un tratamiento que no comprende lenvatinib. Estos tratamientos incluyen, pero no se limitan a, yodo radioactivo, doxorubicina, carboplatino, cisplatino, paclitaxel, sorafenib, docetaxel, trastumab, interleucina-2, interferón, everolimus, sunitinib, pazopanib, vandetanib, y el tratamiento “de referencia” (es decir, el tratamiento de referencia que prevalece según lo determina el profesional sanitario o según lo especifica el estudio clínico) tal como fármacos de investigación y quimioterapia.

Sujetos de todas las edades pueden padecer trastornos tratables con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib). Por lo tanto, una muestra biológica usada en los métodos descritos en la presente memoria se puede obtener de un sujeto (p. ej., un humano) de cualquier edad, incluido un niño, un adolescente o un adulto, tal como un adulto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio.

Los métodos también pueden aplicarse a individuos en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio tratable con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib). Dichos individuos incluyen aquellos que tienen (i) antecedentes familiares (una predisposición genética a) de dichos trastornos o (ii) uno o más factores de riesgo para desarrollar dichos trastornos.

Después de la estratificación o de seleccionar a un sujeto en función de si es más probable o menos probable que el sujeto responda al lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib), un profesional sanitario (p. ej., un médico) puede administrar la modalidad terapéutica adecuada al sujeto. Los métodos para administrar tratamientos con lenvatinib se conocen en la técnica.

5 Se entenderá que cualquier tratamiento descrito en la presente memoria (p. ej., un tratamiento que comprende lenvatinib o un tratamiento que no comprende lenvatinib) puede incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales. Es decir, cualquier tratamiento descrito en la presente memoria se puede coadministrar (administrar en combinación) con uno o más agentes terapéuticos adicionales tales como, pero sin limitarse a, doxorubicina, carboplatino, cisplatino, paclitaxel, docetaxel, trastumab y everolimus. Además, cualquier tratamiento descrito en la presente memoria puede incluir uno o más agentes para tratar, por ejemplo, el dolor, las náuseas y/o uno o más efectos secundarios de un tratamiento que comprenden lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib).

15 Las politerapias (p. ej., coadministración de un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib) y uno o más agentes terapéuticos adicionales) pueden ser, p. ej., simultáneas o sucesivas. Por ejemplo, el lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib) y uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar al mismo tiempo o un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib) se puede administrar en un primer momento y el uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar en un segundo momento. En algunas realizaciones, el uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar en un primer momento y el lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib) se puede administrar en un segundo momento.

20 En casos donde al sujeto que padece cáncer de endometrio y que se ha pronosticado que responderá a un tratamiento con compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib) ya se le ha administrado previamente uno o más tratamientos distintos de lenvatinib, el tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib puede sustituir o sumarse a un tratamiento administrado previamente o actualmente. Por ejemplo, tras tratar con el tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib), se puede suspender o disminuir la administración del tratamiento distinto de lenvatinib, p. ej., administrarlo a niveles más bajos. La administración del tratamiento previo se puede mantener mientras se administra el tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib). En algunas realizaciones, un tratamiento previo se puede mantener hasta que el nivel del tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib) alcanza un nivel suficiente para proporcionar un efecto terapéutico.

#### Matrices

35 Las matrices de ácido nucleico que incluyen los biomarcadores de ácido nucleico descritos en la presente memoria son útiles para, p. ej., detectar la expresión génica y/o medir los niveles de expresión génica. Las matrices también son útiles para, p. ej., pronosticar la respuesta de un sujeto que padece cáncer de endometrio a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib), para identificar a sujetos que padecen cáncer de endometrio quienes se pueden beneficiar de un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib), y para dirigir a sujetos que padecen cáncer de endometrio quienes probablemente no se beneficiarían de un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este (p. ej., mesilato de lenvatinib) hacia otros tratamientos para el cáncer.

40 Una matriz es una disposición ordenada de muestras donde se hace el apareamiento de muestras de ADN conocidas y desconocidas en función de reglas de apareamiento de bases (p. ej., la adenosina se aparea con Timina o Uracilo; la Guanosina se aparea con Citosina). Un experimento con micromatriz típico implica la hibridación de un ARNm, una molécula de ADNc o fragmentos de estos, con una plantilla de ADN a partir de la cual se origina o deriva. Se utilizan muchas muestras de ADN para construir una matriz. Los ADN de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once de los genes en la Tabla 1 se pueden utilizar para construir la matriz. Un experimento con matriz utiliza sistemas de matriz comunes tales como microplacas o membranas de transferencia estándares. Los tamaños de los puntos de muestra son típicamente menores que 200 micrones de diámetro y la matriz normalmente contiene miles de puntos. Los miles de muestras en puntos conocidas como sondas (con identidad conocida) se inmovilizan sobre un sustrato (p. ej., un portaobjetos de vidrio de microscopio, chips de sílice, membrana de nailon). Los puntos pueden ser ADN, ADNc u oligonucleótidos. Estos se utilizan para determinar la unión complementaria de las secuencias desconocidas y permitir, por consiguiente, el análisis de la expresión génica y el descubrimiento de genes en paralelo. Un experimento con un chip de ADN simple puede proporcionar información sobre miles de genes simultáneamente. Una disposición ordenada de las sondas sobre el soporte es importante dado que la ubicación de cada punto en la matriz se utiliza para la identificación de un gen. La cantidad de ARNm unido a cada sitio en la matriz indica el nivel de expresión de los diversos genes que se incluyen en la matriz. Mediante el uso de una matriz que contiene muchas muestras de ADN, se puede determinar, en un solo experimento, los niveles de expresión de cientos o miles de genes al medir la cantidad de ARNm unido a cada sitio en la matriz. Con la ayuda de una computadora, se puede medir con precisión la cantidad de ARNm unido a los puntos en la micromatriz y generar un perfil de expresión génica en la celda.

Las dos principales plataformas de micromatriz de ADN que generalmente se utilizan son las micromatrices de ADNc y oligonucleótidos. Las micromatrices de ADNc se fabrican con moléculas de ADN bicatenarias generadas mediante reacciones enzimáticas tales como PCR (Schna, M. et al., *Science*, 270:467-470 (1995)), mientras que las micromatrices de oligonucleótidos emplean sondas oligonucleotídicas punteadas mediante disposición robótica o síntesis *in situ* sobre un sustrato (Lockhart, D.J. et al., *Nat. Biotechnol.*, 14, 1675-1680 (1996)).

Kits

La presente descripción también proporciona kits. En determinadas realizaciones, el kit puede incluir un anticuerpo o anticuerpos que se pueden utilizar para detectar uno o más de los biomarcadores indicados en la Tabla 1 o su concentración o niveles de expresión. Por ejemplo, el kit puede incluir un anticuerpo que se une específicamente a Ang2. Los anticuerpos en el kit pueden ser monoclonales o policlonales y se pueden conjugar adicionalmente con una etiqueta detectable. En algunas realizaciones, el kit incluye sondas que se pueden utilizar para identificar o detectar cualquiera de los biomarcadores de la Tabla 1. En algunas realizaciones, el kit incluye cualquiera de las matrices de ácido nucleico descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, el kit incluye sondas y anticuerpos que se pueden utilizar para identificar o detectar cualquiera de los biomarcadores de la Tabla 1 o su expresión o niveles de expresión. Los kits, opcionalmente, pueden contener instrucciones para detectar y/o medir la concentración de una o más proteínas o los niveles de ARNm en una muestra biológica.

Los kits, opcionalmente, pueden incluir, p. ej., un testigo (p. ej., una concentración estándar para la proteína que se evalúa) o un conjunto de amplicón etiquetado testigo que contiene cantidades conocidas de uno o más amplicones reconocidos por sondas de ácido nucleico de la matriz. En algunos casos, el testigo puede ser un inserto (p. ej., un inserto en papel o en medio electrónico tal como CD, DVD o disquete) que contiene un nivel de expresión o intervalos de nivel de expresión de una o más proteínas o ARN que pronostican una respuesta a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib).

En algunas realizaciones, los kits pueden incluir uno o más reactivos para procesar una muestra biológica (p. ej., reactivos de calibración, tampones, diluyentes, reactivos de color, reactivos para detener una reacción). Por ejemplo, un kit puede incluir reactivos para aislar una proteína a partir de una muestra biológica y/o reactivos para detectar la presencia y/o cantidad de una proteína en una muestra biológica (p. ej., un anticuerpo que se une a la proteína que es el objeto del ensayo de detección y/o un anticuerpo que se une al anticuerpo que se une a la proteína).

En determinadas realizaciones, el kit incluye al menos una microplaca (p. ej., una placa de 96 pocillos, es decir, 12 hileras de 8 pocillos). La microplaca se puede proporcionar con su cubierta de placa correspondiente. La microplaca puede ser de poliestireno o de cualquier otro material adecuado. La microplaca puede tener el anticuerpo que se usa para identificar la presencia de un biomarcador específico recubierto dentro de cada pocillo. El anticuerpo se puede conjugar con una etiqueta detectable. El kit también puede incluir al menos una tira adhesiva.

En algunas realizaciones, los kits pueden incluir un paquete de programa informático para analizar los resultados de, p. ej., el perfil de expresión o un análisis de micromatriz.

Los kits también pueden incluir uno o más anticuerpos para detectar la expresión proteica de cualquiera de los genes descritos en la presente memoria. Por ejemplo, un kit puede incluir (o en algunos casos, consistir en) uno o una pluralidad de anticuerpos capaces de unirse específicamente a una o más proteínas codificadas por cualquiera de los genes representados en la Tabla 1 y, opcionalmente, instrucciones para detectar y/o medir la concentración de una o más proteínas y/o un anticuerpo de detección que comprende un anticuerpo etiquetado de manera detectable que es capaz de unirse a al menos un anticuerpo de la pluralidad. En algunas realizaciones, los kits incluyen anticuerpos que reconocen uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos 10 o 11 de las proteínas codificadas por los genes indicados en la Tabla 1.

En determinadas realizaciones, el kit puede incluir, además, opcionalmente, una o más dosis unitarias de un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib).

Los kits descritos en la presente memoria también pueden incluir, opcionalmente, instrucciones para administrar un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib, donde la concentración de una o más proteínas o el nivel de expresión de uno o más ARN pronostica que un sujeto que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar cáncer de endometrio responderá a un tratamiento que comprende un compuesto de lenvatinib (p. ej., mesilato de lenvatinib).

En una realización específica, el kit comprende uno o más de los siguientes:

(i) una microplaca (p. ej., una placa de 96 pocillos). La microplaca puede estar recubierta con un anticuerpo anti-Ang2 que se conjuga con una etiqueta detectable. El anticuerpo anti-Ang2 puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser, p. ej., de ratón, conejo, rata o cobayo. La etiqueta detectable puede ser, p. ej., peroxidasa de rábano picante, biotina, un resto fluorescente, un resto radioactivo, una etiqueta de histidina o una etiqueta peptídica. La microplaca se puede proporcionar con su cubierta y, opcionalmente, una o más tiras adhesivas.

(ii) un vial que contiene anti-Ang2 conjugado con una etiqueta detectable. La etiqueta detectable puede ser, p. ej., peroxidasa de rábano picante, biotina, un resto fluorescente, una etiqueta de histidina, una etiqueta peptídica. El vial también puede incluir un conservante.

5 (iii) un vial que contiene un estándar de Ang2 de concentración conocida. La Ang2 puede ser Ang2 humana recombinante.

(iv) un vial que contiene un diluyente de ensayo.

(v) un vial que contiene un diluyente calibrador.

(vi) un vial que contiene un tampón de lavado. El tampón se puede proporcionar como un concentrado.

(vii) uno o más viales que contienen reactivos de color

10 (viii) un vial que contiene una solución de terminación para detener la reacción colorimétrica.

A continuación, figuran ejemplos de la puesta en práctica de la invención. No se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención en ningún modo.

### Ejemplos

15 Ejemplo 1: Identificar biomarcadores que son factores pronóstico para seleccionar pacientes con cáncer de endometrio para tratamiento con E7080 (mesilato de lenvatinib)

Objetivo: La angiogénesis se regula mediante la señalización a través de múltiples receptores de factores de crecimiento, tales como el receptor VEGF y el receptor FGF. La señalización del receptor VEGF también está asociada a la función de las células inmunitarias. E7080 es un inhibidor de la angiogénesis oral dirigido a múltiples tirosina cinasas receptoras; VEGFR1-3, FGFR1-4, RET, KIT y PDGFRβ. Se llevó a cabo un estudio de fase II en 20 pacientes con cáncer de endometrio (EC) avanzado o recurrente tras 1 o 2 tratamientos previos basados en platino (Tx). La importancia de la angiogénesis en el EC resalta la necesidad de entender los mecanismos clínicos de escape de los tratamientos antiangiogénicos. Este análisis clínico de biomarcadores se llevó a cabo para identificar 25 marcadores que son factores pronóstico del beneficio clínico en pacientes con EC tras el tratamiento con E7080 La citocina y los factores angiogénicos circulantes (CAF, por sus siglas en inglés) se pueden medir en muestras de sangre utilizando plataformas de análisis de ELISA y multiplexación. Los CAF examinados en este estudio se indican a continuación en la Tabla 2. Los números entre paréntesis indican la región de perla para cada analito.

Tabla 2: Lista de CAF examinados

Ang-1	sTie-2	G-CSF(12)	IL-1 β(24)	MIP-1β(66)
Ang-2	EGF(2)	GM-CSF(14)	IL-1ra(26)	PDGFAB(68)
FGF-23	ANG2(90)	HGF(86)	IL-2(28)	PDGFBB(73)
PDGF-AA	EGF(80)	IFN-γ(20)	IL-4(32)	PGF(91)
RANTES	Eotaxina(4)	IL-10(44)	IL-6(36)	sIL-2Rα(76)
sCD40L	FGF-2(6)	IL-12(p40)(46)	IL-7(38)	TGFα(78)
SDF-1α	FGF2(79)	IL-12(p70)(48)	IL-8(40)	TNFα(80)
sVEGFR1	FGF4(75)	IL-13(50)	IP-10(56)	VEGF(86)
sVEGFR2	FLT3LG(89)	IL-17(54)	MCP-1(58)	VEGFA(100)
sVEGFR3	fractalquina(10)	IL-1α(22)	MIP-1α(64)	VEGFD(78)

30 El objetivo de este análisis fue el de medir la tirosina, quimiocina y los factores angiogénicos en muestras de sangre, tales como plasma y suero, obtenidas de pacientes en ensayos clínicos pre y postratamiento con E7080 e identificar biomarcadores en sangre que se pueden utilizar para pronosticar si los pacientes responderán al tratamiento con E7080. Para estos análisis, se emplearon los siguientes criterios de respuesta, a saber:

- (a) Respuesta tumoral: índice de respuesta objetivo (ORR) y % de reducción del volumen tumoral máxima (MTS); y
- (b) Beneficios de supervivencia: supervivencia sin progresión (PFS)/ supervivencia global (OS).

Los criterios de respuesta se definen a continuación.

La “respuesta completa” significa la desaparición completa de todas las lesiones diana.

- 5 “Respuesta parcial” significa al menos 30 % de disminución en la suma del diámetro más largo (LD, por sus siglas en inglés) de las lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado inicial.

La “enfermedad progresiva” (PD) significa al menos 20 % de aumento en la suma del LD de las lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado más pequeño registrado desde el inicio del tratamiento, o el aspecto de una o más lesiones nuevas.

- 10 La “enfermedad estable” significa ni suficiente reducción de las lesiones diana para calificar como PR ni suficiente aumento para calificar como enfermedad progresiva (PD), tomando como referencia el LD sumado más pequeño desde el inicio del tratamiento.

El “índice de respuesta objetivo” (ORR) compara sujetos con “respuesta completa” (CR) o “respuesta parcial” (PR) con sujetos con enfermedad estable (SD) o enfermedad progresiva (PD).

- 15 El “% de reducción del volumen tumoral máxima” (MTS) significa el cambio porcentual en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia los diámetros sumados en el inicio y la correlación entre la mutación génica y la TS se analizan mediante el coeficiente de correlación de momento-producto de Pearson y la prueba de coeficiente de correlación por rangos de Spearman.

- 20 La “supervivencia sin progresión” (PFS) se refiere al período desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la última fecha antes de ingresar al estado PD y la correlación entre la mutación génica y la PFS se analiza mediante la prueba Logrank y el modelo de peligros proporcionales de Cox.

La “supervivencia global” (OS) se refiere al tiempo desde aleatorización hasta la muerte por cualquier causa. La “aleatorización” significa aleatorización de un paciente a un grupo de prueba o un grupo testigo cuando se determina el plan de tratamiento para un paciente.

- 25 Materiales y métodos: Los pacientes que padecían cáncer de endometrio metastásico/inoperable después de 1 o 2 tratamientos previos basados en platino recibieron lenvatinib hasta la progresión de la enfermedad o el desarrollo de toxicidades difíciles de manejar. Los pacientes recibieron E7080 a una dosis inicial de 24 mg por vía oral una vez al día en ciclos de 28 días. Se trató y evaluó a 133 pacientes para determinar la eficacia y el análisis correlativo molecular. Este estudio fue parte del estudio de fase 2 multicéntrico con lenvatinib (identificador en ClinicalTrial.gov: NCT01111461). Se recogieron muestras de plasma en el inicio y postratamiento para los análisis moleculares. Las muestras de plasma se recogieron en el día 1 del ciclo 1 (pretratamiento) y el día 1 del ciclo 2 (es decir, en el día 39 postratamiento). Se extrajeron seis mL de sangre intravenosa en tubos tipo campana de extracción por vacío de EDTA. Los tubos se invirtieron suavemente 6-8 veces y luego se centrifugaron a 3000 RPM durante 10 para separar el plasma de la capa de glóbulos rojos. El plasma se recogió del tubo y se dispuso en un criovial de 3,5 mL utilizando una pipeta de transferencia y luego se almacenó inmediatamente a -20 °C. Las muestras de plasma se enviaron sobre hielo seco y luego se transfirieron en última instancia a almacenamiento a -80 °C. Se usaron muestras de plasma de 122 pacientes para el análisis de biomarcadores en sangre. Se usó el suero del día 1 del ciclo 1 (inicio) y del día 1 del ciclo 2 en este análisis. Se analizó la asociación con la supervivencia sin progresión (PFS) y la supervivencia global (OS). Las muestras de plasma se sometieron a ensayo en formato de lote, donde todos los puntos de tiempo del mismo sujeto se analizaron el mismo día. El día del ensayo, las muestras se retiraron de -80 °C y se dejaron descongelar y alcanzar temperatura ambiente. Las muestras de plasma se evaluaron en un panel de ELISA y kit de multiplexación según las instrucciones del fabricante. La Tabla 3 describe los kits de ensayo utilizados en el análisis. Las placas de ELISA se midieron utilizando un lector de microplaca cinético Molecular Devices Uvmax con el programa informático SoftMax Pro 5.2. Los ensayos de multiplexación se llevaron a cabo utilizando el sistema Bio-Rad Bio-Plex con el programa informático Bio-Plex Manager 4.1. Las concentraciones proteicas finales (pg/mL) se calcularon a partir de la curva estándar de cada ensayo. Dependiendo del ensayo, las muestras de plasma pueden haber sido diluidas en tampón de ensayo antes de la prueba. En estos casos, las concentraciones proteicas se multiplicaron por el factor de dilución.

Tabla 3. Kits de ensayo

Nombre	Fabricante	N.º de catálogo	de	Analitos medidos
Angiopoyetina-1	R&D Systems	DANG10		Ang-1

Nombre	Fabricante	N.º de catálogo	Analitos medidos
ELISA	Inc.		
Angiopoyetina-2 ELISA	R&D Systems Inc.	DANG20	Ang-2
FGF-23 ELISA	Millipore Inc.	EZHFGF23-32k	FGF-23
SDF-1aELISA	R&D Systems Inc.	DSA00	SDF-1 alfa
Tie-2 ELISA	R&D Systems Inc.	DTE200	Tie-2
Múltiple de itosina humana	Millipore Inc.	MPXHCYTO-60k-03	sCD40L, PDGFAA, RANTES
Múltiple de receptor VEGF	Millipore Inc.	HSCR-32k	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3
Múltiple de factor de crecimiento humano	Origene Inc.	AM100096	PDGF-AB (68), PDGF-BB (73), FGF4 (75), VEGF-D (78), FGF2 (79), EGF (80), HGF (86), FLT3 LG (89), ANG2 (90), PGF (91), VEGF-A (100)
Múltiple de itosina humana	Millipore Inc.	MPXHCYTO-60k-28	EGF, Eotaxina, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IL-1a, IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, TGFa, TNFa, VEGF, Fractalquina, sIL-2Ra

Los números entre paréntesis indican la región de perla para cada analito.

5 Resultados y discusión: A partir de muestras de 133 pacientes, se usaron muestras de 122 pacientes para los análisis. Se observaron cambios significativos en los niveles de 19 CAF entre 50 CAF evaluados postratamiento (día 1 del ciclo 2) en el plasma de pacientes tratados con E7080 en comparación con los niveles pretratamiento (día 1 del ciclo 1) (inicio) (Fig.1).

10 El modelo de peligros proporcionales de Cox se llevó a cabo para identificar los biomarcadores en sangre que pronostican la supervivencia sin progresión mediante los niveles iniciales de los CAF. Los niveles iniciales de ANG2(90), Ang-2, HGF(86), IL-8(40), MCP-1(58), MIP-1a(58), PGF(91), sIL-2Ra(76), TIE-2, TNFa(80), y VEGFA(100) se asociaron significativamente a OS más extensas, lo que indica que estos factores se pueden utilizar como biomarcadores para el pronóstico de la enfermedad o el pronóstico de la respuesta al tratamiento con E7080 (Tabla 4).

Tabla 4. Niveles iniciales de biomarcadores en sangre asociados a OS

param	N	N.OOR	%OOR	p.probabilidad.relación	p.de wald	puntuación p	HRporSD	HRporsD.CI
ANG2(90)	122	0	0	<0,001	<0,001	<0,001	1,612716	1,2541-2,0738
Ang-2	122	0	0	<0,001	<0,001	<0,001	1,7951	1,4163-2,2751
HGF(86)	122	0	0	<0,001	<0,001	<0,001	1,498094	1,2195-1,8403

ES 2 687 968 T3

param	N	N.OOR	%OOR	p.probabilidad.relación	p.de wald	puntuación p	HRporSD	HRporsD.CI
IL-8(40)	122	12	9,8	<0,001	<0,001	<0,001	1,873316	1,485-2,3631
MCP-1 (58)	122	0	0	0,006	0,005	0,005	1,449622	1,1178-1,8799
MIP-1a(64)	122	20	16,4	0,042	0,049	0,048	1,297641	1,0007-1,6826
PGF(91)	122	7	5,7	0,001	0,001	0,001	1,450188	1,1731-1,7927
sIL-2Ra (76)	122	16	13,1	0,001	0,001	0,001	1,611362	1,2029-2,1585
Tie-2	122	0	0	0,008	0,007	0,007	1,397993	1,094-1,7865
TNFa(80)	122	5	4,1	<0,001	<0,001	<0,001	1,7863	1,3194-2,4183
VEGFA (100)	122	0	0	0,006	0,004	0,004	1,377439	1,1069-1,714

OS: modelo de peligros proporcionales de Cox univariante, HRporSD: relación de peligros para 1 aumento S.D.  
 OOR = fuera de intervalo

5 El análisis del subgrupo cuartil en función de los niveles de CAF iniciales exhibió que los grupos con niveles iniciales más bajos de ANG2(90), Ang-2, HGF(86), IL-8(40), MCP-1(58), MIP-1a(58), PGF(91), sIL-2Ra(76), Tie-2 y TNFa(80) tenían una OS mediana más extensa, mientras que los grupos con niveles iniciales más altos de Ang-2, HGF(86)), IL-8(40)), MCP-1(58)), MIP-1a(58), PGF(91)), sIL-2Ra(76)), Tie-2, TNFa(80)) y VEGFA(100) tenían una OS mediana más corta (Tabla 5).

Tabla 5. OS mediana con 4 subgrupos en función de CAF iniciales

	Expresión baja		Expresión alta	
	OSm (día) en cada cuartil			
	1° (bajo)	2°	3°	4° (alto)
ANG2(90)	541	353	256	260
Ang-2	541	289	268	173
IL-8(40)	NA	315	340	127
HGF(86)	567	452	273	253
PGF(91)	NA	350	393	173
VEGFA(100)	350	541	365	260
Tie-2	541	282	291	192
MCP-1(58)	463	393	340	192

MIP-1a(64)	NA	293	353	264
sIL-2Ra(76)	562	295	387	161
TNFa(80)	654	353	393	218

5 El modelo de peligros proporcionales de Cox se llevó a cabo para identificar los biomarcadores en sangre que pronostican la supervivencia sin progresión mediante los niveles iniciales de los CAF. Los niveles iniciales bajos de ANG2(90), Ang-2, HGF(86), IL-8(40), IP-10(56), MCP-1(58), MIP-1a(64), PGF(91), sIL-2Ra(76), Tie-2, TNFa(80), VEGFA(100) se asociaron significativamente a PFS más extensas (Tabla 6).

Tabla 6. Niveles iniciales de biomarcadores en sangre asociados a PFS PFS: modelo de peligros proporcionales de Cox univariante, HRporSD: relación de peligros para 1 aumento S.D. OOR = fuera de intervalo

Param	N	N.OOR	%OOR	p.probabilidad.relación	p.de wald	puntuación p	HrporSD	HrporSD.CI
ANG2(90)	122	0	0,0	<0,001	<0,001	<0,001	1,644414	1,3148-2,0567
Ang-2	122	0	0,0	<0,001	<0,001	<0,001	1,906941	1,5092-2,4095
HGF(86)	122	0	0,0	0,002	0,001	0,001	1,382498	1,139-1,6781
IL-8(40)	122	12	9,8	<0,001	<0,001	<0,001	1,715626	1,3841-2,1266
IP-10(56)	122	0	0,0	0,010	0,012	0,012	1,401204	1,0772-1,8226
MCP-1(58)	122	0	0,0	0,004	0,003	0,004	1,38988	1,1144-1,7335
MIP-1a (64)	122	20	16,4	0,032	0,036	0,036	1,265194	1,0149-1,5772
PGF(91)	122	7	5,7	0,024	0,019	0,022	1,273256	1,0405-1,5581
sIL-2Ra(76)	122	16	13,1	0,006	0,009	0,008	1,392149	1,0861-1,7844
Tie-2	122	0	0,0	0,007	0,006	0,006	1,35561	1,0925-1,6821
TNFa(80)	122	5	4,1	0,000	0,001	0,001	1,529567	1,1894-1,9671
VEGFA(100)	122	0	0,0	0,038	0,033	0,033	1,255744	1,0183-1,5486

10 El análisis del subgrupo cuartil en función de los niveles de CAF iniciales exhibió que los grupos con niveles iniciales más bajos de ANG2(90), Ang-2, HGF(86), IL-8(40), MCP-1(58), MIP-1a(64), sIL-2Ra(76), Tie-2 y TNFa(80) tenían una PFS mediana más extensa, mientras que los grupos con niveles iniciales más altos de ANG2(90), Ang-2, HGF(86), IL-8(40), IP-10(56), MCP-1(58), PGF(91), sIL-2Ra(76), Tie-2, TNFa(80), VEGFA(100) tenían una PFS mediana más corta (Tabla 7).

Tabla 7. PFS mediana con 4 subgrupos en función de la expresión de CAF inicial

	Expresión baja		Expresión alta	
	PFS (día)			
	0-25 %	25-50 %	50-75 %	75-100 %
ANG2(90)	225	167	145	77
Ang-2	284	167	112	77
IL-8(40)	281	222	145	71
HGF(86)	225	205	145	109
PGF(91)	170	174	218	77
VEGFA(100)	158	205	165	83
Tie-2	273	165	155	112
MCP-1(58)	227	155	167	111
MIP-1a(64)	210	155	117	166
sIL-2Ra(76)	210	161	177	72,5
TNFa(80)	282	117	166	112
IP-10(56)	167	174	220	77

A continuación, se evaluó si los niveles iniciales de CAF estaban asociados a la respuesta tumoral (ORR y MTS). La prueba Exact Wilcox exhibió que los niveles iniciales de mediana de Ang-2 y ANG-2(90) eran significativamente diferentes en pacientes que respondían al tratamiento con E7080 (grupo CR o PR) en comparación con el grupo de los "otros" (pacientes con SD o PD) (Tabla 8 y Fig. 2).

5

**Tabla 8.** Niveles iniciales de biomarcadores en sangre asociados con ORR

N; Número, NN(=ORR+:ORR-); diferencia mediana (dif) (ORR+: ORR-); ORR=fuera del intervalo

param	N	N.OOR	%OOR	NN	NN.OOR	p	mediana.dif
Ang-2	96	0	0,0	27.69	0.0	0,001	-0.1458
ANG2(90)	96	0	0,0	27.69	0.0	0,006	-0.06585

La prueba de correlación por rangos de Spearman exhibió que los niveles iniciales de la mediana de Ang-2, ANG-2 e IL-8 estaban asociados significativamente a la MTS (Tabla 9 y Fig. 2).

**Tabla 9.** Niveles iniciales de biomarcadores en sangre asociados con MTS

MTS: prueba de correlación por rangos de Spearman

Param	N	N.0OR	%0OR	p	R
Ang-2	100	0	0,0	0,000	0,360922
ANG2(90)	100	0	0,0	0,000	0,358635
IL-8(40)	100	12	12,0	0,034	0,212644

El modelo de peligros proporcionales de Cox y el análisis de subgrupo cuartil en función de la edad, peso e histología demostró que no había asociación entre estas variables y los beneficios de supervivencia (Fig. 3).

5 La Tabla 10 resume el análisis correlativo de los CAF iniciales con los desenlaces clínicos para la respuesta tumoral y los beneficios de supervivencia. Los niveles iniciales de 11 CAF (Ang-2, IL-8, HGF, VEGFA, P1GF, Tie-2, MCP-1, MIP1a, sIL2Ra, TNFa, IP-10) estaban asociados significativamente con los beneficios de supervivencia. Sin embargo, solo el nivel inicial de angiopoyetina-2 estaba asociado con la respuesta tumoral (ORR y MTS) y beneficios de supervivencia (OS y PFS). Estos datos indican que el nivel inicial de angiopoyetina-2 pronostica los desenlaces clínicos con el tratamiento con E7080 y otros niveles iniciales de otros CAF se asociaron con el pronóstico del EC.

Tabla 10. Niveles iniciales de CAF asociados con desenlaces clínicos

Param	OS	PFS	ORR	%MTS
ANG2(90)	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
Ang-2	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
IL-8(40)	p<0,01	p<0,01		p<0,05
HGF(86)	p<0,01	p<0,01		
PGF(91)	p<0,01	p<0,05		
VEGFA(100)	p<0,01	p<0,05		
Tie-2	p<0,01	p<0,01		
MCP-1(58)	p<0,01	p<0,01		
MIP-1a(64)	p<0,05	p<0,05		
sIL-2Ra(76)	p<0,01	p<0,01		
TNFa(80)	p<0,01	p<0,01		
IP-10(56)		p<0,05		

OS: supervivencia global – modelo de peligros proporcionales de Cox univariante; PFS: supervivencia sin progresión – modelo de peligros proporcionales de Cox univariante; ORR: índice de respuesta objetivo – prueba Exact Wilcox; %MTS: % de reducción del volumen tumoral máxima – prueba de correlación por rangos de Spearman.

15 Se llevó a cabo un análisis multivariante para examinar si al combinar dos o más factores se mejora el pronóstico de los desenlaces clínicos. Se utilizaron todos los factores (es decir, peso, edad, Ang-1, Ang-2, ANG2(90), FGF-2(6), FGF4(75), HGF(86), IL-8(40), PDGF-AA, PDGFAB(68), PDGFBB(73), PGF(91), Tie-2, VEGF(86), VEGFA(100), VEGFD(78)) como variables de interés independientes, es decir, como biomarcadores candidatos. Los modelos se identificaron mediante el modelo de peligros proporcionales de Cox con un método de selección directo utilizando variables identificadas mediante análisis univariante y se utilizó la comprensión biológica de PFS y OS como variable dependiente, es decir, como uno de los desenlaces clínicos, en este análisis. En primer lugar, se barrieron todos los

factores según valores p calculados mediante el modelo de peligros proporcionales de Cox con un único factor. En segundo lugar, se sometieron a prueba todas las combinaciones de los factores barridos mediante el modelo de peligros proporcionales de Cox para hallar factores significativos en todas las combinaciones de los factores. El modelo de PFS identificó a Ang-2 como un factor único. El modelo de OS identificó a FGF-2, PGF y HGF como factores adicionales, aunque Ang-2 se seleccionó como un factor mucho más significativo (Fig. 4).

Se usó un valor de corte de Ang-2 para evaluar si pacientes con niveles iniciales de Ang-2 tienen mejores desenlaces clínicos, tales como ORR, PFS y OS. En el caso del uso de ORR, se puede aplicar un análisis de curva de rendimiento diagnóstico (ROC). En los índices dados en ROC, el valor de pronóstico positivo (PPV, por sus siglas en inglés) proporciona el rendimiento en el subgrupo que tiene mejores desenlaces clínicos. Se puede seleccionar un posible valor de corte a partir de un intervalo de Ang-2 definido por fijar el PPV diana, p. ej., 30 % o más. Además, en el caso de usar PFS, se puede aplicar como medida la separación de las curvas de Kaplan-Meier de dos grupos divididos por el corte, por ejemplo, el valor p de la prueba logrank. Se puede seleccionar un posible valor de corte a partir de un intervalo de Ang-2 definido por fijar el valor p diana, p. ej., P=0,001. Además, se puede definir un intervalo de Ang-2 al combinar los dos métodos para ORR y PFS. El primer método para ORR identificó el límite superior de Ang-2 como 6024,5 pg/ml y el segundo método para PFS identificó el límite inferior de Ang-2 como 1866,5 pg/ml. En este intervalo dado, el análisis ROC y un índice Youden y MCC posterior pueden proporcionar el valor de corte de Ang-2 óptimo para pronosticar un subgrupo que tiene mejor ORR, como 2082,5 pg/ml (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de curva de rendimiento diagnóstico y posterior prueba Log-Rank para OS

param	N	N.OOR	%OOR	AUC	ROC. correlación	ROC.youden.corte
Ang-2	122	0	0,0	0,724	-0,279	2082,5
	ROC.youden.OS.N	ROC.youden.OS. N alto Gr	ROC.youden.OS.% alto Gr	ROC.youden.OS.p.logrank	ROC.youden.OS.HR	ROC.youden.OS.HR.CI
	122	98	803	0,001	3,223	1,5372-6,7562

Los 24 pacientes con niveles en plasma de Ang-2 iniciales bajos (es decir, <2082 pg/ml) se compararon con los 98 pacientes con Ang-2 inicial alto (es decir, >2082 pg/ml). La prueba log-rank utilizando los valores de corte definidos demostró una PFS media (9,5 con respecto a 3,7 meses) y OS media (23 con respecto a 8,9 meses) mejoradas en el subgrupo con niveles de Ang-2 iniciales bajos en comparación con el subgrupo con niveles de Ang-2 iniciales altos (Fig. 5). También se demostró un ORR mejorado (61 % con respecto a 18 %) en el subgrupo con Ang-2 inicial bajo en comparación con el subgrupo con Ang-2 inicial alto (Fig. 6). Estos análisis indican que el nivel inicial de Ang-2 identifica a pacientes con EC que tienen beneficios claros con los tratamientos con E7080. En este contexto, cabe señalar que el ORR, la PFSm y la OSm sin estratificación basada en los niveles de Ang-2 son de 21,1 %, 5,4 meses y 10,6 meses, respectivamente (Tabla 12).

Tabla 12. Desenlaces clínicos de subgrupos con Ang-2 bajo y alto en pacientes con EC

Categoría de desenlace clínico	Análisis de conjunto completo (N=133)	Ang-2 bajo <2082,51 (N=24)	Ang-2 alto ≥ 2082,51 (N=98)
Respuesta objetiva (CR+PR)	21,8 %	60,9 %	17,8 %
Supervivencia sin progresión (meses)			
Mediana	5,4	9,5	3,7
Supervivencia global (meses)			

Categoría de desenlace clínico	Análisis de conjunto completo (N=133)	Ang-2 bajo <2082,51 (N=24)	Ang-2 alto ≥ 2082,51 (N=98)
Mediana	10,6	23	8,9

Conclusión: Los niveles iniciales de 11 CAF estaban asociados con OS y PFS. Solo los niveles iniciales de Ang-2 estaban asociados con los beneficios de supervivencia (OS y PFS) y la respuesta tumoral (ORR). Por lo tanto, los niveles iniciales bajos de Ang-2 tienen una función independiente en el pronóstico de la sensibilidad al tratamiento con E7080 entre los pacientes con cáncer de endometrio.

Ejemplo 2: Confirmar Ang2 como biomarcador que es factor pronóstico específico para seleccionar pacientes con cáncer de tiroides y endometrio para tratamiento con E7080 (mesilato de lenvatinib)

Objetivo: La función como factor pronóstico de Ang2 se ha demostrado para cánceres de tiroides y endometrio. No se ha evaluado la función como factor pronóstico para otras indicaciones de cáncer. No se ha confirmado que Ang2 sea un biomarcador contundente para cánceres o un biomarcador específico para determinados cánceres. El objetivo de este análisis fue el de confirmar que Ang2 es un biomarcador específico para el cáncer de tiroides y endometrio para seleccionar pacientes para el tratamiento con E7080. Para este análisis, se emplearon los siguientes criterios de respuesta, a saber:

(a) Respuesta tumoral: índice de respuesta objetivo (ORR);

(b) Beneficios de supervivencia: supervivencia global (OS).

Los criterios de respuesta se definen a continuación.

La "respuesta completa" significa la desaparición completa de todas las lesiones diana.

"Respuesta parcial" significa al menos 30 % de disminución en la suma del diámetro más largo (LD, por sus siglas en inglés) de las lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado inicial.

La "enfermedad progresiva" (PD) significa al menos 20 % de aumento en la suma del LD de las lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado más pequeño registrado desde el inicio del tratamiento, o el aspecto de una o más lesiones nuevas.

La "enfermedad estable" significa ni suficiente reducción de las lesiones diana para calificar como PR ni suficiente aumento para calificar como enfermedad progresiva (PD), tomando como referencia el LD sumado más pequeño desde el inicio del tratamiento.

El "índice de respuesta objetivo" (ORR) compara sujetos con "respuesta completa" (CR) o "respuesta parcial" (PR) con sujetos con enfermedad estable (SD) o enfermedad progresiva (PD).

La "supervivencia global" (OS) se refiere al tiempo desde aleatorización hasta la muerte por cualquier causa. La "aleatorización" significa aleatorización de un paciente a un grupo de prueba o un grupo testigo cuando se determina el plan de tratamiento para un paciente.

Materiales y métodos: Los pacientes recibieron lenvatinib hasta la progresión de la enfermedad o el desarrollo de toxicidades difíciles de manejar. Este estudio fue parte de los siguientes estudios de fase 2 con lenvatinib:

Evaluación de la seguridad y eficacia de E7080 oral en cánceres de tiroides diferenciados, inoperables, medulares y resistentes a yodo-131, estratificados por histología (identificador en ClinicalTrials.gov: NCT00784303)

Estudio de E7080 en pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado (HCC) (identificador en ClinicalTrials.gov: NCT00946153)

Un estudio en sujetos con glioma maligno recurrente (identificador en ClinicalTrials.gov: NCT01137604)

Estudio de E7080 en sujetos con cáncer de endometrio avanzado y progresión de la enfermedad (identificador en ClinicalTrials.gov: NCT01111461)

Un estudio abierto, de 2 cohortes, multicéntrico de E7080 en sujetos tratados anteriormente con melanoma inoperable en estadio III o estadio IV (identificador en ClinicalTrials.gov: NCT01136967)

Se recogieron muestras de plasma o suero en el inicio y postratamiento para el análisis molecular y las muestras del inicio se utilizaron en este análisis. Las muestras se evaluaron en un kit de ELISA y multiplexación según las instrucciones del fabricante. La Tabla 13 describe los kits de ensayo utilizados en el análisis. Las placas de ELISA se midieron utilizando un lector de microplaca cinético Molecular Devices UVmax con el programa informático SoftMax

5 Pro 5.2. Los ensayos de multiplexación se llevaron a cabo utilizando el sistema Bio-Rad Bio-Plex con el programa informático Bio-Plex Manager 4.1. Las concentraciones finales de Ang2 (pg/mL) se calcularon a partir de la curva estándar de cada ensayo. Dependiendo del ensayo, las muestras pueden haber sido diluidas en tampón de ensayo antes de la prueba. En estos casos, las concentraciones se multiplicaron por el factor de dilución. Se analizaron la asociación entre la concentración de Ang2 en el inicio con el índice de respuesta objetivo (ORR) y la supervivencia global (OS).

Tabla 13. Kits de ensayo

Nombre	Fabricante	N.º de catálogo	Analitos medidos
Angiopoyetina-2 ELISA	R&D Systems Inc.	DANG20	Ang-2
Múltiple de factor de crecimiento humano	Origene Inc.	AM100096	ANG2 (90) o ANG2(76)

Los números entre paréntesis indican la región de perla para cada analito.

10 Resultados y discusión: A partir de cinco estudios de fase 2 analizados (7 cohortes), se usaron muestras de 483 pacientes para los análisis. Se observaron asociaciones significativas de Ang2 inicial con ORR, así como con OS para cáncer de tiroides (tanto cáncer de tiroides diferenciado (DTC, por sus siglas en inglés) y cáncer de tiroides medular (MTC, por sus siglas en inglés)) y cáncer de endometrio (Tabla 14). El nivel de Ang2 en el carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés) y el glioblastoma (GBM, por sus siglas en inglés) no exhibió asociaciones significativas con ORR ni con OS. En melanoma (BRAF natural (wt) y mutado (mut)), el nivel inicial de Ang2 no se asocia con ORR, pero sí con OS.

15

Tabla 14. Asociación de niveles iniciales de Ang2 con ORR y OS

	Ensayo	N (ORR:otros)	ORR		OS	
			valor P	diferencia (ORR-otros)	valor P	Relación de peligros por desviación típica (IC de 95 %)
DTC de tiroides	Ang-2	53(27:26)	0,239	-0,048	0,001	3,20(1,56-6,56)
	ANG2(90)	51(25:26)	0,046	-0,127	0,044	1,94 (1,02-3,71)
MTC de tiroides	Ang-2	55(18:37)	0,019	-0,159	<0,001	3,16(1,84-5,41)
	ANG2(90)	53(18:35)	0,207	-0,089	0,005	2,05(1,24-3,40)
HCC	Angiopoyetina-2	46(17:29)	0,652	-0,014	0,437	1,15(0,81-1,64)
	ANGPT2	46(17:29)	0,543	0,033	0,821	0,96(0,67-138)
GBM	Ang-2	39(8:31)	0,798	0,029	0,635	0,89(0,57-1,42)
	ANG2(76)	39(8:31)	0,209	0,090	0,857	0,97(0,67-1,40)
De endometrio	Ang-2	122(26:96)	<0,001	-0,166	<0,001	1,80(1,42-2,28)
	ANG2(90)	122(26:96)	0,004	-0,083	<0,001	1,62(1,26-2,08)
Melanoma (BRAF wt)	Ang-2	88(8:80)	0,112	-0,094	0,002	1,51(1,17-1,97)
	ANG2(76)	87(8:79)	0,098	-0,113	0,001	1,69 (1,23-2,31)

	Ensayo	N (ORR:otros)	ORR		OS	
			valor P	diferencia (ORR-otros)	valor P	Relación de peligros por desviación típica (IC de 95 %)
Melanoma (BRAF mut)	Ang-2	78(8:70)	0,548	-0,030	<0,001	2,18(1,61-2,94)
	ANG2(90)	80(8:72)	0,161	-0,067	<0,001	2,13(1,57-2,87)

ORR: Prueba de los signos de Wilcoxon

OS: modelo de peligros proporcionales de Cox univariante

5 Conclusión: Los niveles iniciales de Ang2 estaban asociados con ORR y OS en cánceres de tiroides y de endometrio. Otros tipos de cáncer evaluados (HCC, GBM y Melanoma) no exhibieron una asociación significativa con ninguno de ORR y OS. Esta observación sugiere que Ang2 es un biomarcador específico de determinados cánceres, tales como cánceres de tiroides y de endometrio.

Realizaciones específicas

Las realizaciones específicas de la descripción son las siguientes:

10 [1] Un método para tratar un cáncer de endometrio, el método comprende administrar a un sujeto humano que padece un cáncer de endometrio una cantidad terapéuticamente eficaz de lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde el sujeto humano se ha identificado como que tiene un nivel de expresión de la proteína Ang2 que es bajo en comparación con un testigo.

[2] El método de [1], en donde se ha identificado que el sujeto humano tiene una concentración baja de la proteína Ang2 en una muestra biológica obtenida del sujeto humano.

15 [3] Un método para tratar un cáncer de endometrio, el método comprende:

proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto humano que padece cáncer de endometrio;

medir, en la muestra biológica, un nivel de expresión de la proteína Ang2 que es bajo en comparación con un testigo; y

20 administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz de lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

[4] Un método para pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este, el método comprende:

25 someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto humano y determinar que la concentración de la proteína Ang2 en la muestra biológica es baja, en comparación con un testigo; e

identificar que el sujeto humano que tiene una concentración baja de la proteína Ang2 en la muestra biológica es probable que responda al tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

30 [5] Un método para pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este, el método comprende:

someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto humano y determinar que la concentración de la proteína Ang2 en la muestra biológica es alta, en comparación con un testigo; e

identificar que el sujeto humano que tiene una concentración alta de la proteína Ang2 en la muestra biológica es improbable que responda al tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

35 [6] Un método para auxiliar en el pronóstico de la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este, el método comprende:

someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto humano y determinar que la concentración de la proteína Ang2 en la muestra biológica es baja, en comparación con un testigo; e

identificar que el sujeto humano que tiene una concentración baja de la proteína Ang2 en la muestra biológica es probable que responda al tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- 5 [7] Un método para auxiliar en el pronóstico de la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este, el método comprende:

someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto humano y determinar que la concentración de la proteína Ang2 en la muestra biológica es alta, en comparación con un testigo; e

- 10 identificar que el sujeto humano que tiene una concentración alta de la proteína Ang2 en la muestra biológica es improbable responda al tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

[8] El método de uno cualquiera de [2] a [7], en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de tumor de endometrio archivada y una muestra de biopsia de endometrio.

- 15 [9] El método de uno cualquiera de [2] a [7], en donde la muestra biológica es una muestra de plasma.

[10] El método de uno cualquiera de [1] a [9], en donde el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio avanzado.

[11] El método de uno cualquiera de [1] a [9], en donde el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio inoperable en estadio III o estadio IV.

- 20 [12] El método de uno cualquiera de [1] a [9], en donde el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio recurrente.

[13] El método de uno cualquiera de [1] a [12], en donde el testigo es un valor de corte preestablecido.

- 25 [14] El método de [13], en donde el valor de corte preestablecido es una concentración de la proteína Ang2 que se determina en función del análisis de la curva de rendimiento diagnóstico que predice la respuesta tumoral con un valor predictivo positivo más alto en comparación con la ausencia de corte, y en donde una concentración de la proteína Ang2 igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de Ang2 y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de Ang2.

[15] El método de [14], en donde la respuesta tumoral es un índice de respuesta objetivo, un índice de beneficio clínico o un % de reducción del volumen tumoral máxima de al menos 30 %.

- 30 [16] El método de [13], en donde el valor de corte preestablecido es una concentración de la proteína Ang2 que se determina en función de la predicción de la supervivencia utilizando modelos de simulación para separar dos grupos divididos por el corte, y en donde una concentración de la proteína Ang2 igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de Ang2 y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de Ang2.

- 35 [17] El método de [16], en donde la supervivencia es supervivencia sin progresión o supervivencia global.

[18] El método de [13], en donde el valor de corte preestablecido es una concentración de la proteína Ang2 dentro del intervalo de 1866,5 a 6024,5 pg/ml, y en donde una concentración de la proteína Ang2 igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de Ang2 y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de Ang2.

- 40 [19] El método de uno cualquiera de [1] a [18], en donde la concentración de la proteína se mide mediante un método inmunológico.

- 45 [20] El método de [19], en donde el método inmunológico se selecciona del grupo que consiste en inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, inmunoensayo quimioluminiscente, inmunoensayo electroquimioluminiscente, inmunoensayo turbidimétrico con látex, inmunoensayo fotométrico con látex, ensayo inmunocromatográfico y transferencia western.

[21] El método de uno cualquiera de [1] a [18], en donde la concentración de la proteína se mide mediante espectrometría de masas.

[22] El método de uno cualquiera de [1] a [21], en donde la sal farmacéuticamente aceptable de lenvatinib es mesilato de lenvatinib.

[23] Lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso para tratar el cáncer de endometrio en un sujeto humano, en donde el sujeto humano se identifica mediante el método de [4] como un sujeto que es probable que responda a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

5 [24] Un agente de detección de la proteína Ang2 para su uso para pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

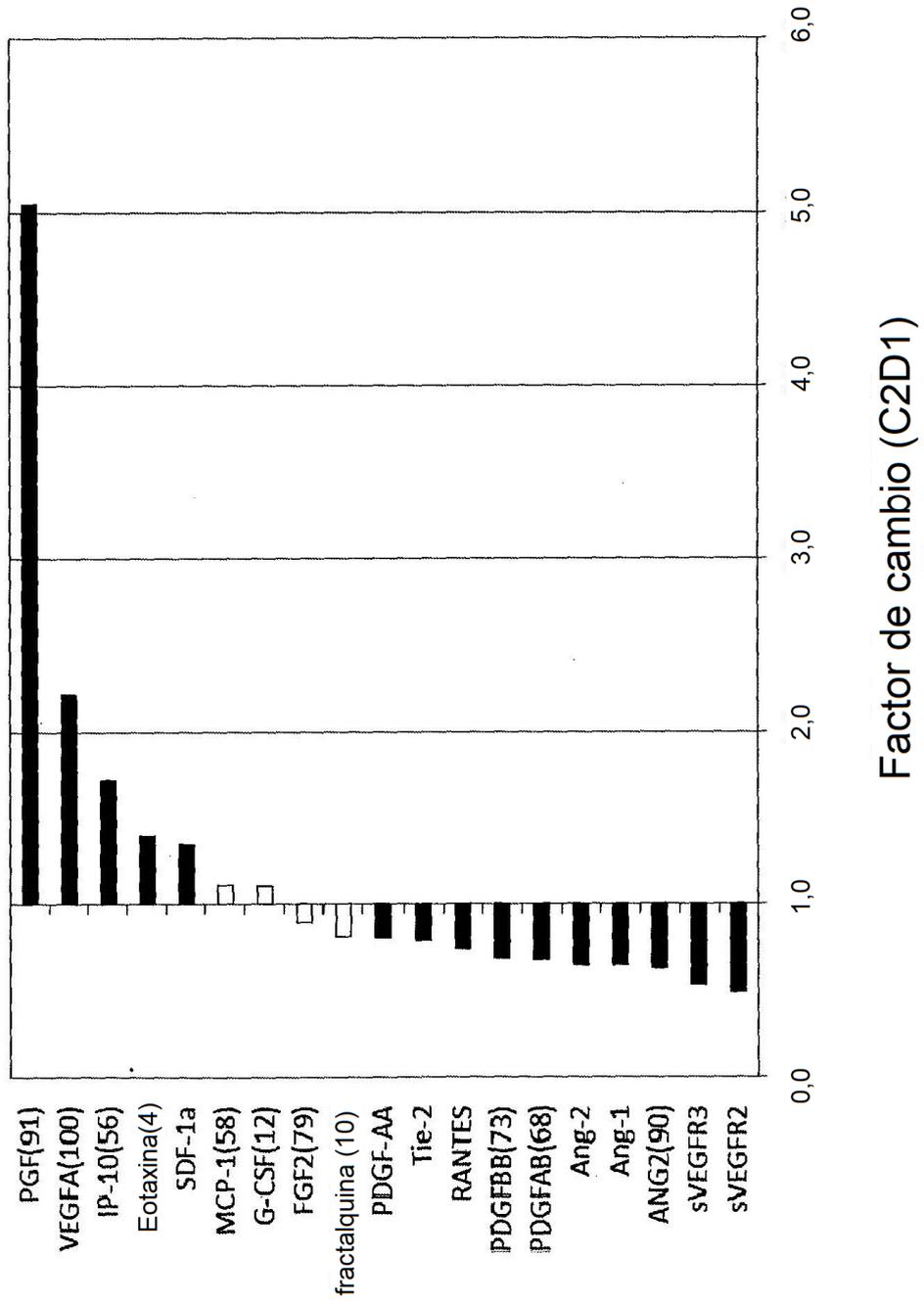
[25] El agente de detección de la proteína Ang2 de [24], en donde el agente de detección de la proteína Ang2 es un anticuerpo anti-Ang2.

10 [26] Una composición farmacéutica para tratar un cáncer de endometrio en un sujeto humano que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde el sujeto humano se identifica mediante el método de [4] como un sujeto que es probable que responda a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

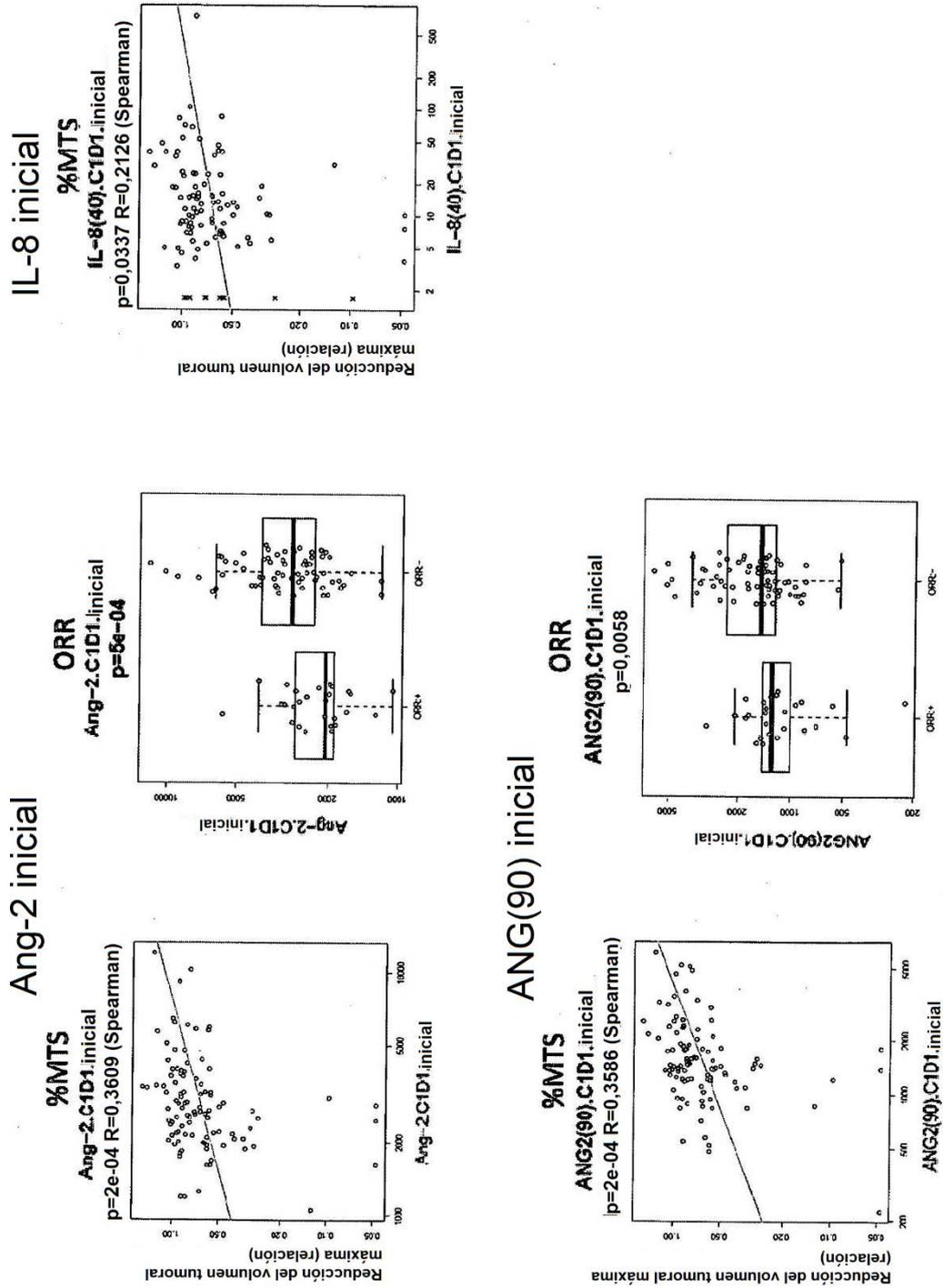
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este, el método comprende:
- 5 someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto humano y determinar que la concentración de la proteína Angiopoyetina 2 (Ang2) en la muestra biológica es baja, en comparación con un testigo; e
- identificar que el sujeto humano que tiene una concentración baja de la proteína Ang2 en la muestra biológica es probable que responda al tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
- 10 2. Un método para pronosticar la respuesta de un sujeto humano que padece, se presume que padece o está en riesgo de desarrollar un cáncer de endometrio, a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este, el método comprende:
- someter a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto humano y determinar que la concentración de la proteína Ang2 en la muestra biológica es alta, en comparación con un testigo; e
- 15 identificar que el sujeto humano que tiene una concentración alta de la proteína Ang2 en la muestra biológica es improbable responda al tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de tumor de endometrio archivada y una muestra de biopsia de endometrio, preferiblemente una muestra de plasma.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cáncer de endometrio es un cáncer de endometrio avanzado, un cáncer de endometrio inoperable en estadio III o estadio IV o un cáncer de endometrio recurrente.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el testigo es un valor de corte preestablecido.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en donde el valor de corte preestablecido es una concentración de la proteína Ang2 que se determina en función del análisis de la curva de rendimiento diagnóstico que predice la respuesta tumoral con un valor predictivo positivo más alto en comparación con la ausencia de corte, y en donde una concentración de la proteína Ang2 igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de Ang2 y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de Ang2.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la respuesta tumoral es un índice de respuesta objetivo, un índice de beneficio clínico o un % de reducción del volumen tumoral máxima de al menos 30 %.
- 30 8. El método de la reivindicación 5, en donde el valor de corte preestablecido es una concentración de la proteína Ang2 que se determina en función de la predicción de la supervivencia utilizando modelos de simulación para separar dos grupos divididos por el corte, y en donde una concentración de la proteína Ang2 igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de Ang2 y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de Ang2.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en donde la supervivencia es supervivencia sin progresión o supervivencia global.
- 40 10. El método de la reivindicación 5, en donde el valor de corte preestablecido es una concentración de la proteína Ang2 dentro del intervalo de 1866,5 a 6024,5 pg/ml, y en donde una concentración de la proteína Ang2 igual o menor que el valor de corte preestablecido es una concentración baja de Ang2 y un valor más alto que el valor de corte preestablecido es una concentración alta de Ang2.
- 45 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la concentración de la proteína se mide mediante un método inmunológico, preferiblemente un método inmunológico seleccionado del grupo que consiste en inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, inmunoensayo quimioluminiscente, inmunoensayo electroquimioluminiscente, inmunoensayo turbidimétrico con látex, inmunoensayo fotométrico con látex, ensayo inmunocromatográfico y transferencia western.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la concentración de la proteína se mide mediante espectrometría de masas.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la sal farmacéuticamente aceptable de lenvatinib es mesilato de lenvatinib.

**Fig.1 Cambio en los niveles de biomarcadores en sangre después del tratamiento con E7080**



**Fig. 2 Correlación entre CAF inicial y la respuesta tumoral**



**Fig. 3 No hay correlación significativa entre peso, edad e histología y la PFS y OS**

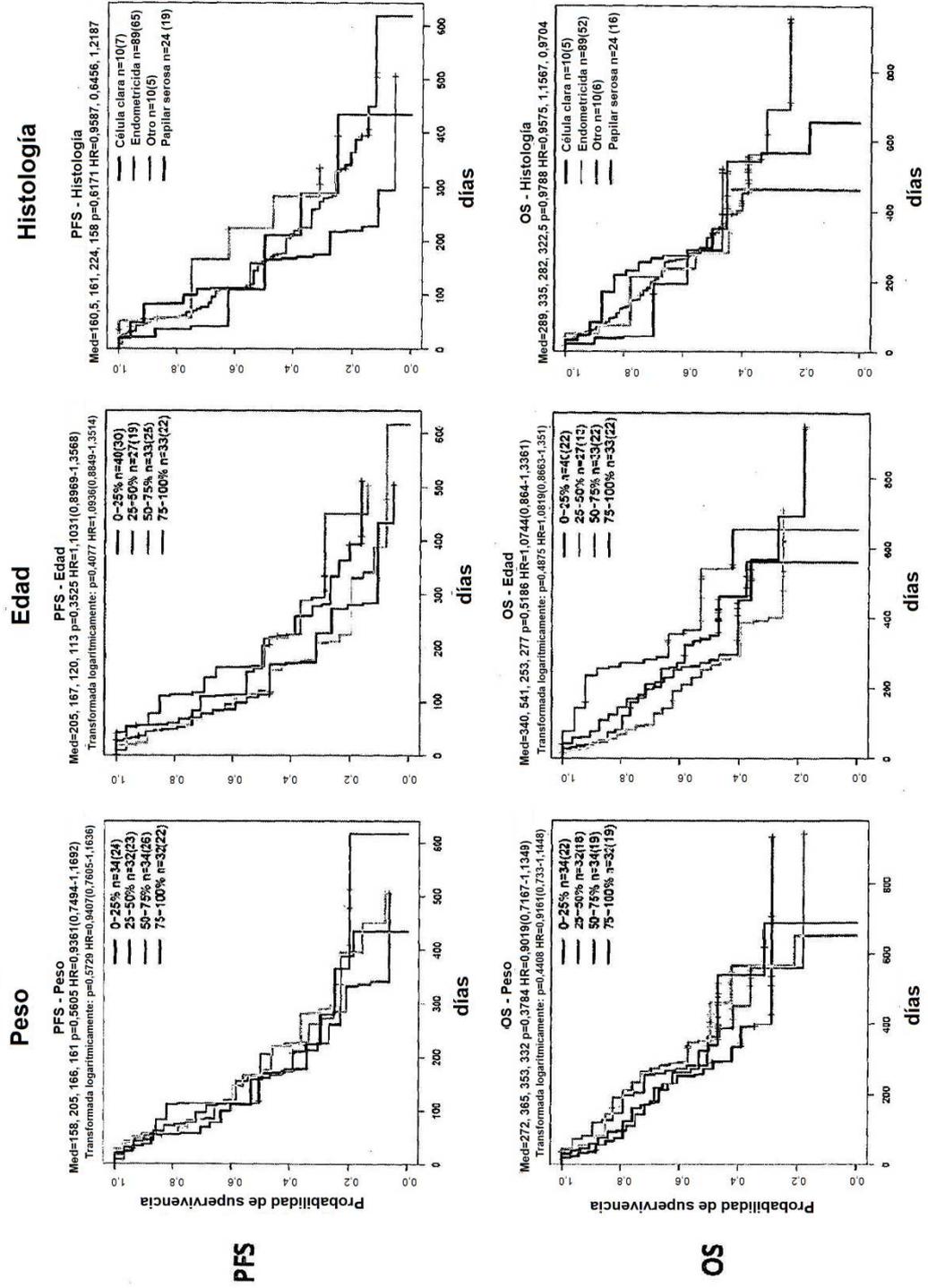


Fig. 4 El análisis multivariante no identifica una posible combinación de factores con Ang-2

**MTS**

```
(Interceptación)      Estimación  Error típico  valor t  Pr(>|t|)
`Ang-2.C1D1.inicial`  -23,269      2,850        -8,163  1,14e-12 ***
`Ang-2.C1D1.inicial`  12,517       3,592         3,485  0,000738 ***
```

**ORR**

```
(Interceptación)      bbbEstimación  Error típico  valor z  Pr(>|z|)
`Ang-2.C1D1.inicial`  -1,4782       0,3643       -4,057  4,96e-05 ***
`Ang-2.C1D1.inicial`  -1,6398       0,6193       -2,648  0,00811 **
```

**PFS**

```
`Ang-2.C1D1.inicial`  coef exp(coef) se(coef)      z Pr(>|z|)
`Ang-2.C1D1.inicial`  0,6422      1,9007      0,1099  5,846 5,04e-09 ***
```

**OS**

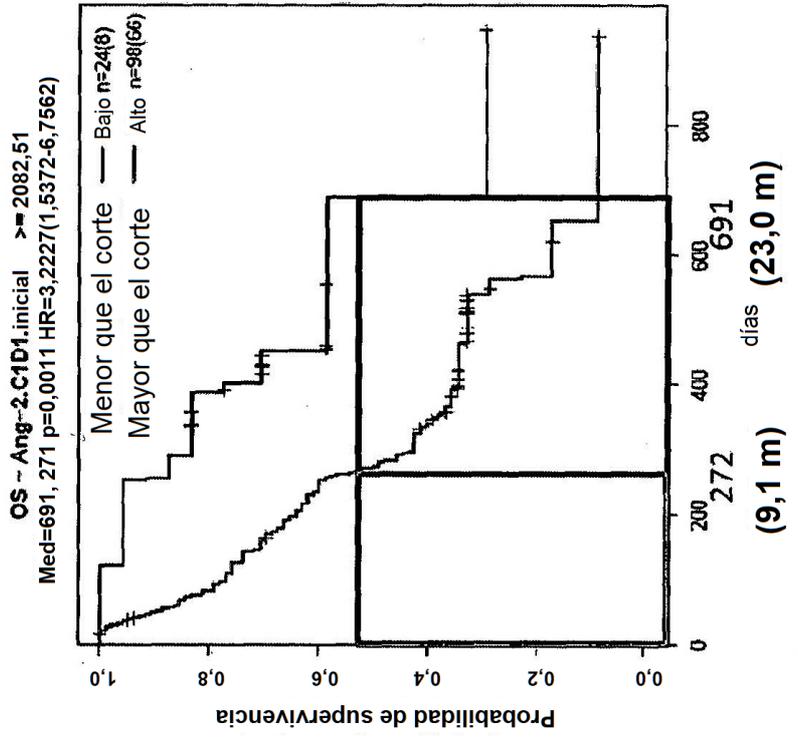
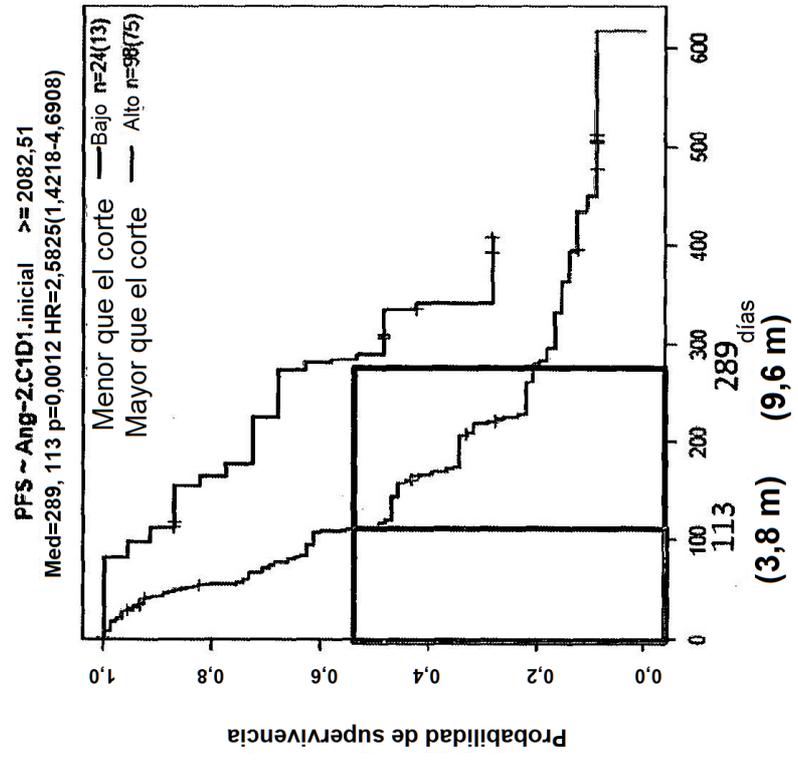
```
`Ang-2.C1D1.inicial`  coef exp(coef) se(coef)      z Pr(>|z|)
`Ang-2.C1D1.inicial`  0,53042     1,69964     0,11519  4,605 4,13e-06 ***
`FGF-2(6).C1D1.inicial`  0,33595     1,39927     0,11400  2,947 0,00321 **
`PGF(91).C1D1.inicial`  0,19499     1,21530     0,08356  2,394 0,01962 *
`HGF(86).C1D1.inicial`  0,18837     1,20728     0,09339  2,017 0,04369 *
```

Variables usadas en los análisis

- PESO
- EDAD
- Ang-1
- Ang-2
- ANG2(90)
- FGF-2(6)
- FGF4(75)
- HGF(86)
- IL-8(40)
- PDGF-AA
- PDGFAB(68)
- PDGFBB(73)
- PGF(91)
- T1e-2
- VEGF(86)
- VEGFA(100)
- VEGFD(78)

**Fig. 5 PFSm y OSm de subgrupos estratificados por nivel de Ang-2 inicial**

**PFS y OS: basados en corte (2082,5 pg/ml)**



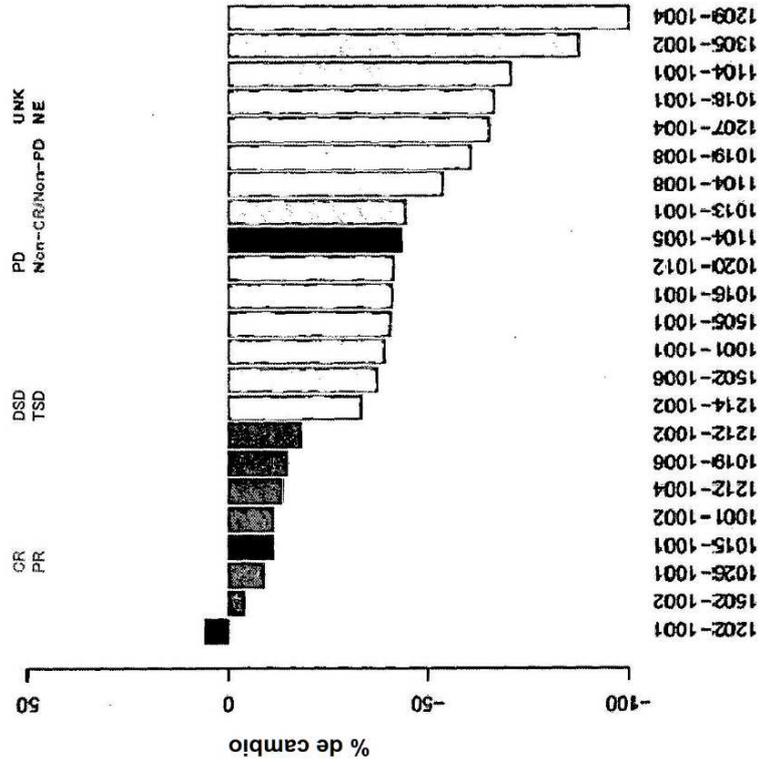
**Fig. 6 Enriquecimiento de población de población de pacientes con mejor ORR en función del nivel inicial de Ang-2**

**Ang-2 < 2082,5 pg/ml (23/96 = 24%)**

**ORR = 60,9 %**

Reducción del volumen tumoral máxima (Ang-2.C1D1.inicial < 2082,51)

**ORR: 14:9 (con MTS 14:9)**



**Ang-2 > 2082,5 pg/ml (73/96 = 76%)**

**ORR = 17,8 %**

Reducción del volumen tumoral máxima (Ang-2.C1D1.inicial >= 2082,51)

**ORR: 13:60 (con MTS 13:59)**

